

HAEMOPHILUS:

CONSIDERACIONES BACTERIOLÓGICAS

BOLETÍN CPC



CENTRO DE PATOLOGÍA CLÍNICA
2232-5406 | 2239-0691 | 9437-9482
PROMOCIONYVENTAS@CPCHN.ORG



HAEMOPHILUS:

CONSIDERACIONES BACTERIOLÓGICAS

Especies del género *Haemophilus* asociadas con humanos:

- *H. influenzae*
- *H. aegyptius*
- *H. haemolyticus*
- *H. parainfluenzae*
- *H. pittmaniae*
- *H. parahaemolyticus*
- *H. paraphrohaemolyticus*
- *H. sputorum*
- *H. ducreyi**

Especies del género *Haemophilus* relacionados con animales:

- *H. avium*
- *H. haemoglobinophilus*
- *H. paracuniculus*
- *H. paragallinarum*
- *H. parasuis*
- *H. pleuropneumoniae*

*Estudios recientes por hibridación de ácidos nucleicos y de secuenciación 16S rRNA sugieren que *H. ducreyi* no pertenece al género *Haemophilus*, pero sí parece ser un miembro válido de la familia *Pasteurellaceae*. Transitoriamente se sigue manteniendo como miembro del género *Haemophilus*.

Diversas especies bacterianas que antes formaban parte del género *Haemophilus*, han sido reclasificadas y ahora pertenecen a otros géneros de la familia *Pasteurellaceae*.

El género de bacterias *Haemophilus*, se ubica entre los bacilos Gram negativo que tienen requerimientos especiales para su crecimiento, es decir que se necesita crear condiciones especiales para favorecer su crecimiento en los medios de cultivo indicados. Ordinariamente no crecen en los medios simples que se usan de rutina.

Taxonomía:

La taxonomía del género *Haemophilus* ha sido motivo de varias revisiones en los últimos cien años, actualmente se le clasifica dentro de la familia *Pasteurellaceae* y cuenta con alrededor de 15 especies, de las cuales 9 se asocian con humanos, ya sea como organismos saprofiticos o como patógenos, las otras especies se asocian con animales. No se encuentran en forma libre en el ambiente.

Hay una variedad de géneros bacterianos muy similares al género *Haemophilus*, que en conjunto se le denomina Grupo HACEK, por las iniciales de sus nombres: *Haemophilus*, *Aggregatibacterium*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*, por su similitud deben tomarse en cuenta en el proceso de identificación. Todos ellos también son organismos con requisitos de cultivo especiales.

Características generales:

Las especies del género *Haemophilus* forman parte de la microbiota normal de humanos y animales, sobre todo residen en el tracto respiratorio superior, algunas especies tienen potencial patogénico.

Son bacilos Gram negativo de 1 µm de grosor y longitud variable, que pueden verse como células cocoides, ovales, alargadas o filamentosas, con marcado pleomorfismo, tanto en las muestras clínicas como en los cultivos. Crecen a una temperatura óptima entre 35-37°C, son inmóviles, facultativamente anaerobios y crecen mejor en una atmósfera enriquecida con

CO₂. Por ejemplo, *H. ducreyi* y algunas cepas no tipificables de *H. influenzae*, no forman colonias visibles a menos que la atmósfera de incubación sea enriquecida con CO₂.

Los organismos de este género requieren para su crecimiento al menos uno de los siguientes factores: hemina (factor X) y/o nicotina adenina dinucleótido - NAD (factor V), por lo que el agar chocolate, que contiene ambos, es un medio excelente para su cultivo. También pueden crecer en otros medios debidamente suplementados con estos factores.

En agar chocolate las colonias de *Haemophilus* son pequeñas, de color gris o café pálido, redondas, convexas y si son encapsuladas, pueden mostrar iridiscencia. Son visibles a las 24 horas después de la siembra. No crecen en medio de MacConkey.

Las especies de este género utilizan carbohidratos en distinta forma, con o sin producción de ácido, reducen nitratos a nitritos, la mayor parte de las especies de importancia médica, excepto algunas cepas de *H. pittmaniae*, son oxidasa positiva, producen catalasa y ureasa en forma variable, pero la mayoría son catalasa y ureasa positiva. Para diferenciar *H. influenzae* de otras especies se puede utilizar como guía el cuadro siguiente (Cuadro No. 1).

Organismo	Factor X	Factor V	B-hemo	Catalasa	Lactosa	Glucosa	Xilosa	Sucrosa	Manosa	B-gal
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>H. aegyptius</i>	+	+	+	+	-	pos*	-	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	+	V	-	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	V	-	+	-	+	-	V
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	V	V	-	+	-	+	+	V
<i>H. pittmaniae</i>	-	+	+	pos ^w	-	+	-	+	+	+
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	-	V
<i>H. ducreyi</i>	+	-	neg*	-	-	V	-	-	-	-

Cuadro 1. Características fenotípicas para la identificación de especies de *Haemophilus* aisladas en humanos

Existen métodos serológicos para la identificación de las especies del género *Haemophilus*, pero hay que asegurarse que los antisueros están de acuerdo con los cambios taxonómicos.

***Haemophilus influenzae*.**

En humanos la especie más importante del género *Haemophilus* es *H. influenzae*, que reúne las características anteriormente descritas. El bacilo fue descubierto por Richard Pfeiffer, médico bacteriólogo alemán, en 1889, durante una epidemia de influenza, considerándolo en aquel entonces como la causa de la enfermedad, y de allí su nombre. Posteriormente se demostró que el agente etiológico de la influenza es un virus, que fue descubierto en 1930.



Figura 1. Richard F.J. Pfeiffer (1858-1945)

Supuestamente la cápsula es el principal factor de virulencia de *H. influenzae*. Desde 1931 se conocen seis serotipos capsulares de esta bacteria: a, b, c, d, e, f. La mayor parte de las infecciones son causadas por el serotipo b. Se ha desarrollado una vacuna contra este serotipo.

El nicho natural de *H. influenzae* es la vía respiratoria superior, particularmente la nasofaringe de las personas, por lo cual se considera normal demostrar su presencia en esta región anatómica, pero a partir de allí puede invadir estructuras adyacentes como el oído medio, los senos para nasales y la epiglotis y producir enfermedad o diseminarse a través del torrente sanguíneo y causar una gran variedad de infecciones a distancia, como meningitis, absceso cerebral, septicemia, conjuntivitis, mastoiditis, endocarditis, artritis, peritonitis, neumonía, empiema, osteomielitis y celulitis facial. También es causa de infecciones genito-uritarias en adultos y vulvo-vaginitis en niñas. *H. influenzae* es un patógeno exclusivamente del humano.

El método más confiable para establecer el diagnóstico de las infecciones por *H. influenzae* es el cultivo, para lo cual, como ya se mencionó, debe usarse el medio de agar chocolate u otro de los medios especiales que han sido diseñados para este propósito; aunque los métodos moleculares, la espectrometría de masa y otras tecnologías avanzadas irán ocupando en el futuro un lugar preponderante. También existen métodos indirectos como la demostración de antígeno capsular que permiten hacer un diagnóstico presuntivo, sin embargo, este último no detecta las cepas no encapsuladas, que también pueden ser patogénicas.

En agar chocolate *H. influenzae* produce después de 24 horas de incubación, colonias planas o convexas, enteras, de 1 a 2 mm de diámetro, con diferentes tonos de color que van de gris a café claro, las cepas encapsuladas pueden tener aspecto mucoso (Fig. 2).

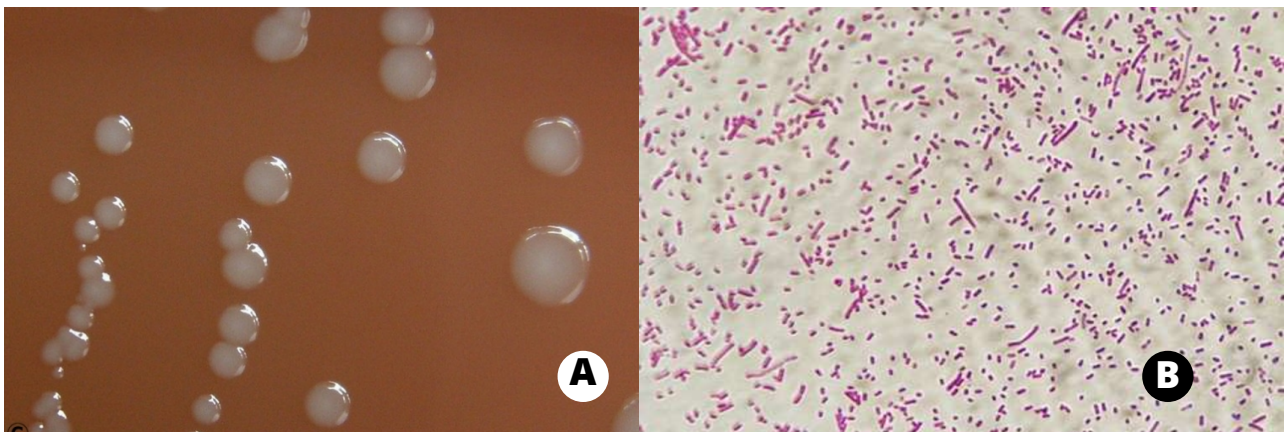


Figura 2. A. Colonias de *Haemophilus influenzae* en agar chocolate. B., Coloración Gram de *Haemophilus* spp.

H. influenzae requiere la presencia de factores X y V en el medio de cultivo, por eso no crece en agares simples con sangre como TSA, porque este medio solo provee factor X, a menos que en el mismo cultivo haya crecimiento de estafilococo, que le provee por difusión al medio, el factor V. Esto da lugar a la formación de pequeñas colonias de *H. influenzae* alrededor de las colonias de estafilococo, lo que se conoce como satelitismo (Fig. 3).

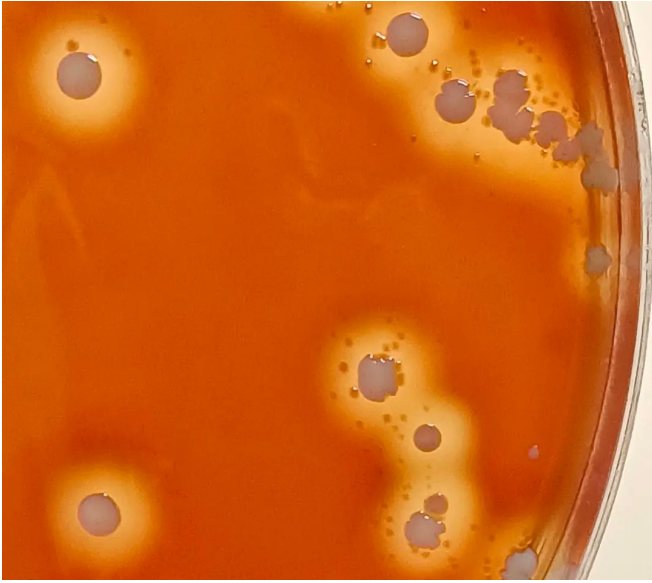


Figura 3. Fenómeno de satelitismo



Figura 4. Prueba de satelitismo

También se puede sembrar deliberadamente una estría de estafilococo al mismo tiempo que se siembra la muestra y si hay *H. influenzae*, se desarrollará el mismo fenómeno (Fig. 4).

Una vez que se tienen colonias sospechosas, éstas deben someterse a pruebas adicionales para demostrar su dependencia de los factores X y V, esto se puede hacer en forma simple colocando discos o pequeñas tiras de papel impregnados con estos factores sobre una siembra reciente de la bacteria en un medio neutro, separados unos 2 cm (Fig. 5).



Figura 5. Prueba de factor X y V

También se pueden llevar a cabo otros estudios fenotípicos para diferenciarlo de especies similares. Hay métodos rápidos para la identificación de estos organismos como la tira API-NH, cuyo desempeño es aceptable y facilita significativamente el proceso de identificación. *H. influenzae* es oxidasa positiva, catalasa positiva, reduce nitratos a nitritos, ureasa positiva y un número variable de cepas producen indol y descarboxilan la ornitina. Es ONPG negativo, no produce H₂S y no hidroliza bilis esculina. Produce ácido a partir de D-glucosa, D-galactosa, maltosa, D-ribosa y D-xilosa. Mediante las pruebas comunes de identificación, se pueden separar varios biotipos.

Existen diversas formas para hacer estudio de sensibilidad a los antibióticos, si se escoge el método de difusión en agar es necesario suplementar el medio de Mueller Hinton con factores X y V y extracto de levadura. Actualmente la primera línea de antibióticos usados para el tratamiento de las infecciones por *H. influenzae* incluye amoxicilina, amoxicilina+AC y ceftriaxona y como alternativas en segunda línea eritromicina y fluoroquinolonas.

Haemophilus parainfluenzae

Solo depende de Factor V para su crecimiento. Las colonias en agar chocolate usualmente son más pequeñas que las de *H. influenzae* y tienen una apariencia mate. Se le considera un habitante normal de la vía respiratoria superior. Aunque en algunos casos se ha designado como causa de otitis media, sinusitis y bronquitis, no se considera un patógeno significativo. También ha sido aislado del tracto genital en casos de infecciones ginecológicas y obstétricas, así como de vulvovaginitis en niñas y uretritis en varones. Si se aísla en cultivos de muestras de esputo, su presencia se considera parte de la microbiota normal de la boca y no se informa como un hallazgo significativo.

Haemophilus haemolyticus.

Necesita factores X y V. Produce hemólisis en medios de agar con sangre.

Haemophilus parahaemolyticus:

Requiere factor V pero no factor X. Las colonias son más grandes que las de *H. influenzae* y zonas amplias de hemólisis en medios de agar con sangre de ovino. Las células también son grandes, mostrando mucho pleomorfismo y se colorean irregularmente. Tienen la tendencia a formar filamentos enrollados (ovillos). Se asocia con endocarditis subaguda y faringitis.

Haemophilus paraphrohaemolyticus:

Al igual que el anterior, también produce zonas amplias de hemólisis. Forma colonias grandes en agar chocolate, independientemente de su incubación en medio enriquecido con CO₂. Ha sido aislado de la faringe, del esputo y de secreción uretral. Aunque su rol patogénico es indefinido.

Haemophilus aegyptius:

Requiere factores X y V, crece entre 25 y 45°C con un rango óptimo entre 35 y 37°C. Forma colonias pequeñas y no produce hemólisis en medios de agar con sangre. Es indistinguible de *H. influenzae* biotipo III en las pruebas comunes de identificación. Cuando se siembra en medios transparentes, las colonias tienen un tinte azulado al verse con luz transmitida. Se le conoce como bacilo de Koch Weeks y es causa de conjuntivitis.

Haemophilus pittmaniae:

Requiere factor V. Las colonias en agar chocolate son de 1 a 2 mm de color gris blanquecino. En agar con sangre de ovino produce Beta-hemólisis. Es débilmente oxidasa y catalasa positivo. Originalmente se aisló de saliva humana y su presencia en la boca se considera normal, sin embargo, se puede comportar como patógeno oportunista y ha sido aislado de varios sitios incluyendo la sangre y la bilis.

Haemophilus sputorum:

Requiere factor V. Forma colonias convexas, blanquecinas, opacas de 0.5 a 1.5 mm, Produce hemolisis en agar con sangre de ovino, pero algunas cepas pueden no ser hemolíticas. Originalmente fue aislado de una lesión dental, causa ocasionalmente infecciones pulmonares sobre todo en pacientes con fibrosis quística. También se ha aislado de la sangre.

Haemophilus ducreyi:

Esta especie no es muy parecida a otras especies del género *Haemophilus* y está pendiente de reclasificación. Fue originalmente descrito por el Dermatólogo y Bacteriólogo Auguste Ducrey (Fig. 6) en 1889, en su estudio clásico sobre chancro blando (chancroide).



Figura 6. Auguste Ducrey (1860-1940)

H. ducreyi es dependiente de factor X. Crece con dificultad formando colonias muy adherentes que se pueden deslizar enteras sobre la superficie del agar. En muestras clínicas, sus células se ven dispuestas en forma paralela en grupos, formando imágenes como “bancos de peces”. Crece mejor en condiciones microaerofílicas a 33 – 35°C en atmósfera con 5% CO₂. Su identificación no es fácil pues no crece en los medios comúnmente usados para las pruebas bioquímicas. Se puede cultivar en medio de Mueller Hinton con 5% sangre de ovino en una atmósfera de 5% CO₂, es asacarolítico, oxidasa positiva, catalasa negativa. Ha sido aislado de úlceras genitales y perianales (chancro blando) y de la piel.

Algunas referencias de interés:

Son innumerables los trabajos que se han escrito a lo largo de los años acerca del género *Haemophilus*, en particular sobre la especie *H. influenzae*. Para referencia se han escogido unas pocas.

1. Zinnemann K. *Haemophilus influenzae* and its pathogenicity. 1960 PMID: 1384757 DOI: 10.1007/978-3-662-42621-0_7
2. Norkov-Lauritsen N. Classification, identification and clinical significance of *Haemophilus*, and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. *Clin Micro Rev* 2014;27:214-240
3. Standards Unit, Microbiology Services, Public Health England. Identification of *Haemophilus* species and the HACEK Group of organisms. 2015
4. Procop G.S, et al. Editores. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 2017. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Cap 9: Miscellaneous fastidious Gram-negative bacilli – *Haemophilus* species, p 475-488
5. Fink D.L., Geme J.W. The Genus *Haemophilus*. 2021. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30746.X_40
6. Cunha C.B. Editor. Schlossberg's Clinical Infectious Disease, 3 ed. 2022. Oxford University Press, Oxford. Cap 138: *Haemophilus*, p 931-935