

Haemophilus influenzae: Caracterización de aislamientos recuperados de enfermedades invasivas en Cuba durante el período 2008-2011

Gilda Torano,^{1*} Dayneris Menéndez,¹ Alina Llop,¹ Félix Dickinson,¹ Marlén Varcárcel,² Miriam Abreu,¹ Neibis Pinto¹

¹ Laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus*, Instituto "Pedro Kourí" (LNRH-IPK). Autopista Novia del Mediodía km 6½, La Habana, Cuba.

² Dirección Nacional de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública, Cuba.

email: gilda@ipk.sld.cu

Con el objetivo de caracterizar los aislamientos de *Haemophilus influenzae*, responsables de enfermedades invasivas en Cuba, en la etapa posterior a la vacunación se estudió el total de los recuperados durante el período 2008-2011, remitidos al Instituto "Pedro Kourí" desde diferentes provincias del país. La confirmación de especie y determinación de serotipos se realizó atendiendo al requerimiento de los factores V y X y empleando el método de aglutinación en lámina, respectivamente. Se definieron los biotipos a través de las pruebas de indol, urea y ornitina; se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la prueba del elipsómetro para la ampicilina, la ceftriaxona, el cloranfenicol y la rifampicina. Para 23 aislamientos se corroboró la identificación como *H. influenzae*: 21 fueron serotipables y 2 no tipables (HNT). El 90,4% de los serotipables fueron serotipo b y se detectaron dos serotipos a. Nueve aislamientos de *H. influenzae* b pertenecieron al biotipo I y los aislamientos, serotipo a y HNT, al biotipo II. En una cepa se demostró producción de la enzima β -lactamasa y resistencia para la ampicilina y el cloranfenicol, con valores de CMI = 8 y 12 μ g/mL, respectivamente. Se puso en evidencia que a pesar de la disminución de la incidencia de la enfermedad invasiva por Hib, este serotipo aún constituye el más frecuente y se alerta sobre la necesidad de una vigilancia sostenida que permita detectar fallos vacunales. La susceptibilidad antimicrobiana demostrada para este período pudiera considerarse como un beneficio adicional de la introducción de la vacunación en Cuba.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae* b, meningitis, vacunación.

Introducción

En Cuba, la vigilancia de las meningitis bacterianas (MB) se inicia en la década de los años 1960 y desde entonces se consideran enfermedades de declaración obligatoria. Entre 1993 y 1998 se notifican 334 casos de meningitis por *Haemophilus influenzae* b (Hib) en menores de un año y 352 casos en niños entre 1 y 4 años de edad, con tasas de incidencia entre 33,7 y 8,6/100 000 habitantes, respectivamente. Hib constituye en ese período el principal agente causal de la MB en los niños menores de cinco años de edad, por lo que en 1999 el Ministerio de Salud Pública (MINSAP) de Cuba incluye en el Programa Nacional de Inmunización (PNI) una vacuna conjugada contra este microorganismo (1, 2).

La estrategia consistió en vacunar a todos los nacidos entre enero de 1998 y octubre de 1999, siguiendo de forma simultánea las tácticas de campaña y el programa. En una segunda etapa se incluyeron a los nacidos entre enero y octubre de 1998 y en la segunda estrategia, a todos los nacidos a partir de noviembre de 1998 y hasta octubre de 1999. La vacuna administrada fue VaxemHib, comercializada por la Chiron, Italia (3).

Luego de la implementación de la vacunación se observa una disminución importante del número de casos de meningitis por Hib, la mayor reducción se observa (70,5%) en los niños menores de un año hacia finales de 2001 (incidencia de 0,1/100 000 habitantes, efectividad de 99%). Para alcanzar estos indicadores el Estado cubano invierte 2,4 millones de dólares cada año en la compra de las dosis necesarias (3).

En el año 2003, tras cumplimentar los ensayos clínicos requeridos, se sustituye la vacuna conjugada convencional en el PNI, por una vacuna conjugada obtenida en Cuba a partir de la síntesis química del polisacárido capsular de Hib (Quimi-Hib) (4). A partir del año 2006 y hasta la fecha, se introduce y aplica la vacuna Heberpenta, producida en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), con la que se logra la administración de Quimi-Hib en combinación con las vacunas para prevenir la difteria, el tétano, la tos ferina (DPT) y la hepatitis B (comunicación personal, Galindo y Valcárcel, PNI, MINSAP).

Después de 13 años de introducida la vacunación contra Hib en Cuba, la notificación de enfermedad invasiva (EI) por este microorganismo disminuye de forma significativa, aunque todavía se notifican algunos casos. En consecuencia y

* Licenciada en Microbiología, Doctora en Ciencias de la Salud, Investigadora y Profesora Titular, LNRH-IPK.

teniendo como premisa posibles cambios en la frecuencia de los serotipos capsulares y de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *H. influenzae*, el Laboratorio Nacional de Referencia para *Haemophilus* del Instituto “Pedro Kouri” (LNRH-IPK) condujo el presente estudio.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio observacional prospectivo en el marco de la vigilancia microbiológica activa que realiza el LNRH-IPK, sobre los principales agentes etiológicos de meningitis y neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad. Se incluyeron todos los aislamientos de *Haemophilus* remitidos al IPK por las diferentes provincias del país, desde enero de 2008 hasta diciembre de 2011.

Identificación de las especies y determinación de los serotipos

Para la confirmación de la identificación de *H. influenzae* los aislamientos se replicaron en placas de agar chocolate y de agar sangre con satelitismo y se incubaron durante 18-24 h a 37 °C, en atmósfera con 5% de CO₂ (5). Los cultivos sugerentes de pertenecer a este género se sembraron en dos placas de agar chocolate con suplemento de crecimiento para *Haemophilus* (Abtek, Biologicals Ltd), que se incubaron bajo las mismas condiciones antes descritas.

El crecimiento obtenido en una de las placas se utilizó para realizar las pruebas de identificación y caracterización, mientras que la biomasa obtenida en la segunda placa se recogió con hisopo estéril, se descargó en un tubo de triptona soya con 15% de glicerol y se dispuso en alícuotas para la conservación de cada aislamiento a -70 °C.

Para la identificación de especie se determinaron los requerimientos de los factores V y X sobre placas de agar Mueller-Hinton (MH) (Oxoid), empleando discos impregnados con los factores V y X (Abtek, Biologicals Ltd.). Se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 18-24 h. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia *H. influenzae* tipo b ATCC 49629. Para aquellos aislamientos que no se confirmaron, como *Haemophilus*, se procedió a la identificación mediante el sistema automatizado VITEK 2 (Compact Biomérieux, Francia).

Los serotipos se determinaron mediante el método de aglutinación en lámina con el antisero polivalente y los monovalentes diseñados contra los diferentes serotipos (Difco *Haemophilus influenzae Antiserum type b*, BD, USA).

Cuando no se produjo aglutinación frente al antisero polivalente el aislamiento en cuestión se clasificó como no capsulado o *H. influenzae* no tipable (HNT). Como control positivo se utilizó la cepa de referencia *H. influenzae* tipo b ATCC 49629.

Caracterización de los aislamientos

Se realizó de acuerdo con la clasificación en biotipos y los resultados del estudio de la susceptibilidad antimicrobiana. Para la determinación del biotipo se siguió el esquema de clasificación propuesto por Kilian, en función de los resultados frente a las pruebas bioquímicas: producción de indol, hidrólisis de la urea y descarboxilación de la ornitina (6). Se utilizaron como controles las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 49132 y *H. influenzae* biotipo I y biotipo IV. Estas últimas pertenecientes a la colección de cultivos del LNRH-IPK.

Para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana se investigó la producción de la enzima β-lactamasa mediante el método de la Nitrocefina Cromógena, siguiendo las indicaciones del fabricante (Oxoid); se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la prueba del elipsómetro o *E-Test* (siglas en inglés de *Epsilometric Test*) para la ampicilina, la ceftriaxona, el cloranfenicol y la rifampicina (AB BIODISK, Suiza). Para ello se utilizaron placas de *Haemophilus Test Medium* (HTM) (Oxoid) con suplemento para el crecimiento de *Haemophilus* (Abtek, Biologicals Ltd.) (10 mL/L de medio), y se partió de suspensiones en solución salina estéril de cada uno de los aislamientos, con concentraciones equivalentes a 1x10⁸ UFC/mL.

Las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 18-24 h. Se utilizó como control positivo la cepa de referencia *H. influenzae* tipo b ATCC 49629. Para informar los patrones de susceptibilidad frente a los antimicrobianos investigados se siguieron los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (5, 7).

Recopilación de la información clínico-epidemiológica

Se pesquisaron en forma retrospectiva a los pacientes en quienes se consignó el diagnóstico de EI por *Haemophilus* durante el período de estudio. En los casos de MB se obtuvieron los datos del Sistema de Vigilancia Nacional de Síndromes Neurológicos Infecciosos que lleva a cabo la Subdirección de Epidemiología del IPK y el MINSAP.

Para los aislamientos recuperados de neumonías, como estas no constituyen enfermedades de declaración obligatoria, los datos se solicitaron al hospital donde ingresó el paciente. También fue útil la información reflejada en el modelo que acompañó a cada cepa recibida: “Muestras para diagnóstico microbiológico o envío de cepas para el trabajo de referencia nacional en el IPK”. En todos los casos se obtuvieron los datos siguientes: variables demográficas (edad, sexo, procedencia y fecha); antecedentes médicos (manifestaciones clínicas, sitio de recuperación de la bacteria) y número de dosis de vacuna anti-Hib recibidas.

La información clínica y epidemiológica se introdujo en una base de datos diseñada al efecto, mediante el programa Excel, Microsoft Office 2010. Se describen los aislamientos, los serotipos y biotipos detectados y la susceptibilidad antimicrobiana.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se recogen los aislamientos de *Haemophilus* realizados en las diferentes provincias cubanas y que fueron remitidos al LNRH-IPK para su confirmación. Se describen por año de estudio y tipo de EI. Del total de recibidos, 24 fueron viables; 20 se recuperaron de pacientes con meningitis bacterianas y cuatro se obtuvieron de procesos no meníngeos: tres neumonías y una endocarditis.

Tabla 1. Distribución de los aislamientos recibidos en el LNRH-IPK por año de estudio y tipo de enfermedad invasiva para confirmar el diagnóstico de *Haemophilus*.

Año	No. aislamientos			
	Recibidos	Viables	Meningitis	Neumonía
2008	2	1	1	-
2009	5	4	4	-
2010	15	13*	9	3
2011	7	6	6	-
Total	29	24	20	3

* Un aislamiento se recuperó de una endocarditis a partir de un hemocultivo realizado a un paciente de 63 años de edad. El microorganismo se identificó como *Gemella haemolisans*.

Aunque no se refleja en la Tabla, es oportuno señalar que entre los cinco aislamientos no viables, tres procedían de meningitis y dos de neumonías, de modo que en el transcurso del estudio solo seis de los aislamientos recibidos provenían de procesos no meníngeos (cinco neumonías y una endocarditis). En cambio, predominaron los aislamientos recuperados de procesos meníngeos, lo que obedece a que el Programa Nacional de Síndromes Neurológicos Infecciosos (SNI) estipula la remisión al Laboratorio Nacional de Referencia del IPK, del 100% de los microorganismos aislados en los casos de meningitis adquiridas en la comunidad (3).

No obstante a esta regulación, la depresión que experimentó la red de laboratorios de microbiología del país durante los años precedentes a este estudio, repercutió de forma negativa en la vigilancia de *Haemophilus*, un microorganismo para el que aún en condiciones óptimas se dificulta el aislamiento. De manera general, el bajo porcentaje de recuperación e identificación de los agentes responsables de SNI en la red de laboratorios hace difícil establecer la incidencia de las meningitis por *Haemophilus* en Cuba, luego de la introducción de la vacunación (8, 9).

Se confirmó la identificación de *H. influenzae* en 23 aislamientos; no hubo coincidencia para un caso remitido con el diagnóstico presuntivo de *Haemophilus aphrophilus*, para el cual el propio laboratorio del hospital de procedencia

tuvo dudas con el diagnóstico. Este microorganismo se identificó como *Gemella haemolisans* y se especifica en la Tabla 1 como recuperado a partir de una endocarditis bacteriana en el año 2010.

La identificación de *G. haemolisans* a través de los métodos convencionales del Laboratorio de Microbiología es difícil, para ello se requieren métodos automatizados y moleculares (10, 11). No obstante, la ausencia del fuerte olor picante a indol que se describe para *H. influenzae* y el desarrollo de un crecimiento confluyente en toda la placa de agar MH durante la prueba de requerimiento de los factores V y X, sugirió en el LNRH-IPK una identificación incorrecta que se pudo corregir a través del sistema automatizado VITEK 2. Este error del laboratorio de procedencia, justificable por lo antes señalado, permitió constatar una infección severa por *G. haemolisans* en Cuba, no descrita con anterioridad en el país.

Entre los 23 aislamientos identificados como *H. influenzae*, 21 fueron serotipables y dos se clasificaron como HNT. La mayoría de los aislamientos investigados (19 cepas) pertenecieron al serotipo b (90,4%), dos se clasificaron como *H. influenzae* serotipo a (Hia). Este último hallazgo se correspondió con lo observado por otros estudios internacionales, en los que los informes de EI por este serotipo son infrecuentes en la etapa posvacunal. En cambio, difiere de otros como, por ejemplo, un estudio en Manitoba, Canadá, que demostró 29% de aislamientos de Hia en pacientes entre 3 y 59 años de edad, en una serie de 122 casos de EI.

De igual forma, la recuperación de dos aislamientos de HNT coincidió con los resultados de otras investigaciones conducidas internacionalmente durante la etapa posterior a la vacunación contra Hib, que señalan un incremento de los aislamientos no tipables como responsables de EI (12, 13). En Cuba, los estudios del LNRH-IPK en la década de los años 1990 señalan a *H. influenzae* como el principal patógeno causante de MB en los niños menores de cinco años de edad y al serotipo b como el más involucrado en los procesos invasivos y entre los portadores nasales y faríngeos (1, 2).

En el período 2000-2005, 100 aislamientos remitidos desde las diferentes provincias del país, recuperados de hemocultivos y de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) se confirmaron como Hib en el IPK; pero a partir del año 2006, como una consecuencia de la disminución drástica del envío de cepas al Laboratorio de Referencia, la vigilancia se fundamentó en datos epidemiológicos (14, 15).

A pesar de la imposibilidad de estudiar todos los aislamientos de *Haemophilus* recuperados de EI a lo largo del país, tras la introducción de la vacunación contra Hib, por las dificultades confrontadas con el diagnóstico en la red de laboratorios, previamente discutidas, la incidencia de las MB por este agente se mantiene baja y no se demuestra un incremento de la circulación de serotipos diferentes al b o de HNT.

Aunque el número de aislamientos estudiados es escaso con relación a la etapa prevacunacional, estos constituyen el total de los recibidos y los resultados de su estudio no denotan cambios en la proporción de los serotipos responsables de enfermedad. No obstante, es imprescindible mantener una estricta vigilancia para detectar cambios subsiguientes a la vacunación, tanto en lo relativo a la distribución de los serotipos, como a las variaciones en la expresión de los polisacáridos capsulares.

En este sentido, la detección de aislamientos de HNT representa un resultado interesante que deberá seguirse de cerca, pues podría obedecer al hecho de que existen aislamientos que a pesar de presentar el gen capsular específico de tipo b, no expresan el polisacárido correspondiente y por eso se les denomina *H. influenzae* b-. Se especula que la utilización de la vacuna conjugada contra Hib podría producir un aumento en la incidencia de EI asociadas a estas cepas y que la ausencia del antígeno aglutinante podría llevar a una subestimación de su incidencia y consecuentemente, a una sobrestimación de la eficiencia de la vacunación (16).

En la Tabla 2 se muestra la relación entre los serotipos y biotipos de los aislamientos de *H. influenzae* estudiados. Se identificaron cinco biotipos de los ocho descritos: los dos aislamientos del serotipo y los dos de HNT pertenecieron al biotipo II, mientras que nueve de los clasificados como Hib pertenecieron al biotipo I.

Tabla 2. Distribución de los aislamientos recibidos en el LNRH-IPK por año de estudio y tipo de enfermedad invasiva para confirmar el diagnóstico de *Haemophilus*.

Serotipos	Biotipos								Total
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
a	-	2	-	-	-	-	-	-	2
b	9	3	-	1	3	-	-	3	19
HNT	-	2	-	-	-	-	-	-	2
Total	9	7	-	1	3	-	-	3	23

La utilidad de la clasificación en biotipos es muy discutida; mientras algunas investigaciones ponen en duda su escaso valor epidemiológico, otras plantean variaciones en los biotipos circulantes y algunas sostienen que guardan relación con la fuente de aislamiento. Los resultados de este estudio no permitieron demostrar ni descartar cambios con respecto a la etapa anterior a la introducción de la vacunación en Cuba, pero es constante en ambos períodos la presencia de los biotipos I y II y notable la aparición de aislamientos Hib biotipo VIII, no notificado en el período prevacunacional (1, 2). La determinación de los biotipos circulantes constituye un elemento que debe considerarse en la estrategia de vigilancia epidemiológica que se siga en Cuba, pues la vacuna que se administra en el país para conferir protección frente a las EI por Hib (Heberpenta, CIGB) no tiene precedentes en el mundo. Todos los datos epidemiológicos reunidos hasta el

presente, luego de la introducción de la vacunación contra este microorganismo, proceden de la observación y experiencia acumulada con la administración de vacunas conjugadas obtenidas por métodos convencionales.

Los resultados del estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos puso de manifiesto que un aislamiento (4,3%) era productor de la enzima β -lactamasa y resistente a la ampicilina y el cloranfenicol, con valores de CMI de 8 y 12 μ g/mL, respectivamente. Este se correspondió con un aislamiento Hib biotipo I, recuperado de una meningitis bacteriana. Para los demás aislamientos los valores de CMI frente a los antimicrobianos probados estuvieron dentro del rango de sensibles, bien distantes de los valores para ser considerados como resistentes (7).

Un estudio realizado en el LNRH-IPK en 938 aislamientos de Hib, recuperados entre el período de 1990-2000, demuestra una alta resistencia a múltiples antibióticos y una disminución del fenómeno tras la introducción de la vacunación. Por ejemplo, para la ampicilina varía entre 35,5 a 20,0%, mientras que para el cloranfenicol oscila desde 32,2 hasta 20,0% y 100% de los aislamientos fueron sensibles a la ceftriaxona y la rifampicina (17). La resistencia de *H. influenzae* a la ampicilina se describe por primera vez en la década de los años 1970. Esta resistencia se incrementa de forma rápida en el mundo, pero con diferencias significativas entre las distintas regiones geográficas. La producción de β -lactamasa es el mecanismo más asociado con la resistencia y son infrecuentes las cepas β -lactamasa negativas resistentes a la ampicilina, aunque se sugiere una subestimación relacionada con los problemas metodológicos para su detección.

Es por eso que en este estudio se alteró el orden cronológico convencional utilizado para el establecimiento de la susceptibilidad antimicrobiana y se determinó, en primera instancia, la enzima β -lactamasa e independientemente del resultado se estableció la CMI para la ampicilina (18). La susceptibilidad a los antimicrobianos que se constató pudiera considerarse como un beneficio adicional de la introducción de la vacunación contra Hib en Cuba.

La disminución en la incidencia de las EI por este microorganismo presupone una disminución en la utilización de los antibióticos más utilizados para el tratamiento y esto repercute en la significación clínica de la resistencia, pues se deja de ejercer una presión selectiva sobre la bacteria. Diversos estudios encaminados a establecer una relación entre el consumo de antimicrobianos y la resistencia bacteriana frente a ellos apuntan a que existe una relación directamente proporcional (18, 19).

En la Tabla 3 se presenta la distribución del número de aislamientos de *H. influenzae* estudiados, según la edad, el diagnóstico clínico, el serotipo responsable de la enfermedad y el estatus de vacunación. El mayor número de aislamientos de *H. influenzae* se recuperó de niños entre 12 y 23 meses de

Tabla 3. Número de aislamientos invasores de *H. influenzae* según la edad, diagnóstico clínico, serotipo responsable de la enfermedad y estatus de vacunación.

Edad	Diagnóstico clínico		Total	Vacunación*	Serotipo responsable		
	Meningitis	Neumonía	n	n	Hia	Hib	HNT
	n	n	%				
< 12 meses	5	2	7	5	1	5	-
12 -23 meses	11	1	12	11	1	9	1
24 -59 meses	3	-	3	3	-	3	-
> 5 - 14 años	1	-	1	1	-	-	1
Total	20	3	23	21	2	17	2

* Serie primaria de vacunación completa: tres dosis de vacuna (2, 4 y 6 meses de edad)

Hia: *H. influenzae* tipo a. Hib: *H. influenzae* tipo b. HNT: *H. influenzae* no tipable

edad y menores de 12 meses. No se obtuvieron aislamientos en pacientes mayores de 14 años de edad. En todos los casos se obtuvo información sobre el número de dosis recibidas de la vacuna anti-Hib, sus fechas de aplicación y el tipo de vacuna. De esta forma, para 21 de los 23 pacientes con un diagnóstico de EI por *Haemophilus* se evidenció el cumplimiento de la serie primaria de inmunización. En dos casos se constató que no recibieron la tercera dosis: uno de ellos porque en el momento de enfermar no le correspondía (solo cinco meses de edad), y el otro, por un retraso en el esquema de vacunación (niño de siete meses de edad que debió recibir la tercera dosis a los seis meses). En ambos casos se demostró que Hib fue el serotipo responsable de la enfermedad.

Para cuatro de los 21 pacientes con la serie primaria de vacunación completa se demostró como agente etiológico Hia y HNT; mientras que en 17 pacientes el serotipo responsable de la enfermedad fue Hib. Excepto para un caso que recibió la vacuna VaxemHib, a todos los pacientes se les administró la vacuna pentavalente cubana (Heberpenta). En relación con la inmunización contra Hib se entiende como fallo de vacunación: 1) la recuperación de Hib a partir de sangre o de LCR, transcurrida una semana o más de administrada la segunda dosis de la vacuna a un paciente menor de un año de edad; 2) la recuperación de Hib después de dos semanas de la tercera dosis en pacientes ≥ 1 año; 3) todos aquellos casos de infección invasiva por Hib que ocurren, a pesar de que el niño recibiera al menos la serie primaria de vacunación (tres dosis: a los 2, 4 y 6 meses), sin hacer distinciones de edad (20).

En correspondencia con este último criterio, tras relacionar la información clínico-epidemiológica y la caracterización microbiológica de los aislamientos de *Haemophilus* estudiados, se puede sugerir la ocurrencia de 15 fallos vacunales entre los 17 casos en los que se demostró EI por Hib.

La generalización en el mundo del uso de las vacunas anti-Hib conjugadas a proteínas redujo rápidamente la prevalencia de la EI por este microorganismo, no obstante, se informan casos esporádicos en aquellos países donde la vacuna se aplican de forma sistemática. La revisión de los fallos en los niños vacunados de manera correcta demuestran que estos no parecen asociarse a ninguna marca o lote

concreto de vacuna y señalan como causas posibles: la no aplicación de una dosis de recuerdo, la administración simultánea con la vacuna acelular de *Bordetella pertussis* o en combinación con otras vacunas conjugadas (20).

La ocurrencia de verdaderos fallos vacunales entre los casos de EI por Hib demostrados en el presente estudio entre los niños vacunados se deben confirmar mediante la profundización de los factores inherentes al estado inmunitario de cada uno de ellos. Sin embargo, es posible descartar de antemano que obedezcan a un descenso de la cobertura vacunal o que estén relacionados con la aplicación de un esquema de inmunización reducido, pues el PNI en Cuba estipula la administración de una dosis de recuerdo a los 18 meses. Por otra parte, la vacuna que se administra incluye células completas de *B. pertussis*. No debe descartarse la posibilidad de que el incremento de la notificación de casos de EI por Hib responda también a la propia revitalización de la vigilancia, pues si se retoma la información recogida en la Tabla 1 es evidente que al final del período de estudio se aprecia una recuperación de esta actividad en el país.

Los resultados de la caracterización de aislamientos de *H. influenzae* en la etapa posvacunal en Cuba alertan acerca de que el monitoreo de la efectividad de la vacunación anti-Hib requiere de acciones de vigilancia sostenidas de la enfermedad en su conjunto, a la que debe integrarse toda la red de laboratorios del sistema de salud. Para elevar los indicadores de sensibilidad de la vigilancia y detectar cambios en el patrón epidemiológico de las enfermedades por Hib es importante la notificación de todas las formas clínicas de EI por *Haemophilus*, no solo de las MB, con inclusión de la edad, la muestra de procedencia y los antecedentes de vacunación. Así mismo, deben proponerse estudios para la detección de portadores nasofaríngeos en niños vacunados.

Referencias

1. Tamargo I, Toraño G, Fuentes K, Rodríguez O. *Haemophilus influenzae* circulantes en Cuba. Caracterización de cepas aisladas de meningitis. Rev Cubana Med Trop 1999;51(3):204-5.
2. Tamargo I, Toraño G, Rodríguez O, Pérez M, Llop A. Characterization of *Haemophilus influenzae* obtained from invasive disease in Cuban children under five years of age. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94(4):477-8.

3. Dickinson F, Pérez A, Galindo M, Quintana I. Impacto de la vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo b en Cuba. *Rev Panam Salud Pública* 2001;10(3):169-73.
4. Vérez-Bencomo V, Fernández V, Hardí E, Toledo ME, Rodríguez MC, Heynngnezz L, et al. Synthetic Conjugate Polysaccharide Vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science* 2004;35:522-5.
5. WHO/CDS/CSR/RMD. Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. Geneva: WHO; 2003.
6. Kilian M, Mesterky J, Shrohenloher R. Pathogenic species of the genus *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1979;9:409-12.
7. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement. CLSI document M100-S20, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
8. Pérez A, Rodríguez M. Síndromes neurológicos bacterianos. Cuba 1er Semestre 2008 (Datos preliminares). *BOLIPK* 2008;18(26):201.
9. Toraño G, Llanes R, Pías L, Abreu M, Varcárcel M. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en Cuba y progresión de la resistencia a la penicilina. *Rev Cubana Med Trop* 2010;62(2):157-62.
10. Murat A, Ozkalay N, Helvacı M, Agus N, Guler O, Dikerler A, et al. Meningitis due to *Gemella haemolysans* in a Pediatric Case. *J Clin Microbiol* 2007;45:2337-9.
11. Senent C, Sancho JN, Chiner E, Singnes J, Camarasa A, Amdreu AL. Epiema pleural por microorganismos del género *Gemella*: una complicación infrecuente. *Arch Bronconeumol* 2008;44:574-7.
12. Adderson E, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Carroll K, Mottice S, et al. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics* 2001;108(1):18-20.
13. Tsang R, Sill ML, Skinner S, Law D, Zhou J, Wyle J. Characterization of invasive *Haemophilus influenzae* disease in Manitoba, Canada, 2000-2006: invasive disease due to non-type b strains. *Clin Infect Dis* 2007;44:1611-14.
14. Tamargo I, Llanes R, Toraño G, Hernández I, Pérez M, Llop A, et al. Informe Regional Sireva II: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores, 2000-2005. *Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV 2007/002*. Washington: OPS; 2007.
15. Tamargo I, Llanes R, Toraño G, Hernández I, Pérez M, Llop A, et al. Informe Regional Sireva II, 2006: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. *Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV- 2008/001*. Washington: OPS; 2008.
16. Weltman G, Fossati MS, Correa C, Requeira M, Mollerach M. Tipificación capsular mediante PCR de aislamientos de *Haemophilus influenzae* no tipificables por aglutinación. *Rev Argent Microbiol* 2005;37(4):199-202.
17. Tamargo I, Fuentes K, Llop A, Oteo J, Campos J. High levels of multiple antibiotic resistances among 938 *Haemophilus influenzae* type b meningitis isolates from Cuba (1990-2002). *J Antimicrob Chemother* 2003;52(4):695-8.
18. Hasegawa K, Yamamoto N, Chiba R, Kobayashi K, Jacobs M. Diversity of ampicillin resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and United States. *Microb Drug Resist* 2003;9(1):39-46.
19. Ferguson J. Antibiotic prescribing: how can emergence of antibiotic resistance be delayed? *Aust Prescr* 2004;27:39-42.
20. Heath P, Booy R, Griffiths H, Clutterbuck E, Azzopardi H, Slack MP, et al. Clinical and immunological risk factors associated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine failure in childhood. *Clin Infect Dis* 2000;31:973-80.

***Haemophilus influenzae*: Characterization of the isolates recovered from invasive diseases in Cuba from 2008-2011**

Abstract

In order to characterize *Haemophilus influenzae* isolates responsible for invasive disease (ID) in Cuba during the post-vaccination period, we studied the total isolates recovered from 2008 to 2011 and submitted to the Institute «Pedro Kouri» from different provinces. Species confirmation and serotype determination were performed by considering the factors V and X requirements and using the agglutination plate method, respectively. Biotypes were defined by testing indol, urea and ornithine. The minimum inhibitory concentration (MIC) was assessed by ellipsometer test for ampicillin, ceftriaxone, chloramphenicol and rifampicin. Twenty three isolates were identified as *H. influenzae*; of them, 21 were serotyped and two non-typable (HNT). Near ninety percent of the serotyped isolates were classified as serotype b and only 2 as serotype a. Nine isolates of *H. influenzae* b belonged to biotype I while serotype a and HNT isolates corresponded to biotype II. In one strain it was demonstrated production of β -lactamase enzyme as well as resistance to ampicillin (MIC=8 μ g/mL) and chloramphenicol (MIC=12 μ g/mL). It was evident that despite the decline in the incidence of Hib ID, this serotype is still the most common in Cuba, and highlights the need for ongoing monitoring to detect vaccine failures. The antimicrobial susceptibility observed during this period might be considered as an additional benefit of vaccination.

Keywords: *Haemophilus influenzae* b, meningitis, vaccination.
