



Facultad de Ciencias Naturales y Matemática

PREVALENCIA DE *Haemophilus influenzae* EN NIÑOS MENORES DE UN
AÑO DE EDAD HOSPITALIZADOS EN CUATRO HOSPITALES DE LIMA

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

AUTOR (A)

Palomares Reyes, Carlos Cesar

ASESOR (A)

Marcelo Rodríguez, Álvaro Julián

JURADO

Yupanqui Siccha, Gisela Francisca

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

Lima – Perú

2019

Autor:

Carlos Cesar Palomares Reyes

Dedicatoria

Dedico de manera especial a mis padres quienes son el principal motor de mi vida, sentaron en mis bases las responsabilidades y deseo de superación, en ellos tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus grandes corazones me llevan a admirarlos cada día más. También dedico este trabajo a mi única hermana que desde el cielo siempre me cuida y a mi hermosa hija que me da las fuerzas para seguir adelante.

Agradecimientos

En primer lugar doy gracias a Dios por permitir seguir mi camino, agradecerles a mis padres por apoyarme siempre, gracias a mi alma mater UNFV, a los maestros por las enseñanzas, a mis amigos que forman parte de mi historia de vida, que estuvieron presentes en los buenos y malos momentos.

Finalmente a Cienciactiva del CONCYTEC por el financiamiento que a través del proyecto denominado: “PLATAFORMA NANO-BIOTECNOLÓGICA MULTIDISCIPLINAR PARA CONTENER EL IMPACTO DE SÍNDROMES FEBRILES EN ZONAS DE ALTO RIESGO EN EL PERÚ” (contrato N° 164-2016-FONDECYT), logre terminar mi tesis.

ÍNDICE

Resumen.....	6
Abstract.....	7
I. Introducción.....	8
II. Marco teórico.....	10
2.1 Antecedentes.....	16
2.2 Definición de Conceptos.....	18
III. Metodología (Materiales y Método)	
3.1 Problema.....	19
3.2 Objetivo.....	22
3.3 Hipótesis.....	23
3.4 Tipo y Diseño de Investigación.....	23
3.5 Muestra.....	23
3.6 Variables.....	24
3.7 Instrumentos y Materiales.....	25
3.8 Procedimiento.....	26
3.9 Técnica de Análisis y Procesamiento de Datos.....	30
IV. Resultados.....	31
V. Discusiones.....	38
VI. Conclusiones.....	41
VII. Recomendaciones.....	42
VIII. Referencias bibliográficas.....	43
IX. Anexos.....	51

Resumen

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) constituyen una de las cinco primeras causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Una bacteria causante de infecciones respiratorias agudas, principalmente en niños menores de 5 años es *H. influenzae* tipo b. Se estima que provoca por lo menos tres millones de casos de enfermedad grave al año y alrededor de 386000 defunciones, la mayor parte se registra en países en desarrollo. El objetivo fue identificar la prevalencia y serotipos de *H. influenzae* en lactantes menores de 1 año hospitalizados con diagnóstico de infección respiratoria aguda. De los 339 casos, 91(26.8%) fueron positivos *H. influenzae*, de los cuales 3 (3.3%) fueron no tipificables y 88 (96.7%) casos tipificables. Dentro del grupo de *H. influenzae* tipificable, 22 (24.2%) casos son del tipo b, quedando un 75.8% de un subtipo no incluido en la vacuna. En conclusión este estudio pone de manifiesto la existencia de un alto porcentaje de *H. influenzae* que no están cubiertos por la vacuna actual, por eso se recomienda una vigilancia activa de esta patógeno.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, Infección respiratorio aguda.

Abstract

Acute respiratory infections (ARI) are a cause of morbidity and mortality worldwide. A bacterium that causes acute respiratory infections, mainly in children under 5 years old, is *H. influenzae* type b. It is estimated that it caused less than three million cases of illness per year and around 386,000 deaths, most of which occurred in developing countries. The objective was to identify the prevalence and serotypes of *H. influenzae* in infants under 1 year of age hospitalized with a diagnosis of acute respiratory infection. Of the 339 cases, 91 (26.8%) were positive for *H. influenzae*, of which 3 (3.3%) were typable and 88 (96.7%) typifiable cases. Within the group of typifiable *H. influenzae*, 22 (24.2%) cases of type B, leaving 75.8% of a subtype not included in the vaccine. In conclusion, this study reveals the existence of a high percentage of *H. influenzae* that is not covered by the actual vaccine, therefore active surveillance of this pathogen is recommended.

Key words: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus influenzae* type b, Acute respiratory infection.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son la principal causa de morbilidad y mortalidad pediátrica a nivel mundial, donde en América se registran más de 100.00 defunciones anuales de niños menores de cinco años (OMS, 2014; Grassi, et al. 2014). En el Perú se reporta 2664 por cada 10000 menores de 5 años (MINSA-DGE, 2015).

Entre las IRAs se encuentran aquellas infecciones leves como resfrío o catarro, faringitis, amigdalitis, bronquitis, otitis, meningitis; o graves como la Neumonía, que constituye la principal causa de defunción infantil en el mundo, y responsable del 15% total de defunciones de niños menores de 5 años (OMS, 2014). En el Perú, a la semana epidemiológica N° 17 del año 2015, se reportó 81 defunciones por Neumonía, de las cuales el 51% corresponden a niños entre 2 a 11 meses, el 30% a niños entre 1 a 4 años y el 19% a menores de 2 meses. En el grupo de adultos mayores de 60 años, se han notificado 217 defunciones del total de 2835 episodios de neumonía notificados a la nivel nacional, ocasionando una tasa de letalidad de 7.7% (Yon, 2015).

Los principales agentes bacterianos responsables de la neumonía en lactantes son el *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) que pertenecen al grupo de bacterias típicas, y las bacterias atípicas como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia thachomatis* (Diaz, et al. 2005; Ulanova, et al. 2014).

Haemophilus influenzae es un patógeno que afecta las vías respiratorias y es responsable de la neumonía y meningitis en países en vías de desarrollo. Pertenece al grupo de bacterias gram negativas y anaeróbicas facultativas que puede encontrarse en su forma capsular (también llamado tipificable) o no capsular (No tipificable). Dentro de los *H. influenzae* tipificable se han identificado seis serotipos (a, b, c, d, e y f), siendo el más virulento el serotipo b; el cual causa enfermedades invasivas graves tales como meningitis, epiglotitis, sepsis, neumonía, celulitis, artritis, entre otras (Ullanova, et al. 2014). Recientemente se ha reconocido a *H. influenzae* No

Tipificable como un agente etiológico frecuente de infecciones locales por contigüidad, tales como otitis media, sinusitis y conjuntivitis, en niños pequeños. Así mismo *H. influenzae* es el agente etiológico más frecuente aislado en la población infantil y la segunda causa más importante de neumonías bacterianas (Campos, 2001; Takemura, et al. 2001; Watt, et al. 2009; Briere, et al. 2014).

H. influenzae se transmite de un sujeto infectado a uno susceptible a través de las gotas de las secreciones respiratorias. Por lo general, el contagio da lugar a un periodo transitorio de colonización nasofaríngea de algunas semanas de duración, y solo en una minoría de los casos se traduce en infecciones invasivas (Neto, et al. 2003). La nasofaringe es colonizada tempranamente por comensales. Y en forma transitoria por patógenos como *H. influenzae* tipo b.

Esta crítica condición es en parte debida a la falta de actitudes preventivas de la población como, suspensión temprana del amamantamiento, baja cobertura con vacunaciones específicas, consulta médica tardía. Otros factores de riesgo señalados por las OMS son la desnutrición, bajo peso al nacer, hacinamiento, polución ambiental y en algunos países, deficiencias de vitamina A. Además existen algunos casos de errores en el diagnóstico temprano de IRA ípor parte de los profesionales de salud, en especial sobre el criterio de gravedad, que condiciona la muerte del niño.

En consecuencia las enfermedades debidas a la infección por *H. influenzae*, representan a nivel mundial una preocupación en la salud pública. Por este motivo es de suma importancia evaluar la prevalencia de *H. influenzae* y los serotipos circulantes en niños menores de un año hospitalizados con diagnóstico clínicos de IRA. Por lo tanto teniendo en cuenta la importancia de las IRAs causado por *H. influenzae*, es fundamental implementar y utilizar técnicas más sensibles y específicas para obtener un mejor diagnóstico.

II. MARCO TEÓRICO

En el año 1883 Robert Koch describió por primera vez a *Haemophilus*, en un examen directo, coloreado por tinción de Gram, de un exudado conjuntival en pacientes procedentes de Egipto. Robert Pfeiffer fue el primero en aislarlo del esputo y tejido pulmonar en pacientes hospitalizados con neumonía, al que denominó a la bacteria *Pfeiffer influenza bacillus* (Pfeiffer, 1893). Sin embargo La Sociedad Americana de Bacteriología, cambió su nombre por el de *Haemophilus influenzae*; *Haemophilus* que significa “amigo de la sangre” porque requiere los factores X y V que están presentes en la sangre para su crecimiento in vitro y el término influenza por su histórica asociación con la influenza (Winslow *et al*, 1920).

Según la Novena Edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Garrity, et al. 2004), la posición taxonómica de este microorganismo es (ver Tabla N°1).

Tabla N°1: Taxonomía de *H. influenzae*.

Reino	Procariota
División	Bacteria
Sección V	Bacilos gram negativos anaerobios facultativos
Orden	Eubacteriales
Familia	Pasteurellaceae
Genero	<i>Haemophilus</i>
Especie	<i>influenzae</i>

H. influenzae es aislado a partir exclusivamente de los seres humanos, predominantemente en el tracto respiratorio. Ningún animal o fuentes ambientales han sido identificados. *H. influenzae* pertenece a la familia Pasteurellaceae, bacterias gram negativas, inmóviles, anaerobios facultativos, que requieren factores de crecimiento especiales como hemina (factor X) y NAD (factor V) (Slack, 2006). Las cepas de *H. influenzae* se dividen en dos grupos, encapsulado (Tipificable) y no encapsuladas (No-tipificable) que dependen de la presencia o no de la cápsula de polisacárido respectivamente. Cepas encapsuladas son reactivos con antisueros, mientras que las cepas no encapsuladas son no reactivos, y por lo tanto se conocen como no tipificable. Seis serotipos designados de “a” a la “f” se han identificado sobre la base de cápsulas de polisacáridos antigénicamente diferentes. Cepas del serotipo b causan infecciones invasivas en lactantes y niños. Cepas no tipificables comúnmente colonizan el tracto respiratorio superior y causan infecciones de las mucosas en niños y adultos (Agrawal y Murphy, 2011).

La Infección Respiratoria Aguda (IRA) constituye un grupo de enfermedades que afectan el aparato respiratorio alto y bajo, pueden ser causadas por diferentes microorganismos como virus, bacterias entre otros, con evolución menor a 15 días. Puede cursar desde un resfriado común hasta una complicación más severa como la neumonía e incluso puede ocasionar la muerte (OPS-CDC, 2009). Los cuadros leves son generalmente de naturaleza viral, altamente contagiosos y de corta duración. Incluyen fiebre de inicio súbito, tos, y otros síntomas del tracto respiratorio superior como dolor de garganta, rinorrea, y síntomas sistémicos como dolor de cabeza, dolores musculares y fatiga. Generalmente la enfermedad se resuelve en pocos días, la tos y el malestar pueden persistir por más de dos semanas (Rodríguez, et al. 2010).

En los cuadros graves se incluye la infección respiratoria aguda que puede tener origen viral o bacteriano, y que para su manejo requiere tratamiento intrahospitalario (Louie, 2005). El cuadro clínico incluye un inicio inferior a 15 días de tos y dificultad respiratoria, además de estridor, dolor o

enrojecimiento faringeo, otalgia, otorrea, rinorrea, obstrucción nasal (Benguigui, et al. 1997, y Del Castillo, et al. 2012), el cual en caso de no ser manejado de forma adecuada y oportuna, puede conducir a la muerte.

Las bacterias juegan un papel importante cuando existen factores de riesgo del huésped como desnutrición, carencia multivitamínica, colonización temprana de gérmenes en la oro faringe y hacinamiento entre otros (OPS - CDC, 2009). Dependiendo de la severidad del cuadro, puede acompañarse de hipoxia y compromiso sistémico (letargia, convulsiones, falla ventilatoria. La colonización de la nasofaringe procede usualmente a la infección por *H. influenzae* b. La presencia de *H. influenzae* b en la orofaringe puede originar una infección sintomática localizada en las mucosas respiratorias altas (otitis media, sinusitis o rinofaringitis), y provocar posteriormente, una infección del tracto respiratorio bajo como meningitis, epiglotitis, celulitis, pericarditis, osteoartritis y otras manifestaciones clínicas, o en peor de los casos neumonía (Leibovitz, et al. 2004). Existen dos factores que influyen que la colonización orofaríngea derive o no en una enfermedad invasiva, la edad y la presencia de anticuerpos séricos. La edad se relaciona con la capacidad del sistema inmune para responder a la exposición al polisacárido de *H. influenzae* b y dar lugar a una adecuada respuesta de anticuerpos específicos a través de la activación de celular B, T-timo independiente. Una concentración sérica mayor que 0.15 ug/ml asegura una rápida eliminación de las bacterias que pudiera traspasar la mucosa faríngea e invadir el torrente sanguíneo. La colonización por *H. influenzae* b en un niño mayor de 2 años de edad tiene altas probabilidades de actuar como estímulo inmunizante o como un refuerzo de la inmunidad pre-existente. Por el contrario, el lactante que ha perdido la inmunidad materna y cuyo sistema inmune no ha alcanzado la madurez necesaria para reconocer los antígenos polisacarídicos reúne las condiciones propicias para desarrollar las consecuencias más graves de la colonización faríngea por *H. influenzae* b (Kelly, et al. 2005).

La vacuna contra *H. influenzae* tipo b, se introdujo en el año 1985 en Estados Unidos, seguidas de las vacunas conjugadas en el año 1989

(Tabla N°2). (CDC, 2002). Como resultado de la introducción de las vacunas contra *H. influenzae* b en los Estados Unidos con alta cobertura de vacunación, la infección por *H. influenzae* b es ahora rara, por debajo del objetivo de *Healthy People* (Healthy People, 2013).

El Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización recomienda la administración rutinaria de una serie de vacunas a partir de los 2 meses de edad. En Perú existe un calendario vacunal propuesto por el ministerio de Salud que está alineado con el recomendado por el Comité Asesor Sobre Prácticas de Inmunización (MINSA, 2014).

Tabla N°2: Vacuna conjugada de *H. influenzae* tipo b (Hib) con licencia y disponible en los Estados Unidos.

Vacuna Monovalente					
Producto de Vacuna	Fabricante	Nombre comercial	Componentes	Serie primaria	Dosis de recuerdo
PRP-OMP	Merck & Co, Inc	PedvaxHIB	PRP conjugated to OMP	2, 4 mes	12–15 mes
PRP – T	sanofi pasteur	ActHIB	PRP conjugated to tetanus toxoid	2, 4, 6 mes	12–15 mes
PRP – T	GlaxoSmithKline	Hiberix	PRP conjugated to tetanus toxoid	No licencia para serie primaria	12–15 mes
Vacuna Conjugada					
Producto de Vacuna	Fabricante	Nombre comercial	Componentes	Serie primaria	Dosis de recuerdo
PRP-OMP-HepB	Merck & Co, Inc	Comvax	PRP-OMP + hepatitis B vaccine	2,4 mes	12–15 mes
DTaP-IPV/PRP-T	Sanofi pasteur	Pentacel	DTaP-IPV + PRP-T	2, 4, 6 mes	15–18 mes
MenCY/PRP-T	GlaxoSmithKline	MenHibRIX	MenCY + PRP-T	2, 4, 6 mes	12–15 mes

Los niños de 2 - 6 meses deben recibir una serie de 3 dosis de *H. influenzae* b PRP-T, Pentacel o MenHibRIX; o una serie de dos dosis de Hib PRP-OMP, PedvaxHib o Comvax. La primera dosis se puede administrar a las 6 semanas. Una dosis de refuerzo que será la tercera o cuarta dosis, dependiendo del tipo de vacuna usada en la primera serie, se debe administrar a los 12 o 15 meses (CDC, 2008).

En el Perú, a partir del año de 1998 se incorporó parcialmente la vacuna contra Hib en los distritos de extrema pobreza los cuales representan el 47% de la población infantil menor de un año. En el año 2004 se extendió su uso al 66% de la población referida, y en el año 2006 se incrementó al 100% (MINSa, 2006).

El diagnóstico de la infección por *H. influenzae* se basa principalmente en exámenes auxiliares (radiografía de tórax examen citoquímico / físico de líquido cefalorraquídeo (LCR) que mostraban evidencia de neumonía, e infección que corresponde a una infección bacteriana. Esta evidencia es necesaria para que se proceda a la obtención de muestra de sangre para hemocultivo. Los frascos de hemocultivos se incuban a 35°C-37°C, y se realizan subcultivos a las 24 horas en placas de agar sangre al 5% y agar chocolate suplementado y se incuban a 35°C-37°C durante 24 horas con atmósfera al 5%-10% de CO₂ (Grupo Multifuncional de Neumonías, 2003). La lectura e interpretación de los medios de cultivo se realizan siguiendo las normas de la Comisión Nacional de Estados Unidos para Estándares de Laboratorio clínico (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995). Para la determinación de serotipos de *H. influenzae* se realiza por la técnica de aglutinación en placa descrita en el Manual de la Organización Mundial de la salud / Centro de Control de enfermedades, en el cual utilizan antiseros comerciales (DIFCO): polivalentes y monovalentes (a-f), en el cual usan cultivo puro de 18 horas de incubación, aislado en GC Agar base (OXOID). La identificación de serotipo se realiza por visualización macroscópica de aglutinación en un lapso de 2-3min (Grupo Multifuncional de Neumonías, 2003).

2.1 ANTECEDENTES

H. influenzae tipo b sigue causando muertes y secuelas debilitante, en países que no ofrecen la vacunación rutinaria en niños (OMS, 2009). Según la OMS, el manejo adecuado de vacunación es la mejor manera de reducir la mortalidad por IRA, pero se debe tener un profundo estudio de las características culturales, económicas y sociales, así como también el conocimiento previo de los habitantes de la población en torno a las IRAs.

H. influenzae, incluido *H. influenzae* tipo b, es un comensal habitual de la nasofaringe de los niños y es la segunda causa más importante de Neumonía, y de las infecciones respiratorias agudas. Antes de la era de la vacunación, la mayoría de los niños no inmunes tenían la nasofaringe colonizada por *H. influenzae* b en algún momento, en ocasiones durante meses, aunque la tasa de colonización bacteriana variaba considerablemente con la edad y los factores socioeconómicos (OMS, 2003).

Las infecciones invasivas por *H. influenzae* b son reconocidos como un problema de salud pública que afecta niños menores de 5 años de los países en vía de desarrollo. Según estimaciones de la OMS, *H. influenzae* tipo b, es el responsable de más de 350000 muertes anuales por neumonía y 250000 muertes por meningitis (Debbia, 2001; Jamison, et al. 2006).

Según se observa en la literatura que el mayor impacto recae sobre las poblaciones infantiles más pobres. Los portadores sanos, que albergan el microorganismo en la nasofaringe constituyen la principal fuente de infección por *H. influenzae* (Farjo *et al.*, 2004).

La detección de cepas de *H. influenzae* directamente de muestras clínicas, puede realizarse en medios que contienen eritrocitos lisados de carnero o conejo (Agar Chocolate) elaborados con Base de Columbia enriquecido con Isovitalax u otro suplemento que contenga los factores de crecimiento X y V. La adición de bacitracina al medio

de cultivo crea condiciones selectivas para el desarrollo de *H. influenzae* en muestras de exudados nasofaríngeos o en aquellas que normalmente no son estériles (Fuentes, et al. 2003; Perilla, et al. 2003).

Se ha demostrado que la PCR es una prueba rápida, sensible y específica para el diagnóstico de Hi a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo (Shereen, et al. 2001; Rotta, et al. 2004). En el 2004 encontraron que *H. influenzae* fue el microorganismo más común en las infecciones de otitis media aguda, y que la técnica de PCR fue la más sensible que los métodos convencionales para detectar el agente causal de la infección (Rotta, et al. 2004).

En Polonia, mediante la técnica de Electroforesis en gel de campo pulsado se evaluaron la prevalencia de *H. influenzae* encapsulado y no encapsulado, donde determinaron que del total de cepas aisladas, el 5.6% eran encapsulados siendo el serotipo más común el tipo “b” con un 40.3% de los casos (Skoczynska, et al. 2004).

En Bélgica se estudió un total de 333 niños sanos en edad de 3 a 6 años, se evaluó la colonización nasofaríngea de varias bacterias, entre ellos *H. influenzae*, después de la introducción de la vacuna pcv7, en dos niveles socioeconómicos distintos, se evidencio que la flora nasofaríngea está influenciada no solo por la edad sino también por los ajustes socioeconómicos (Jourdain, et al. 2010).

2.2 DEFICIONES DE CONCEPTOS

- PCR: Reacción en cadena de polimerasa para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular.
- *H. Influenzae* Tipificable: cepas con capsula bacteriana, es decir tiene capa definida, compuesto por polímeros. Se clasifican en tipos a, b, c, d, e, f.
- *H. influenzae No-Tipificable*. Cepas que no tiene capsula bacteriana.
- IRA (Infecciones respiratorias agudas): son un conjunto de enfermedades provocado en el tracto respiratorio, por bacteria o virus.
- Serotipo: Es un tipo de microorganismo clasificado según los antígenos en su superficie celular.
- Secuenciación de ADN: Es una técnica molecular que determina el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

III. METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS)

3.1 PROBLEMA

3.1.1 PLANTEAMIENTO

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son la principal causa de morbilidad y mortalidad pediátrica a nivel mundial ocasionando la muerte de 1,5 millones de niños menores de 5 años, lo cual representa el 15% del total de defunciones anuales (OMS, 2014; Grassi, et al. 2014). En América se registran más de 100.000 defunciones anuales de niños menores de un año. En el Perú, a la Semana Epidemiológica (SE) N° 17, se reportó 762 400 episodios en menores de 5 años lo que representa una incidencia acumulada (IA) de 2 664,0 por cada 10 000 menores de 5 años (Yon, 2015; MINSA-DGE, 2015).

El grupo poblacional de mayor riesgo son los niños menores de 5 años, que cursan con alguna enfermedad crónica de base, en especial aquéllos que cursan con algún tipo de inmunosupresión; y las personas mayores de 60 años. Existen varios factores influyentes que hacen que este grupo de personas sean susceptibles a padecer una infección respiratoria, tales como: la capacidad funcional física, mental y el estado nutricional (Vega, et al. 2006). Las condiciones socioeconómicas de los países en desarrollo también favorecen a los factores de riesgo, ocasionando una incidencia más alta de IRA que conlleva a un aumento en las cifras de morbilidad y mortalidad (Paris, et al. 2013).

Entre las IRA se encuentran aquellas infecciones leves como resfrío o catarro, faringitis, amigdalitis, bronquitis, otitis, meningitis; o graves como la Neumonía, que constituye la principal causa de defunción infantil en el mundo y responsable

del 15% total de defunciones de niños menores de 5 años (OMS, 2014). En el Perú, a la semana epidemiológica N° 17 del año 2015, se reportó 81 defunciones por Neumonía, de las cuales el 51% corresponden a niños entre 2 a 11 meses, el 30% a niños entre 1 a 4 años y el 19% a menores de 2 meses. En el grupo de adultos mayores de 60 años, se han notificado 217 defunciones del total de 2835 episodios de neumonía notificados a la nivel nacional, ocasionando una tasa de letalidad de 7.7% (Yon, 2015; MINSA-DGE, 2015).

H. influenzae (Hi) es un patógeno que afecta las vías respiratorias y es responsable de la neumonía y meningitis en países en vías de desarrollo. Es el agente etiológico más frecuente aislado en la población infantil y la segunda causa más importante de neumonías bacterianas (Campos, 2001; Takemura, et al. 2001; Watt, et al. 2009, Briere, et al. 2014).

En Estados Unidos la primera vacuna de *H. influenza* tipo b se introdujo en el año 1985. La incidencia anual durante en los años 1989 y 2000 disminuyó un 99%, es decir menos de un caso por 100 000 niños menores de 5 años (CDC, 2002). Durante el 2000 – 2012 la tasa de incidencia anual media de la enfermedad invasiva *H. influenza* tipo b en niños menores de 5 años se mantuvo en 0.27 por 100 000 niños (Briere, et al. 2014).

En Colombia se realizó un estudio del costo-efectividad de la vacuna contra el *H. influenzae*, y observaron que la vacunación puede prevenir cerca de 25 000 casos de enfermedad invasora en un año, además de evitar cerca de 700 defunciones y salvar anualmente 44054 vidas (Alvis, et al. 2006).

A pesar que se incorporó la vacuna contra *H. influenzae* b en todo el Perú, el riesgo para la enfermedad invasiva continúa entre los no inmunizados y niños inmunizados debido a que no todos completan las dosis de la serie y el refuerzo recomendado.

El diagnóstico etiológico en hospitales de IRAs por *H. influenzae*, utilizan métodos microbiológicos, que a pesar que sea un método específico, este es poco sensible y la bacteria demora varios meses en crecer. Así mismo teniendo en cuenta la importancia de las IRAs causado por *H. influenzae*, es fundamental implementar y utilizar técnicas más sensibles y específicas para obtener un mejor diagnóstico. Por este motivo es importante identificar y caracterizar los serotipos de esta bacteria responsable de las infecciones respiratorias agudas.

3.1.2 FORMULACIÓN

En consecuencia las enfermedades debidas a la infección por *H. influenzae*, representan a nivel mundial una preocupación en la salud pública. Por este motivo es de suma importancia evaluar la prevalencia de *H. influenzae* y los serotipos circulantes en niños menores de un año hospitalizados con diagnóstico clínicos de IRA.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 GENERAL

- Evaluar la prevalencia de *H. influenzae* en niños menores de 1 año de edad hospitalizados procedentes de cuatro hospitales de Lima.

3.2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar la presencia de *H. influenzae* en muestras de hisopados nasofaríngeos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Caracterizar los serotipos de *H. influenzae* en muestras de hisopados nasofaríngeos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación automática.
- Correlacionar los parámetros clínicos con la prevalencia de *H. influenzae*.

3.3 HIPOTESIS

3.3.1 GENERAL

- *H. influenzae* se presenta en gran porcentaje en niños menores de un año de edad hospitalizados.

3.3.2 ESPECIFICAS

- Se identificó la presencia de *H. influenzae* mediante la técnica PCR.
- Se caracterizó los serotipos de *H. influenzae* mediante la técnica PCR.
- La presencia de *H. influenzae* son independientes de los parámetros clínicos

3.4 TIPOS Y DISEÑOS DE INVESTIGACIÓN

Es un estudio descriptivo y transversal.

3.5 MUESTRA

La población en estudio conto con muestras nasofaríngeas de niños menores de 1 año hospitalizados con sintomatología de IRA cedidas de los procedimientos de rutina de los cuatro hospitales de Lima (Hospital Cayetano Heredia, Hospital Dos de Mayo, Hospital Loaysa, Hospital San José. Las variables demográficas y clínicas se obtuvieron de la ficha de datos (Imagen 01).

3.5.1 CRITERIO DE INCLUSIÓN

- Niños con presunta sintomatología clínica (fiebre, paroxismo de tos, cianosis, dificultad respiratoria, apnea, rojez, estridor respiratorio, vomito después de la tos, diarrea) para IRA (imagen 01).
- Muestras, ficha de datos completa.

3.5.2 CRITERIO DE EXCLUSIÓN

- Niños sin presunta sintomatología de infección por IRA.
- Muestras con ficha de datos incompleto.

3.6 VARIABLES

- V1: Edad en meses de niños menores de 1 año con diagnóstico de infección respiratoria aguda.
- V2: Sexo de niños menores de 1 año con diagnóstico de infección respiratoria aguda.
- V3: Síntomas clínicos en pacientes menores de 1 año de edad con diagnóstico de infección respiratoria aguda.

3.7 INSTRUMENTOS Y MATERIALES

- EQUIPOS

- Termociclador
- Cabina de extracción
- Cabina de Pre-PCR
- Centrifuga
- Vortex
- Cámara Electroforética
- Pipetas 0.5ul-10ul, 10ul-100ul, 20ul-200ul, 100ul-1000ul.
- Hisopos de alginato de calcio

- REACTIVOS:

- kit comercial *High Pure Template Preparation* (Roche Applied Science, Penzberg Germany)
- *Ready mix enzyme* (Taq polimerase, 2.5 mM Mg Cl₂; 15 mM Tris/HCl PH 8.3, 50 mM KCl, 200 uM de cada deoxynucleotido) (Kappa Biosystem)
- Cebador (Macrogen korea)
- Agarosa
- TAE 1X (Tris, HCl, EDTA)
- Bromuro de Etidio
- Agua Destilada
- Alcohol (90%)

3.8 PROCEDIMIENTO

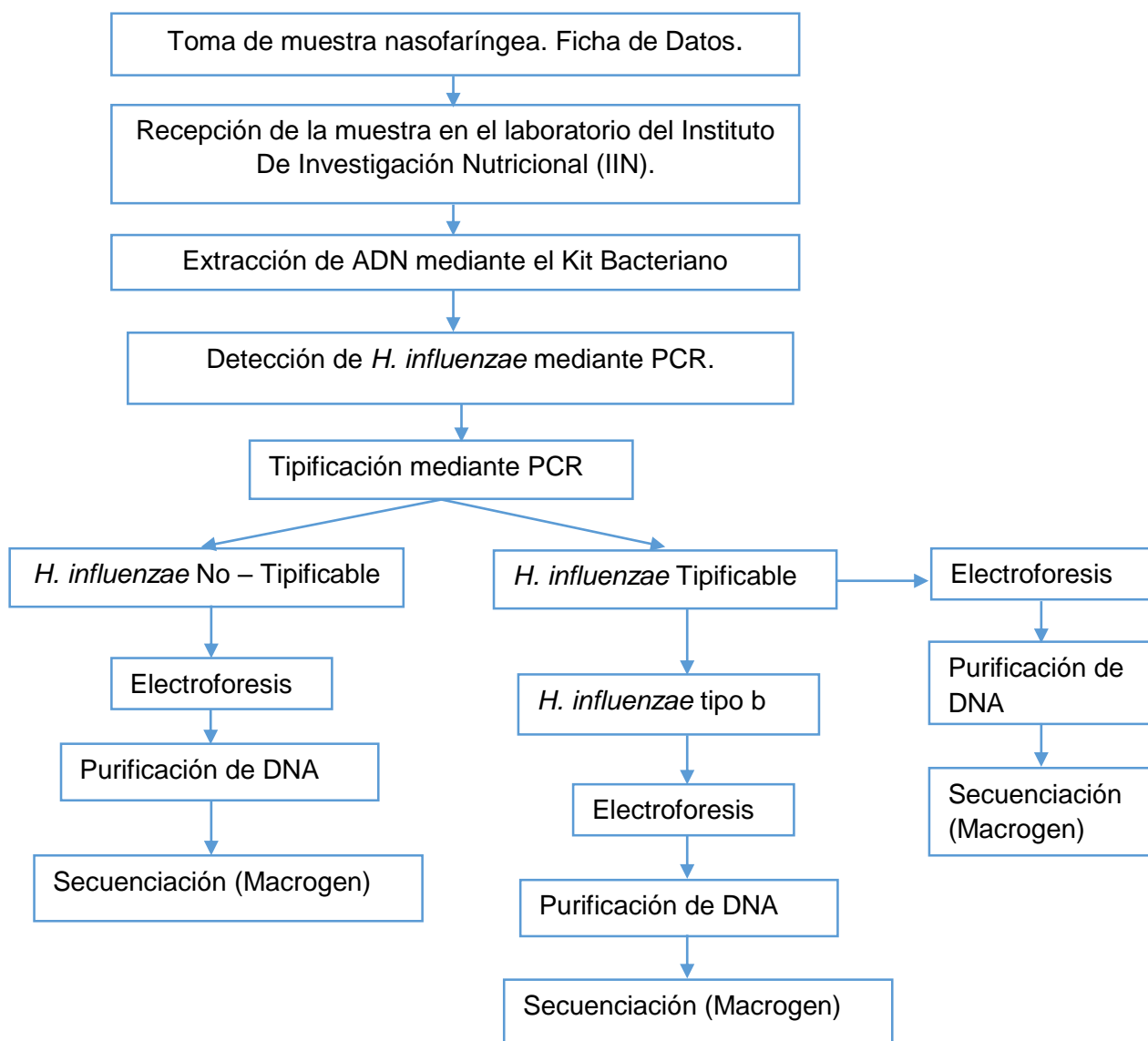


Figura N°1: Metodología para la identificación y tipificación de *H. influenzae*. No se logró identificar los otros tipos (a, c, d, e, f) de *H. influenzae* tipificable.

3.8.1 TÉCNICA DE MUESTREO

La muestra se colectará mediante un hisopado nasofaríngeo con ayuda de un hisopo flexible de alginato de calcio. Posteriormente estas son sumergidas en un tubo de plástico tipo falcón que contiene medio de transporte (PBS) y almacenadas a 4°C.

Las muestras serán transportadas de manera adecuada y siguiendo las condiciones de bioseguridad al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas y el Instituto de Investigación Nutricional para su procesamiento.

3.8.2 TÉCNICA DE EXPERIMENTACIÓN

3.8.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

Un volumen de 200 µL de muestra de hisopado nasofaríngeo será utilizada para la obtención del ADN bacteriano, para lo cual se utilizará el kit comercial *High Pure Template Preparation* (Roche Applied Science, Penzberg Germany) y se procederá de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. El ADN extraído será diluido en 50µL de agua libre de ARNasa/ADNasa e inmediatamente almacenado a -20°C hasta su utilización en la PCR.

3.8.2.2 PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE *Haemophilus influenzae*

Para la amplificación del material genético mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizarán cebadores específicos para *Haemophilus influenzae* (Tabla N°3).

Tabla N°3: Gen ompP2

GEN	Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón	referencia
OmpP2	ompP2	F: 5'- ATAACAACGAAGGGACTAACG-3' R: 5'- ACCTACACCCACTGATTTTTC-3'	1000 pb	Weltman <i>et al.</i> 2005

La mezcla de la reacción se realizará a un volumen final de 50 μ L, el cual contendrá 25 μ L *ready mix enzyme* (Taq polimerase, 2.5 mM Mg Cl₂; 15 mM Tris/HCl PH 8.3, 50 mM KCl, 200 uM de cada deoxynucleotido) (Kappa Biosystem), 20 umol de cada cebador (Macrogen-Korea), agua y 5 μ L de DNA. Las condiciones del termociclador serán adaptadas de la siguiente manera: pre-desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido de 55 ciclos de desnaturalización de 1 min a 95°C, anillamiento durante 1 min a 55°C de temperatura de elongación durante 45 segundos a 72°C, con una elongación final de 10 min a 72°C. La amplificación será realizada utilizando un termociclador de gradiente de la marca Verity (Applied Biosystem, California, USA). La presencia y el tamaño del producto amplificado será analizado mediante electroforesis al 2.5% de agarosa (FMC, Rockland, ME), el gel previamente será teñido con 3 g/mL of bromuro de etidio y separado en un buffer 1x Tris-ácido acético-EDTA. Las bandas serán visualizadas con ayuda de un sistema documentador de geles KODAK LOGIC 1500 (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA).

3.8.2.3 PCR CONVENCIONAL PARA LA TIPIFICACIÓN DE *Haemophilus influenzae*

Para la identificación de *H. influenzae* No-tipificable se usó los cebadores HiAR y HiAF. Los cebadores 16RNA-HiF y 16RNA-HiR se usaron para identificar *H.i* tipificable y dentro de los Hi tipificable se logró identificar Hi tipificable tipo b usando los cebadores BexAR y BexAF (Tabla N°4).

Tabla N°4: Cebadores específicos para la tipificación de *Haemophilus influenzae*.

Nombre del cebador	Secuencia	Producto Amplificado	Tipificación	Referencia
HiA	F: 5'-TTGCTTCAACTGACGAGAAG-3' R: 5'-TTGTCGGCAACAACACTGGAG-3'	550pb	Hi No-Tipificable	García, et al. 2008
16 RNAr Hi	F:5'CGTATTATCGGAAGATGAAAGTGC-3' R: 5'-AGTACTCTAGTTACCCAGTCTGA-3'	483pb	Hi Tipificable	Hendolin, et al. 2000c ;
BexA	F: 5'-GGCGAAATGGTGCTGGTAA-3' R: 5'-AACTCAACCGAAAGTGAGAGA-3'	310pb	Hi Tipificable tipo b.	Corless, et al. 200c

Para la confirmación la especificidad de los amplicones, éstos fueron enviados a secuenciar al servicio de MacroGen-Korea.

3.9 TÉCNICA DE ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

3.9.1 MANEJO DE DATOS

Se desarrolló una base de datos en Excel donde se registrarán los datos personales del paciente, datos de los parámetros clínicos, entre otros (según Ficha de datos) y los resultados de las pruebas moleculares. Las muestras fueron codificadas para un mejor registro.

3.9.2 PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS:

Los datos obtenidos fueron ingresados por doble digitación al programa Excel y exportados a STATA v11.0. Se realizó un análisis descriptivo de las variables recogidas donde se hizo una correlación entre los síntomas clínicos y la infección de *H. influenzae* usando como prueba estadística *Chi cuadrado de Pearson*.

IV. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DE *H. influenzae* MEDIANTE PCR

Al analizar las 339 muestras de hisopado nasofaríngeo de niños menores de 1 año de edad, se determinó por PCR 91 muestras positivas con una prevalencia de 26.8% (Tabla N°5).

Tabla N°5. Resultado del Diagnóstico de *Haemophilus influenzae* por PCR.

Casos	PCR	
	Frecuencia	(n) Prevalencia (%)
Positivos	91	26.8
Negativos	248	73.2
Total	339	100.0

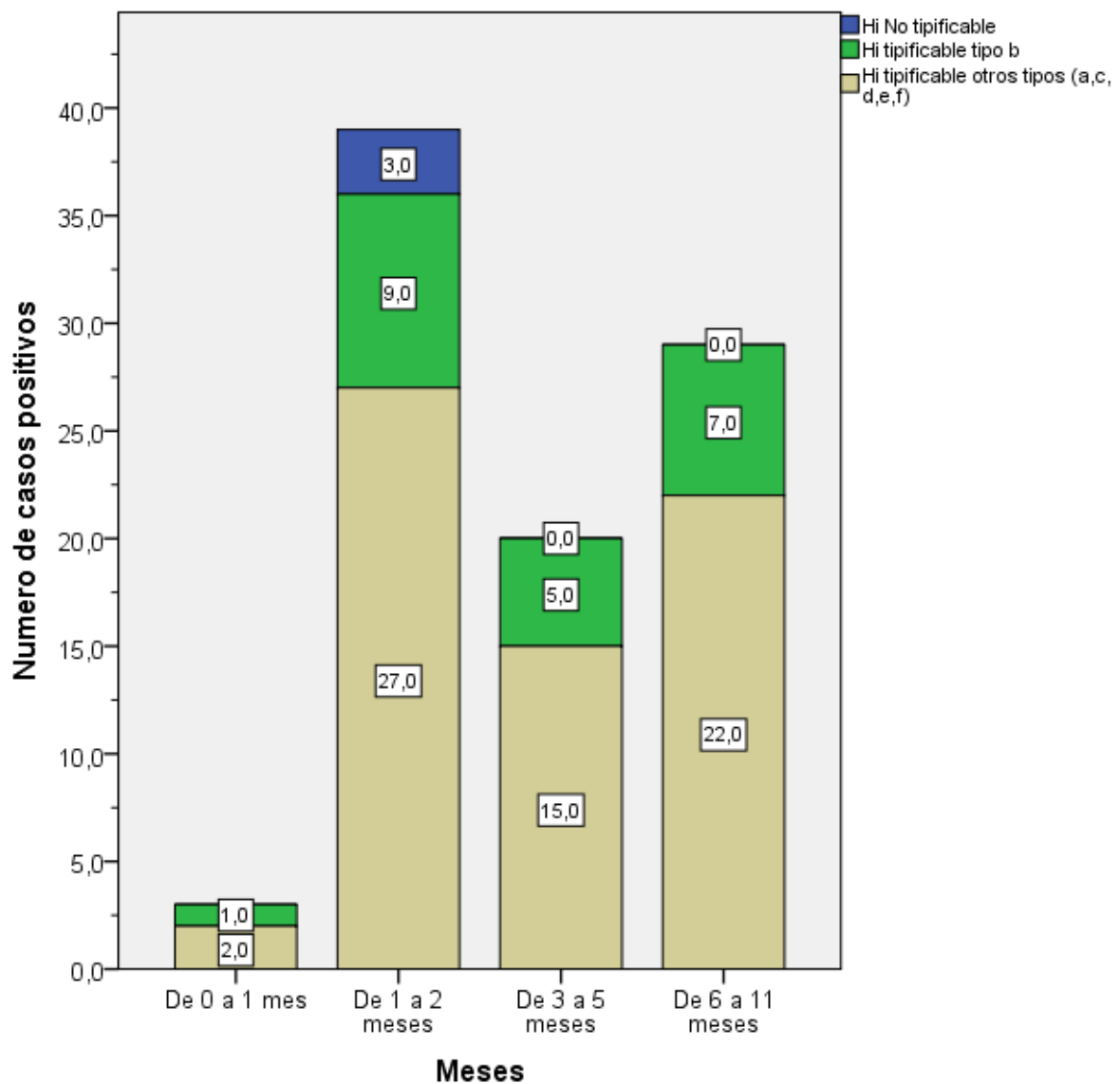
4.2 TIPIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS DE *H. influenzae*

En la tabla N°6, con relación a la edad en meses, el 46,2% (42) del total de positivos (91) de *H. influenzae* son bebés que tienen entre 0 a 2 meses de edad, el 21,9 % positivo de *H.influenzae* son bebés de 3 a 5 meses de edad y el 31,9% positivo son bebés de 6 a 11 meses de edad. Así mismo en relación con el género el 52,7% y el 47,3% del total de positivos de *H. influenzae* son bebés de género masculino y femenino respectivamente.

Tabla N° 6: Resumen de sexo y edad con la infección de *H. influenzae* en los niños menores de un año

Pacientes	Diagnóstico por PCR			
	Hi No-Tipificable	Hi Tipificable		Total Hi
		Tipo b	Otros tipos	
Características	n = 3 (%)	n = 22 (%)	n = 66 (%)	n = 91 (%)
Año (meses)				
< 1 (<i>neonatos</i>)	0 (0.0)	1 (4.6)	2 (3.0)	3 (3.3)
(1 - 2)	3 (100.0)	9 (40.9)	27 (40.9)	39 (42.9)
(3 - 5)	0 (0.0)	5 (22.7)	15 (22.8)	20 (21.9)
(6 - 11)	0 (0.0)	7 (31.8)	22 (33.3)	29 (31.9)
Genero				
Masculino	1 (33.3)	10 (45.5)	37 (56.1)	48 (52.7)
Femenino	2 (66.7)	12 (54.5)	29 (43.9)	43 (47.3)

La tipificación de los serotipos de *H. influenzae* se realizó mediante la técnica de PCR y se identificó *H. influenzae* tipificable y *H. influenzae* No Tipificable.



Grafica N°1: Distribución de los casos positivos entre las edades en meses.

El 96.7% y 3.3% representan los *H. influenzae* tipificable y no tipificable respectivamente. Dentro de los *H. influenzae* tipificable se encontró que 22 muestras representan al tipo “b” es decir el 24.2% del total de casos positivos. Los otros tipo de Hi tipificable (a, c, d, e, f) que no se logró identificar representan el 72.5 % (66) de total de casos positivos (Grafica N°1).

4.3 CORRELACIÓN DE LA PRESENCIA DE *H. influenzae* CON LOS SÍNTOMAS CLÍNICOS

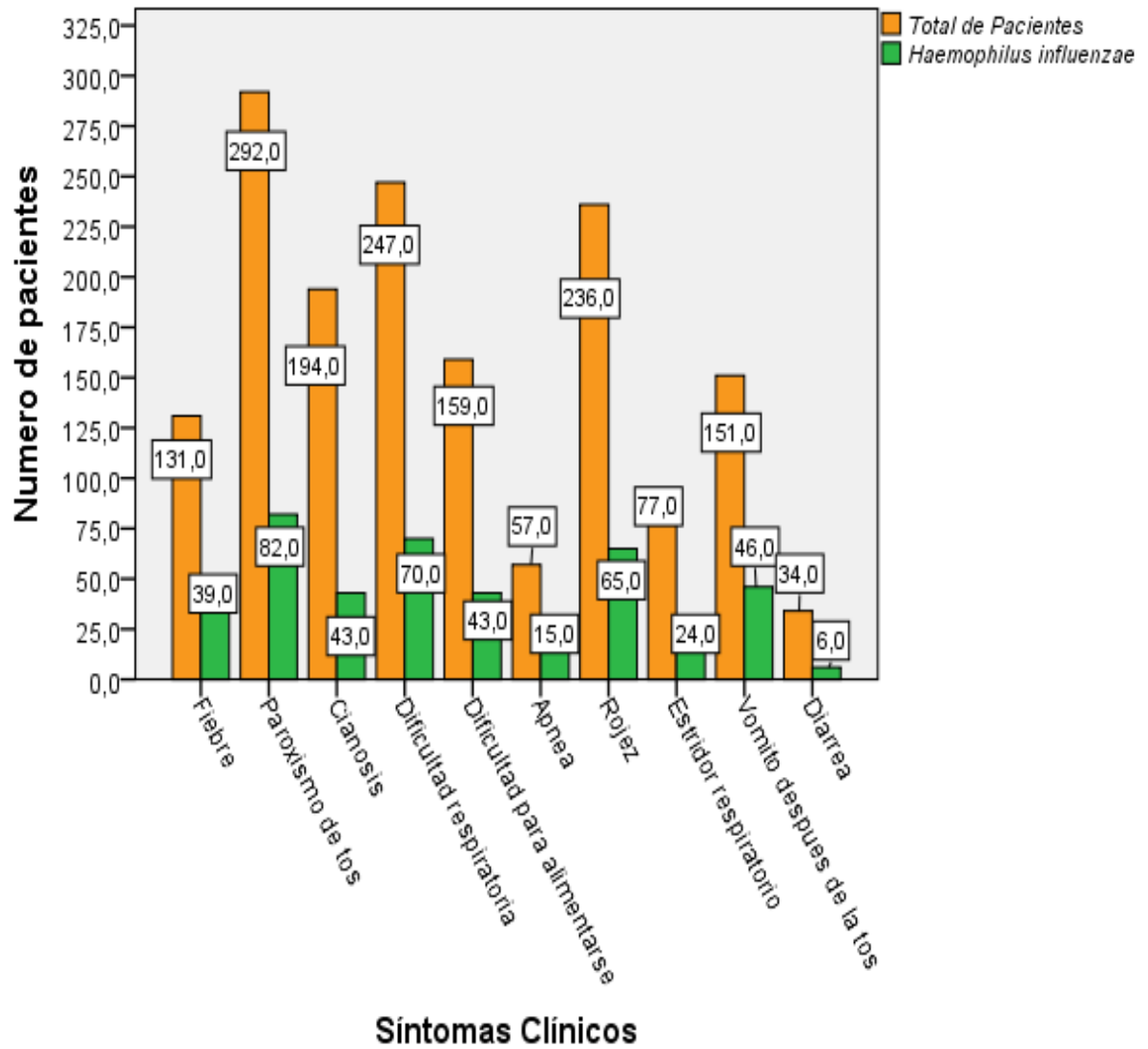
Tabla N°7: Síntomas Clínicos relacionado con presencia de *Haemophilus influenzae*

Síntomas Clínicos	Total de Pacientes n=339 (%)	<i>Haemophilus influenzae</i>	
		n=91 (%)	p-valor
Fiebre	131 (38.6)	39 (42.9)	0.334
Paroxismo de tos	292 (86.1)	82 (90.1)	0.200
Cianosis	194 (57.2)	43 (47.3)	0.024
Dificultad Respiratoria	247 (82.9)	70 (76.9)	0.308
Dificultad para alimentarse	159 (46.9)	43 (47.3)	0.938
Apnea	57 (16.8)	15 (16.5)	0.921
Rojez	236 (69.6)	65 (71.4)	0.660
Estridor respiratorio	77 (22.7)	24 (26.4)	0.330
Vomito después de la tos	151 (44.5)	46 (50.5)	0.001
Diarrea	34 (10.0)	6 (6.6)	0.202

* Chi-cuadrado de Pearson (χ^2)

Los síntomas clínicos relacionados con la patología de *H. influenza* son Fiebre, Paroxismo de tos, cianosis, dificultad respiratoria, dificultad para alimentarse, apnea, rojez, estridor respiratorio, vomito después de la tos, diarrea. Los síntomas clínicos que tienen un valor significativo en relación a la prevalencia de *H. influenzae*, es Vomito después de la tos que presentan un p-valor de 0.001 y la cianosis con un p-valor de 0.024 (Tabla N°7).

En la gráfica N°2 se muestra la presencia de *H. influenzae* relacionado con los síntomas clínicos, donde el 47.3 % (43) casos positivos de *H. influenzae* tienen cianosis, así como el 50.5% (469 casos positivos) tiene el síntoma de vomitar después de la tos.



Grafica N°2: Presencia de *H. influenzae* relacionado con los síntomas clínicos.

En la tabla N°8 el estado de vacunación se distribuyó en grupos de edades en pacientes positivos, donde los bebés de 2 a 3 meses 4 casos positivos para *H. influenzae* tipo b, no fueron vacunados. Entre los 4 a 5 meses, del total de casos positivos, 5 presentan una incompleta vacunación. De los 6 a 11 meses, 4 presentan una incompleta vacunación

Tabla N°8: Casos positivos de *H. influenzae* tipo b y el estado de vacunación distribuidos en grupos de edades.

Año (meses)	Pacientes con <i>H. influenzae</i> tipo b n=22 (%)	Pacientes con vacuna para Hib			
		0 dosis n = 12 (%)	1 dosis n = 5 (%)	2 dosis n = 4 (%)	3 dosis n = 1 (%)
< 2	6 (100.0)	6 (100.0)			
2 – 3	4 (100.0)	4 (100.0)	0 (0.0)		
4 – 5	7 (100.00)	1 (14.3)	4 (57.1)	2 (28.6)	
6-11	5 (100.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	2 (40.0)	1 (20.0)

V. DISCUSIONES

Tradicionalmente, el “*gold estándar*” para el diagnóstico de *H. influenzae* es el cultivo bacteriano, pero esta técnica requiere un mínimo de 1 día o más y en muchos casos no puede diferenciar *H. influenzae* de otras *Haemophilus* spp. (Garau, et al. 2014). Además, la aglutinación tradicional para tipificación de *H. influenzae* han demostrado tener un nivel importante de discrepancias en comparación con la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Cooper, et al. 2003). Este estudio es el primero en evaluar la prevalencia de Hib en lactantes peruanos mediante PCR para detección y serotipificación. Esta contribución debe enriquecerse con nuevas investigaciones extendidas que abordan la prevalencia de serotipos de *H. influenzae*, especialmente Hib, y el impacto de la vacuna Hib en Perú (Chien, et al. 2013; Grijalva, et al. 2014).

La prevalencia en nuestro estudio (26.8%) es mucho mayor en comparación con otros estudios es mayor y similar en algunos casos. En el 2003 se realizó un estudio donde la prevalencia fue 0,8% en niños menores de 5 años. En Europa la prevalencia varían entre 0.6% y 17% en paciente hospitalizados por neumonía. En Sudamérica, África y Sureste Asiático, se han encontrado un porcentaje entre 18 y 51% de *H. influenzae*. Estudios realizados en Chile y Brasil muestran una prevalencia entre 8 y 22% de *H. influenzae*, utilizando cultivo de aspirado pulmonar. La prevalencia de *H. influenzae* en nuestro estudio que difieren a otros pudo estar relacionada a que utilizamos la PCR como técnica de diagnóstico el cual es mucho más específico y sensible (Wang, et al. 2017).

Haemophilus influenzae b (Hib) representó una de las causas importantes de IRAs en niños. En nuestro estudio la identificación de *H. influenzae* diferentes al tipo b (72,5%) y Hi no tipificable (nt) (3,3%) han emergido como agentes importantes de enfermedad. Dado al uso generalizado de las vacunas para *H. influenzae* tipo b (Hib) entre los niños menores de 5 años, se ha observado un aumento en la incidencia de la enfermedad causado por otros serotipos (a, c, d, e, f) en

todo el mundo con algunas series que informan Hi tipo “a” como una causa emergente de enfermedad invasiva (Nair, et al. 2013). Además, la vacunación Hib también han demostrado reducir el número de portadores asintomáticos de este serotipo (Van den Broek, et al. 2014). Debido a nuestro diseño de estudio y recursos limitados, sólo pudimos realizar tipificación de Hib mediante PCR; sin embargo, es importante notar la alta prevalencia de Hib que observamos a pesar de una cobertura nacional de inmunización de 94,45% en 2012 (Stuckey-Schrock, et al. 2012). Por lo tanto, se evaluó el estado de vacunación Hib entre estos pacientes. Sorprendentemente, en los pacientes entre 2 y 3 meses de edad ninguno de los 4 casos fueron vacunados, y en los 12 niños entre 4, 5, 6 a 11 meses de edad, también encontramos bajas tasas de vacunación.

Un escenario similar se informó en 2016 en un estudio en China donde el 51% de casos positivos para Hib no tenía ninguna o sólo 1 dosis de la vacuna Hib (Hu, et al. 2016). Esto es especialmente preocupante ya que como mencionamos antes, una cobertura de vacunación no uniforme, programas retardados o cobertura de dosis de bajo refuerzo han sido responsables de una alta prevalencia de Hib en otros países latinoamericanos como Argentina (Sommer et al, 2006). Sospechamos que podría haber ocurrido una cobertura irregular durante nuestro período de estudio que podría haber contribuido a la presencia de una tasa considerable de Hib en nuestra población.

También es importante mencionar que los niños menores de 2 meses, un grupo muy sensible que no están protegidos por la vacuna, fueron los segundos más afectados por el Hib en 6 (27,3%) de los sujetos de nuestro estudio, incluyendo un caso de un neonato masculino de 25 días de edad que fue hospitalizado en la Unidad de cuidados intensivos por neumonía grave. El papel de los contactos del hogar como posible transporte de Hib necesita ser dilucidado en este grupo de edad. En este estudio, a los cuidadores del paciente se les preguntó si había algún contacto en el hogar con síntomas respiratorios similares. Se encontró

que el 65,93% (60/91) de los pacientes con una muestra positiva para *H. influenzae* tuvieron al menos un contacto sintomático, siendo las madres en el 35% (21/60) la más frecuente seguida por los hermanos menores de 7 años en 30% (18/60).

Los principales síntomas clínicos que se presentan en las enfermedades invasivas como consecuencia de la infección de *H. influenzae* en nuestro estudio son fiebre, paroxismo de tos, cianosis, dificultad respiratoria, dificultad para alimentarse, apnea, rojez, estridor respiratorio, vómitos después de la tos y diarrea. Además el análisis de correlación realizado en nuestro estudio, para ver si eran dependiente e independiente los síntomas clínicos descritos y la presencia de *H. influenzae* nos muestra que el vómito después de la tos y la cianosis presentan un p-valor de 0.001 y 0.025 respectivamente, es decir estadísticamente dependen de la presencia de *H. influenzae*. Sin embargo este estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, como hemos mencionado antes, debido a nuestro diseño de estudio y recursos limitados, sólo pudimos realizar tipificación de PCR de Hib, por lo tanto, ignoramos otros serotipos que representaron 66 casos de IRAs. Además, como sólo hemos detectado *H. influenzae* en muestras de pacientes, no podemos establecer una causalidad directa entre la presencia de *H. influenzae* y el diagnóstico de IRAs, ya que en algunos de nuestros pacientes la bacteria podría haber sido un simple hallazgo más que el agente etiológico, especialmente porque se ha demostrado una asociación positiva entre *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en la colonización nasofaringe de niños pequeños (Van den Broek, et al. 2014). Sin embargo, consideramos nuestros hallazgos relevantes, ya que hemos reportado una prevalencia importante de Hib y una cobertura vacunal heterogénea más baja de lo esperado en el país.

VI. CONCLUSIONES

- La prevalencia de *H. influenzae* es 26.8% en niños menores de 1 de edad.
- El serotipo b representa el 27,27% de los casos positivos de *H. influenzae*.
- El síntoma vomito después de la tos y la cianosis, tiene un valor significativo en relación con la prevalencia de *H. influenzae*.

VII. RECOMENDACIONES

- Es necesario una cuantificación rápida de *H. influenzae* para distinguir entre la infección y la colonización nasofaringe en niños por ello se deberían implementar nuevas técnicas moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR),
- Es necesario identificar los otros serotipos diferentes al *H. influenzae* tipo b, para tener una mejor análisis.
- Se necesita realizar más estudios sobre *H. influenzae* con mayor número de muestras para disminuir la medida de error, y tener una mejor referencia.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alvis, N., De La Hoz, F. & Vivas, D. (2006). Relación costo-efectividad de la vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b en niños menores de dos años de edad en Colombia. *Rev Panam Salud Pública*, 20(4): 248–55.
- Agrawal, A. & Murphy, T. (2011). *Haemophilus influenzae* Infections in the *H. influenzae* Type b Conjugate Vaccine Era. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (11): 3728–3732.
- Briere, E., Rubin, L., Moro, P., Cohn, A., Clark, T. & Messonnier, N. (2014). Prevention and Control of *Haemophilus influenzae* Type b Disease: Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Rep. Recomend. De MMWR*, 63(RR01); 1-14.
- Benguigui, Y., Lopez, F., Schmunis, G. & Yunes, J. (1997). Infecciones respiratorias en niños. Washington, D.C. OPS.
- Campos, J. (2001). *Haemophilus influenzae*: from the post-vaccination era to antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infecct*, 7 (6): 287-290.
- CDC. (2002). *Haemophilus influenzae*. In: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, 7th ed.
- CDC. (2008). Licensure of a diphtheria and tetanus toxoids and acellular pertussis adsorbed, inactivated poliovirus, and *Haemophilus b* conjugate vaccine and guidance for use in infants and children. *MMWR*, 57:1079–80.
- Chien, Y., Vidal, J., Grijalva, C., Bozio, C., Edwards, K., Williams, J., ... Klugman, K. (2013). Density Interactions between *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in

the Nasopharynx of Young Peruvian Children. *Pediatr Infect Dis J*, 32(1):72-7.

- Cooper, N., Sutton, A., Abrams, K., Wailoo, A., Turner, D. & Nicholson, K. (2003). Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ*, 326 (7401):1235.
- Corless, C., Gulver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A. & Kaczmarski, E. (2001). Simultaneous detection of *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenza* and *Streptococcus pneumonia* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 39(4): 1553-8.
- Debbia, E. (2001). Epidemiology of major respiratory pathogens. *J Chemother*, 2005-10.
- Diaz, A., Fuentes, G., Couble, B., Uribe, R., Mercado, G., Soza, A., ... Saldias, P. (2005). Etiología de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos hospitalizados en Santiago, Chile: implicancias para las guías clínicas. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 21: 23-32.
- Del Castillo, F., Baquero, F., De la Calle, T., López, M., Ruiz, J., Alfayate, S. ... Calvo, C. (2012). Documento de Consenso sobre etiología, diagnóstico y tratamiento de la Otitis Media Aguda. *Anuales de Pediatría*, 77 (5): 345 e1-345 e8.
- Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. (2008). XIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 24: 4.
- Farjo, R., Foxman, B., Patel, M., Zhang, L., Perrigrew, M. & McCoy, S. (2004). Diversity and sharing of *Haemophilus influenza* strains

colonizing healthy children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis, J.* 23 (1): 41-6.

- Fuentes, K., Tamargo, I. & Toraño, G. (2003). *Haemophilus influenzae* en portadores sanos que asisten a círculos infantiles. *Rev Enf Inf Ped,* 15 (60): 128-34.
- Garau, J., Nicolau, D., Wullt, B. & Bassetti, M. (2014). Antibiotic stewardship challenges in the management of community-acquired infections for prevention of escalating antibiotic resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistanc,* 2 (4): 245 – 253.
- García, C., Lozano, P., Rivera, J., Giono, S., Martínez, Y. & Rocha-Gracia, R. (2008). Identificación y tipificación de *Haemophilus influenzae*. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia),* 49 (4): 436-452.
- Garrity, G., Bell, J. & Lilburn, T. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes release 5.0: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- Grassi, T., Mancini, F., Ciervo, A., Vescio, M., Ghazal, A., Ashour, H., Saleh, E., El Zalabani, M., Donatelli, I., El Sawaf, G. & Rezza, G. (2014). *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and influenza in children with respiratory infections in Alexandria. *Egypt J Infect Dev Ctries,* 8:379–383.
- Grijalva, C., Griffin, M., Edwards, K., William, J., Gil, A., Verastegui, H., ... Lanata, C. (2014). Cohort profile: The study of respiratory pathogens in Andean children. *Int J Epidemiol.* 43(4):1021-30.
- Grupo Multifuncional de Neumonías. (2003). Vigilancia epidemiológica centinela de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en menores de 5 años en el Perú. *Rev. Perú. med. exp. salud pública.* 20 (3): 150-155. ISSN 1726-4634.
- Healthy people 2020 topics and objectives. (2013). US Department of Health and Human Services. Washington, DC: US Department of Health and Human Services.

- Hendolin, P., Paulin, L. & Ylikoski, J. (2000). Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. *J Clin Microbiol*, 38:125-32.
- Hu, J., Sun, X., Huang, Z., Wagner, A., Carlson, B., Yang, J., ... Yuan, Z. (2016). *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b carriage in Chinese children aged 12-18 months in Shanghai, China: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*, 16:149.
- Jamison, D., Breman, J., Measham, J., Alleyne, G., Claeson, M., Evans, D. ... Musgrove, P. (2006). *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Second Edit. Oxford University Press and the World Bank.
- Jourdain, S., Smeesters, P., Denis, O., Dramaix, M., Sputael, V., Malaviolle, X., ... Vergison, A. (2010). Differences in nasopharyngeal bacterial carriage in preschool children from different socio-economic origins. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17: 907–914.
- Kelly, D., Pollard, A. & Moxon, E. (2005). Immunological memory. The rolls of B cells en long-term protection against invasive bacterial pathogens. *JAMA*. 294(23): 3019-23.
- Leibovitz, E., Jacobs, M. & Dagan, R. (2004). *Haemophilus influenzae*: a significant pathogen in acute otitis. *Pediatr Infect Dis*, 23(12): 1142-52.
- Louie, H. (2005). Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. *Clinic Infect Dis*, 41:822-8.
- Ministerio de Salud del Perú. (2006). Registro y Extensión de Vacunación Pentavalente. Estrategia Sanitaria Nacional de Inmunizaciones.

- Ministerio de Salud del Perú. (2014). Manuel de Registro y Codificación de la Atención en la Consulta Externa. Estrategia Sanitaria Nacional de Inmunizaciones.
- Ministerio de Salud. Dirección General de Epidemiología. (2015). Situación epidemiológica de las infecciones respiratorias agudas (IRA), neumonías y SOB (asma) en el Perú hasta la SE 17 – 2015. 24 (17): 339 – 340.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1995). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixth informational supplement. Villanova, Pennsylvania: NCCLS (NCCLS document M100-S6).
- Nair, H., Simões, E., Rudan, I., Gessner, B., Azziz-Baumgartner, E., Zhang, J., ... Campbell, H. (2013). Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 9875:1380–1390.
- Neto, A., Lavado, P., Flores, P., Dias, R., Pessanha, M., Sousa, E., ... Esperança-Pina, J. (2003). Risk factors for the nasopharyngeal carriage of respiratory pathogens by Portuguese children: phenotype and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, 9(1): 99-108.
- OPS-CDC. (2009). Protocolo genérico para la vigilancia de influenza.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Documento de la posición de la OMS sobre las vacunas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b.
- Organización Mundial de la Salud. (2009). Una atención más limpia es una atención más segura.

- Organización Mundial de la Salud. (2014). Infecciones respiratorias agudas en el Perú. Experiencia frente a la temporada de bajas temperatura.
- Organización Panamericana de la Salud. (2013). “Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud” Washington, D.C.: OPS, © 2013”.
- París, O., Castillo, N., Dávila, A., Angel, C. & Calvo, V. (2013). Factores de riesgo modificables de infecciones respiratorias en Hogares Infantiles y Jardines Sociales del municipio de San José de Cúcuta. *Revista Universidad y salud*, 15(1): 34 – 44.
- Pfeiffer, R. (1983). Die Aetiologie der Influenza. *Z Hyg Infektionskr.* 13:357-86.
- Perilla, M., Ajello, G., Bopp, C., Elliot, J., Facklam, R. & Knapp, J. (2003). CDC. WHO/CDS/CSR/RMD/2033.2.
- Rotta, M., Pereira, M., Cantarelli, V. & Costa, S. (2004). Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion. *Jornal de Pediatria*, 80(1): 41-48.
- Rodríguez, O., Louzado, E., Espindola, A. & Rodríguez, O. (2010). Intervención educativa sobre infecciones respiratorias agudas. *Revista Archivo Medico Camaguey*. 14 (3): 0-0. ISSN 1025-0255.
- Shereen, S., Mahbubur, R. & Mahmuda, Y. (2001). Rapid Detection of Haemophilus influenzae Type b in Bangladeshi Children with Pneumonia and Meningitis by PCR and Analysis of Antimicrobial Resistance. *Centre for Health and Population Research*, 19(4):268-274.
- Skoczynska, A., Lewandowska, M., Klarowicz, A. & Hryniewicz, W. (2004). Prevalence and Serotype Distribution of Encapsulated Haemophilus influenzae Isolates from Patients with Lower Respiratory

Tract Infections in Poland. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (2): 938-941.

- Slack, M. (2006). *Haemophilus*. In Topley & Wilson's microbiology & microbial infections. 2: 1692–1718.
- Somer, A., Salman, N., Yalcin, I. & Ağaçfidan, A. (2006). Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Istanbul, Turkey. *J Trop Pediatr*, 52:173e8.
- Stuckey-Schrock, K., Hayes, B., & Georg, C. (2012). Community-Acquired Pneumonia in Children. *American Family Physician*, 86 (7): p661.
- Takemura, N. & De Andrade, S. 2001. *Haemophilus influenzae* tipo b meningitis in the state of Parana, Brazil. *J Pediatr (Rio J)*, 77(5): 387-392.
- Ulanova, M. & Tsang, R. (2014). *Haemophilus influenzae* serotype a as a cause of serious invasive infections. *Lancet Infect Dis*. 14: 70–82.
- Vega, L., Abarca, K. & Sánchez, I. (2006). Vacuna anti-influenza en niños: Estado del arte. *Revista chilena de Infectología*, 23 (2): 164-169.
- Van den Broek, J., Verheij, T., Numans, M., & Van der Velden, A. (2014). Antibiotic use in Dutch primary care: relation between diagnosis, consultation and treatment. *J Antimicrob Chemother*, 69:1701–7.
- Wang, S., Tafalla, M., Hanssens, L. & Dolhain, J. (2017). A review of *Haemophilus influenzae* disease in Europe from 2000 – 2017: challenges, successes and the contribution of hexavalent combination vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 16(11): 1095-1105.

- Watt, J., Wolfson, L., O'Brien, K., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Levine, O., Hajjeh, R., Mulholland, K. & Cherian, T. (2009). Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 374: 903–911.
- Weltman, G., Fossati, M., Correa, C., Regueira, M. & Mollerach, M. (2005). Tipificación capsular mediante PCR de aislamientos de *Haemophilus influenzae* no tipificables por aglutinación. *Revista Argentina de Microbiología*. 37(4): 199-202.
- Winslow, C., Broadhurst, J. & Buchanan, R. (1920). The families and genera of the bacteria: final report of the committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol*, 5: 191-229.
- Yon C. (2015). Situación epidemiológica de las infecciones respiratorias agudas (IRA), neumonías y SOB (asma) en el Perú hasta la SE 17 – 2015. 24 (17): 339 – 340.

IX. ANEXOS

FICHA DE DATOS

Nombres y Apellidos:

Historia clínica:

Teléfono de contacto

Fecha de Ingreso:

Dirección:

Edad: (meses)

Sexo:

Procedencia (identificar distrito)

Fecha de toma de muestra

Tiempo de enfermedad antes del ingreso: _____ (días)

Signos y síntomas principales:	Complicaciones:	Contacto epidemiológico:
Paroxismos de tos: <input type="checkbox"/>	1. SOBA: <input type="checkbox"/>	1. Madre : <input type="checkbox"/>
Cianosis : <input type="checkbox"/>	2. Neumonía: <input type="checkbox"/>	2. Padre : <input type="checkbox"/>
Dificultad respiratoria : <input type="checkbox"/>	3. Atelectasia: <input type="checkbox"/>	3. Hermanos < 7 años : <input type="checkbox"/>
Fiebre : <input type="checkbox"/>	4. Convulsiones: <input type="checkbox"/>	Hermanos 7-10 años: <input type="checkbox"/>
Dificultad para lactar : <input type="checkbox"/>	5. Hemorragia de mucosas: <input type="checkbox"/>	Hermanos > 10 años <input type="checkbox"/>
Apnea : <input type="checkbox"/>	6. Hernia umbilical: <input type="checkbox"/>	4. Tíos: <input type="checkbox"/>
Rubicundez : <input type="checkbox"/>	7. Hernia inguinal: <input type="checkbox"/>	5. Otros: <input type="checkbox"/>
Diarrea : <input type="checkbox"/>	8. Otros: <input type="checkbox"/>	6. No refiere: <input type="checkbox"/>
Vómitos post tos: <input type="checkbox"/>	9. Ingreso a UCI: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>	
Estripor inspiratorio <input type="checkbox"/>		
Otros: <input type="checkbox"/>		

Asistencia a guardería: Si _____ No _____

Antecedentes de vacunación previa del paciente (DPT):

Nº de dosis: Estado Nutricional: _____

Hemograma:

Leucocitos: _____

Linfocitos : _____

Antibióticos recibidos previo a la toma de muestra: _____ Dosis _____ Días _____

Duración de los síntomas: _____ (días desde el ingreso)

Paroxismos de tos _____ Tos _____ Número de días hospitalizado: _____

Número de días en UCI: _____ Diagnósticos de Egreso: _____

Fallecimiento: Si _____ NO _____

Causas de fallecimiento _____

Imagen 01: Ficha de datos.

- **Detención Molecular de *H. influenzae***

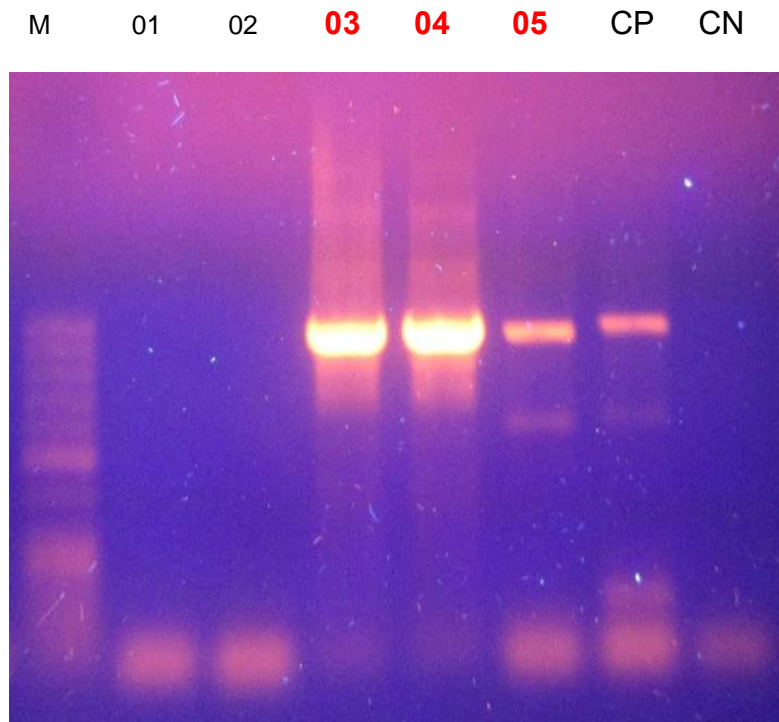


Imagen 02: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 3 muestras positivos para *H. influenzae*.

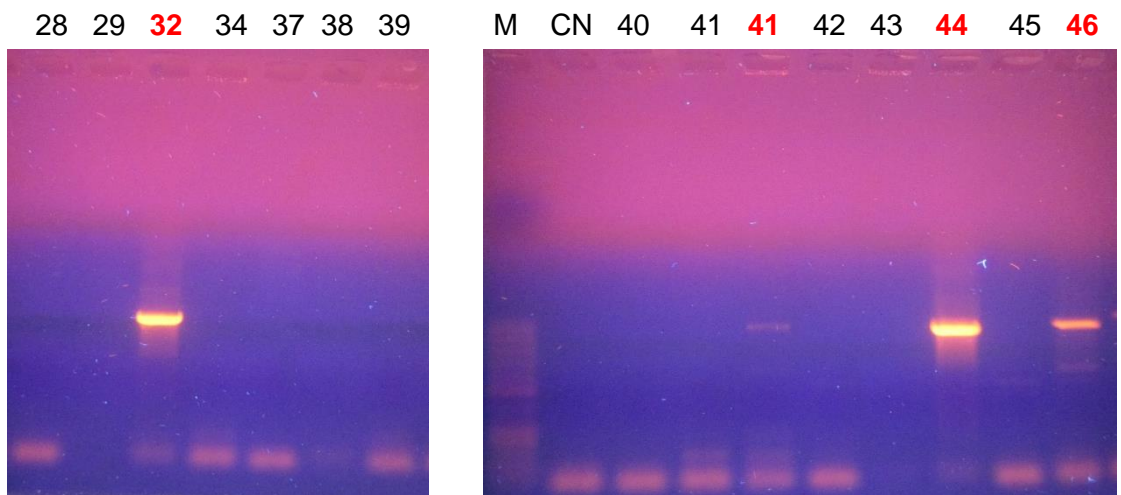
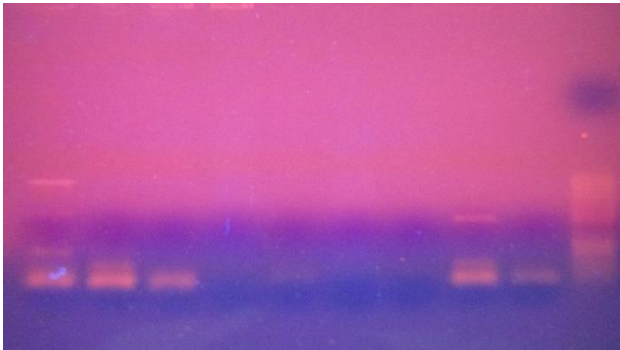


Imagen 03: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 4 muestras positivos para *H. influenzae*.

49 50 52 55 56 57 61 62 63 M



M CN 64 65 66 67 69 71 72 73 74

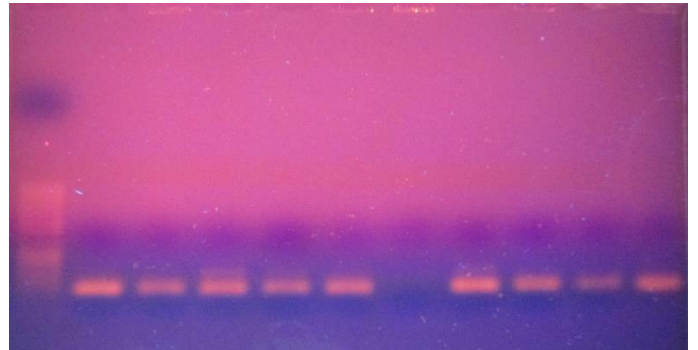
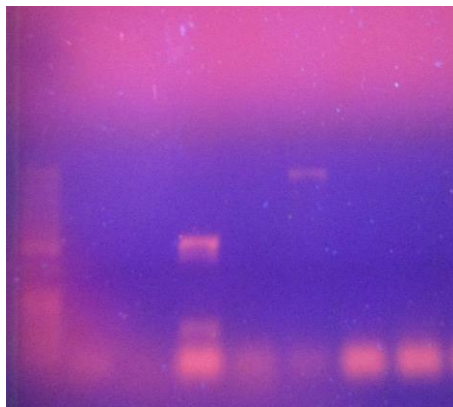


Imagen 04: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 1 muestras positivos para *H. influenzae*.

M 75 76 78 79 77 80 CN



M 81 82 83 83 84 85 86 87

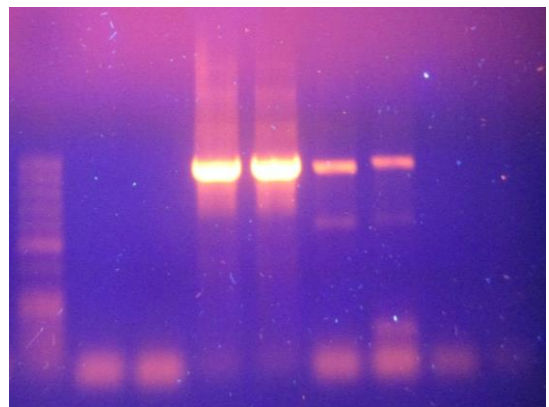
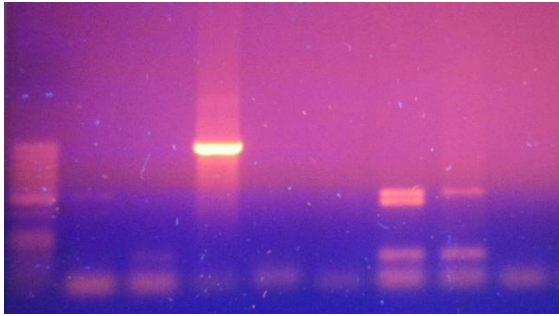


Imagen 05: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 5 muestras positivos para *H. influenzae*.

M 88 89 **90** 91 92 **93** **94** 95



CN **97** 98 **99** 100 **101** 102 103 104 M

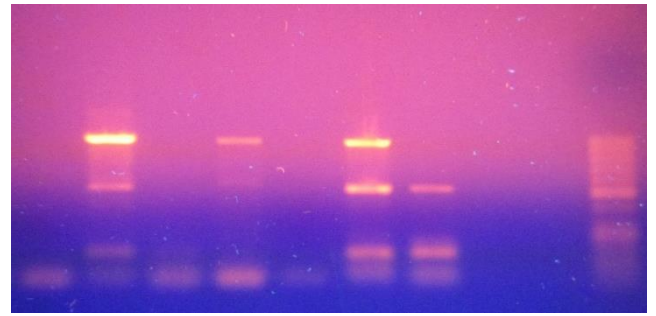
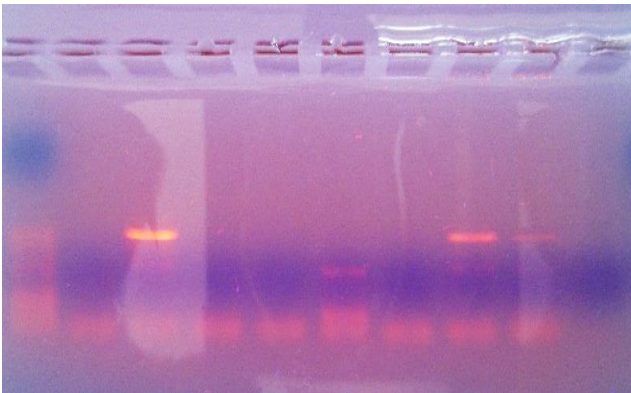


Imagen 06: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 5 muestras positivos para *H. influenzae*.

M 105 **106** 107 108 109 110 **111** **112** 115



M 116 **117** **118** 120 121 122 **123** **124** CN

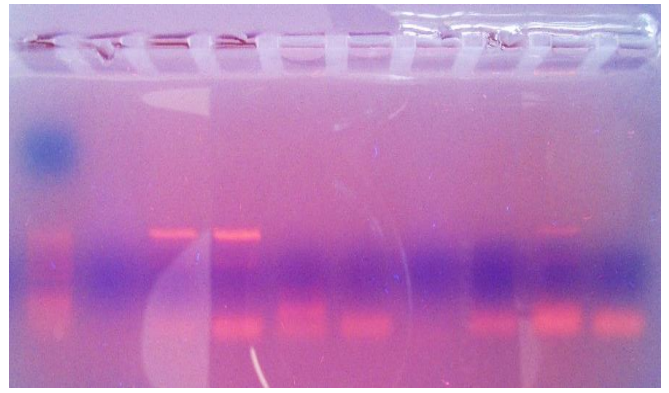
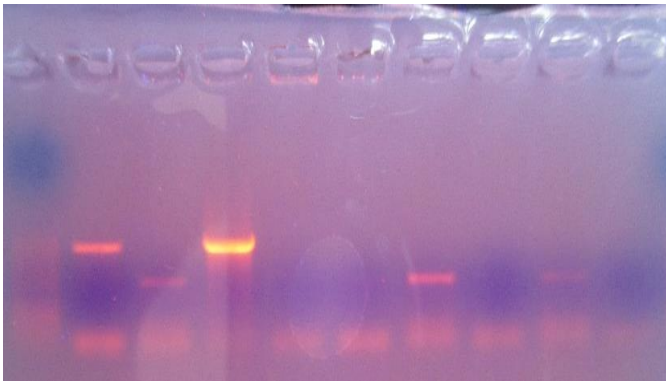


Imagen 07: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 7 muestras positivos para *H. influenzae*.

M 126 127 128 130 136 137 140 141 144



M 145 147 148 149 151 152 153 154 CN

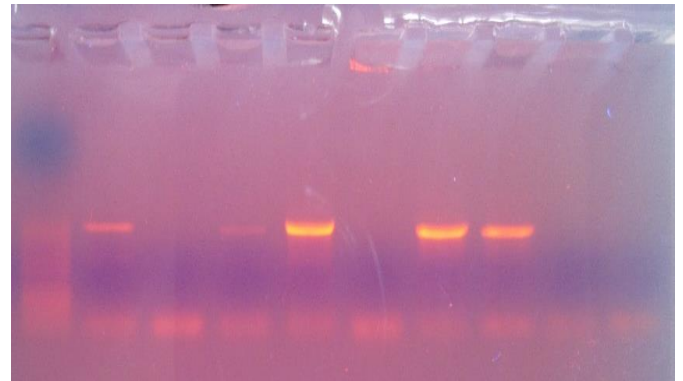
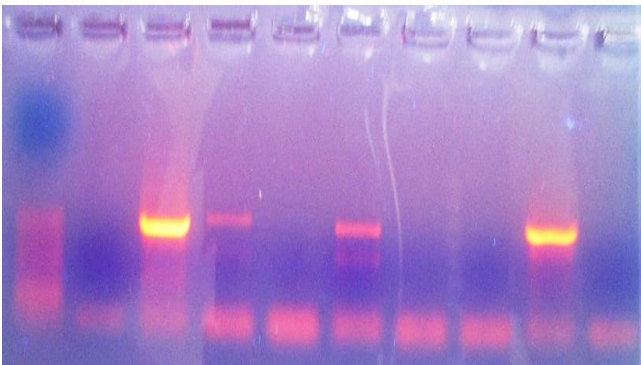


Imagen 08: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 7 muestras positivos para *H. influenzae*.

M 155 156 157 158 159 160 161 162 163



M 164 165 167 168 169 170 171 166 CN

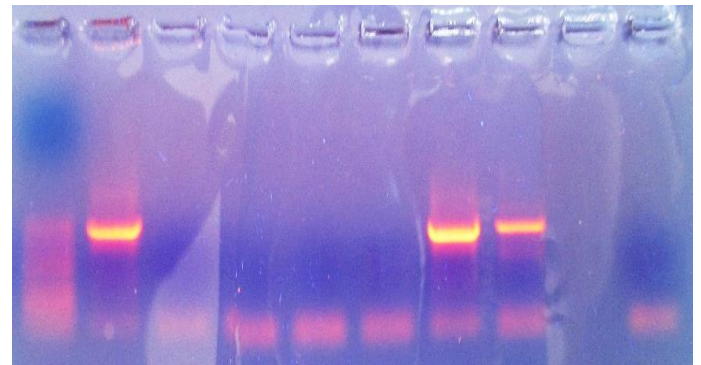


Imagen 09: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 7 muestras positivos para *H. influenzae*.

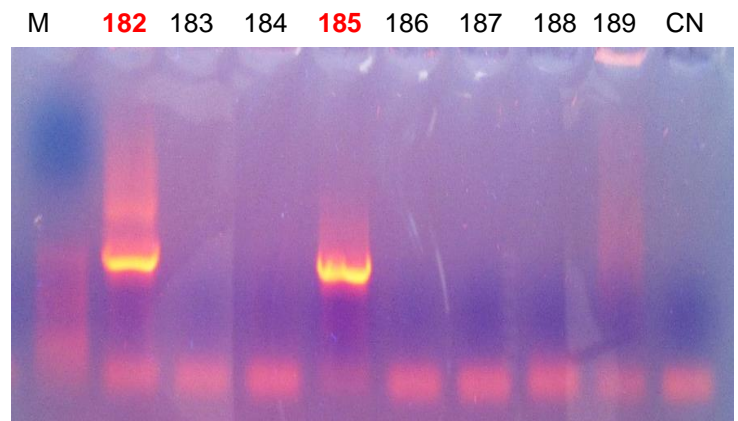
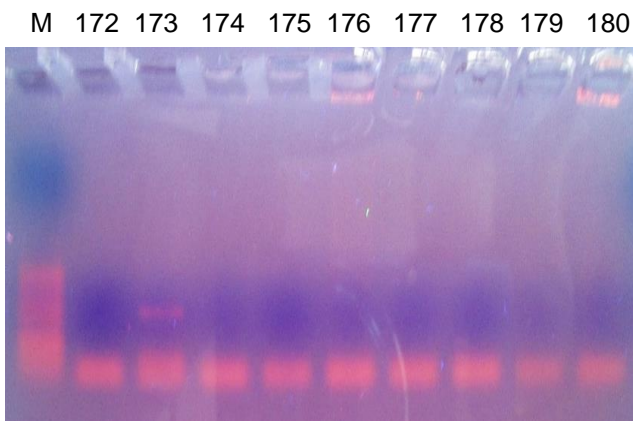


Imagen 10: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 2 muestras positivos para *H. influenzae*.

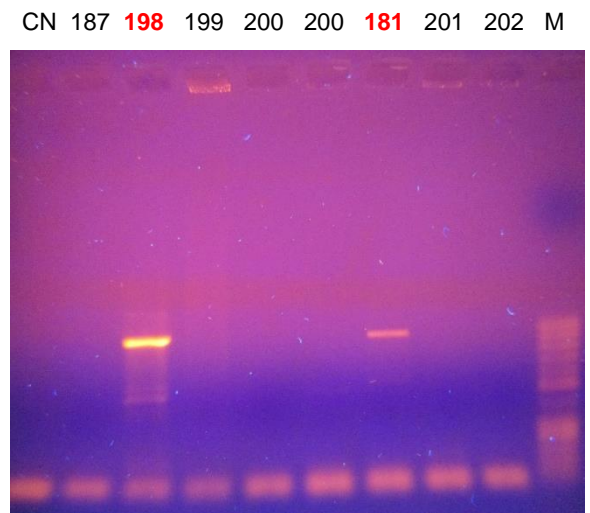
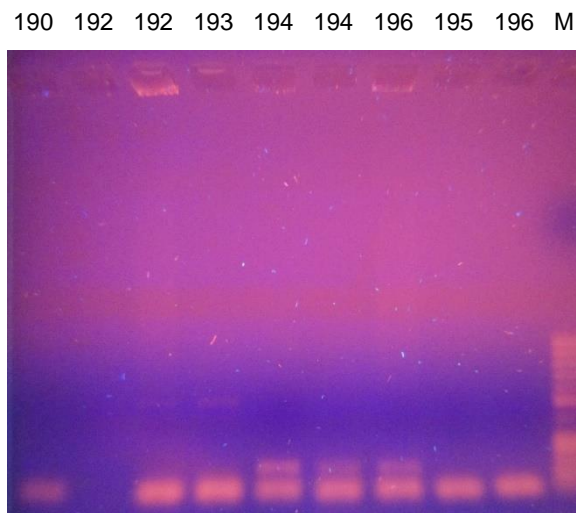


Imagen 11: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 2 muestras positivos para *H. influenzae*.

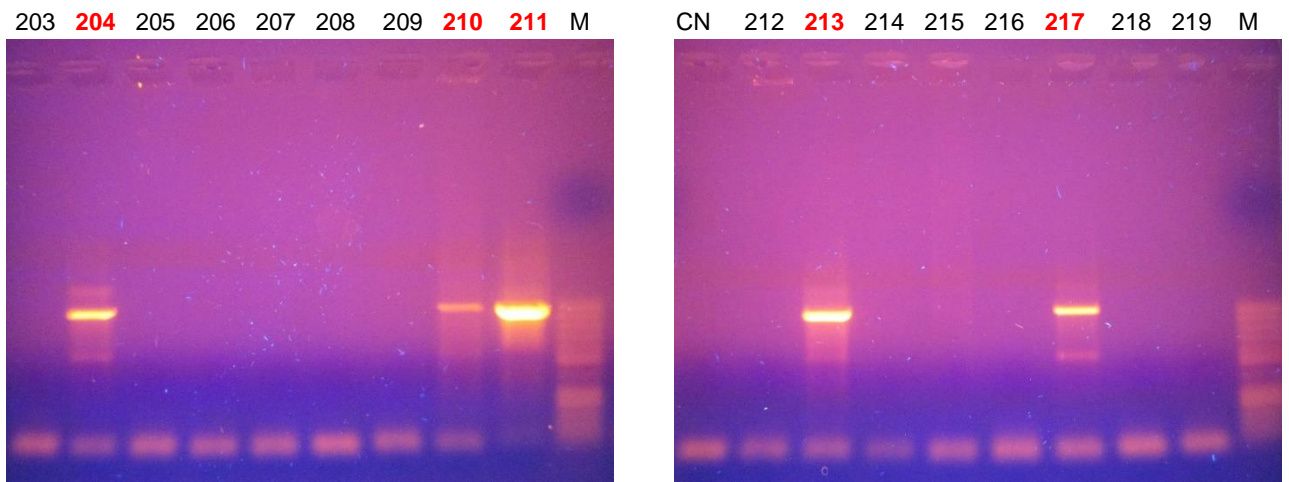


Imagen 12: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 5 muestras positivos para *H. influenzae*.

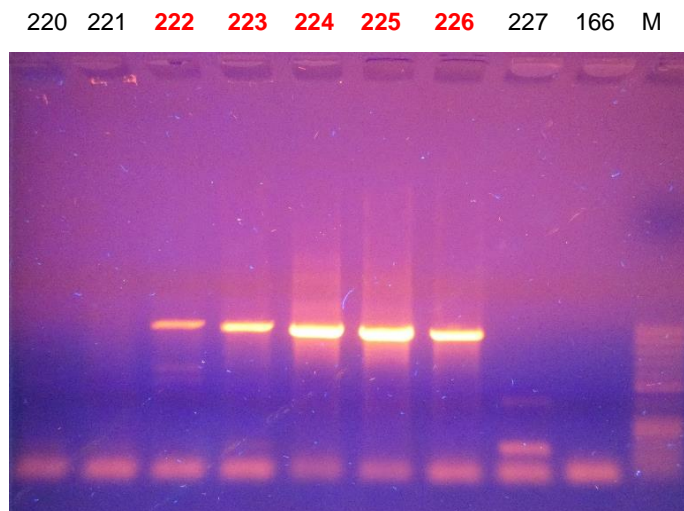


Imagen 13: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 5 muestras positivos para *H. influenzae*.

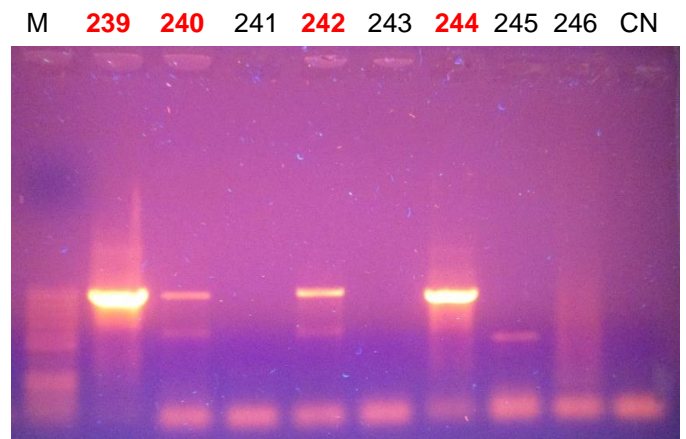
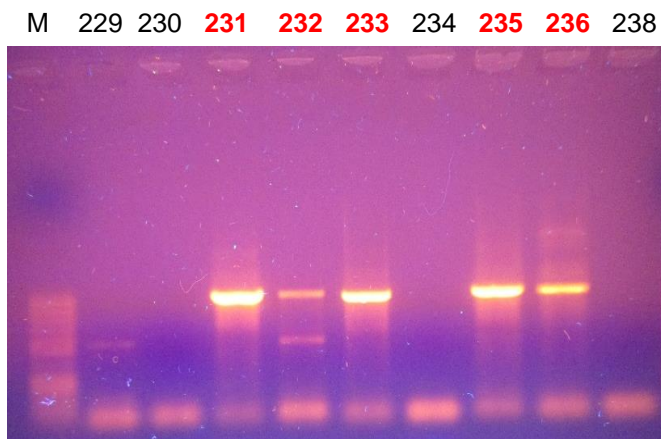


Imagen 14: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 9 muestras positivos para *H. influenzae*.

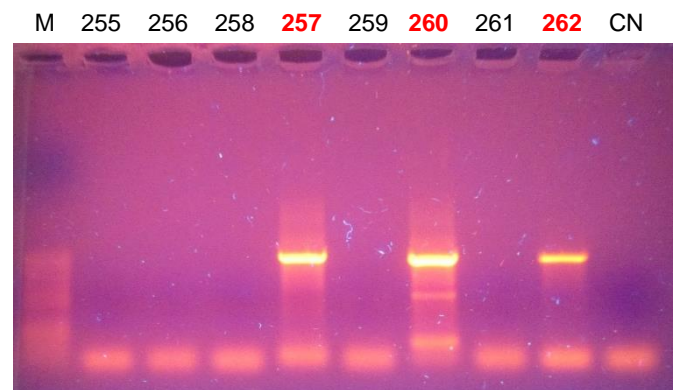
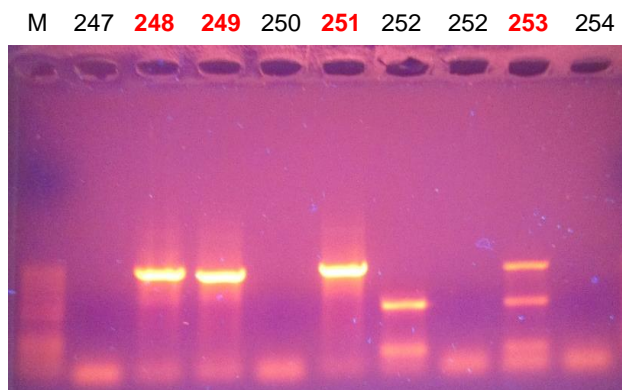


Imagen 15: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 7 muestras positivos para *H. influenzae*.

M CN 263 264 265 266 267 268 269 270 271

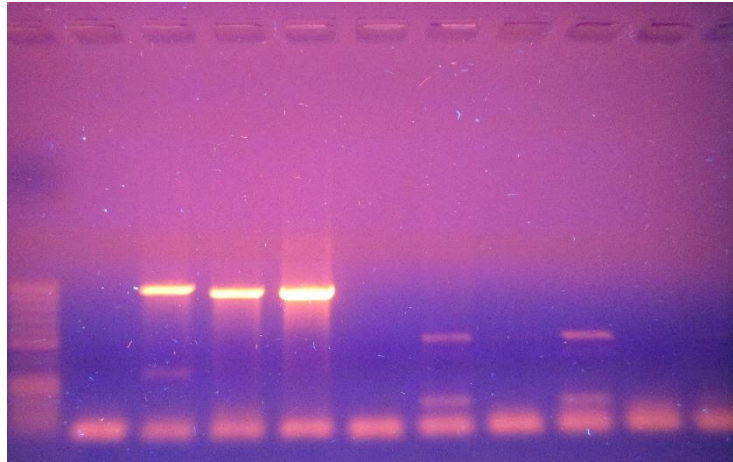
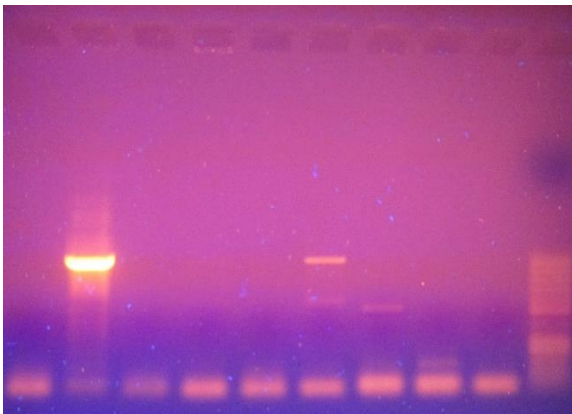


Imagen 16: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 3 muestras positivos para *H. influenzae*.

272 273 274 275 276 277 278 279 280 M



M CN 281 282 283 284 285 286 287 288 289

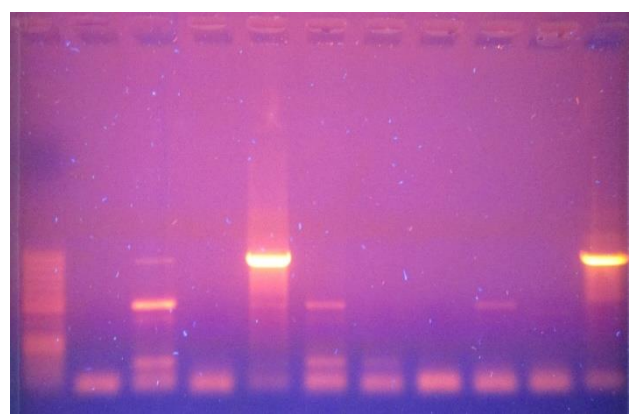
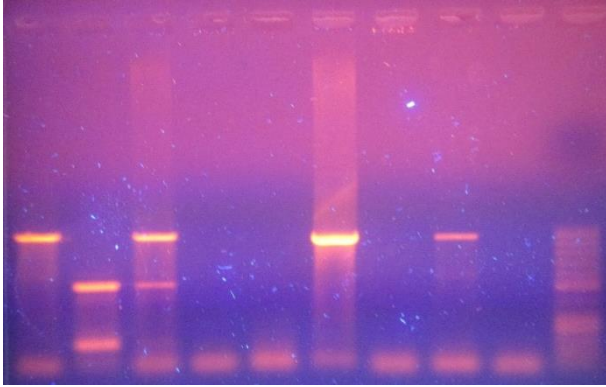


Imagen 17: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 5 muestras positivos para *H. influenzae*.

291 292 293 294 295 296 297 298 299 M



M 301 302 303 304 306 307 308 310 311 CN

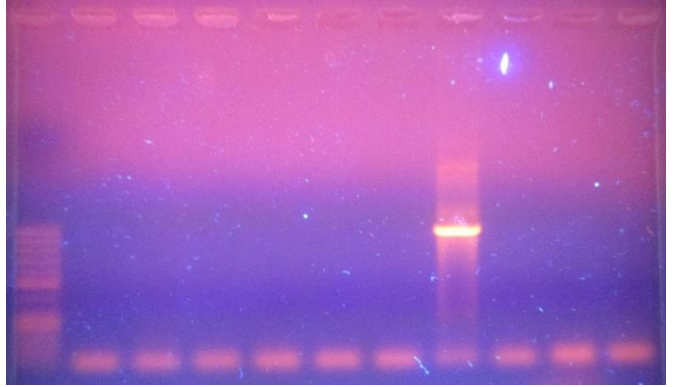
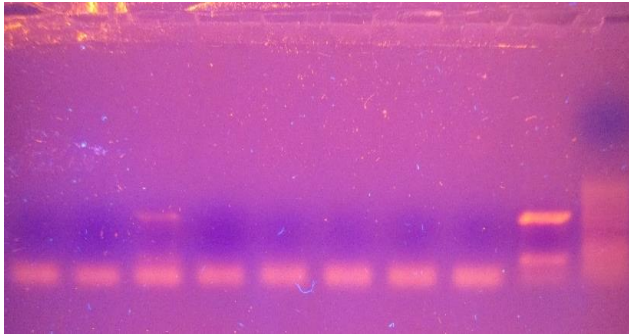


Imagen 18: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 5 muestras positivos para *H. influenzae*.

358 359 360 361 362 363 364 365 357 M



M 366 367 368 370 371 372 373 374 375 CN

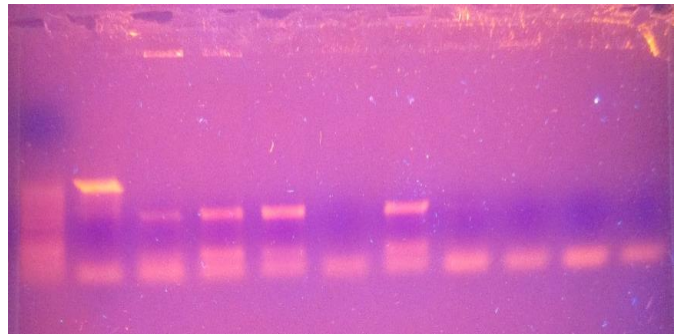
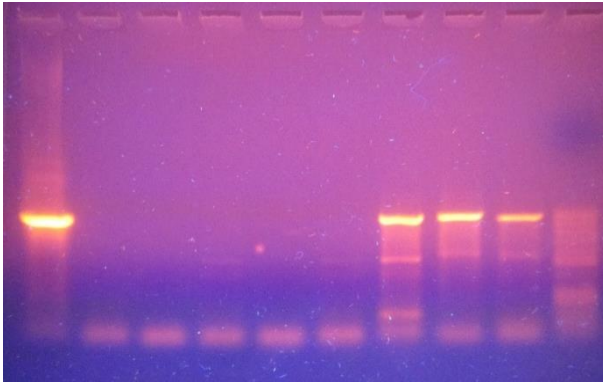


Imagen 19: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 1 muestras positivos para *H. influenzae*.

312 315 316 317 319 320 321 322 323 M



M 327 324 325 328 329 330 331 332 333 CN

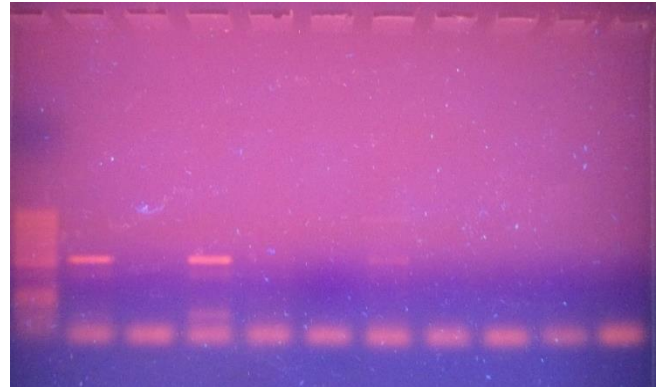
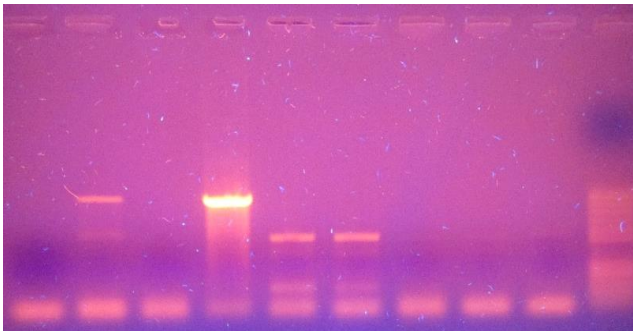


Imagen 20: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 5 muestras positivos para *H. influenzae*.

376 377 378 379 380 382 383 384 385 M



M 386 387 388 389 391 392 393 394 395 CN

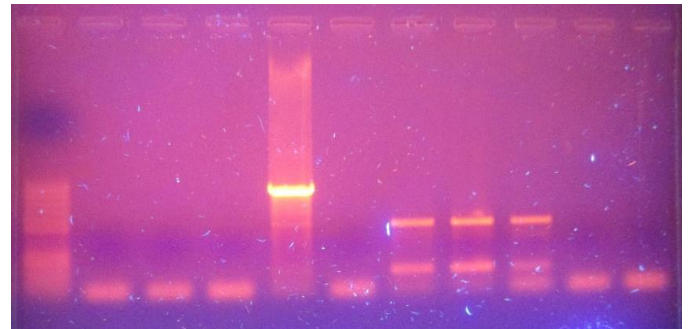


Imagen 21: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 3 muestras positivos para *H. influenzae*.

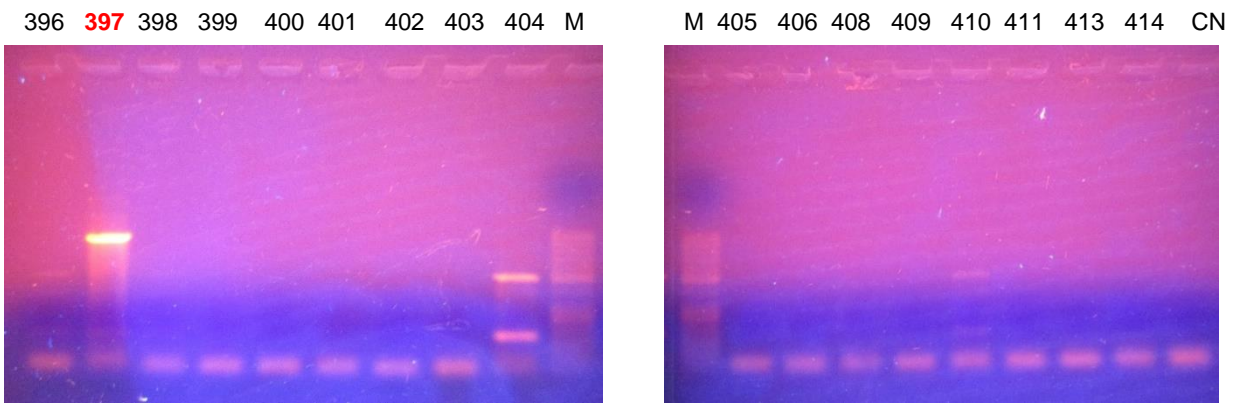


Imagen 22: Electroforesis de agarosa al 1% para la detección de *H. influenzae*. Tamaño del producto amplificado es de 1000pb. Se observa 1 muestras positivos para *H. influenzae*.

- **Detección Molecular de *H. influenzae* Tipificable**

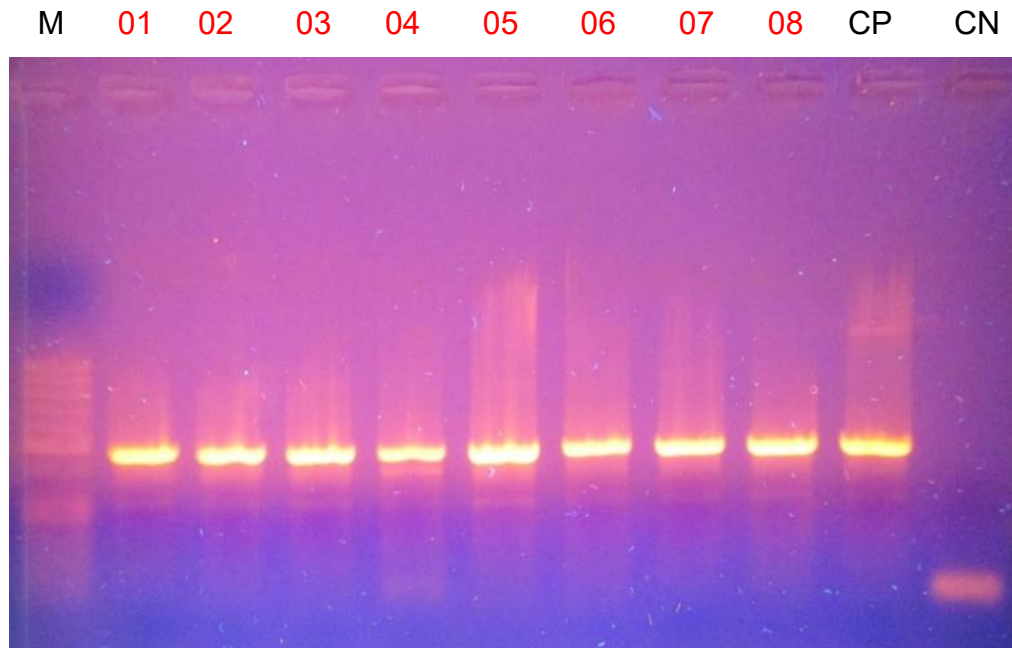


Imagen 23: Electroforesis de agarosa al 1.5 % para la detección de *H. influenzae* Tipificable Tamaño del producto amplificado es de 483pb. Se observa 8 muestras positivas.

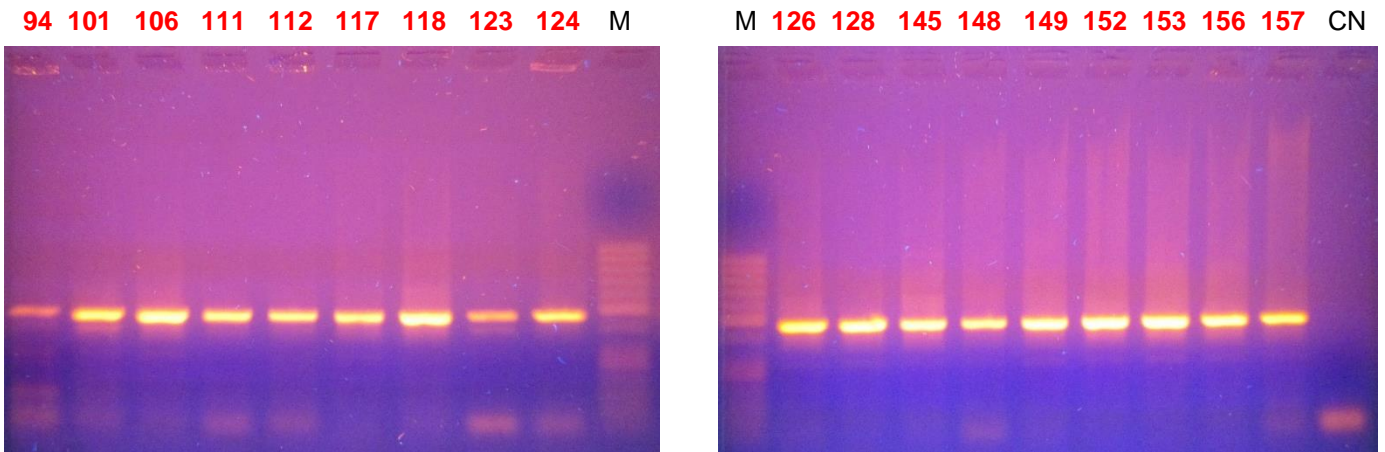


Imagen 24: Electroforesis de agarosa al 1.5 % para la detección de *H. influenzae* Tipificable Tamaño del producto amplificado es de 483pb. Se observa 18 muestras positivas.

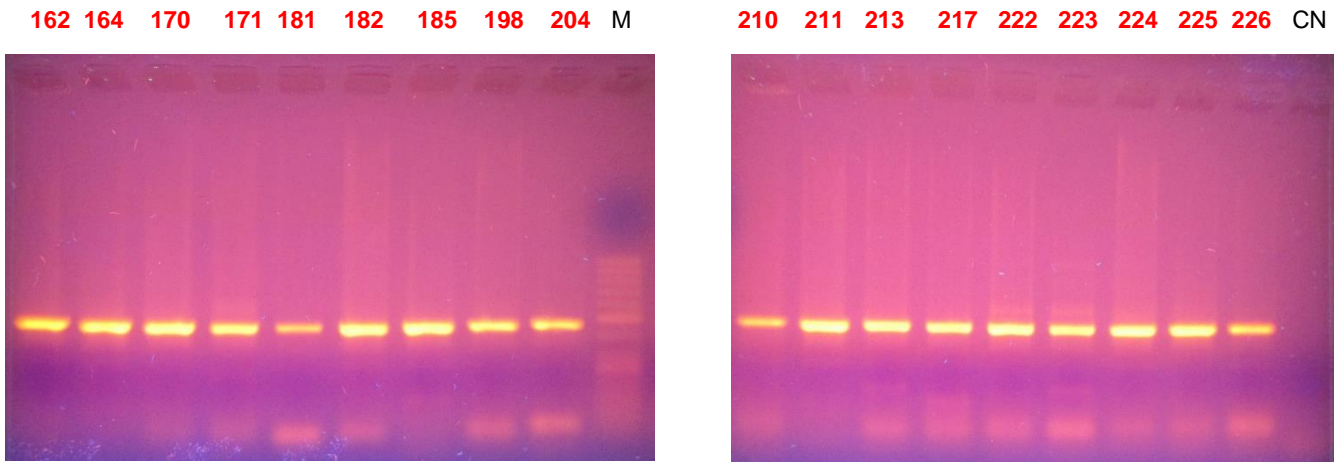


Imagen 25: Electroforesis de agarosa al 1.5 % para la detección de *H. influenzae* Tipificable Tamaño del producto amplificado es de 483pb. Se observa 18 muestras positivas.

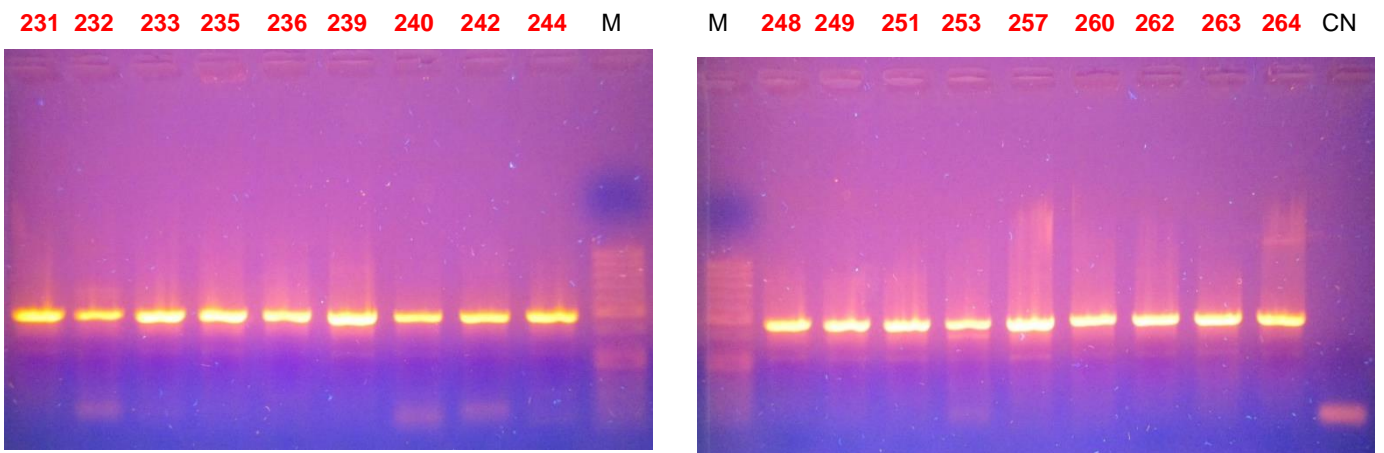


Imagen 26: Electroforesis de agarosa al 1.5 % para la detección de *H. influenzae* Tipificable Tamaño del producto amplificado es de 483pb. Se observa 18 muestras positivas.

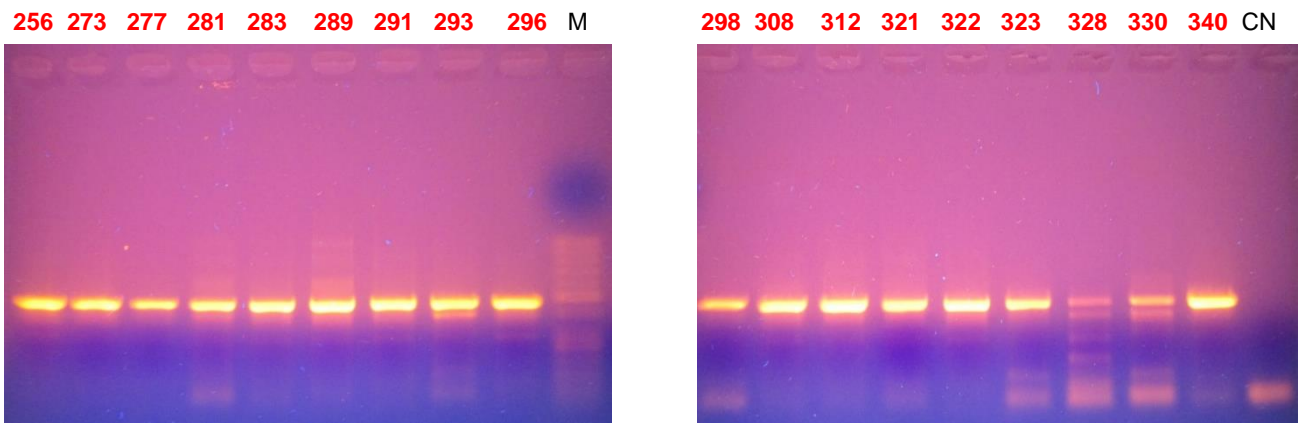


Imagen 27: Electroforesis de agarosa al 1.5 % para la detección de *H. influenzae*. Tipificable. Tamaño del producto amplificado es de 483pb. Se observa 18 muestras positivas.

- **Detección Molecular de *H. influenzae* NO Tipificable**

159 **342** 345 149 177 123 M

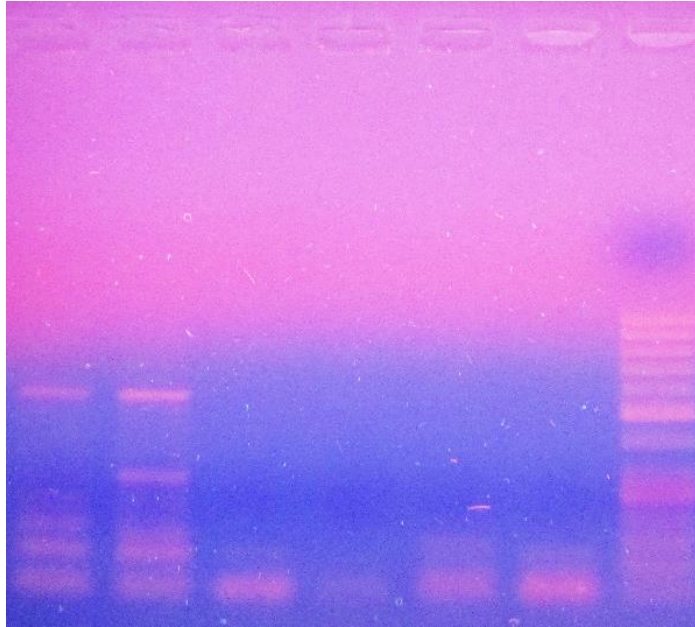


Imagen 28: Electroforesis de agarosa al 1.5 % para la detección de *H. influenzae* No-tipificable. Tamaño del producto amplificado es de 550pb. Se observa 2 muestras positivas.

- **Detección Molecular de *H. influenzae* Tipificable tipo b.**

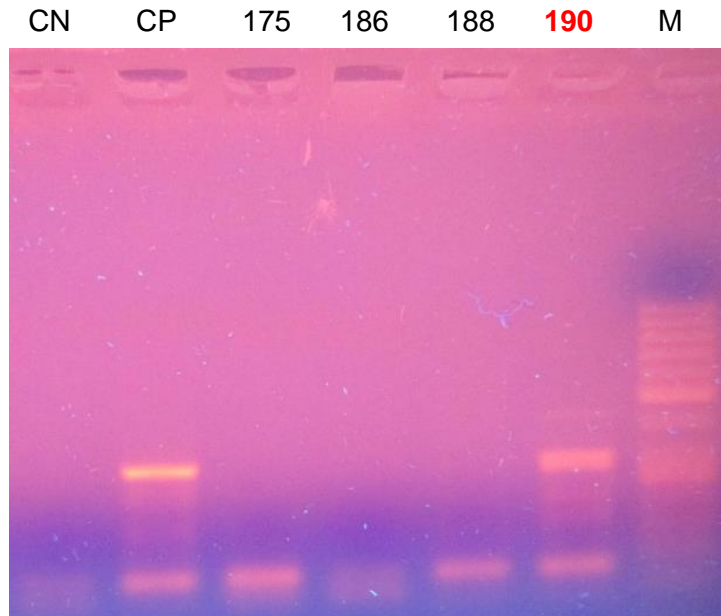
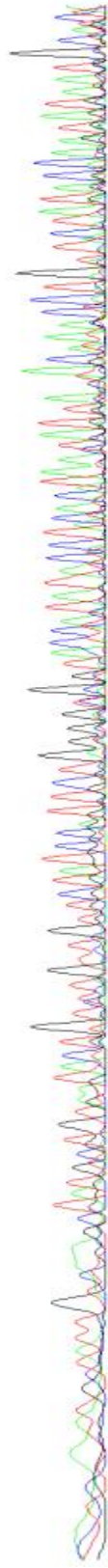


Imagen 29: Electroforesis de agarosa al 2.0 % para la detección de *H. influenzae* Tipificable tipo b. Tamaño del producto amplificado es de 310pb. Se observa 2 muestras positivas.

10 GCAATGGGATATGCTATTGTCAAGCTATGCTGTAACTGTTTGTGTTCTAICCATTCI GGGGTGGTACCA TATACCTCACTAATATTAGCAAA CCTGTTCTATACCAATATAATGCACA 120



130 GGTAACACTTCGTAATTTTGGTGGTTCATTACCATATGTGTTTCTGGTATATTTAACAGCTGTGACATTAGTTTGGACACTGTTAATCTGTTTTTCCACATTTAAACCTAATTAGCAGCGCA 240



250 TAA GCACGCCCTCTGCACATGTTAAACATTGGCAATGGGCATATATGCTATAGGGCTGTATT 300



Imagen 30: Cromatograma, secuenciación en MacroGen.