



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

Métodos de diagnóstico de laboratorio para la detección de *Haemophilus influenzae* en pacientes pediátricos

Autor: Taco Falcón, Melanie Nicole
Tene Gualli, Kevin Israel

Tutor: González Romero Ana Carolina, Ph.D.

Riobamba, Ecuador

2026



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE TITULACIÓN - MODALIDAD TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
LICENCIADO/A EN LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

Métodos de diagnóstico de laboratorio para la detección de *Haemophilus influenzae* en
pacientes pediátricos.

AUTOR:

Taco Falcón, Melanie Nicole

Tene Gualli, Kevin Israel

TUTOR:

González Romero Ana Carolina, Ph.D.

Riobamba, Ecuador

2026

© DECLARATORIA DE AUTORÍA

Nosotros, Melanie Nicole Taco Falcón, con cédula de identidad 0504840562 y Kevin Israel Tene Gualli, con cédula de identidad 1450065378, autores del trabajo de titulación: Métodos de diagnóstico de laboratorio para la detección de *Haemophilus influenzae* en pacientes pediátricos, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor de la obra referida, será de nuestra entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 19 de octubre de 2026.

MELANIE NICOLE TACO FALCÓN
NUI: 0504840562

KEVIN ISRAEL TENE GUALLI
NUI: 1450065378

DECLARATORIA SOBRE EL USO DE HERRAMIENTAS DE IA

Nosotros, Melanie Nicole Taco Falcón, con cédula de identidad 0504840562 y Kevin Israel Tene Gualli, con cédula de identidad 1450065378, autores del presente trabajo de titulación, declaro que el uso de herramientas de inteligencia artificial en la elaboración del presente trabajo de titulación se limitó exclusivamente al apoyo en la organización de ideas y a la mejora de la redacción y claridad expositiva, en los apartados de introducción, marco teórico y marco metodológico, sin implicar la generación autónoma de contenidos académicos, análisis, resultados, conclusiones ni aportes propios del proceso investigativo.

Asimismo, dejo constancia de que las decisiones académicas, el desarrollo conceptual, el enfoque metodológico, el análisis de fuentes y la interpretación de resultados son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Finalmente, declaro que el uso de dichas herramientas no sustituyó mi criterio académico, ni vulneró las disposiciones institucionales sobre plagio, propiedad intelectual y autoría, manteniéndose el cumplimiento de las normas de citación y referenciación, con el fin de garantizar la transparencia académica y el uso ético y responsable de tecnologías emergentes en la elaboración del trabajo de titulación.

En Riobamba, 19 de octubre de 2026.



MELANIE NICOLE TACO FALCÓN
NUI: 0504840562



KEVIN ISRAEL TENE GUALLI
NUI: 1450065378

DEDICATORIA

Dedico este logro, a Dios, por sostenerme en los momentos de incertidumbre, darme la fortaleza para superar cada desafío y permitirme alcanzar una de las metas más importantes de mi vida. A las mujeres de mi hogar, quienes han sido el pilar fundamental de mi vida: a mi madre, Araceli Falcón, por ser el mayor ejemplo de fortaleza que la vida me ha regalado. Gracias por enseñarme, con tu amor, esfuerzo y sacrificio, que ningún obstáculo es imposible de superar. Admiro profundamente la valentía con la que sacaste adelante a tus hijas. Todo lo que soy hoy lleva una parte de ti. A mi segunda madre, Diana Falcón, por acogerme como una hija y brindarme su apoyo y cariño durante toda mi carrera. A mis hermanas, Yadira, Carolina y Michelle, por ser mi inspiración diaria y las mujeres en las que siempre he querido reflejarme. A mis abuelitos, por las enseñanzas que han marcado mi vida. A los más pequeños Mateo y Sofía, por llenar mis días de alegría y recordarme, con cada sonrisa, el verdadero valor de la familia. Finalmente, a Kevin Tene, por su amistad sincera y por acompañarme en este camino. Gracias a todos por creer en mí y ser parte de este logro, que también les pertenece.

Melanie Nicole Taco Falcón.

Le dedico este trabajo a Dios, por iluminar mi camino y darme fortaleza para nunca rendirme ante cualquier adversidad. A mis padres, Luis Tene y Martha Gualli, gracias por su amor incondicional, por cada sacrificio realizado y por enseñarme, con su ejemplo, que el esfuerzo, la humildad y la perseverancia siempre abren camino hacia las metas más grandes. Gracias por demostrarme que las dificultades no son un obstáculo, sino una oportunidad para crecer. A mis hermanas, Eliana y Dayana Tene, gracias por estar siempre a mi lado, por confiar en mí y por brindarme su apoyo y cariño en cada etapa de este recorrido. A mis sobrinos, Lia Tene y Liam Ojeda, cuya alegría ha sido un motivo constante para sonreír; deseo que este logro les inspire a creer en ustedes y a perseguir sus sueños con determinación. Finalmente, a Nicole Taco, mi compañera de tesis y amiga, gracias por compartir este camino desde el inicio de la carrera, por tu compromiso, paciencia y amistad. Este logro también refleja el apoyo, la confianza y el cariño que cada uno de ustedes me brindó para nunca dejar de creer en mí.

Kevin Israel Tene Gualli

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo, por abrirme las puertas y brindarme los conocimientos que no solo hicieron posible mi formación académica, sino que también me acompañarán a lo largo de mi vida profesional. A cada uno de los docentes que formaron parte de este camino, gracias por su paciencia, dedicación y por compartir sus enseñanzas, las cuales fueron fundamentales para mi crecimiento. De manera especial, agradezco a mi tutora de tesis, PhD. Ana Carolina González Romero por su orientación, apoyo constante y confianza durante el desarrollo de este trabajo, permitiéndome culminar esta importante etapa. Finalmente, mi mayor gratitud es para mi madre, mi tía, mis hermanas, mi hermano, mi sobrina, demás familiares y amigos, quienes estuvieron a mi lado en los momentos más difíciles y en cada logro alcanzado. Su cariño, palabras de aliento y apoyo incondicional fueron la fuerza que me impulsó a seguir adelante y hacer realidad este sueño.

Melanie Nicole Taco Falcón

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de Chimborazo por abrirme las puertas al conocimiento y brindarme la oportunidad de formarme como profesional, gracias a cada uno de los docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico, por fortalecer mi vocación de servicio y prepararme con los conocimientos y valores que me acompañarán durante toda mi vida. A mi tutora de tesis PhD. Ana Carolina González Romero, por su paciencia, compromiso y valiosa guía; su experiencia, confianza y dedicación fueron fundamentales para culminar este trabajo. A mis abuelos, por ser ejemplo de perseverancia; y, especialmente, a mi abuelo que hoy me acompaña desde el cielo, porque su recuerdo sigue iluminando mi camino. A mi tía, Pathy, por su amor incondicional y apoyo constante. A mis primas, Mishel y Jazmín, gracias por estar siempre presentes, por sus palabras de ánimo y por celebrar conmigo cada pequeño logro. Finalmente, a mis amigos Keyla, Desire, Carolina, Karmina, Marcela, Jhoel y Pool, gracias por su amistad sincera, por cada palabra de aliento, por las risas, el apoyo y la compañía que hicieron esta etapa una experiencia inolvidable.

Kevin Israel Tene Gualli

INDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	16
MARCO REFERENCIAL	17
Paciente pediátrico.....	17
<i>Haemophilus influenzae</i>	17
Taxonomía.....	17
Clasificación	18
Mecanismos de patogenicidad y virulencia.....	18
Hábitat y colonización.....	19
Factores de riesgo	20
Importancia clínica y enfermedades asociadas.....	20
Enfermedades invasivas	20
Meningitis.....	20
Sepsis.....	21
Epiglotitis	21
Enfermedades no invasivas	21
Otitis media	21
Sinusitis	22
Infecciones respiratorias	22
Muestras clínicas para diagnóstico	22
Líquido cefalorraquídeo (LCR).....	23
Sangre	23
Exudado nasofaríngeo	23
Aspirado traqueal.....	24
Esputo	24
Secreción ótica (Otorrea).....	24
Métodos de diagnóstico de laboratorio.....	24
Métodos microbiológicos convencionales	24
Métodos automatizados	28
Métodos inmunológicos	29

Métodos moleculares.....	30
Tratamiento.....	31
Importancia del diagnóstico temprano en pediatría.....	32
METODOLOGÍA.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	72

RESUMEN

Haemophilus influenzae constituye uno de los principales agentes asociados a infecciones respiratorias, otitis media, meningitis y otras enfermedades invasivas en la población pediátrica. Su identificación oportuna resulta fundamental para establecer un tratamiento y prevenir complicaciones. El objetivo de esta investigación fue recopilar información sobre los métodos de diagnóstico de laboratorio, mediante revisión bibliográfica de técnicas microbiológicas y moleculares, con el fin de contribuir en la identificación oportuna de esta bacteria en pacientes pediátricos. El estudio se desarrolló con un enfoque cualitativo, de tipo documental, descriptivo y no experimental, con una población de 82 artículos científicos, seleccionando una muestra de 30 mediante criterios de inclusión y exclusión. Los resultados evidenciaron que los métodos microbiológicos más utilizados fueron el cultivo en agar chocolate, los sistemas automatizados de identificación y la espectrometría MALDI-TOF MS, los cuales permitieron el aislamiento y caracterización del microorganismo. Asimismo, se identificó que las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (qPCR), PCR digital por gotas (ddPCR), secuenciación genética y secuenciación metagenómica, proporcionaron una mayor capacidad diagnóstica al detectar material genético bacteriano con rapidez y precisión. Las muestras clínicas más empleadas fueron el hisopado nasofaríngeo, esputo, lavado broncoalveolar y líquido de oído medio, cuya utilidad dependió del sitio anatómico de la infección y del objetivo diagnóstico. En conjunto, la evidencia analizada permitió establecer que la integración de métodos microbiológicos y moleculares favorece una detección más confiable del patógeno, contribuyendo al diagnóstico oportuno y al adecuado manejo clínico de las infecciones pediátricas.

Palabras claves: *Haemophilus influenzae*, pediatría, especímenes, técnicas microbiológicas, técnicas moleculares.

ABSTRACT

Haemophilus influenzae is one of the main agents associated with respiratory infections, otitis media, meningitis, and other invasive diseases in the pediatric population. Timely identification is essential for appropriate treatment and preventing complications. The objective of this research was to compile information on laboratory diagnostic methods through a literature review of microbiological and molecular techniques, to contribute to the timely identification of this bacterium in pediatric patients. The study used a qualitative, documentary, descriptive, and non-experimental approach, with a population of 82 scientific articles from which a sample of 30 was selected based on inclusion and exclusion criteria. The results showed that the most commonly used microbiological methods were culture on chocolate agar, automated identification systems, and MALDI-TOF MS mass spectrometry, which allowed the isolation and characterization of the microorganism. Likewise, molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR (qPCR), droplet digital PCR (ddPCR), genetic sequencing, and metagenomic sequencing were found to provide greater diagnostic capacity by detecting bacterial genetic material quickly and accurately. The most frequently used clinical specimens were nasopharyngeal swabs, sputum, bronchoalveolar lavage, and middle ear fluid, whose usefulness depended on the anatomical site of infection and the diagnostic objective. Overall, the evidence analyzed established that the integration of microbiological and molecular methods favors more reliable detection of the pathogen, contributing to timely diagnosis and appropriate clinical management of pediatric infections.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, pediatrics, specimens, microbiological techniques, molecular techniques.



Reviewed by:

Ms.C. Ana Maldonado León

ENGLISH PROFESSOR

C.I.0601975980

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población pediátrica a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo. Dentro de los agentes bacterianos relacionados con estas infecciones, *Haemophilus influenzae* es considerado la bacteria más común. Este microorganismo pertenece a la familia Pasteurellaceae, y constituye una causa común de diversas infecciones bacterianas, tanto invasivas como no invasivas¹.

En relación con lo anterior, esta bacteria coloniza de forma habitual la nasofaringe y orofaringe de personas sanas, siendo exclusiva del ser humano. Se clasifica en cepas encapsuladas, como *H. influenzae* tipo b (Hib) y no encapsuladas (NTHi). Hib son las principales responsables de infecciones invasivas en niños menores de cinco años, las cuales se producen cuando el microorganismo alcanza sitios estériles del cuerpo, originando patologías como meningitis, neumonía, bacteremia, artritis séptica, epiglotitis y osteomielitis, además de su elevada letalidad, estas infecciones pueden dejar secuelas permanentes como daño neurológico y pérdida auditiva^{2,3}.

Por otro lado, *H. influenzae* no tipificable (NTHi) forma parte de la microbiota comensal, especialmente en niños. Sin embargo, se comporta como un patógeno oportunista cuando el sistema inmunológico del paciente se altera o se debilita, produciendo infecciones generalmente menos invasivas que las ocasionadas por cepas encapsuladas. En el laboratorio, su aislamiento requiere el uso de factores de crecimiento específicos como hemina y nicotinamida para su cultivo en el laboratorio^{4,5}.

Las infecciones por este cocobacilo, especialmente las cepas no encapsuladas (NTHi), se relacionan con su capacidad de proliferar en ausencia de anticuerpos protectores, lo que facilita su colonización. Estas bacterias producen toxinas que alteran las funciones respiratorias, como la cilia, favoreciendo el desarrollo de infecciones como otitis media aguda bacteriana (OMA) y sinusitis. Asimismo, NTHi es un patógeno frecuente en pacientes con neumonía o exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), además de presentarse comúnmente en individuos con fibrosis quística^{4,5}.

Además, estas cepas se clasifican según distintos biotipos metabólicos, lo que refleja su heterogeneidad genética y variabilidad en el potencial patógeno⁶. En este sentido, se han definido ocho biotipos en función de la presencia o ausencia de tres enzimas como la triptofanasa (producción de indol), ureasa y ornitina descarboxilasa⁷. Esta clasificación no solo permite su caracterización bioquímica, sino que también actúa como marcador epidemiológico para el estudio de la colonización y de las cepas patógenas. Así, el biotipo I se asocia con meningitis en niños y mayor resistencia antimicrobiana, los biotipos II y III se relacionan principalmente con infecciones de las vías respiratorias superiores⁸.

Por consiguiente, diversos métodos de laboratorio permiten identificar y caracterizar al patógeno, entre ellos el cultivo microbiológico, los ensayos serológicos y bioquímicos, Desorción/Ionización por láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo (MALDI-TOF), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real y la secuenciación del genoma completo⁹. Tradicionalmente, los aislamientos se han serotipificado y biotipificado mediante métodos fenotípicos; sin embargo, estos no siempre resultan completamente fiables⁷.

La identificación de *H. influenzae* es fundamental para orientar una terapia antibiótica adecuada, puesto que una detección precisa contribuye a reducir el uso innecesario de antibióticos. Debido a su relevancia clínica, el desarrollo de métodos de detección molecular rápidos y precisos son esenciales. A pesar de ser el método tradicional de referencia para el diagnóstico, el cultivo bacteriano suele arrojar una tasa de positividad menor para este organismo exigente en comparación con otros patógenos, lo que representa una limitación importante en muchos laboratorios clínicos¹⁰.

H. influenzae puede causar una amplia variedad de infecciones que van desde cuadros leves, como otitis media, hasta enfermedades graves como bacteriemia y meningitis. Antes de la introducción de la vacunación sistemática con vacunas conjugadas contra Hib, este microorganismo era el principal agente de meningitis bacteriana en niños y una de las principales etiologías de neumonía a nivel mundial. Se estimaba que generaba aproximadamente 1,76 millones de episodios anuales de neumonía grave en menores de cinco años, concentrando cerca del 80% de los casos invasivos en este grupo etario¹¹.

En relación con la epidemiología mundial, según European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2023), un total de 30 países de la Unión Europea/Espacio Económico Europeo (UE/EEE) notificaron 5234 casos confirmados de enfermedad invasiva por *H. influenzae*, evidenciando un incremento sostenido en comparación con los 3983 casos reportados en 2022 y cifras considerablemente menores registradas en 2021 (1693) y 2020 (1838). En consecuencia, la tasa global de notificación alcanzó 1,2 casos por cada 100 000 habitantes, destacándose Dinamarca (2,3 por 100 000), Lituania (2,1) y Suecia (2,1) como los países con mayores tasas¹².

Dentro de esta distribución, Francia (883 casos), Alemania (1456) e Italia (315) concentraron el 51% (2 663 casos) del total de casos confirmados en la UE/EEE, lo que refleja una mayor carga de enfermedad en estos países; en contraste, Croacia (1), Chipre (2), Estonia (3) y Malta (2) reportaron cifras mínimas que Liechtenstein no notificó casos en 2023. En ese mismo año, la enfermedad invasiva por *H. influenzae* presentó una marcada variación según la edad, con la mayor tasa en lactantes menores de un año (6,41 por cada 100 000 habitantes); Posteriormente, se observó una disminución significativa en los grupos de 1 a 4 años (1,49), 5 a 14 años (0,33)¹².

Estos datos coinciden con lo señalado por el estudio de Slack et al. (2021), el cual muestra que más del 90% de las infecciones invasivas por Hib ocurren en niños menores de

cinco años, mientras que alrededor del 60% de la meningitis se presenta en lactantes menores de 12 meses. No obstante, esta proporción varía según la región geográfica: en América, Europa y el Pacífico Occidental, entre el 40% y el 55% afecta a este grupo, mientras que, en regiones de alta mortalidad, como África y Asia, puede alcanzar hasta el 80%, lo que evidencia una mayor vulnerabilidad en estos contextos¹¹.

Aunque la población pediátrica concentra una proporción importante de los casos, la distribución de la enfermedad también varía según la edad en poblaciones adultas. En Finlandia, por ejemplo, el 9,5% de los cuadros invasivos por Hib y el 3% de la meningitis se registraron en personas mayores de 10 años. Asimismo, en el Reino Unido, aunque solo alrededor del 10% de los cuadros invasivos fueron causados por cepas NTHi, aproximadamente dos tercios se presentaron en adultos, especialmente en mayores de 65 años, lo que sugiere un cambio en el patrón epidemiológico hacia grupos de mayor edad¹¹.

Esta distribución etaria también se relaciona con los cambios observados después de la vacunación. Khattak et al. (2023), señalan que, tras la introducción de la vacuna conjugada contra Hib en 1987, se produjo una marcada reducción de la enfermedad invasiva en niños menores de cinco años en Norteamérica, especialmente en Estados Unidos. Sin embargo, actualmente predominan las infecciones por cepas no tipificables, con una incidencia elevada en niños nativos de Alaska (5,4 por 100 000). Del mismo modo, en 2017, las tasas de incidencia en menores de cinco años fueron de 0,18 para Hib y de 1,7 para cepas no b y no tipificables por cada 100 000 habitantes¹.

A nivel de la región de las Américas, en la investigación de Juárez et al. (2023), antes de la implementación generalizada de la vacunación, Hib representaba una causa importante de morbimortalidad infantil, estimándose alrededor de 5.300 casos de neumonía con una letalidad del 2 %, así como cerca de 200 casos de meningitis con una mortalidad de hasta el 30 %¹³. En América Latina y el Caribe, Slack et al. (2021), señalaron que la carga de enfermedad era aún más elevada, con una incidencia de meningitis de 35 por cada 100 000 niños menores de cinco años y aproximadamente 60 casos por 100 000 para enfermedad invasiva¹¹.

En este contexto, países como Argentina evidenciaban que Hib constituía un importante problema de salud pública, siendo la principal causa de meningitis bacteriana en este grupo etario. No obstante, tras la introducción de la vacuna en los programas nacionales de inmunización, como ocurrió en 1998, se observó una reducción sostenida de la incidencia hasta alcanzar tasas inferiores a 0,1 por 100 000 habitantes, lo que demuestra el impacto positivo de la vacunación¹³.

Posteriormente, en la era posvacunal, se evidenció un cambio en la epidemiología del patógeno, con la aparición de infecciones por *H. influenzae* tipo a (Hia) en países como Colombia, Venezuela, Argentina y Cuba, con mayor frecuencia en Brasil. De manera similar, en Paraguay, aunque la vacunación logró disminuir significativamente las

infecciones invasivas por Hib en niños pequeños, se ha observado un incremento de cepas no tipificables (NTHi) en niños mayores, lo que sugiere una transición en la distribución de serotipos y una adaptación epidemiológica del microorganismo¹¹.

Esta variación ocurre por los serotipos circulantes en otros países de América Latina. El Instituto de Salud Pública de Chile (2023), ilustra esta transición; las cepas NTHi concentraron el 88,6% de los aislamientos en 2023, situando por debajo al serotipo a en un 6,8%, y a los serotipos b y f en un 2,3% cada uno. Este escenario confirma el desplazamiento de las variantes encapsuladas por las no encapsuladas. Paraguay replicó esta tendencia tras incorporar la vacuna en 2004; la carga de enfermedad por Hib se redujo en menores de cinco años, mientras que los casos por NTHi se desplazaron hacia poblaciones de mayor edad, un comportamiento epidemiológico consistente con el resto de la región¹⁴.

En Ecuador, Silva et al. (2022), destacan que *H. influenzae* es un patógeno relevante dentro de las infecciones respiratorias agudas (IRA) pediátricas. Aunque cerca del 90% de estos cuadros clínicos es de origen viral, la fracción bacteriana restante es liderada por este microorganismo y por *Streptococcus pneumoniae*. Las IRA saturan los servicios de salud al concentrar hasta el 70% de las consultas y entre el 30% y 60% de los internamientos en menores de 15 años, afectando principalmente a los mayores de tres años. La cobertura vacunal insuficiente y las condiciones socioeconómicas favorecen su persistencia, por lo que es necesario fortalecer la inmunización para prevenir complicaciones graves¹⁵.

De manera específica, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2021) en el ámbito epidemiológico de Ecuador, en el 2020 se documentaron tres casos de *H. influenzae*, todos en pacientes menores de 12 meses, de sexo masculino y con diagnóstico de neumonía, aislados a partir de hemocultivos. Dos de los aislamientos correspondieron al serogrupo b, mientras que uno fue no tipificable, lo que evidencia la coexistencia de cepas encapsuladas y no encapsuladas en el país¹⁶.

Ante esta problemática, se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál de los métodos diagnósticos de laboratorio es el más preciso, sensible y aplicable para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos?

El estudio adquiere relevancia debido a que *H. influenzae* constituye el agente causal de la mayoría de las infecciones en la población pediátrica, principalmente por su capacidad para desarrollar enfermedades invasivas como meningitis, neumonía, sepsis, etc. En este sentido, su correcta identificación mediante métodos de diagnóstico de laboratorio brindará a los profesionales de la salud información actualizada que permitirá la emisión de diagnósticos fiables y la toma de decisiones terapéuticas, mitigando de esta manera las complicaciones y la morbilidad infantil.

El desarrollo de la investigación se fundamentó en la revisión sistemática de literatura científica actualizada, el análisis de artículos incluidos en bases de datos especializadas e

investigaciones previas, lo cual posibilitó el acceso a información confiable y pertinente, facilitando la comparación entre los distintos métodos de diagnóstico de tipo microbiológico, y molecular empleados en la detección de este patógeno.

El trabajo beneficio especialmente a estudiantes y profesionales del área de la salud, al brindar una recopilación organizada y reciente sobre las técnicas disponibles para la identificación de este microorganismo generando un impacto directo en la población pediátrica, dado que, garantiza un abordaje preciso basado en la investigación. Además, la divulgación de estos resultados puede servir como base teórica para futuras investigaciones que tendrán como propósito fortalecer las habilidades diagnósticas a través de la aplicación de procesos de detección precisos.

Asimismo, contribuye al área de la investigación científica, generando conocimientos que servirán de apoyo en la formación y capacitación de estudiantes y personal del área de la salud en la identificación de agentes infecciosos en la población infantil.

OBJETIVOS

Objetivo general

Recopilar información sobre los métodos de diagnóstico de laboratorio, mediante revisión bibliográfica de técnicas microbiológicas y moleculares, con el fin de contribuir en el diagnóstico oportuno de *H. influenzae* en pacientes pediátricos.

Objetivos específicos

- Analizar las ventajas y desventajas de los métodos microbiológicos convencionales y moleculares para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos, a partir de la revisión de artículos, con el fin de aportar evidencia que optimice el diagnóstico y apoye decisiones clínicas oportunas en el manejo de las infecciones causadas por este patógeno.
- Comparar la sensibilidad y especificidad de los métodos microbiológicos y moleculares, mediante el análisis de resultados en estudios clínicos, para determinar el método más preciso en la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos.
- Destacar las muestras clínicas más utilizadas para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos, a través del estudio de artículos científicos, con el fin de analizar el espécimen de mayor utilidad diagnóstica.

MARCO REFERENCIAL

Paciente pediátrico

Un paciente pediátrico comprende el período que va desde el nacimiento hasta la mayoría de edad. Para su adecuada evaluación, esta población se clasifica según etapas del desarrollo: prematuro (antes de la semana 37 de gestación), neonato (primer mes de vida), lactante (hasta los 12 meses), niño pequeño (hasta los 4 años), niño mayor (hasta los 10 años) y adolescente (a partir de los 10 años). Estos rangos varían según el contexto regional, extendiéndose en algunos casos hasta los 18 o incluso 21 años; además, desde aproximadamente los 15 años, ciertos adolescentes pueden optar por atención médica en servicios de adultos¹⁷.

La población pediátrica especialmente los menores de 5 años presenta una mayor vulnerabilidad frente a diversas enfermedades, entre las que destacan las infecciones de las vías respiratorias. Estas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con un impacto más marcado en países de ingresos bajos y medios. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), patologías como la neumonía continúan siendo una de las principales causas de muerte en este grupo etario, lo que subraya la necesidad de fortalecer las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento adecuado¹⁸.

Haemophilus influenzae

H. influenzae es una de las bacterias más pequeñas de importancia clínica. Se presenta como un cocobacilo pleomórfico, gramnegativo, con un tamaño aproximado de 1,0 a 1,5 μm (Anexo 1). Es inmóvil, no forma esporas, posee metabolismo anaerobio facultativo y es oxidasa positivo^{6,19}. Además, es un microorganismo exigente en sus condiciones de cultivo, ya que para su crecimiento *in vitro* requiere factores específicos como la hematina (factor X) y la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD o factor V)¹⁹.

Taxonomía

- **Dominio:** Bacteria
- **Filo:** Proteobacteria
- **Clase:** Gammaproteobacteria
- **Orden:** Pasteurellales
- **Familia:** Pasteurellaceae
- **Género:** *Haemophilus*
- **Especie:** *influenzae*²⁰.

Clasificación

Las cepas de *H. influenzae* se clasifican en tipificables (encapsuladas) y no tipificables (no encapsuladas), según la presencia de una cápsula polisacárida. Las cepas tipificables se subdividen en seis serotipos (a–f), definidos por las diferencias en los polisacáridos de dicha cápsula. Entre estos, el serotipo b (Hib) es el más virulento, debido a que su cápsula está compuesta por polirribosil-ribitol-fosfato (PRP), un componente estrechamente relacionado con su patogenicidad y utilizado en las vacunas contra Hib⁶.

Aunque Hib es el principal causante de enfermedad invasiva, otras cepas encapsuladas también pueden producir cuadros similares; en particular, *H. influenzae* tipo a (Hia) se ha asociado con infecciones invasivas, como meningitis, clínicamente indistinguibles de las causadas por Hib. En contraste, las cepas no tipificables (NTHi) carecen de cápsula, por lo que no reaccionan con antisueros específicos y se clasifican mediante esquemas basados en proteínas de la membrana externa y otros marcadores; sin embargo, presentan alta variabilidad entre cepas y no muestran una asociación definida con la virulencia, a diferencia de las cepas encapsuladas^{21,22}.

Mecanismos de patogenicidad y virulencia

H. influenzae es un microorganismo que puede ser parte de la microbiota normal del ser humano, pero que tiene la capacidad de generar enfermedad cuando se presentan ciertas condiciones predisponentes. Cuando existe una enfermedad de carácter invasivo se asocia contundentemente a las cepas encapsuladas y, en menor proporción, a las no encapsuladas de esta bacteria (Anexo 2). Por otro lado, la propagación sistémica produce cuando la infección supera el tracto superior y se disemina a otros órganos, ocasionando patologías como meningitis, epiglotitis, artritis, pericarditis purulenta, endocarditis, osteomielitis, entre otras⁶.

Históricamente, las infecciones en el torrente sanguíneo han sido principalmente atribuibles a Hib, el cual se distingue por la presencia exclusiva de PRP, un factor de virulencia clave en su cápsula. Por ende, este componente facilita la invasión de tejidos, la propagación en el sistema sanguíneo y, en ciertos casos, la afección del sistema nervioso central⁶.

Por otro lado, las cepas NTHi causan infecciones invasivas en las mucosas tras dañar el tracto respiratorio. Aunque son menos virulentas que *Hib*, NTHi se asocia con enfermedades locales como otitis, rinosinusitis y exacerbaciones de EPOC, asma y fibrosis quística. La colonización de la nasofaringe es el primer paso en la infección, sirviendo como reservorio y punto de transmisión a través de gotitas, lo que facilita la propagación bacteriana a otras áreas como los senos paranasales y el oído medio⁶.

Para llevar a cabo estos procesos infecciosos *H. influenzae* aplica tres mecanismos principales de virulencia para generar la infección en el humano, como la adhesión (fijación), invasión y supervivencia intracelular y formación de biopelículas. Cada uno de estos

mecanismos ayuda a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad pulmonar aguda o exacerbar enfermedades pulmonares crónicas⁶.

En primer lugar, la adhesión que es un paso clave en la interacción entre el patógeno y el hospedador. La bacteria utiliza varias adhesinas en su membrana externa para unirse a dianas específicas en el epitelio del tracto respiratorio, especialmente en la mucosa dañada y no ciliada, dicha unión se facilita por fimbrias, proteínas de la membrana externa (OMP) y otras moléculas; además, el lipooligosacárido (LOS) de la pared celular bacteriana bloquea la función ciliar, impidiendo la eliminación de *H. influenzae* del tracto respiratorio⁶.

Posteriormente, este agente emplea diferentes mecanismos para persistir en la superficie epitelial, como la inactivación de IgA, la formación de biopelículas y la señalización de quórum. Estos mecanismos, que están más asociados con las cepas NTHi, son menos comprendidos en las cepas encapsuladas como Hib. Sin embargo, las cepas no tipificables secretan peptidasas específicas que descomponen y neutralizan la IgA, que es la principal inmunoglobulina que protege la mucosa y previene la invasión bacteriana⁶.

Además de persistir en la superficie, NTHi puede invadir células epiteliales y macrófagos, sobreviviendo intracelularmente al evadir la degradación lisosomal y generar antioxidantes que contrarrestan el estrés oxidativo en fagosomas y trampas extracelulares de neutrófilos. Las proteasas IgA favorecen esta supervivencia intracelular al cortar las proteínas de membrana asociadas a los lisosomas, debilitando aún más las defensas antimicrobianas del huésped. Estas características permiten la colonización crónica y la evasión inmunitaria en las infecciones respiratorias⁶.

De manera complementaria, la formación de biopelículas es una estrategia de supervivencia de *H. influenzae*, especialmente en cepas NTHi. Estas estructuras, compuestas por una matriz polimérica, protegen a las bacterias frente al estrés ambiental, la respuesta inmunitaria y los antibióticos. En el oído medio y las vías respiratorias, contribuyen a la colonización persistente y a la otitis media recurrente. Además, la detección de quórum, un proceso de comunicación bacteriana, regula la expresión de genes implicados en la supervivencia y la virulencia⁶.

Finalmente, la colonización es un proceso dinámico en el que nuevas cepas de *H. influenzae* entran y salen de la mucosa respiratoria, lo que puede desencadenar inflamación y exacerbaciones en la persona. Según la "hipótesis de la cepa", es la adquisición de una nueva cepa, más que su abundancia, lo que provoca la exacerbación. Este fenómeno se observa en la EPOC, donde el 20-30% de las exacerbaciones se relacionan con nuevas cepas. Infecciones como la otitis media o la rinosinusitis suelen resultar de la propagación bacteriana a nuevas áreas de la mucosa respiratoria⁶.

Hábitat y colonización

H. influenzae es un agente oportunista y una causa importante de infecciones respiratorias. El ser humano constituye su único reservorio conocido, y su transmisión ocurre

de persona a persona mediante gotitas respiratorias generadas al toser, hablar o estornudar, así como por contacto directo con secreciones de individuos portadores⁶. En neonatos, también puede transmitirse por aspiración de líquido amniótico o por contacto con secreciones genitales durante el parto. Este microorganismo habita principalmente en la mucosa del tracto respiratorio, especialmente en la nasofaringe, donde se encuentra en hasta el 75% de las personas sanas y, con menor frecuencia, en el tracto genital^{21,23}.

En este contexto, los lactantes y niños pequeños actúan como importantes reservorios y fuentes de transmisión. Además, las cepas NTHi colonizan con frecuencia el tracto respiratorio inferior en pacientes con asma, EPOC y fibrosis quística. Por otra parte, los brotes de infecciones de las vías respiratorias superiores por *H. influenzae* son más comunes en entornos concurridos, donde se facilita su propagación²¹.

Factores de riesgo

La susceptibilidad a *H. influenzae* es alta en la población pediátrica, de manera que la edad, el estado inmunológico y las comorbilidades son las características más importantes. Los menores de cinco años, y especialmente los lactantes, tienen un alto riesgo de enfermedad invasiva por Hib. Este riesgo se incrementa por la vacunación incompleta y al asistir a guarderías u otros lugares de cuidado infantil que favorecen la transmisión del agente. Asimismo, condiciones médicas como la enfermedad de células falciformes, asplenia, infección por VIH, inmunodeficiencias y tratamientos oncológicos aumentan la susceptibilidad, lo que resalta la importancia de la prevención y el diagnóstico temprano²⁴.

Importancia clínica y enfermedades asociadas

H. influenzae causa infecciones invasivas y no invasivas, afectando principalmente a niños menores de cinco años. Las manifestaciones clínicas varían según el órgano comprometido²⁴. Este microorganismo puede producir desde cuadros leves, que rara vez generan complicaciones, hasta infecciones graves asociadas a secuelas a largo plazo e incluso la muerte. Por otro lado, no se conoce con exactitud el periodo de incubación; sin embargo, los síntomas pueden aparecer en pocos días tras la exposición²⁵.

Enfermedades invasivas

- **Meningitis**

Es una infección grave de las meninges (Anexo 3), causada principalmente por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *Neisseria meningitidis*, que afecta sobre todo a niños menores de un año. Las bacterias ingresan al organismo a través del tracto respiratorio o el torrente sanguíneo, atraviesan la barrera hematoencefálica e infectan este tejido²⁶. Las infecciones bacteriémicas por *H. influenzae* pueden presentarse de forma aislada o asociadas a neumonía, con inicio repentino de fiebre, cefalea, alteración del estado mental, rigidez de cuello, fotofobia, náuseas y vómitos. En los lactantes, la presentación clínica puede incluir irritabilidad, vómitos, rechazo a la alimentación, letargo y reflejos anormales²⁵.

- **Sepsis**

La sepsis es un síndrome clínico complejo caracterizado por alteraciones fisiológicas y bioquímicas desencadenadas por una infección, que originan una respuesta inmune desregulada. Este desequilibrio inmunológico provoca disfunción de la microcirculación y daño progresivo en órganos diana, siendo más determinante que el propio microorganismo causal en la evolución hacia el fallo multiorgánico²⁷.

En este contexto, los recién nacidos constituyen el grupo etario más vulnerable a la sepsis por *H. influenzae*, debido a la inmadurez de su sistema inmunológico. Esta susceptibilidad es mayor en prematuros, quienes además presentan condiciones asociadas que incrementan el riesgo de infecciones. Sin embargo, su incidencia no es la más frecuente dentro de las sepsis neonatales; por ejemplo, en un estudio realizado en Paraguay en 2015, los principales agentes aislados en sepsis precoz fueron *Streptococcus* del grupo B (35,7%), mientras que Hib representó solo el 7,1%, evidenciando su menor participación epidemiológica en este grupo²⁸.

Además, la infección por *H. influenzae* puede cursar con manifestaciones clínicas graves, como se describe en un caso clínico de sepsis asociado a este microorganismo e infección concomitante por influenza A. En este reporte se documentaron tos productiva, disnea, fiebre, hipoxemia con saturación de oxígeno del 82–83%, crepitantes inspiratorios bilaterales, disminución de ruidos respiratorios, edema en extremidades inferiores, infiltrados pulmonares bilaterales compatibles con neumonía y taquicardia asociada a fibrilación auricular con respuesta ventricular rápida de 121 latidos por minuto²⁹.

- **Epiglotitis**

La epiglotitis, también denominada supraglotitis, es una inflamación aguda de la epiglotis, estructura cartilaginosa ubicada en la base de la lengua que protege la vía aérea durante la deglución. Puede progresar rápidamente hasta obstruir la vía respiratoria, constituyendo una emergencia médica, siendo su principal agente etiológico Hib³⁰. El cuadro clínico inicia con dolor de garganta súbito e intenso, fiebre, voz apagada, ausencia de tos y dificultad respiratoria. En etapas más avanzadas aparecen signos de gravedad como babeo, incapacidad para hablar, postura en trípode o inclinación hacia adelante al sentarse y respiración con la boca abierta, con deterioro progresivo del compromiso respiratorio²⁵.

Enfermedades no invasivas

- **Otitis media**

La otitis media (OM) ocurre cuando microorganismos presentes en la nasofaringe ascienden a través de la trompa de Eustaquio hasta el oído medio, con origen viral, bacteriano o mixto. Es una infección muy frecuente en la infancia, ya que aproximadamente tres de cada cuatro niños presentan al menos un episodio antes de los 3 años de edad y entre el 50% y 80% la padecerán en algún momento de su vida. Entre los principales agentes bacterianos

implicados se encuentran *S. pneumoniae*, *H. influenzae* no tipificable (NTHi) y *Moraxella catarrhalis*³¹.

Clínicamente, la otitis media se manifiesta con dolor de oído, enrojecimiento e inflamación del tímpano, fiebre y somnolencia²⁵. Estudios microbiológicos han mostrado que *H. influenzae* es el agente más frecuente (38,3%), seguido de *S. pneumoniae* (26,7%), predominando además cepas NTHi. Asimismo, se han identificado factores de riesgo como antecedentes familiares de otitis media recurrente, alimentación con biberón, exposición al humo del tabaco, secreción nasal y ronquidos, asociados a su aparición y recurrencia³¹.

- **Sinusitis**

La sinusitis es un proceso inflamatorio de la mucosa de los senos paranasales clasificado según el tiempo de evolución de los síntomas: aguda (<30 días), subaguda (30-90 días) y crónica (> 90 días). Aunque la forma aguda suele ser viral, bacteriana o fúngica, también intervienen factores no infecciosos como los irritantes ambientales y las alergias. En la variante bacteriana aguda, el cuadro clínico supera los 10 días e incluye congestión nasal, rinorrea persistente, dolor o presión facial, tos nocturna, halitosis, fiebre y edema periorbitario. Esta afección predomina en la población pediátrica, donde suele coexistir con otras infecciones de la vía aérea superior como la otitis media y la conjuntivitis^{32,33}.

Investigaciones realizadas entre 2009 y 2018 analizaron las características clínicas y microbiológicas de 67 niños con sinusitis bacteriana aguda, asociada a conjuntivitis u otitis media. Sus resultados evidencian que este tipo de coinfección es habitual: con ocho pacientes con otitis media y diez pacientes con conjuntivitis; además, la mayor parte del universo analizado (50,7%) mostraba antecedentes de hacinamiento o convivencia en grupos familiares numerosos, un factor que podría promover la transmisión en el núcleo familiar. *H. influenzae* fue el principal aislado (70%), seguido de *M. catarrhalis* (18%) y *Staphylococcus aureus* (8%), destacando su relevancia en la sinusitis bacteriana aguda³³.

- **Infecciones respiratorias**

Las infecciones respiratorias son causadas por virus, bacterias o, en menor medida, hongos, que afectan las vías respiratorias como la nariz, la garganta, los bronquios y los pulmones. Pueden variar desde cuadros leves como el resfriado común hasta formas graves como la neumonía o la bronquitis, y sus síntomas más frecuentes incluyen congestión nasal, tos, dolor de garganta, fiebre y dificultad respiratoria. Los pacientes pediátricos son especialmente susceptibles debido a la inmadurez de su sistema inmunológico. Entre los principales agentes bacterianos se encuentran *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, asociados principalmente a neumonía y otras complicaciones en este grupo etario³⁴.

Muestras clínicas para diagnóstico

La recolección de muestras clínicas para diagnosticar *H. influenzae* depende del sitio anatómico afectado y la presentación de la enfermedad. El hemocultivo sigue considerando

ser el método referente para la identificación del microorganismo en los casos de sepsis y neumonía. En meningitis en cambio, se opta por el líquido cefalorraquídeo (LCR) por su mejor rendimiento diagnóstico. En el caso de las infecciones respiratorias, en especial las causadas por cepas NTHi, se usan muestras de esputo, aspirado traqueal o hisopado nasofaríngeo. En otitis media se examinan muestras del oído medio y en situaciones más complejas se utilizan líquidos estériles como el líquido pleural o pericárdico¹.

- **Líquido cefalorraquídeo (LCR)**

El LCR es un fluido claro e incoloro que se localiza en los ventrículos cerebrales y en el espacio subaracnoideo del sistema nervioso central (SNC). Se produce principalmente en los plexos coroides de los cuatro ventrículos, con una tasa aproximada de 0,35 ml/min (alrededor de 500 ml diarios) y se renueva cada 4–8 horas. Su volumen total es de aproximadamente 150 ml en adultos y 50 ml en niños^{35,36}.

En cuanto a su composición, el LCR está constituido en un 99% por agua y en un 1% por proteínas, glucosa, iones, vitaminas y neurotransmisores, siendo similar al plasma, aunque con menor concentración de proteínas y diferencias en los iones. Por otra parte, no sólo reduce los impactos y protege al sistema nervioso central, sino que ayuda al transporte de ciertas sustancias, a eliminar productos de desecho y a mantener la homeostasis a través del manejo de los electrolitos. Del mismo modo, su estudio es una herramienta fundamental en el diagnóstico de distintas patologías del SNC³⁵.

- **Sangre**

La sangre es un tejido conectivo líquido que se produce en la médula ósea roja. En el adulto su volumen medio es de unos 5 litros y su componente extracelular es el plasma. Cumple funciones esenciales como el transporte de oxígeno, nutrientes y hormonas, la eliminación de dióxido de carbono y desechos metabólicos, y la regulación de procesos como la coagulación, el equilibrio ácido-base y la termorregulación³⁷. En el diagnóstico de *H. influenzae* en pacientes pediátricos, esta es una muestra clave en infecciones invasivas, debido a que los hemocultivos permiten identificar tempranamente el microorganismo y posibles genes de resistencia, facilitando la optimización del tratamiento antibiótico³⁸.

- **Exudado nasofaríngeo**

El exudado nasofaríngeo se obtiene mediante un hisopo estéril introducido por la fosa nasal, paralelo al paladar, hasta alcanzar la pared nasofaríngea³⁹. La nasofaringe corresponde a la porción superior de la faringe, situada detrás de las coanas y por encima del paladar blando, recubierta por mucosa⁴⁰. Se utiliza para detectar microorganismos asociados a infecciones de las vías respiratorias superiores, transmitidas por secreciones. En este contexto, permite identificar la presencia de cepas NTHi en pacientes pediátricos; además, el medio agar chocolate suplementado con bacitracina, vancomicina, clindamicina y anfotericina B presenta una sensibilidad aproximadamente 10% mayor para su aislamiento¹.

- **Aspirado traqueal**

El aspirado traqueal (AT) es un procedimiento que consiste en la extracción de secreciones de la tráquea o bronquios mediante una sonda introducida a través de un tubo endotraqueal o una traqueostomía⁴¹. Esta técnica puede realizarse con material convencional y un sistema neumático de succión disponible en la mayoría de los hospitales. En el ámbito diagnóstico, presenta una sensibilidad promedio de aproximadamente 81% y una especificidad cercana al 65%, lo que implica la posibilidad de obtener resultados falsos negativos⁴².

- **Espujo**

El espujo es una secreción mucosa espesa producida en los pulmones, que se expulsa por la boca al toser. Su consistencia permite atrapar partículas extrañas, que luego son movilizadas por los cilios de las vías respiratorias para su eliminación. Como muestra clínica, su cultivo facilita la identificación de microorganismos, siendo los más frecuentes *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* y especies de *Klebsiella*. Además, su color puede orientar el diagnóstico; por ejemplo, tonalidades amarillo oscuro o verde suelen asociarse a procesos bacterianos como la neumonía⁴³⁻⁴⁵.

- **Secreción ótica (Otorrea)**

La otorrea es la salida de líquido del oído, que puede ser seroso, sanguinolento o purulento. En algunos pacientes con otitis media, especialmente niños, la membrana timpánica puede romperse, permitiendo la liberación del material acumulado en el oído medio. El cultivo de esta secreción es un examen de laboratorio que permite identificar bacterias. Para ello, se recolecta una muestra mediante un hisopo del conducto auditivo externo o, en casos específicos, directamente del oído medio durante un procedimiento quirúrgico^{46,47}.

Métodos de diagnóstico de laboratorio

Métodos microbiológicos convencionales

- **Examen microscópico directo (Tinción de Gram)**

La tinción de Gram, desarrollada en 1880 por Hans Christian Gram, es una técnica que permite diferenciar bacterias en grampositivas y gramnegativas según su capacidad de retener el colorante. Las primeras se observan de color azul-violeta, mientras que las segundas se decoloran y adquieren un tono rosado al teñirse con safranina. Esta diferencia se explica por la estructura de su pared celular: las grampositivas poseen una capa gruesa de peptidoglucano con ácidos teicoicos, mientras que las gramnegativas presentan una capa más delgada con lipopolisacáridos⁴⁸.

El fundamento de esta técnica radica en cómo responde la pared celular frente a los reactivos utilizados. En las bacterias grampositivas, la estructura densa del peptidoglucano retiene el complejo cristal violeta-yodo, impidiendo su eliminación durante la decoloración. En cambio, en las gramnegativas, la capa delgada y la presencia de una membrana externa favorecen la pérdida del colorante inicial, permitiendo que posteriormente se fijen con el colorante de contraste. Esto es lo que finalmente genera la diferencia de color observada al microscopio⁴⁸ (Anexo 4).

Cultivo

- **Medios enriquecidos (Agar chocolate)**

El agar chocolate es un medio de cultivo enriquecido, obtenido a partir del agar sangre mediante la lisis de los eritrocitos, proceso que le confiere su característico color marrón. Se emplea para el aislamiento de bacterias exigentes, como *H. influenzae*, ya que proporciona los nutrientes esenciales para su crecimiento. Este medio se incuba a temperaturas entre 35 y 37 °C en una atmósfera con aproximadamente 5 % de CO₂^{49,50}.

Su principio se basa en la liberación de factores de crecimiento como el NAD (factor V) y la hemina (factor X), que son la vía para facilitar el crecimiento bacteriano, durante la lisis de los glóbulos rojos. La muestra se siembra utilizando técnicas de estriado que permitan el aislamiento de colonias, además, se incuba bajo las condiciones controladas de temperatura y de CO₂. Al final de la incubación se evaluarán las colonias formadas, observando el tamaño, color y textura de las mismas. Las colonias de *H. influenzae* generalmente son pequeñas, lisas y de color crema a gris^{49,50} (Anexo 5).

Pruebas de identificación

El algoritmo de identificación comienza con la tinción de Gram para observar coccobacilos gramnegativos. De forma paralela, la muestra se inocula en agar chocolate suplementado con Isovitalex (con o sin bacitracina) y se incuba a 35–37 °C durante 24–48 horas en condiciones de microaerofilia. Tras el aislamiento de colonias sospechosas, se procede a su confirmación fenotípica. Esta etapa incluye una nueva tinción de Gram, la determinación de los requerimientos de los factores X (hemina) y V (NAD), así como la evaluación del satelitismo, la producción de indol, la actividad de las enzimas oxidasa y catalasa, y la fermentación de glucosa y lactosa^{20,23} (Anexo 6).

- **Requerimiento de factores X (hemina) y V (NAD)**

Las bacterias del género *Haemophilus* requieren factores de crecimiento específicos para desarrollarse, principalmente la hemina (factor X) y el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD o factor V). La necesidad de uno o ambos factores varía según la especie, por lo que la prueba de factores X y V constituye una herramienta útil para su identificación en el laboratorio. Esta característica nutricional es fundamental en microbiología clínica para orientar el diagnóstico⁵¹.

El principio de esta técnica se basa en observar el patrón de crecimiento bacteriano en relación con la presencia de los factores X y V. Para ello, se emplea un medio nutritivo sin estos compuestos, donde se inocula la muestra de forma uniforme. Luego, se colocan discos impregnados con los factores y se incuban bajo condiciones controladas. Tras la incubación, el crecimiento alrededor de los discos permite interpretar las necesidades nutricionales de la bacteria. Este patrón permite diferenciar especies como *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* y *H. ducreyi*⁵¹ (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las especies de *Haemophilus* aisladas del ser humano.

Especie	Factor V	Factor X	Ureasa	Indol	Ácido a partir de		β-hemólisis	Catalasa
					Glucosa	Lactosa		
<i>H. influenzae</i>	+	+	+/-	+/-	+	-	-	+
<i>H. parainfluenzae</i>	+	-	+/-	-	+	-	-	+/- (lento)
<i>H. haemolyticus</i>	-	+	+	+/-	+	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>H. segis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+/- (lento)
<i>H. aegypticus</i>	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>H. ducreyi</i>	-	+	-	-	+/-	-	-	-

Fuente: <http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%20libro%20digital/Manual%20de%20Bacteriologia.pdf>

• Satelitismo

La prueba de satelitismo es un método utilizado para la identificación de *H. influenzae*, basado en su capacidad de crecer cerca de colonias de *S. aureus*. Este fenómeno ocurre porque *S. aureus* libera NAD (factor V) durante su crecimiento, mientras que el medio aporta el factor X necesario. Gracias a esta interacción, la bacteria puede desarrollarse en zonas donde normalmente no crecería por sí sola. Las colonias que se forman presentan un aspecto similar a “gotas de rocío”, lo que ayuda a su identificación presuntiva²⁰.

El fundamento de esta técnica consiste en realizar un cultivo conjunto en un medio adecuado previamente inoculado con la suspensión bacteriana. Luego, se siembra de forma uniforme y se añade una cepa de *S. aureus* mediante estriado. Tras la incubación a temperatura y atmosfera controladas con CO₂, se favorece la interacción entre ambos microorganismos. Finalmente, se evalúa el crecimiento en la placa, observando el desarrollo de colonias alrededor de *S. aureus*. La aparición de colonias pequeñas en esta zona indica un resultado positivo de satelitismo, lo que confirma la dependencia del factor V y orienta a la identificación de *H. influenzae*⁵² (Anexo 7).

- **Prueba de la oxidasa**

En cuanto a la prueba de la oxidasa, esta resulta positiva en el caso de *H. influenzae*²³. Dicha técnica identifica microorganismos que poseen la enzima citocromo oxidasa, un componente esencial de la cadena de transporte de electrones que participa en la respiración aerobia donde el oxígeno actúa como aceptor final, diferenciándolos de los anaerobios obligados⁵³.

El método emplea reactivos que actúan como donadores artificiales de electrones, los cuales cambian de color al oxidarse. Para su ejecución, se aplica el indicador sobre un soporte físico y se inocula la colonia bacteriana. El viraje cromático varía según el reactivo utilizado pudiendo ser rosado, fucsia o azul intenso, siendo la velocidad de reacción un factor crítico, un cambio tardío se interpreta como débilmente positivo, mientras que la ausencia de coloración confirma un resultado negativo⁵³ (Anexo 8).

- **Prueba de la catalasa**

H. influenzae es positiva para la prueba de la catalasa, una técnica que detecta la presencia de dicha enzima en bacterias aerobias estrictas y anaerobias facultativas. Su función principal es descomponer el peróxido de hidrógeno que es un compuesto citotóxico si se acumula en agua y oxígeno. Para realizarla, se coloca una gota del reactivo sobre un portaobjetos y se añade la colonia bacteriana. La aparición inmediata y continua de burbujas, debido a la liberación de oxígeno, indica un resultado positivo; por el contrario, la ausencia de burbujeo indica un resultado negativo^{23,53} (Anexo 8).

- **Producción de indol**

La prueba del indol evalúa la capacidad metabólica microbiana para degradar el triptófano, un proceso mediado por la enzima triptofanasa que genera indol, ácido pirúvico y amoníaco. Esta reacción forma parte del panel bioquímico IMViC (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato), ampliamente utilizado en la identificación bacteriana. El indol producido reacciona con el *p*-dimetilaminobenzaldehído del reactivo de Kovacs, dando lugar a la formación de un anillo rojo característico que indica un resultado positivo.⁵³

Para realizar la prueba, la bacteria se inocula en un caldo enriquecido con triptófano y se incuba a 35 °C durante 24 a 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se agregan unas gotas del indicador para observar la reacción. La aparición de un anillo rojo intenso en la interfase del medio indica un resultado positivo⁵³. En *H. influenzae*, esta producción es variable según la cepa aislada, por lo que el hallazgo debe contrastarse con el resto del perfil bioquímico para asegurar un diagnóstico definitivo²³.

- **Producción de ácidos a partir de glucosa y lactosa**

La fermentación de glucosa determina la capacidad bacteriana para degradar este carbohidrato por vía fermentativa, con la consecuente producción de ácidos y,

eventualmente, gas. El procedimiento emplea un medio base con peptona, el azúcar a testear y un indicador de pH que vira al amarillo al acidificarse; por su parte, la aerogénesis se evidencia mediante la aparición de burbujas en la campana de Durham. Tras inocular el microorganismo e incubarlo a 35 °C durante 48 horas, se realiza la lectura. En el caso de *H. influenzae*, la reacción es positiva, mientras que el comportamiento frente a otros azúcares como la lactosa es habitualmente negativo, un patrón que facilita su diferenciación^{23,53}.

La fermentación de lactosa determina la capacidad del microorganismo de hacer uso de este disacárido como fuente carbonada por medio del fenómeno fermentativo. Se realiza en un caldo que contiene el azúcar y rojo fenol como un pH indicador que cambia a amarillo una vez que se generen ácidos orgánicos. Después de inocular, el medio se debe incubarse a 35-37 °C durante 24 horas y luego se interpreta el resultado. *H. influenzae* es propio y característico por no degradar a este carbohidrato por lo que el medio tiene el color rojizo original. Este rasgo negativo es una propiedad bioquímica que tiene gran importancia para su diferenciación^{23,54}.

Métodos automatizados

- **MALDI-TOF para identificación bacteriana**

El MALDI-TOF se ha consolidado en la microbiología clínica durante más de una década, debido a su capacidad para identificar microorganismos de manera rápida y precisa. Además de su aplicación en colonias obtenidas en medios sólidos, esta técnica permite analizar muestras directamente desde hemocultivos, líquido cefalorraquídeo y orina. En este sentido, ha demostrado ser útil para la identificación de bacterias grampositivas y gramnegativas, así como de microorganismos aerobios, anaerobios, micobacterias, *Nocardia*, levaduras, hongos filamentosos e incluso algunos virus⁵⁵.

Por otra parte, el proceso analítico inicia cuando la muestra microbiana se mezcla con una matriz y se coloca en una placa donde se seca formando cristales. Posteriormente, al ser expuesta a un láser, la mezcla absorbe energía, lo que provoca su ionización y vaporización. A continuación, los iones generados son acelerados en un tubo de vuelo bajo un campo electrostático, desplazándose según su relación masa-carga, es así que, el detector registra estas señales, generando un espectro donde el eje x representa el valor m/z y el eje y la intensidad, la cual se relaciona con la abundancia de las proteínas presentes⁵⁵ (Anexo 9).

- **API NH**

El sistema API (Analytical Profile Index) es una técnica útil para la identificación de microorganismos basada en reacciones bioquímicas estandarizadas, organizadas en galerías miniaturizadas que permiten obtener perfiles metabólicos específicos. Su diseño facilita la reproducibilidad de los resultados y la comparación mediante bases de datos estructuradas, lo que favorece una identificación confiable⁵⁶. Este sistema se destaca por su aplicabilidad

en el laboratorio, ya que cuenta con un alto nivel de precisión, manteniéndose vigente como método fenotípico de referencia⁵⁷.

La metodología se basa en un conjunto estandarizado de pruebas bioquímicas miniaturizadas dispuestas en tiras o galerías que se inoculan con una suspensión del cultivo microbiano, proporcionando múltiples reacciones en paralelo que permiten construir un perfil fenotípico único. Durante la incubación, las reacciones generan cambios visibles que se codifican numéricamente para formar un perfil analítico que se compara con una base de datos de referencia⁵⁷.

- **VITEK**

El sistema VITEK es una plataforma automatizada en microbiología clínica diseñada para agilizar la identificación de patógenos y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. A diferencia de los métodos convencionales, este equipo utiliza mediciones ópticas sobre tarjetas con micropozos que contienen sustratos bioquímicos específicos, los cuales son inoculados con una suspensión bacteriana. A lo largo de la incubación, el software integrado monitoriza y analiza las variaciones de absorbancia de forma continua. Este procesamiento optimiza el flujo de trabajo en el laboratorio y reduce los tiempos de entrega de resultados, garantizando una alta reproducibilidad diagnóstica^{58,59}.

- **MicroScan**

El sistema MicroScan utiliza paneles estandarizados semi-automatizados para la identificación microbiana y la determinación de perfiles de susceptibilidad. Los paneles contienen reactivos liofilizados que facilitan la observación de reacciones bioquímicas y de crecimiento, generando perfiles fenotípicos reproducibles. Integrado con tecnologías de lectura óptica y software especializado, detecta cambios de color y turbidez, mejorando la reproducibilidad y la consistencia analítica, lo que optimiza el procesamiento de pruebas y contribuye eficientemente al diagnóstico clínico⁶⁰.

Métodos inmunológicos

- **Aglutinación en látex**

La prueba de aglutinación en látex, como el sistema Wellcogen™ para *H. influenzae* tipo b (Hib), es un método rápido de detección cualitativa diseñado para identificar el antígeno capsular del microorganismo en fluidos corporales o hemocultivos como consecuencia de una infección (Anexo 10). Se basa en el uso de partículas de látex de poliestireno recubiertas con anticuerpos específicos frente al antígeno de Hib, las cuales se aglutinan de forma visible cuando este está presente en cantidad suficiente, permitiendo una identificación presuntiva del serogrupo mediante una técnica en portaobjetos de fácil ejecución⁶¹ (Anexo 11).

Esta prueba tiene un uso estrictamente profesional y, por lo tanto, su interpretación debe ser adecuada, no es automatizada. Aunque es útil como método de cribado, los resultados deben ser confirmados con el cultivo microbiológico y correlacionados con la evaluación clínica del paciente, por lo que no debe ser utilizada como prueba final. En conjunto, forma parte de estrategias diagnósticas integrales orientadas a obtener resultados oportunos y de calidad en el laboratorio clínico⁶¹.

- **Inmunoensayos.**

Los inmunoensayos constituyen una herramienta analítica fundamental para el diagnóstico y el monitoreo biológico frente a *H. influenzae*, con especial énfasis en el serotipo b (Hib). Entre estas técnicas, el ensayo ELISA permite identificar el polisacárido capsular PRP y cuantificar anticuerpos específicos, como la inmunoglobulina G (IgG) anti-Hib en suero. Esta medición es clave para evaluar la respuesta protectora desencadenada tanto por la infección natural como por la vacunación, facilitando la detección de fallos inmunológicos y la verificación de la eficacia de los esquemas de inmunización⁶².

En esta línea de investigación, se han desarrollado metodologías basadas en ELISA para optimizar el análisis de estos anticuerpos. Un ejemplo es un ensayo diseñado para la detección de IgG contra el PRP de Hib, que emplea un antígeno sintético producido por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, Cuba. Para su calibración, se utilizó de un suero estándar secundario obtenido a partir de mezclas de donantes y previamente estandarizado con el patrón internacional de la OMS, lo que garantiza la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados⁶³.

Con base en este diseño, el procedimiento experimental consistió en la adsorción del antígeno en placas de 96 pocillos, seguida de la incubación con sueros diluidos y la posterior adición de un conjugado anti-IgG humana unido a peroxidasa. Posteriormente, se realizó el revelado con ortofenilendiamina y la reacción fue detenida con ácido sulfúrico. Finalmente, la densidad óptica se midió a 492 nm, y los valores obtenidos se transformaron en concentraciones mediante un software especializado, permitiendo una cuantificación precisa de los anticuerpos anti-PRP y la evaluación del desempeño del ensayo⁶³.

Métodos moleculares

- **PCR convencional y en tiempo real**

La PCR es un método molecular que logra amplificar fragmentos específicos de ADN mediante cebadores complementarios. Este proceso es catalizado por una ADN polimerasa termoestable, que sintetiza nuevas cadenas a partir de nucleótidos libres, la mezcla incluye ADN molde, cebadores, desoxinucleótidos, la enzima y un cofactor como el magnesio. Posteriormente se somete a ciclos térmicos controlados que favorecen la replicación, cada ciclo comprende tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión^{64,65} (Anexo 12).

Por otro lado, la PCR en tiempo real o qPCR permite observar la amplificación del ADN mientras ocurre. A diferencia de la técnica convencional, no requiere electroforesis, ya que la detección es simultánea, en este método se emplea principios similares, pero incorpora sistemas basados en fluorescencia. Esta señal aumenta conforme se generan más copias del ADN y el proceso se realiza en equipos especializados que registran la amplificación en cada ciclo⁶⁶.

- **Detección de genes específicos (*bexA*, *hpd*)**

La detección molecular de *H. influenzae* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la identificación de genes específicos como *hpd* y *bexA*, lo que permite una caracterización precisa del microorganismo. Las muestras positivas para ambos genes se consideran indicativas de *H. influenzae* encapsulado, y pueden someterse a PCR adicionales dirigidas a genes específicos de serotipo para su confirmación mediante secuenciación de ADN de los amplicones⁶⁷.

Por otro lado, las muestras positivas únicamente para el gen *hpd* y negativas para *bexA* se interpretan como posibles NTHi o *H. haemolyticus*. En estos casos, la secuenciación del gen *hpd* permite diferenciar entre ambas especies, mejorando la precisión diagnóstica y facilitando una adecuada interpretación clínica⁶⁷.

Tratamiento

El tratamiento de las infecciones por *H. influenzae* tipo b (Hib) se basa principalmente en el uso de antibióticos betalactámicos; sin embargo, su eficacia puede verse comprometida por la creciente resistencia bacteriana. El mecanismo más frecuente es la producción de β -lactamasas, presente en aproximadamente el 10–25 % de las cepas, lo que limita la acción de fármacos como la ampicilina y la amoxicilina. Además, se han descrito otros mecanismos, como mutaciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBP), especialmente en la PBP3 codificada por el gen *ftsI*, que disminuyen la afinidad de estos antibióticos por su sitio de acción y generan distintos perfiles de resistencia^{6,68,69}.

De entre las alternativas terapéuticas, se encuentran la amoxicilina-ácido clavulánico y las cefalosporinas de tercera generación por su capacidad bactericida y por su adecuada penetración al LCR, pero en las infecciones invasivas graves como la meningitis o la sepsis se recomienda la cefotaxima o la ceftriaxona, en perfusión intravenosa. Para la neumonía, se considera de elección la amoxicilina-ácido clavulánico, aunque la ampicilina o la penicilina G son útiles si se verifica que no hay β -lactamasas. El meropenem se reserva para infecciones por microorganismos multirresistentes, y la cefuroxima se evita por su menor eficacia en la eliminación bacteriana a nivel del SNC⁶⁸.

El abordaje de las infecciones no invasivas suele ser ambulatorio y por vía oral, recurriendo a amoxicilina-ácido clavulánico o cefalosporinas de segunda o tercera generación, reservando la amoxicilina como monoterapia ante cepas sensibles. Por otra parte, en el manejo de la meningitis, la administración concomitante de dexametasona junto

con el antimicrobiano inicial disminuye significativamente el riesgo de secuelas neurológicas; para ello, se pauta un esquema de 0,6 mg/kg/día fraccionado cada 6 horas durante 4 días⁶⁸.

Teniendo en cuenta que las BLNAR (β -lactamasa negativas resistentes a ampicilina), las cuales se encuentran asociadas a mutaciones del gen *ftsI*, se clasifican en distintos grupos (I, II, III y III-like) y entre estos, los grupos III y III-like son aquellos que presentan los mayores niveles de resistencia, con concentraciones mínimas inhibitorias más elevadas. En estos casos, puede ser necesario recurrir a alternativas terapéuticas como macrólidos o quinolonas, dependiendo del perfil de sensibilidad⁶⁹.

La creciente resistencia antimicrobiana en *H. influenzae* dificulta el manejo clínico en la población pediátrica. Este comportamiento, favorecido por el uso inadecuado de antibióticos, responde principalmente a la producción de β -lactamasa y a mutaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP). Estudios recientes han evidenciado una alta prevalencia de cepas productoras de β -lactamasa, alcanzando hasta el 92 % en algunas series, lo que refleja una considerable variabilidad geográfica y resalta la necesidad de vigilancia constante⁷⁰.

Ante esta situación, es fundamental que los laboratorios de microbiología refuercen la vigilancia de la resistencia antimicrobiana y que el tratamiento se base en pruebas de sensibilidad. Asimismo, el uso racional de antibióticos por parte de los profesionales de la salud resulta clave para limitar la diseminación de cepas resistentes y optimizar el manejo terapéutico en pacientes pediátricos⁷⁰.

Importancia del diagnóstico temprano en pediatría

La infección especialmente por el serotipo Hib, continúa siendo un problema relevante de salud pública en poblaciones infantiles con baja cobertura de vacunación. Diversos estudios indican que la mayoría de las muertes asociadas a este patógeno se deben a neumonía (76 %), mientras que cerca de dos tercios de las infecciones invasivas corresponden a meningitis. La letalidad de esta última varía considerablemente, desde alrededor del 5 % en países con alto desarrollo humano hasta el 40 % en contextos con recursos limitados; además, entre los sobrevivientes, entre el 10 % y el 15 % presenta secuelas permanentes, lo que evidencia su importante impacto clínico y epidemiológico⁶⁸.

Dentro de las manifestaciones clínicas, la meningitis representa la forma más grave de infección por *H. influenzae*, debido a su asociación con complicaciones como pérdida auditiva, convulsiones, edema cerebral e hidrocefalia, pudiendo evolucionar a coma o muerte sin tratamiento oportuno. Otras presentaciones también pueden alcanzar elevada gravedad: la neumonía puede progresar a sepsis o complicarse con empiema y pericarditis; la otitis media y la sinusitis pueden derivar en mastoiditis o abscesos; y la epiglotitis constituye una urgencia médica por el riesgo de obstrucción de la vía aérea, requiriendo intervención inmediata¹.

Frente a este escenario, la intervención terapéutica inicial es el factor crítico para optimizar el pronóstico. El inicio inmediato de una antibioterapia empírica, respaldada por la toma simultánea de hemocultivos para el posterior ajuste del esquema, es la pauta central del manejo hospitalario. Cabe destacar que la evolución clínica está sujeta a la edad del paciente y la carga bacteriana inicial; no obstante, los cuadros no invasivos como la neumonía no complicada por Hib o cepas no tipificables suelen cursar con una evolución notablemente más favorable que las formas sistémicas¹.

En el ámbito preventivo, la vacuna conjugada contra Hib representa la estrategia más eficaz para combatir la enfermedad invasiva, garantizando una protección cercana al 98% en menores de cinco años. La estructura de este biológico, basado en el polisacárido capsular PRP unido a una proteína transportadora, induce una respuesta inmunitaria robusta. Más allá de la síntesis de anticuerpos específicos, este mecanismo frena la colonización nasofaríngea, un efecto que mitiga la transmisión bacteriana a nivel comunitario^{1,68}.

METODOLOGÍA

Tipo de investigación

Según el enfoque

El presente estudio es de tipo cualitativo, considerando que no se utilizaron mediciones cuantitativas ni herramientas estadísticas para la obtención de datos. Este enfoque permitió analizar en profundidad la información científica recopilada de diversas bases bibliográficas sobre los métodos diagnósticos empleados para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos.

Según el nivel

Es de tipo descriptivo, en virtud que se fundamentó en la búsqueda, recopilación y análisis de información relevante proveniente de revistas especializadas, informes técnicos, libros electrónicos y repositorios académicos disponibles en bases de datos científicas. Estas fuentes permitieron describir las principales técnicas diagnósticas de laboratorio en la identificación de la bacteria.

Según diseño

Es un trabajo de carácter documental y no experimental, en razón de que no se realizó una manipulación intencional de variables de estudio; esto permitió llevar a cabo un análisis sistemático de la información reportada en la literatura científica. Asimismo, se consideró datos relevantes provenientes de publicaciones de organismos nacionales e internacionales, relacionados con el diagnóstico de *H. influenzae*.

Según la secuencia temporal

La investigación es de corte transversal, en vista que se analizó información científica proveniente de investigaciones previas, publicadas en un periodo de tiempo determinado, sin seguimiento longitudinal. Los datos se recolectaron de documentos relevantes, lo que permitió establecer una base que oriente al desarrollo de futuros trabajos enfocados con el tema de estudio.

Según la cronología de los hechos

Es de tipo retrospectivo, dado que se estableció en el análisis de investigaciones previamente realizadas y publicadas. No se generaron datos primarios, sino que se analizó información relacionada con los métodos de diagnóstico de *H. influenzae*.

Población y Muestra

Población

La población de estudio se obtuvo mediante una búsqueda sistemática de literatura científica utilizando palabras clave en inglés y español, con el propósito de recopilar información relevante y actualizada sobre el tema de estudio. Como resultado, se seleccionaron 82 artículos científicos relacionados con los métodos de diagnóstico para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos, provenientes de bases de datos de alcance internacional como PubMed (26), Scopus (7), SciELO (1), ProQuest (28), Google Scholar (7), MDPI (2), SpringerLink (2), Frontiers (6), ResearchGate (2) y Elsevier (1). Se optimizó la estrategia de búsqueda empleando operadores booleanos AND y OR, a fin de obtener una mayor precisión de los resultados.

Muestra

Una vez aplicados los criterios de selección, la muestra quedó conformada por 30 artículos de revisión relevantes para el estudio. La información recopilada mantuvo relación directa con el problema de investigación y los objetivos planteados, y se obtuvo de bases de datos indexadas que cumplieron con los criterios establecidos para el tema en análisis. Los artículos seleccionados estuvieron indexados en PubMed (9), ProQuest (13), Google Scholar (4), Frontiers (3), MDPI (1) (Anexo 11).

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

La información que se consideró en la presente investigación incluyo:

- Artículos científicos publicados en los últimos 10 años (2016–2026).
- Estudios que abordaron de manera contundentemente métodos microbiológicos y moleculares aplicados a la identificación de *H. influenzae*.
- Información indexada en bases de datos reconocidas que contuvieron estudios completos y relevantes sobre los métodos de diagnóstico para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos

Criterios de exclusión

Se incluyó en el trabajo aquellos documentos que a pesar de cumplir con características que aportan a la investigación fueron finalmente excluidos:

- Información poco relevante o que no se relacionó directamente con el problema de estudio.
- Publicaciones con algunos datos que ya no estuvieron vigentes.

- Artículos incompletos, aunque abordaron aspectos de interés, no presentaron información suficiente o resultados relevantes para el desarrollo de la investigación.
- Artículos que su acceso era limitado debido a las condiciones de costo.

Método de estudio

En el presente trabajo se aplicó un enfoque basado en el método teórico, mediante el cual se realizó el análisis y la síntesis de la información recopilada de diversas fuentes científicas. Para ello, se consultaron artículos relevantes, libros, manuales y sitios web de organizaciones nacionales e internacionales relacionadas con el tema de estudio.

Técnicas y procedimientos

Técnica

Observación.

Procedimiento

El diseño metodológico se basó en el análisis descriptivo de literatura científica indexada, organizando la información recopilada de forma sistemática. Para ello, se seleccionaron fuentes de alto impacto, con el fin de garantizar el respaldo teórico y la validez académica del estudio.

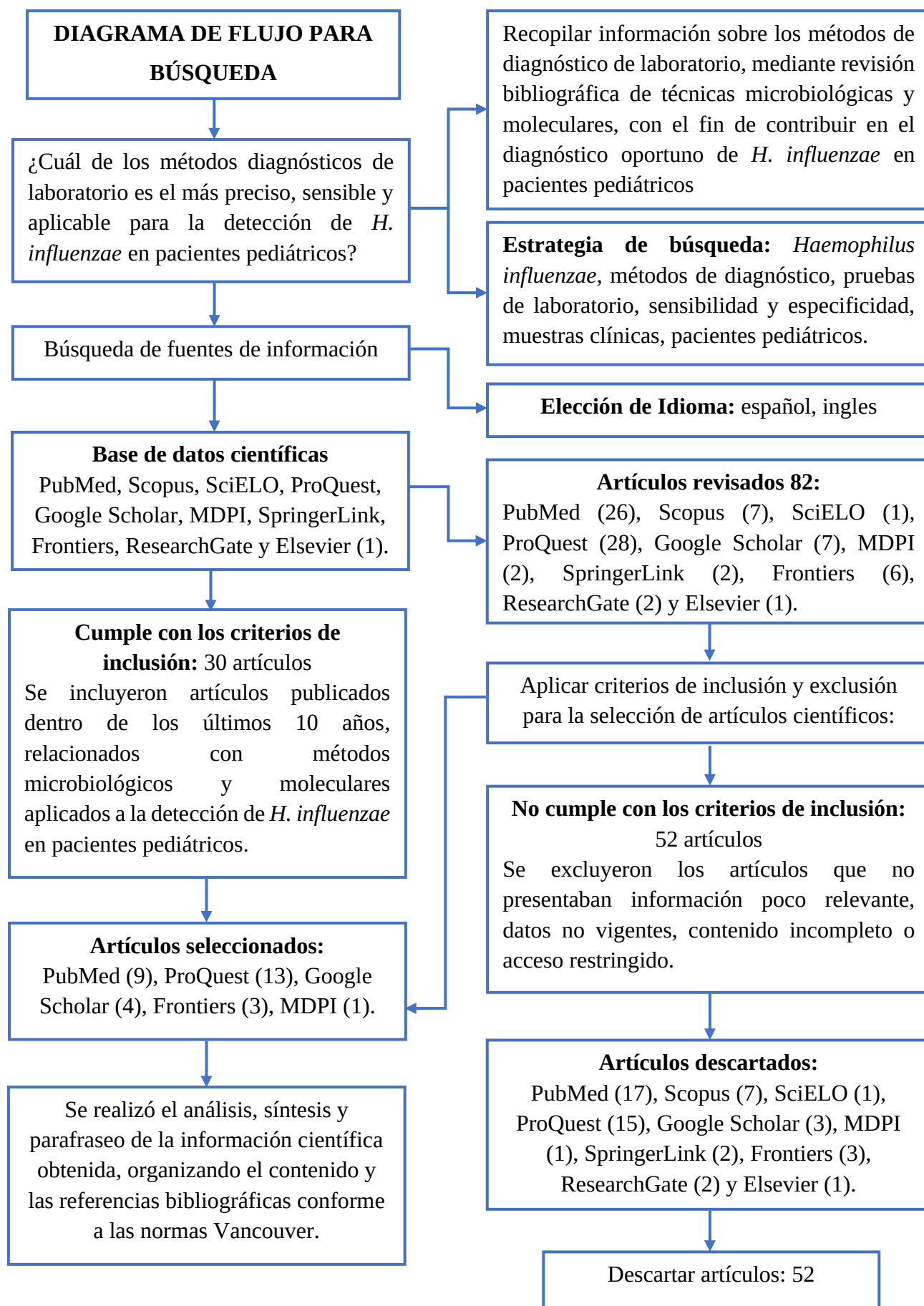
Procesamiento estadístico

El procesamiento de datos incluyó el análisis crítico y la contrastación de la literatura obtenida de las distintas fuentes bibliográficas. Luego, la información se organizó y se comparó, lo que permitió extraer datos cualitativos relevantes para el desarrollo y la comprensión del tema de investigación.

Consideraciones éticas

En el presente proyecto de investigación se respetaron las consideraciones éticas correspondientes, garantizando el adecuado uso de la información científica recopilada. Para ello, se reconoció la propiedad intelectual de los diferentes autores mediante la aplicación de las normas Vancouver en las citas y referencias bibliográficas. Asimismo, los datos obtenidos fueron utilizados únicamente con fines académicos y para el cumplimiento de los objetivos planteados en el estudio.

En el siguiente diagrama de flujo se detalla el proceso llevado a cabo para la búsqueda bibliográfica y la selección de los artículos más relevantes.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

H. influenzae mantiene su consideración como un patógeno importante en la población pediátrica por su excepcional capacidad para ser responsable de infecciones localizadas, así como de cuadros sistémicos graves. Ante este espectro clínico, el diagnóstico de laboratorio cobra gran relevancia para su identificación precoz y selección del tratamiento correspondiente. En este sentido, han aparecido distintos métodos diagnósticos, convencionales y moleculares, cada uno con características específicas que facilitan la detección del microorganismo.

La elaboración de este capítulo se fundamentó en la revisión de artículos sobre los métodos de diagnóstico de laboratorio para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos. Con el fin de dar respuesta a la investigación, los objetivos propuestos se desglosan en tres apartados:

- Analizar las ventajas y desventajas de los métodos microbiológicos convencionales y moleculares para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos, a partir de la revisión de artículos, con el fin de aportar evidencia que optimice el diagnóstico y apoye decisiones clínicas oportunas en el manejo de las infecciones causadas por este patógeno.
- Comparar la sensibilidad y especificidad de los métodos microbiológicos y moleculares, mediante el análisis de resultados en estudios clínicos, para determinar el método más preciso en la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos.
- Destacar las muestras clínicas más utilizadas para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos, a través del estudio de artículos científicos, con el fin de analizar el espécimen de mayor utilidad diagnóstica.

Con el propósito de dar cumplimiento a los objetivos específicos de este trabajo, se procedió a la recolección de los datos más relevantes, los cuales se estructuran y exponen en las tablas subsiguientes:

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos microbiológicos convencionales y moleculares para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos.

Nº	Autor y año	Población de estudio	Métodos de laboratorio	Ventajas	Desventajas	Contribución diagnóstica y manejo clínico de <i>H. influenzae</i>
1.	Haddad et al. ⁷¹ (2018)	122	Convencionales	- Cultivo: Gold standard. - Gram: Orienta al diagnóstico.	- Cultivo: Mayor tiempo. - Cultivo y Gram: Disminuyen su rendimiento tras el uso de antibióticos o con baja carga bacteriana.	- Orienta al diagnóstico inicial. - Confirman la presencia del agente mediante cultivo y pruebas complementarias.
			Moleculares	- Alta sensibilidad y especificidad para Hib. - Identifica ADN bacteriano. - Útil después de antibióticos.	- Costo elevado. - No identifica los serotipos	- Diagnóstico rápido/eficaz. - Detectan casos no identificados. - Apoyan la vigilancia de Hib.
2.	O'Brien et al. ⁷² (2018)	1.692	Convencionales	- Gold standard. - Identificación definitiva de <i>H. influenzae</i>	- Posibles falsos negativos.	- Confirman la infección. - Identifica el agente causal.
			Moleculares	- Detecta ADN de <i>H. influenzae</i> y, según los genes analizados, diferencia cepas	- Baja sensibilidad en sangre.	- Detección de infecciones invasivas. - Ayuda diagnóstica.

				encapsuladas y no tipificables.	- Posibles resultados asociados a coinfecciones.		
				- Alta especificidad y sensibilidad diagnóstica.			
3.	Supriya et al. ⁷³ (2021)	272	Convencionales	- Cultivo (AS y ACH) - Tinción de Gram y de naranja de acridina. - Catalasa y oxidasa.	- Cultivo: Método referencial - Gram: Orienta el diagnóstico inicial. - Naranja de acridina: Apoyo en cultivos negativos. - Bioquímicas: identificación bacteriana convencional.	- Sensibilidad baja tras uso previo de antibióticos. - Requiere más tiempo. - Resultados falsos negativos.	- Orientan el diagnóstico. - Confirman la infección por aislamiento bacteriano. - Apoyan la evaluación microbiológica del LCR.
			Moleculares	- Detecta ADN bacteriano incluso cuando el cultivo es negativo. - Detección simultánea de varios patógenos. - Alta sensibilidad y especificidad.	- El microorganismo no se recupera para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. - Mayor costo.	- Aumentan el rendimiento diagnóstico. - Complementa el diagnóstico etiológico de la meningitis. - Útil con administración previa de antibióticos.	
4.	Carnalla et al. ⁷⁴ (2022)	278	Convencionales	- Cultivo (AS y ACH con factor X y V) y Gram	- Cultivo: Método de referencia. - Gram: Complementa el diagnóstico.	- Sensibilidad limitada. - Baja de la sensibilidad tras administración previa de antibióticos.	- Permiten confirmar la infección y orientar el tratamiento antimicrobiano cuando el cultivo es positivo.

			Moleculares	- Alta especificidad y sensibilidad. - Menor contaminación. - Resultados más rápidos.	- Requiere equipamiento especializado.	- Favorecen el diagnóstico precoz y el inicio oportuno del tratamiento, optimizando el manejo clínico.
5.	Beissbarth et al. ⁷⁵ (2018)	773.	Convencionales - Cultivo (BVCCA) - Factores X y V.	- Aislamiento bacteriano para posteriores estudios. - Permite la identificación fenotípica de <i>H. influenzae</i>.	- No distinguen <i>H. influenzae</i> de <i>H. haemolyticus</i>. - Riesgo de identificación errónea en muestras.	- Contribuye a la evaluación inicial de infecciones respiratorias.
			Moleculares	- Diferencia <i>H. influenzae</i> de <i>H. haemolyticus</i>. - Mayor especificidad. - Reducen errores de identificación fenotípica.	- Mayor complejidad y costo. - El rendimiento depende del gen diana empleada.	- Interpretación más precisa de la etiología de infección.
6.	Pimenta et al. ⁷⁶ (2020)	325	Convencionales - Cultivo (ACH con bacitracina) y Gram - Prueba de oxidasa - Factores X y V.	- Aislamiento directo a partir de muestras nasofaríngeas. - Permite la identificación fenotípica.	- Afectado por uso de antibióticos previos. - Depende de la calidad del espécimen y del cultivo. - No descubre todos los casos positivos.	- Confirma la infección mediante aislamiento. - Permite ejecutar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

			Moleculares - qPCR dirigida al gen <i>hpd</i>	- Tiene mayor sensibilidad que el cultivo. - Identifica <i>H. influenzae</i> incluso con baja carga bacteriana o tras el uso de antibióticos previos.	- No diferencia la colonización de infección. - Requiere equipo especializado y personal capacitado. - Mayor costo que el cultivo.	- Mejora el rendimiento diagnóstico
7.	Bajanca et al. ⁷⁷ (2022)	1.524	Convencionales - Cultivo (ACH Isovitalax o bacitracina)	- Identificación inicial de cepas sospechosas. - Aislamiento de <i>H. influenzae</i>.	- Solo caracteriza crecimiento y morfología. - Sin caracterización genética - Limitada diferenciación.	- Permite el aislamiento bacteriano. - Apoya la vigilancia epidemiológica.
			Moleculares - PCR del gen <i>bexA</i>. - WGS y MLST	- Detecta el gen <i>bexA</i>, marcador de cepas encapsuladas. - Detecta genes de resistencia y virulencia. - Caracterización genética.	- Mayor costo. - Requiere equipamiento especializado.	- Identifica cepas con potencial invasivo. - Fortalece la vigilancia epidemiológica. - Apoya el seguimiento del impacto de la vacunación contra Hib.
8.	Yuan et al. ⁷⁸ (2023)	800	Convencionales - VITEK® 2 NH. - Biotipificación (biotipos I–VIII)	- VITEK® 2 NH: Identifica de forma automatizada entre 2 y 8 horas.	- Elevado costo y solicita cultivo previo - Biotipificación: No detecta serotipo ni resistencia antimicrobiana.	- Confirma la identificación de <i>H. influenzae</i>. - Favorece la vigilancia epidemiológica.

				- Biotipificación: Diferencia biotipos con utilidad epidemiológica.		- Orienta el tratamiento cuando se complementa con pruebas de susceptibilidad.
			Moleculares	- Detecta genes capsulares y diferencia los serotipos (a–f). - qPCR: Identifica genes de resistencia.	- PCR capsular: Exige equipo especializado. - qPCR: Detecta únicamente los genes incluidos en el ensayo.	- Reconoce si la cepa es encapsulada o NTHi. - Determina el serotipo capsular (a, b, c, d, e o f). - Detecta cepas BLPACR. - Fortalece la vigilancia epidemiológica molecular.
9.	Fan et al. ⁷⁹ (2018)	1.514	Convencionales	- Cultivo: Bajo costo y permite aislar la bacteria viva. - Gram: Permite observar cocobacilos gramnegativos sugestivos de <i>H.</i> <i>influenzae</i> - Factores X y V: confirman la identificación de <i>H.</i> <i>influenzae</i> .	- Cultivo: Mayor tiempo (24–48 h). - Cultivo: Puede fallar si el paciente ha recibido antibióticos previos. - Gram: La escasa carga bacteriana disminuye su sensibilidad. - Factores X y V: Necesario el aislamiento previo del agente.	- Confirma la infección para definir el esquema antibiótico. - Facilitan el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana y fortalecen el monitoreo epidemiológico de la región.
			Moleculares	- Cuenta con alta sensibilidad y especificidad. - Caracterización simultánea del patógeno	- Incapaz de discriminar el serotipo específico dentro de las cepas encapsuladas	- Rapidez diagnóstica. - Apoya decisiones clínicas oportunas. - Aumenta la detección de <i>H.</i> <i>influenzae</i> .

				(ompP6) y su potencial capsular (bexA).	-	Demanda equipamiento especializado y personal capacitado.	
				- No depende de microorganismos viables	-	Mayor costo	
10.	Tran et al. ⁸⁰ (2024)	336	Convencionales	- Método de referencia.	-	Resultados tardíos (24–72 h).	- Corroboran el aislamiento.
			- Cultivo.	- Permite realizar identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobiana.	-	Menor rendimiento tras el uso de antibióticos o baja carga bacteriana.	- Permiten la ejecución de pruebas de sensibilidad antimicrobiana.
				- Eficaz concordancia con qPCR cuando la carga bacteriana es apropiada.	-	Demanda de condiciones especiales de cultivo para bacterias exigentes.	
			Moleculares	- Mayor sensibilidad que el cultivo bacteriano.	-	Alto costo.	- Facilita el diagnóstico etiológico temprano.
			- qPCR.	- Resultados rápidos.	-	Requiere equipamiento y personal especializado.	- Favorece el inicio oportuno del tratamiento antimicrobiano.
				- Identifica bajas cargas bacterianas	-	No proporciona aislamiento bacteriano ni antibiograma	- Complementa al cultivo, en pacientes previamente tratados con antibióticos.
				- Detectar coinfecciones cuando se utiliza en formato multiplex.			

***Nota:** **AC:** Agar chocolate, **AS:** Agar sangre, **BVCCA:** Agar chocolate con bacitracina, vancomicina y clindamicina, **LCR:** Líquido cefalorraquídeo, **RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, **PCR-HRM:** Reacción en Cadena de la Polimerasa seguida de Fusión de Alta Resolución, **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico, **Hib:** *H. influenzae* tipo b, **NTHi:** *H. influenzae* no tipificable, **hpd:** Gen de la proteína D, **WGS:** Secuenciación de genoma completo, **MLST:** Tipificación de Secuencias Multilocus, **BLPACR:** Betalactamasa Positiva, Resistente a Amoxicilina/Clavulánico

Análisis e interpretación

La tabla 2 pone de manifiesto que los métodos habituales, representados principalmente por el cultivo y el Gram, continúan siendo elementos fundamentales y necesarios para el diagnóstico de *H. influenzae* ya que permiten su aislamiento e identificación y en determinados casos la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana. No obstante, pueden verse limitados por la administración previa de antibióticos, la poca carga bacteriana y los largos tiempos de los que se dispone para obtener resultados.

Por su parte, las técnicas moleculares, como las diferentes modalidades de PCR, han mostrado tener una mejor sensibilidad y especificidad que el cultivo. Estas técnicas permiten identificar casos que puedan no ser detectados por los métodos convencionales y distinguir entre cepas, serotipos y genes de resistencia, además de dar respuestas más rápidamente, lo cual facilita la toma de decisiones terapéuticas más precoces y refuerza la vigilancia epidemiológica. Por otro lado, su uso puede quedar limitado por su costo y por requerir de infraestructura especializada.

Discusión

Los estudios revisados indican que este diagnóstico de *H. influenzae* ha cambiado de forma significativa debido a la reciente introducción de las técnicas moleculares, las cuales han demostrado un mejor rendimiento que las técnicas microbiológicas tradicionales, especialmente en los pacientes pediátricos con sospecha de enfermedad invasiva o de infecciones respiratorias. Sin embargo, más allá de los resultados generales, la realidad de cada laboratorio depende de su contexto y capacidades disponibles.

Para optimizar la detección de infecciones invasivas por *H. influenzae* en pediatría, Haddad et al.⁷¹, evaluaron 122 muestras de LCR contrastando los métodos convencionales (cultivo y Gram) con la técnica de RT-PCR singleplex. Aunque las herramientas tradicionales mantienen su utilidad en la orientación inicial, su rendimiento clínico decae ante la antibioterapia previa o bajas cargas bacterianas. Por el contrario, la RT-PCR demostró un perfil analítico superior, identificando casos adicionales que habían sido omitidos por el cultivo, lo que agiliza el abordaje oportuno y consolida la vigilancia epidemiológica de Hib.

Por otro lado, O'Brien et al.⁷², analizaron el desempeño del cultivo convencional y la qPCR en 1.692 muestras clínicas para optimizar el diagnóstico de *H. influenzae*. Aunque el cultivo se mantiene como el método de referencia para confirmar la infección y el agente causal, suele arrojar falsos negativos si existe un uso previo de antibióticos. En cambio, la qPCR detectó cepas encapsuladas y no encapsuladas con alta sensibilidad y especificidad, rescatando casos que los métodos tradicionales no reconocieron. Así, el estudio demuestra que las herramientas moleculares complementan eficazmente al cultivo en el diagnóstico de estas infecciones invasivas pediátricas.

Para optimizar el diagnóstico etiológico de la meningitis bacteriana, Supriya et al.⁷³, evaluaron a 272 pacientes para comparar el rendimiento de la mPCR frente a métodos convencionales (cultivo, Gram y naranja de acridina, y pruebas bioquímicas). Las técnicas clásicas siguen siendo fundamentales en la evaluación microbiológica inicial, su sensibilidad disminuye notablemente si existe una administración previa de antimicrobianos. En cambio, la PCR múltiple permitió identificar simultáneamente varios patógenos y detectar ADN bacteriano incluso en muestras con cultivos negativos, demostrando ser un complemento eficaz que incrementa de forma significativa el rendimiento diagnóstico.

En el estudio realizado por Carnalla et al.⁷⁴, compararon el cultivo y la tinción de Gram con la RT-PCR multiplex en 278 niños. El estudio demostró que el cultivo sigue siendo esencial para la confirmación microbiológica, su sensibilidad decae considerablemente tras el uso previo de antibióticos. Por su parte, la RT-PCR multiplex aportó una elevada especificidad, sensibilidad y rapidez; sin embargo, no identificó casos de *H. influenzae* debido al predominio de otros patógenos en la población evaluada. Aun así, los autores destacaron que esta herramienta agiliza el manejo clínico oportuno y ayuda a reducir el uso innecesario de antimicrobianos.

Con el fin de refinar la diferenciación de *H. influenzae* frente a especies estrechamente relacionadas, Beissbarth et al.⁷⁵ evaluaron 773 muestras respiratorias mediante cultivo convencional y PCR-HRM dirigida al gen *hpd*. Aunque los métodos fenotípicos son útiles para el aislamiento y caracterización posterior, su resolución es insuficiente para distinguir *H. influenzae* de *H. haemolyticus*, lo que eleva el riesgo de falsos diagnósticos. Por el contrario, la PCR-HRM aportó una especificidad superior al discriminar con precisión ambas bacterias, superando los sesgos del cultivo y garantizando una asignación etiológica exacta.

Para analizar la colonización nasofaríngea como reservorio de *H. influenzae* en la infancia, Pimenta et al.⁷⁶ evaluaron 325 muestras mediante cultivo convencional y qPCR dirigida al gen *hpd*. Los resultados del estudio evidenciaron que, aunque el cultivo permite el aislamiento de cepas para su posterior tipificación, este resultado oscila según la calidad de la muestra y el uso previo de antibioterapia. En comparación, la qPCR detectó un mayor número de cepas, tanto tipificables como no tipificables. Sin embargo, los autores indican que esta técnica no realiza la distinción de colonización frente a infección activa, por lo que sus resultados deben considerarse junto al contexto clínico del paciente.

Los hallazgos de Bajanca et al.⁷⁷ quienes evaluaron 1.524 aislamientos de *H. influenzae* mediante cultivo, PCR del gen *bexA*, secuenciación del genoma completo y tipificación multilocus, evidenciaron que las técnicas moleculares superan a los convencionales, ya que permiten identificar con mayor precisión los serotipos capsulados, los genes de resistencia antimicrobiana y los factores de virulencia. Aunque el cultivo continúa siendo eficaz para el aislamiento inicial, su limitada capacidad para definir el perfil genético reduce su utilidad en salud pública. Por eso se resalta la necesidad de incorporar herramientas moleculares para reforzar la vigilancia y evaluar el impacto real de la vacunación contra Hib.

Frente al crecimiento de variantes no tipificables como las de resistencia antimicrobiana, Yuan et al.⁷⁸ efectuaron el análisis de 800 aislamientos pediátricos mediante biotipificación, VITEK® 2 NH, PCR capsular y qPCR. Los autores evidencian que, si bien las pruebas tradicionales son accesibles y prácticas para la identificación inicial, tienen limitaciones a la hora de caracterizar las cepas NTHi y de detectar con precisión los mecanismos de resistencia. Las técnicas moleculares mostraron una alta concordancia diagnóstica, permitiendo la tipificación de serotipos capsulares y la identificación de genes específicos de resistencia, para ayudar a reforzar el tratamiento y la vigilancia epidemiológica.

Con el objetivo de poder comparar el cultivo y la tinción de Gram con la mPCR de un solo paso en 1.514 muestras, Fan et al.⁷⁹ valoró el impacto del diagnóstico rápido en el pronóstico del paciente. Los resultados mostraron que, aunque el cultivo continúa siendo el método de referencia para el aislamiento bacteriano y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, requiere más tiempo y su rendimiento disminuye cuando el paciente ha recibido antibióticos previos. Por su parte, la mPCR demostró una alta sensibilidad y especificidad para identificar de manera rápida cepas tipificables y no tipificables. En consecuencia, esta metodología molecular se perfila como una herramienta clave para el diagnóstico de *H. influenzae*.

Finalmente, el estudio de Tran et al.⁸⁰ refuerza la evidencia presentada en esta revisión sobre las ventajas de las técnicas moleculares frente a los convencionales. Tras evaluar 336 muestras clínicas mediante cultivo y qPCR, los autores confirmaron que, aunque el cultivo sigue siendo indispensable para el aislamiento bacteriano y la realización del antibiograma, presenta una menor capacidad de detección y requiere más tiempo para obtener resultados. En cambio, la qPCR destacó por su alta sensibilidad, rapidez y capacidad para identificar coinfecciones. Pese a condicionantes como su costo, el estudio demuestra que esta metodología agiliza la intervención terapéutica y optimiza el manejo del paciente.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de los métodos microbiológicos y moleculares para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos.

Nº	Autor y año	Población de estudio	Método de laboratorio		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Método más preciso
1.	Farajzadeh et al. ⁸¹ (2021)	92	Microbiológico	- Cultivo (AS y ACH)	N/R	N/R	- La mPCR mostró mayor capacidad de detección. - Identifica casos no detectados.
			Molecular	- mPCR	100%	95,3%	
2.	Supriya et al. ⁷³ (2021)	272	Microbiológico	- Cultivo (AS y ACH)	70-90%	N/R	- La mPCR ofrece mejor rendimiento diagnóstico - Mayor detección que el cultivo.
			Molecular	- mPCR	100%	98,87%	
3.	Xirogianni et al. ⁸² (2022)	50	Microbiológico	- Cultivo (ACH) - RapID NH System	N/R	N/R	- La mPCR tiene mayor precisión diagnóstica.
			Molecular	- mPCR	100%	100%	
4.	Jacobson et al. ⁸³ (2024)	100	Microbiológico	- Cultivo (AS y ACH)	0%	N/R	- Multiplex-qPCR detecta ADN bacteriano, independientemente de la viabilidad.
			Molecular	- Multiplex-qPCR	100%	100%	
5.	Deng et al. ⁸⁴ (2022)	103	Microbiológico	- Cultivo y Gram	27,3%	100%	- mNGS presentó mayor sensibilidad diagnóstica.
			Molecular	- mNGS	72,7%	98,9%	
6.		125	Microbiológico	- Cultivo (AS y ACH)	80%	100%	

	Seth et al. ⁸⁵ (2017)			- Gram	40%	95,56%	- mPCR detectó más casos que cultivo.
			Molecular	- mPCR	100%	100%	
7.	Pouladfar et al. ⁸⁶ (2022)	492	Microbiológico	- Cultivo y Gram - Hemocultivo	N/R	N/R	- La Multiplex qPCR detectó todos los casos de meningitis por Hib
			Molecular	- Multiplex qPCR	89,4%	100%	
8.	Cao et al. ⁸⁷ (2025)	167	Microbiológico	- Cultivo bacteriano	N/R	N/R	- Multiplex ddPCR detectó todos los casos positivos sin generar falsos positivos.
			Molecular	- Multiplex qPCR	95,1%	N/R	
				- Multiplex ddPCR	100%	100%	
9.	Zhou et al. ¹⁰ (2025)	168	Microbiológico	- Cultivo bacteriano	33,3%	100%	- El RAA y qPCR permitieron detectar más casos.
			Molecular	- RAA Dúplex y qPCR	100%	100%	
10.	Gier et al. ⁸⁸ (2016)	80	Microbiológico	- Cultivo bacteriano	N/R	N/R	- qPCR más preciso, al identificar con exactitud cepas variantes.
			Molecular	- qPCR	96%	91%	

***Nota:** Algunos estudios incluidos en la revisión consideran al cultivo como método de referencia (Gold estándar) y reportan un alto desempeño diagnóstico; sin embargo, no proporcionan valores porcentuales de sensibilidad ni especificidad. **N/R:** No reporta, **ACH:** Agar chocolate, **AS:** Agar sangre, **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, **mPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa múltiple, **ddPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa digital de gotas, **mNGS:** secuenciación metagenómica de nueva generación, **RAA:** Amplificación asistida por recombinasa, **Hib:** *H. influenzae* tipo b.

Análisis e interpretación

En la Tabla 3 se consolidan el predominio analítico de los métodos moleculares frente a la microbiología convencional en la detección de *H. influenzae* pediátrico. Mientras que el cultivo bacteriano registró sensibilidades sumamente bajas llegando incluso al 0 % en ciertos escenarios, herramientas como la mPCR, qPCR, ddPCR, mNGS y RAA exhibieron un rendimiento óptimo, con sensibilidades de entre el 89,4 % y el 100 %, y especificidades que rozaron la perfección.

Esta brecha estadística corrobora la capacidad de las plataformas moleculares para rescatar falsos negativos del método tradicional e identificar variantes genotípicas del patógeno. De este modo, la consistencia en los altos indicadores de la PCR digital, la qPCR y la tecnología RAA confirma su elevada precisión metodológica, posicionándolas como el recurso idóneo para robustecer el diagnóstico en la población infantil.

Discusión

Al evaluar la precisión diagnóstica de las herramientas para detectar *H. influenzae* en pediatría, Farajzadeh et al.⁸¹, compararon el cultivo en agar sangre y agar chocolate frente a la mPCR en 92 muestras clínicas, se observaron que los métodos microbiológicos convencionales dejaron ir varios casos positivos debido a sus limitaciones técnicas. En contraste, la mPCR alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95,3%, rescatando aquellos diagnósticos que el cultivo omitió. Estos resultados confirman que la mPCR es una alternativa sustancialmente más robusta para asegurar una detección temprana y oportuna en la población infantil.

La búsqueda de mayor sensibilidad diagnóstica ha consolidado el uso de herramientas moleculares, capaces de identificar patógenos cuando los esquemas convencionales fallan. Bajo esta premisa, Supriya et al.⁷³, analizaron a 272 pacientes mediante cultivo microbiológico y mPCR para la detección de *H. influenzae*. Los autores señalaron que, si bien el cultivo sigue siendo valioso para el abordaje inicial de las muestras, su rendimiento decae notablemente debido a la administración previa de antimicrobianos.

En cuanto al rendimiento analítico, el cultivo registró una sensibilidad de entre el 70% y el 90%, mientras que la mPCR alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,87%, rescatando con éxito aquellos casos que la metodología tradicional pasó por alto. De este modo, el estudio demuestra que la tecnología molecular es una alternativa eficaz para complementar el diagnóstico microbiológico clásico y optimizar la identificación etiológica en la población pediátrica⁷³.

Los hallazgos de Xirogianni et al.⁸², respaldan la utilidad de las técnicas moleculares para identificar con precisión *H. influenzae* en pacientes pediátricos con meningitis. En su estudio, evaluaron 50 casos mediante cultivo en agar chocolate, el sistema RapID NH, seroaglutinación y una mPCR de tubo único, se determinó que las metodologías convencionales quedan rezagadas frente al 100% de sensibilidad y especificidad alcanzado

por la alternativa molecular. Esta plataforma demostró, además, la ventaja crítica de tipificar los serotipos capsulares directamente desde la muestra biológica, aportando máxima certeza diagnóstica y optimizando de forma paralela el monitoreo epidemiológico.

En este contexto, identificar con rapidez los patógenos responsables de infecciones pleuropulmonares en pediatría permite optimizar el esquema antimicrobiano y prevenir complicaciones clínicas asociadas. Bajo este enfoque, Jacobson et al.⁸³, evaluaron 100 muestras de pacientes con empiema pleural mediante cultivo convencional y qPCR múltiple para comparar su rendimiento diagnóstico. Los autores destacaron que el uso previo de antibióticos un escenario muy común en la práctica clínica constituye la principal barrera para lograr el aislamiento bacteriano a través del método tradicional.

En cuanto a los resultados diagnósticos, el cultivo convencional arrojó una sensibilidad del 0% ya que no se identificó ningún caso de *H. influenzae*, mientras que la qPCR múltiple exhibió un 100% de sensibilidad y especificidad al detectar casos no identificados por cultivo. Esta notable diferencia demuestra cómo la herramienta molecular incrementa de forma significativa la tasa de detección y recorta los tiempos de respuesta. De este modo, los autores destacan que la implementación de esta metodología es clave para acortar los esquemas de antibioticoterapia empírica, abriendo paso a un tratamiento dirigido y oportuno⁸³.

El desarrollo tecnológico ha impulsado el uso de estrategias moleculares en infecciones respiratorias complicadas. En este contexto, Deng et al.⁸⁴, evaluaron a 103 pacientes pediátricos mediante cultivo, Gram y mNGS, y señalaron que, si bien las herramientas convencionales se mantienen vigentes por su bajo costo, sus alcances son limitados. En rendimiento, las pruebas tradicionales alcanzaron una sensibilidad de apenas el 27,3%, mientras que la mNGS exhibió un 72,7% de sensibilidad y un 98,9% de especificidad. La diferencia muestra que las estrategias metagenómicas funcionan mejor en casos clínicos complicados. Esto apoya su uso en la práctica médica actual.

Las conclusiones de Seth et al.⁸⁵ señalan las ventajas de los estudios moleculares respecto a los métodos microbiológicos clásicos. En un estudio de 125 pacientes pediátricos a los que se les llevó a cabo un mPCR, el cultivo tenía una sensibilidad del 80 %, mientras que la tinción de Gram presentaba un rendimiento mucho menor. En cambio, la mPCR alcanzó una sensibilidad y especificidad del 100 %, permitiendo identificar casos que no fueron detectados por las técnicas tradicionales. Estos hallazgos respaldan el uso de plataformas moleculares para mejorar el diagnóstico de la meningitis bacteriana infantil.

Un estudio de Pouladfar et al.⁸⁶ respalda la utilidad de las técnicas moleculares en el diagnóstico de meningitis por *H. influenzae* tipo b. En una cohorte de 492 pacientes analizados mediante cultivo, tinción de Gram, hemocultivo y qPCR múltiple, la plataforma molecular mostró una sensibilidad del 89,4 % y una especificidad del 100 %. Este desempeño permitió identificar casos positivos que no fueron detectados por la microbiología convencional. En consecuencia, los autores destacan que la incorporación de

estos ensayos mejora la detección temprana de infecciones invasivas y facilita el inicio oportuno de la terapia antimicrobiana.

Para diferenciar la eficacia diagnóstica Cao et al.⁸⁷, evaluaron a 167 pacientes mediante cultivo, qPCR múltiple y ddPCR múltiple para la detección de *H. influenzae*. Mientras que la qPCR múltiple presentó una sensibilidad del 95.1%, la ddPCR múltiple alcanzó un rendimiento absoluto del 100% en sensibilidad y especificidad. Esta capacidad evidencia la precisión de la PCR digital para capturar cargas bacterianas mínimas que se escapan de otros métodos, lo que valida su incorporación como una herramienta de alta fidelidad en el entorno clínico pediátrico.

En el marco del desarrollo de estrategias de respuesta rápida, Zhou et al.¹⁰, compararon el cultivo con la RAA dúplex y la qPCR en 168 pacientes pediátricos, destacando que el método clásico presentó una sensibilidad de apenas el 33,3%, a pesar de mantener una especificidad del 100%. Por el contrario, tanto la RAA dúplex como la qPCR alcanzaron un rendimiento perfecto del 100% en sensibilidad y especificidad para la detección de *H. influenzae*. Asimismo, el estudio destacó que la plataforma RAA recorta significativamente los tiempos de procesamiento frente a otras metodologías moleculares, consolidándose como una alternativa idónea para el abordaje oportuno de infecciones bacterianas.

Para finalizar, Gier et al.⁸⁸ comparando el método convencional de cultivo con la qPCR en 80 muestras clínicas orientadas a la detección de *H. influenzae*, nos muestran que mientras que los procedimientos de siembra convencionales tienen limitaciones, la qPCR tiene una sensibilidad y especificidad del 96 % y 91 %, respectivamente, incluso pudiendo detectar el microorganismo frente a viabilidades bacterianas muy pobres o muestras muy escasas. Este rendimiento hace que la metodología molecular se consolide como una herramienta que permite mejorar el tamizaje microbiológico pediátrico.

Tabla 4. Muestras clínicas más utilizadas para la detección de *H. influenzae* en pacientes pediátricos.

Nº	Autor y año	Población de estudio	Muestra clínica	Casos detectados	Métodos empleados	Espécimen con mayor utilidad diagnóstica
1.	Rafiei Tabatabaei et al. ⁸⁹ (2021)	902	- Hisopado Nasofaríngeo.	- 267 (29%) para <i>H. influenzae</i> . - 150 (16,6%) para cepas encapsuladas tipificables - 24 (2,6%) fueron Hib.	- PCR (gen omp6). - PCR (gen bexA). - PCR capsular de Hib. - Electroforesis en gel.	- Hisopado nasofaríngeo
2.	Li et al. ⁹⁰ (2026)	7.909	- Esputo. - BALF	- <i>H. influenzae</i> se aisló en 1028/7909 muestras (13,0%).	- Cultivo (ACH) y Gram. - VITEK 2 (tarjetas NH). - VITEK MS (MALDI-TOF MS).	- Esputo y BALF
3.	Doxey et al. ⁹¹ (2025)	230	- Hisopado Nasofaríngeo.	- Se detectó <i>H. influenzae</i> en 81/221 (37%) muestras.	- Cultivo (AS y ACH). - RNA-seq	- Hisopado nasofaríngeo.
4.	Wang et al. ⁹² (2019)	2.073	- Esputo. - Hisopado faríngeo. - BALF. - Líquido de punción pulmonar. - Secreción ocular. - Derrame de OM. - Sangre. - LCR.	- 1734 (83,6%) del tracto respiratorio - 339 (16,4%) de otro origen.	- Cultivo en medio selectivo y Gram - Identificación mediante VITEK NH card.	- Esputo.

5.	Ekinçi et al. ⁶⁹ (2023)	554	- Hisopado nasofaríngeo - Sangre y LCR	- 554 de <i>H. influenzae</i>. - 96,4% (534/554) de cepas NTHi.	- Cultivo (ACH). - MALDI-TOF MS (Microflex LT). - Bioquímicas (índol, ureasa y ornitina descarboxilasa). - Serotipificación con antisueros. - PCR y secuenciación del gen <i>ftsI</i>	- Hisopado nasofaríngeo.
6.	Ni et al. ⁹³ (2026)	1.601	- Hisopado nasofaríngeo. - Aspirado endotraqueal.	- 218 (13,7%) <i>H. influenzae</i> + otras bacterias. - 150 (9,4%) <i>H. influenzae</i> exclusivamente.	- RT-PCR convencional. - mNGS. - Cultivo (ASC). - Identificación automatizada.	- Hisopado nasofaríngeo.
7.	Pettigrew et al. ⁹⁴ (2016)	383	- Esputo inducido. - Hisopado nasofaríngeo /orofaríngeo.	- Pruebas convencionales: 1/383 (0,3%) casos. - Esputo: 40/383 (10,4%)	- Cultivo de esputo. - Secuenciación del gen ARNr 16S (región V4).	- Esputo.
8.	Alexandrova et al. ⁹⁵ (2025)	121	- Muestra nasofaríngea. - Líquido del OM.	- 23 (18,1%) aislamientos de <i>H. influenzae</i>.	- Cultivo. - PCR convencional y qPCR. - Tipificación capsular por PCR (gen <i>bexB</i>). - Biotipificación. - PCR (gen fimbrial <i>hifA</i>).	- Líquido del OM.

9.	Pi et al. ⁹⁶ (2026)	2.299	- Hisopado faríngeo. - BALF.	- 491/1845 (26,6%) para <i>H. influenzae</i>	- tNGS. - Multiplex PCR	- BALF.
10.	Agosta et al. ⁹⁷ (2025)	216	- Líquido sinovial. - Fluidos purulentos /biopsias. - Sangre total.	- 1/123 (0,8%) para <i>H. influenzae</i> .	- BIOFIRE® Joint Infection Panel, PCR múltiple sindrómica. - Cultivo.	- Líquido sinovial.
11.	Moriki et al. ⁹⁸ (2025)	135	- BALF	- 43 casos totales de <i>H. influenzae</i>	- Cultivo (AS y ACH).	- BALF.

***Nota:** **ACH:** Agar chocolate, **AS:** Agar sangre, **ASC:** Agar Sangre Columbia, **BALF:** Lavado broncoalveolar, **LCR:** Líquido cefalorraquídeo, **OM:** Otitis Media, **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, **omp6:** Gen de la proteína de membrana externa número 6, **bexA:** Gen A de exportación capsular, **ftsI:** Gen de sensibilidad térmica filamentosa I, **hifA:** Gen de la subunidad principal de las fimbrias de *H. influenzae*, **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, **MALDI-TOF MS:** Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo, **LT:** Tiempo de Vuelo Linea, **RNA-seq:** Secuenciación de ARN, **mNGS:** secuenciación metagenómica de nueva generación, **tNGS:** Secuenciación Dirigida de Nueva Generación, **ARNr:** Ácido Ribonucleico Ribosómico, **Hib:** *H. influenzae* tipo b, **NTHi:** *H. influenzae* no tipificable.

Análisis e interpretación

La Tabla 4 expone a las muestras del tracto respiratorio como los especímenes biológicos de mayor rendimiento para detectar *H. influenzae* en pediatría. Entre ellas, el hisopado nasofaríngeo destacó como el recurso más utilizado y con capacidad para identificar prevalencias importantes, mientras que el esputo y el BALF registraron tasas elevadas de aislamiento, reafirmando su valor crítico en el abordaje de cuadros clínicos complejos.

Asimismo, aunque se incluyeron muestras como sangre, LCR, secreciones oculares, exudados de oído medio y líquido sinovial, su recolección fue menos frecuente y arrojó tasas de positividad inferiores. A pesar de ello, estos especímenes mantienen un valor diagnóstico crítico cuando se emplean de forma dirigida según la sospecha clínica (como en otitis media o artritis séptica), funcionando como un valioso complemento en el abordaje integral del paciente pediátrico.

Discusión

En relación con las muestras clínicas utilizadas para la detección de *H. influenzae* en población pediátrica, Rafiei Tabatabaei et al.⁸⁹, evaluaron la colonización nasofaríngea en 902 niños menores de seis años mediante hisopados y técnicas de PCR dirigidas a los genes *omp6* y *bexA*. Los autores identificaron 267 aislamientos de *H. influenzae* y reportaron una baja frecuencia de cepas Hib tras la introducción de la vacunación sistemática. Este escenario confirma que el frotis nasofaríngeo es un recurso idóneo para monitorizar la circulación bacteriana comunitaria y evaluar el impacto real de los programas de inmunización en la población infantil.

Las infecciones respiratorias bajas representan el principal escenario de aislamiento para *H. influenzae* en pediatría. Bajo este contexto, Li et al.⁹⁰, analizaron 7.909 muestras de esputo y BALF mediante cultivo en agar chocolate, VITEK 2 y MALDI-TOF MS, logrando recuperar 1.028 aislamientos, con una mayor prevalencia en niños de uno a tres años. Aunque ambas matrices resultaron eficaces, los autores señalaron que el BALF ofrece una representación más fiel y confiable del sitio anatómico de la infección, consolidándose como el recurso idóneo para esclarecer la etiología de cuadros respiratorios graves.

A diferencia de los enfoques basados únicamente en el aislamiento bacteriano, Doxey et al.⁹¹, evaluaron a 230 pacientes pediátricos mediante hisopado nasofaríngeo combinando cultivo convencional y RNA-seq. Este abordaje facilitó el mapeo integral de la microbiota respiratoria y determinó la implicación de diversos patógenos en los cuadros infecciosos. Al identificar *H. influenzae* en una proporción significativa de las muestras, los autores validaron el uso de estos frotis como un recurso práctico y mínimamente invasivo; una alternativa cuyo rendimiento analítico se incrementa de forma notable mediante la secuenciación, al rescatar agentes que resultan indetectables para los métodos tradicionales.

Con el propósito de evaluar la distribución de *H. influenzae* en diferentes sitios anatómicos, Wang et al.⁹², analizaron 2.073 muestras clínicas procedentes de esputo, frotis faríngeo, BALF, secreciones oculares, sangre, LCR y punción pulmonar. Los autores emplearon cultivo, Gram y sistemas automatizados, determinando que el 83,6% de los aislamientos provenían del tracto respiratorio, con un claro predominio en las muestras de esputo. Este perfil de distribución reafirma la estrecha vinculación del patógeno con los cuadros respiratorios infantiles y posiciona a estas matrices como las herramientas primarias tanto para el rescate microbiológico como para la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana.

Por otro lado, dado que la colonización nasofaríngea es el paso crítico en la patogénesis de *H. influenzae*, Ekinci et al.⁶⁹, caracterizaron 554 aislamientos obtenidos de frotis nasofaríngeos, sangre y LCR en niños con y sin afección respiratoria. Mediante cultivo, MALDI-TOF MS, pruebas bioquímicas y secuenciación, el equipo reportó un claro predominio de cepas NTHi, las cuales superaron el 90% de las muestras, junto a una alta frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana. De este modo, el estudio posiciona al muestreo nasofaríngeo como un pilar epidemiológico doble: no solo confirma el transporte del patógeno, sino que permite rastrear la circulación de variantes resistentes.

La incorporación de herramientas moleculares ha transformado el abordaje de las infecciones respiratorias pediátricas. Ni et al.⁹³ evaluaron 1.601 pacientes mediante hisopado nasofaríngeo y aspirado endotraqueal, utilizando RT-PCR, mNGS y cultivo. Evidentemente esta técnica ha permitido observar un patrón de infecciones por *H. influenzae* dentro de coinfecciones complejas. Los autores aportan que el hisopado nasofaríngeo es un buen método de cribado por la facilidad de obtención y su buen rendimiento molecular, en cambio el aspirado endotraqueal es suficiente para adultos en el ámbito hospitalario donde se observa mejor la microbiota del tracto respiratorio inferior y la relación con la severidad clínica.

La exactitud del diagnóstico etiológico de las patologías respiratorias está en función de matrices biológicas que reproduzcan fielmente el foco del agente causante de la enfermedad. Así, Pettigrew et al.⁹⁴ analizaron 383 pacientes mediante esputo inducido e hisopados combinados (naso/orofaríngeos), las mismas fueron contrastadas por cultivo convencional frente a la secuenciación del ARN ribosomal 16S. Mientras que la técnica clásica limitó el rescate de *H. influenzae*, el análisis genómico mostró una diversidad microbiana más rica. Los autores concluyeron que el esputo inducido genera un mapa más fiable del microbioma pulmonar profundo, tornándose en un método de alto valor en la pediatría.

Alexandrova et al.⁹⁵ compararon el rendimiento del exudado nasofaríngeo con el líquido de oído medio en 121 niños con el objetivo de examinar cuál matriz podría proporcionar una caracterización más precisa de *H. influenzae*. El procesamiento mediante técnicas microbiológicas y moleculares (PCR y qPCR) mostró que el fluido ótico era más adecuado dada la obtención de forma directa del sitio de infección, además de poder mapear determinantes genéticos importantes para la adhesión y evasión inmunológica. Al evitar los

sesgos de arrastre de las vías aéreas altas, esta muestra se consolida como la herramienta de elección para investigar la patogenia de la otitis media en la población infantil.

La identificación del verdadero agente etiológico en los cuadros respiratorios depende por completo de la representatividad anatómica de la muestra. Bajo esta premisa, Pi et al.⁹⁶, evaluaron a 2.299 pacientes pediátricos mediante frotis faríngeo y BALF, utilizando tNGS y mPCR. Tras reportar una presencia significativa de *H. influenzae* en casos de neumonía adquirida en la comunidad, los autores contrastaron el valor de ambos especímenes, mientras el hisopado faríngeo sufre el sesgo de arrastre de la microbiota colonizadora de las vías altas, el BALF proporciona un mapa fidedigno del tracto inferior, consolidándose como la matriz de elección para el diagnóstico etiológico de infecciones graves.

Aparte del tradicional enfoque de las infecciones respiratorias, Agosta et al.⁹⁷ estudiaron la presencia de *H. influenzae* en infecciones osteoarticulares pediátricas utilizando líquido sinovial, material purulento, biopsias y sangre total. Para ello, incorporaron el cultivo convencional junto con el panel sindrómico BIOFIRE® Joint Infection. Utilizando este enfoque, identificaron un caso de osteomielitis causada por este patógeno, siendo esta muestra la de mayor rendimiento diagnóstico. El estudio también demostró que la metodología molecular aumenta la sensibilidad y reduce el tiempo de respuesta, lo que favorece la instauración precoz de una terapia dirigida.

Finalmente, Moriki et al.⁹⁸, analizaron 135 muestras de BALF provenientes de pacientes pediátricos con patologías respiratorias, empleando cultivo en agar sangre y agar chocolate. El aislamiento de 43 cepas de *H. influenzae* evidenció el rendimiento de esta matriz para la detección del microorganismo en el tracto inferior. Los autores señalaron que la obtención directa de la zona afectada reduce la influencia de la microbiota de las vías aéreas superiores, lo que optimiza la interpretación microbiológica en función de las manifestaciones clínicas del paciente.

CONCLUSIONES

- Respecto al primer objetivo específico, orientado a analizar los métodos microbiológicos y moleculares, la revisión de la literatura demuestra que diagnosticar *H. influenzae* en pediatría exige combinar distintas herramientas de laboratorio. Los métodos microbiológicos tradicionales siguen siendo indispensables para aislar el patógeno y evaluar su resistencia a los antibióticos. Sin embargo, factores como la viabilidad bacteriana, la calidad de la muestra y el uso previo de antimicrobianos suelen afectar su rendimiento. Para superar estas limitaciones, se pueden utilizar metodologías moleculares y complementarias, pues esto ayuda a identificar las infecciones de manera más rápida. De esta forma, se puede abordar de manera más precisa las infecciones respiratorias y sistémicas en esta población.
- Respecto al segundo objetivo específico, las evidencias aportadas demuestran que las técnicas moleculares constituyen el pilar del diagnóstico de *H. influenzae*, debido a que permiten la detección de su material genético con mayor rapidez y precisión que los cultivos tradicionales. El uso de métodos de amplificación y secuenciación aumenta la confirmación etiológica y permite detectar casos que podrían no evidenciarse con la microbiología convencional. Además, estas técnicas facilitan la caracterización molecular del patógeno, lo que contribuye a la vigilancia de cepas circulantes y a la toma oportuna de decisiones terapéuticas pediátricas.
- En relación con el tercer objetivo específico, la evidencia analizada demuestra que la utilidad del diagnóstico microbiológico está condicionada por el sitio anatómico de muestreo. Los especímenes obtenidos directamente del foco infeccioso permiten identificar con certeza al patógeno causal, mientras que aquellos procedentes de zonas de colonización resultan esenciales para monitorizar la circulación bacteriana en la comunidad. De este modo, la elección correcta del espécimen optimiza tanto el análisis microbiológico como el molecular, permitiendo una intervención terapéutica oportuna en pediatría.

BIBLIOGRAFÍA

1. Khattak ZE, Anjum F. *Haemophilus influenzae* Infection. Bact Infect Charact Types Treat. 2023 Apr 27;105–18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562176/> PubMed PMID: 32965847.
2. Balta VA, Davis B, DeByle CK, Desnoyers C, Gotcsik M, Westley B, et al. Clinical Course and Outcomes of Invasive *Haemophilus influenzae* Infections among Children at Two Hospitals in Alaska. J Pediatr. 2026 Jan 1;288. Disponible en: <https://www.jpeds.com/action/showFullText?pii=S0022347625003403> PubMed PMID: 40882866.
3. Chelbi Y, Meftah K, Deghmane AE, Mhimdi S, Aloui F, Bouafsoun A, et al. *Haemophilus influenzae* Invasive Infections in Children in Vaccine Era: Phenotypic and Genotypic Characterization Tunis, Tunisia. Microorganisms. 2024 Dec 1;12(12):2666. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/12/2666/htm>
4. Thofte O, Bettoni S, Su YC, Thegerström J, Jonsson S, Mattsson E, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* P5 Binds Human C4b-Binding Protein, Promoting Serum Resistance. J Immunol. 2021 Sep 15;207(6):1566–77. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2100105> PubMed PMID: 34433620.
5. Mahammed A, Damtie D, Sema T. A Global Review of Invasive *Haemophilus Influenzae* Diseases from 2000-2023: A Systematic Review of Current Status, Challenges, and Future Perspectives Journal of Infectious Diseases & Treatments. J Infect Dis Treat. 2025;3(4):1–10. Disponible en: www.oaskpublishers.com
6. Angelis A De, Marchello M, Tramontano A, Cicchetti M, Nigro M, Simonetta E, et al. *Haemophilus influenzae* in bronchiectasis. Eur Respir Rev. 2025 Aug 6;34(177). Disponible en: <https://publications.ersnet.org/content/errev/34/177/250007> PubMed PMID: 40769533.
7. Slotved HC, Johannesen TB, Stegger M, Fuursted K. Evaluation of molecular typing for national surveillance of invasive clinical *Haemophilus influenzae* isolates from Denmark. Front Microbiol. 2022 Nov 17;13:1030242. Disponible en: <https://github.com/Vikash84/>
8. Gonzales Jaimes BE, Pinedo-Bardales M, Lopez-Briceño M, Rivera-Fernandez EA, Durand Vara D, Mercado EH, et al. Distribución de serotipos, biotipo y sensibilidad antibiótica de *Haemophilus influenzae* en niños portadores nasofaríngeos en Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2025 Nov 21;416–23. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/14767>
9. Retchless AC, Topaz N, Marjuki H, Marasini D, Potts CC, Wang X. *Haemophilus influenzae*. Mol Med Microbiol Third Ed. 2024 Jan 1;1399–421. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/edited->

volume/abs/pii/B9780128186190001295?via%3Dihub PubMed PMID: 15912399.

10. Zhou L, Xia Y, Feng Y, Du B, Huang X, Xu W, et al. Rapid detection of *Hemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* simultaneously using a duplex recombinase-aided amplification assay directly from invasive clinical samples. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025 Nov 18;15:1631633. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/rapid-detection-hemophilus-influenzae/docview/3291462305/se-2?accountid=36757> PubMed PMID: 41341952.
11. Slack MPE, Cripps AW, Grimwood K, Mackenzie GA, Ulanova M. Invasive *Haemophilus influenzae* infections after 3 decades of hib protein conjugate vaccine use. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. American Society for Microbiology; 2021 [cited 2026 May 11]. Disponible en: [/doi/pdf/10.1128/cmr.00028-21?download=true](https://doi.org/10.1128/cmr.00028-21?download=true) PubMed PMID: 34076491.
12. Centre for Disease Prevention E. *Haemophilus influenzae* disease - AER 2023 [Internet]. [cited 2026 May 12]. Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/HAEINF_AER_2023_Report.pdf
13. Juárez X, Flores Yavi R, Balboa R, Matteucci E, Burundarena C, Causarano MF, et al. Enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae*: reporte de 14 casos luego de un año de iniciada la pandemia por COVID-19. *Arch Argent Pediatr*. 2023;121(4):e202202805. Disponible en: <https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2023/v121n4a02e.pdf> PubMed PMID: 36625673.
14. Instituto de Salud Público de Chile. Informe de Resultados de Vigilancia de Laboratorio *Haemophilus influenzae* [Internet]. 2023 [cited 2026 May 12]. Disponible en: https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2023/08/Informe-Haemophilus-influenzae_5julio2023-1-4.pdf
15. Silva L, Callejas D, Silva C, Silva G. Epidemiological Profile of Acute Respiratory Infections in Pediatric Patients in Ecuador. *Enferm Investig* [Internet]. 2022;7(2):1–6. Disponible en: <https://orcid.org/0000-0002-2746-3115>
16. Organización Panamericana de la Salud. Informe regional de SIREVA II, 2018. Informe regional de SIREVA II, 2018 [Internet]. 2021 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://iris.paho.org/items/f6cab26b-e6a9-4dfb-8b1f-cc8e5f0e1b01>
17. Ostos R. Paciente pediátrico: cuidados y clasificación | Centro Médico ABC [Internet]. 2023 [cited 2026 May 11]. p. 1–5. Disponible en: <https://centromedicoabc.com/revista-digital/que-cuidados-debe-recibir-un-paciente-pediatrico/>
18. Albishi NS, Alenazi AO, Alshammari WO, Al-Ruwaili JA, Al Samti AMS, Alharbi

- KHD, et al. Respiratory Infections in Children: An Updated Review of Pathophysiology, Diagnosis, Treatment, Biochemical Aspects, and Nursing Interventions. J Med Chem Sci. 2024 Dec 1;7(12):1847–60. Disponible en: https://www.jmchemsci.com/article_211142.html
19. Amerson M. Pathology Outlines - *Haemophilus influenzae* [Internet]. 2024 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/microbiologyhinfluenzae.html>
 20. Lavana A. Análisis de serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* causante de enfermedad en población mexicana (2019-2021) [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3022/LAXAXL08.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 21. Gompf SG. *Haemophilus influenzae* Infections: Background, Etiology, Pathophysiology [Internet]. 2025 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/218271-overview>
 22. Yusuf E. A Book Review on: Sherris Medical Microbiology “ International Edition, 6th Edition. Front Cell Infect Microbiol. 2015 Apr 10;5:undefined-undefined. Disponible en: https://www.mendeley.com/catalogue/6a4cec1b-04f0-315e-89cd-a368bb5533ee/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.8&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7B79ea95d2-c4da-493e-a871-aa4390ab4cba%7D
 23. Aryal S. *Haemophilus influenzae*: Habitat, Cell Morphology, Cultural Characteristic, Biochemical Tests, Pathogenicity, Diagnosis and Treatment [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://microbiologyinfo.com/haemophilus-influenzae/>
 24. Centers for Disease Control and Prevention. Factores de riesgo de la enfermedad por *Haemophilus influenzae* | *H. influenzae* | CDC [Internet]. 2025 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hi-disease/es/risk-factors/factores-de-riesgo-de-la-enfermedad-por-haemophilusinfluenzae.html>
 25. Centers for Disease Control and Prevention. Síntomas y complicaciones de la enfermedad por *Haemophilus influenzae* | *H. influenzae* | CDC [Internet]. 2025 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hi-disease/es/symptoms/sintomas-y-complicaciones-de-la-enfermedad-por-haemophilus-influenzae.html>
 26. Liu L, Wang X, Guo L, Chen T, Hu B, Jian B, et al. Epidemiological characteristics and disease burden of bacterial meningitis in hospitalized children in China: a 6-year nationwide retrospective study. BMC Infect Dis 2025 251. 2025 Apr 24;25(1):592-. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12879-025-10928-0> PubMed PMID: 40275150.

27. Gómez B. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en urgencias de pediatría Sepsis [Internet]. 2024 [cited 2026 May 12]. Disponible en: https://seup.org/wp-content/uploads/2024/04/12_Sepsis_4ed.pdf
28. Núñez MP, Ghione A, Giménez P, Sobrero H, Borbonet D. Sepsis neonatal precoz en un pretérmino de 32 semanas causada por *Haemophilus influenzae* no tipificable. Arch Pediatr Urug. 2025;96(1):e306. Disponible en: <https://adp.sup.org.uy/index.php/adp/article/view/677>
29. Walls S, Adhikari P, Reesha H, Baxter M, Walls S, Adhikari P, et al. Sepsis Due to *Haemophilus influenzae* and Masked Influenza A Infection. Cureus. 2022 Feb 21;14(2). Disponible en: <https://cureus.com/articles/87860-sepsis-due-to-haemophilus-influenzae-and-masked-influenza-a-infection>
30. Valencia MCF, Valencia SCF. Epiglotitis en edades pediátricas: comprensión actual y estrategias de manejo. La Cienc AL Serv La Salud y Nutr. 2023 Oct 10;14(2):C_115-124. Disponible en: <https://cssn.esPOCH.edu.ec/index.php/v3/article/view/236/398>
31. Ghallab AF, Sleit AM, Elsayed RAE, Abdelrazek AM, Abu Shady EF, Elnems MG. The role of non-typable *Haemophilus influenzae* in recurrent otitis media in children. Egypt J Otolaryngol 2024 401. 2024 Jan 30;40(1):18-. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/s43163-024-00577-6>
32. Leung AKC, Hon KL, Chu WCW. Acute bacterial sinusitis in children: an updated review. Drugs Context. 2021 Nov 23;9:1–11. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7685231/>
33. Hu YL, Lee PI, Hsueh PR, Lu CY, Chang LY, Huang LM, et al. Predominant role of *Haemophilus influenzae* in the association of conjunctivitis, acute otitis media and acute bacterial paranasal sinusitis in children. Sci Reports 2021 111. 2021 Jan 8;11(1):11-. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-79680-6> PubMed PMID: 33420151.
34. Clinica Elgeadi. Tratamiento de las infecciones de las vías respiratorias [Internet]. 2024 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://clinicaelgeadi.com/infecciones-respiratorias-causas-sintomas-prevencion/>
35. Czarniak N, Kamińska J, Matowicka-Karna J, Koper-Lenkiewicz OM. Cerebrospinal Fluid–Basic Concepts Review. Biomed 2023, Vol 11, Page 1461. 2023 May 17;11(5):1461. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/5/1461/htm>
36. Erazo C. Análisis interpretativo de los estudios de líquido cefalorraquídeo en el diagnóstico de meningoencefalitis [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/9298>

37. Nova S. Sangre: Composición, células y funciones | Kenhub [Internet]. 2023 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/sangre-histologia>
38. Kuzawka M, Cassanelli M, Capecce F, Pereda R. Detección de microorganismos y genes de resistencia en hemocultivos positivos mediante FilmArray® panel BCID2: experiencia en un hospital pediátrico. *Rev Argent Microbiol.* 2024 Jul 1;56(3):249–57. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754124000786?via%3Dihub> PubMed PMID: 39079884.
39. Suiza Lab. ¿Cuál es la diferencia entre Hisopado Nasofaríngeo y Nasal? - Suiza Lab [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.suizalab.com/cual-es-la-diferencia-entre-hisopado-nasofaringeo-y-nasal/>
40. Guzmán M. Nasofaringe: definición, estructura y función | Kenhub [Internet]. 2023 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/nasofaringe>
41. González M, Martín C, Muriana R. Aspiración de secreciones por tubo endotraqueal o traqueotomía - Manuales Clínicos [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://manualclinico.hospitaluvroci.es/procedimientos-generales-de-enfermeria/tecnicas-realizadas-al-paciente/aspiracion-de-secreciones-por-tubo-endotraqueal-o-traqueotomia/>
42. Cruz AG, Montelongo F de J, Suárez AS, Martínez MT, Ramírez VH, Pichardo CF. Lavado broncoalveolar por broncoscopia vs aspirado traqueal para el diagnóstico de neumonía en pacientes con ventilación mecánica. *Med Crítica.* 2025 Mar 21;38(7):589–93. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.35366/119533>
43. Bezerra C. Esputo: qué es y para qué sirve su prueba (y cómo se hace) - Tua Saúde [Internet]. 2024 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.tuasaude.com/es/esputo/>
44. Abraham M. Sputum Culture: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels [Internet]. 2025 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/2119232-overview?form=fpf>
45. MedlinePlus. Cultivo de esputo: Prueba de laboratorio de MedlinePlus [Internet]. 2024 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/cultivo-de-esputo/>
46. Formeister E. Supuración del oído - Trastornos otorrinolaringológicos - Manual MSD versión para público general [Internet]. 2025 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/trastornos-otorrinolaringologicos/sintomas-de-las-enfermedades-del-oido/supuracion-del-oido>

47. MedlinePlus. Cultivo de secreción del oído: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. 2024 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003763.htm>
48. Cuervo Parra Pérez JA, Cortes TR. Coloración de bacterias con Tinción de Gram. Ingenio y Conciencia Boletín Científico la Esc Super Ciudad Sahagún. 2025 Dec 8;12:61–2. Disponible en: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/sahagun/article/view/16217>
49. Medical Lab Notes. Chocolate Agar: Introduction, Composition, Principle, Preparation [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: https://medicallabnotes.com/chocolate-agar-introductioncomposition-principle-preparation-requirementstesting-procedure-colony-characteristics-uses-keynotes-and-chocolate-agar-footages/#google_vignette
50. Aryal S. Chocolate Agar- Composition, Principle, Preparation, Results, Uses [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://microbenotes.com/chocolate-agar/>
51. Aryal S. X and V Factor Test: Principle, Procedure, Results [Internet]. 2023 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://microbenotes.com/x-and-v-factor-test-for-haemophilus/>
52. Xi Y, Wang H, Wang S, Wu X, Wang Z. A study of various factors affecting satellitism tests of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* using *Staphylococcus aureus* as the source of NAD. J Microbiol Methods. 2022 Feb 1;193:106417. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701222000124?via%3Dihub> PubMed PMID: 35033634.
53. Menes J, Garmendia G, Martínez A, Vero S. Manual de prácticas de microbiología general [Internet]. 2022 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.cse.udelar.edu.uy/wp-content/uploads/2024/05/Manual-de-practicas-de-Microbiologia.pdf>
54. Lactose fermentation test - Virtual Microbiology Lab Simulator Software [Internet]. [cited 2026 Jul 2]. Disponible en: <https://vumicro.com/docs/lactose-fermentation-test/>
55. Chen XF, Hou X, Xiao M, Zhang L, Cheng JW, Zhou ML, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. Microorg 2021, Vol 9, Page 1536. 2021 Jul 19;9(7):1536. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/7/1536/htm>
56. Pławińska-Czarnak J, Wódz K, Strzałkowska Z, Zychska M, Nowak T, Kwieciński

- A, et al. Comparison of automatic methods MALDI-TOF, VITEK2 and manual methods for the identification of intestinal microbial communities on the example of samples from alpacas (*Vicugna pacos*). *J Vet Res*. 2023 Sep 20;67(3):361–72. Disponible en: <https://reference-global.com/article/10.2478/jvetres-2023-0051>
57. Artati D, Oman M, Sukarta D, Robisalmi A. Validation of Analytical Method for *Aeromonas hydrophila* Identification using Analytical Profile Index (API) 20E KIT Method. *J Med Vet*. 2024 Apr 1;7(1):88–104. Disponible en: <https://e-journal.unair.ac.id/JMV/article/view/50443>
 58. Ghavami Q, Abd Ulhai Nasser H, Vaziri SS, Moghadam MT. A Focused Review on Commercially Available Automated Systems for Antibiotic Susceptibility Testing. *J Trop Med*. 2025 Jan 1;2025(1):9694354. Disponible en: [/doi/pdf/10.1155/jotm/9694354](https://doi/pdf/10.1155/jotm/9694354)
 59. Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiot* 2022, Vol 11, Page 427. 2022 Mar 23;11(4):427. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/4/427/htm> PubMed PMID: 35453179.
 60. Ombelet S, Natale A, Ronat JB, Vandenberg O, Hardy L, Jacobs J. Evaluation of MicroScan Bacterial Identification Panels for Low-Resource Settings. *Diagnostics* 2021, Vol 11, Page 349. 2021 Feb 19;11(2):349. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/2/349/htm>
 61. ThermoFisher. Wellcogen™ *Haemophilus influenzae* b Rapid Latex Agglutination Test 30 Tests [Internet]. [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R30858801>
 62. Stanford Medicine Children's Health. Anticuerpos contra *Haemophilus influenzae* - Stanford Medicine Children's Health [Internet]. [cited 2026 May 12]. Disponible en: https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=haemophilus-influenzae-antibody-167-haemophilus_influenzae_antibody_ES
 63. Rodríguez-Pelíer C, Zúñiga-Rosales Y. Niveles de protección contra *Haemophilus influenzae* tipo b en niños, adolescentes y adultos cubanos. *Vaccimonitor* [Internet]. 2023 [cited 2026 May 13];32:1123. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2023000100001
 64. Diz O. Técnicas De Biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Septiembre [Internet]. 2020;100:88–111. Disponible en: <https://orcid.org/0000-0002-5408-6263>
 65. Onelab. Proceso de PCR: Pasos Clave Explicados | OneLab [Internet]. 2025 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://www.onelab.com.ar/proceso-de-pcr-pasos-clave->

explicados?srsId=AfmBOoqTctenkKF0jTb5BZ3ZtZkxjb6XbnIjhZ3YQnSrKVC3dtBtMfoY

66. Aryal S. Real-Time PCR (qPCR): Principle, Process, Markers, Uses [Internet]. 2025 [cited 2026 May 12]. Disponible en: <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>
67. Ulanova M, Tsang RSW, Goldfarb DM, Smieja M, Huska B, Luinstra K, et al. Prevalence of *Haemophilus influenzae* in the nasopharynx of children from regions with varying incidence of invasive *H. influenzae* serotype a disease: Canadian Immunization Research Network (CIRN) study. *Int J Circumpolar Health*. 2024 Dec 31;83(1):2371111. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/22423982.2024.2371111> PubMed PMID: 38941555.
68. Comité Asesor de Vacunas e Inmunizaciones. *Haemophilus influenzae* tipo b | Comité Asesor de Vacunas de la AEP [Internet]. 2026 [cited 2026 May 17]. Disponible en: <https://vacunasaep.org/profesionales/enfermedades/haemophilus-infl-tipo-b>
69. Ekinici E, Willen L, Rodriguez Ruiz JP, Maertens K, Van Heirstraeten L, Serrano G, et al. *Haemophilus influenzae* carriage and antibiotic resistance profile in Belgian infants over a three-year period (2016–2018). *Front Microbiol*. 2023 Apr 24;14:1160073. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1160073/full>
70. Wang Q, Liu CG, Xu J, Zhang Q, Zhao CH, Song PP, et al. Characteristics and Antibiotic Resistance of *Haemophilus influenzae* in Children with Lower Respiratory Tract Infection in Chengdu, China. *Jundishapur J Microbiol* 2021 142. 2021 Feb 28;14(2):e114210. Disponible en: [/journals/jjm/articles/114210](https://journals/jjm/articles/114210)
71. Haddad-Boubaker S, Lakhal M, Fathallah C, Bouafsoun A, Kharrat M, Khemiri M, et al. Molecular diagnosis of bacterial meningitis by multiplex real time PCR in Tunisian children. *J Infect Dev Ctries*. 2018;12(4):235–43. Disponible en: <https://www.proquest.com/docview/2560103776/F852BADC2E0B42FBPQ/1?accountid=36757&sourcetype=Scholarly Journals> PubMed PMID: 31851632.
72. Brien HO, Nielsen M, Meyler K, Sullivan NO, Cunney R, Drew RJ. Real-time PCR for the diagnosis of invasive *Haemophilus influenzae* bacteraemia and meningitis in children: A diagnostic accuracy study of over 2,000 samples. *Adv Pediatr Res*. 2018. Disponible en: <https://www.longdom.org/abstract/realtime-pcr-for-the-diagnosis-of-invasive-haemophilus-influenzaebacteraemia-and-meningitis-in-children-a-diagnostic-a-78.html>
73. Sharma S, Acharya J, Caugant DA, Banjara MR, Ghimire P, Singh A. Detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* in

- culture negative cerebrospinal fluid samples from meningitis patients using a multiplex polymerase chain reaction in Nepal. *Infect Dis Rep.* 2021;13(1):173–80. Disponible en: <https://www.proquest.com/docview/2521253858/5FAD53A5A64F4C66PQ/1?accountid=36757&sourcetype=Scholarly Journals>
74. Carnalla-Barajas MN, Soto-Noguerón A, Martínez-Medina L, Olvera-Herrera ME, Mosqueda-Gómez JL, Rodríguez-Cortez P, et al. Diagnosis of bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, and *Haemophilus influenzae* using a multiplex real-time PCR technique. *Brazilian J Microbiol.* 2022;53(4):1951–8. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9679081/> PubMed PMID: 36107398.
 75. Beissbarth J, Binks MJ, Marsh RL, Chang AB, Leach AJ, Smith-Vaughan HC. Recommendations for application of *Haemophilus influenzae* PCR diagnostics to respiratory specimens for children living in northern Australia: A retrospective re-analysis. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):1–5. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3429-z> PubMed PMID: 29784027.
 76. Pimenta FC, Moiane B, Lessa FC, Venero AKL, Moura I, Larson S, et al. Dried blood spots for *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* detection and serotyping among children < 5 years old in rural Mozambique. *BMC Pediatr.* 2020;20(1):1–8. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7331148/> PubMed PMID: 32615947.
 77. Bajanca-lavado MP, Fernandes M, Touret T, Candeias C, Sim AS, Raquel S. *Haemophilus influenzae* Carriage among Healthy Children in. *Microorganisms* [Internet]. 2022;10(10):2015–9. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101964>
 78. Yuan M, Ma M, Jiang H, Fan M, Sun Y, Zhou B, et al. Characterization of Serotypes and Molecular Drug Resistance Patterns of *Haemophilus influenzae* in Kunming Children. *Polish J Microbiol.* 2023;72(2):125–31. Disponible en: <https://www.proquest.com/docview/2825508504/8F4A11EFA714B98PQ/1?accountid=36757&sourcetype=Scholarly Journals> PubMed PMID: 37144671.
 79. Fan X, Liu X, Ji L, Cai D, Jiang J, Zhu J, et al. Epidemiological analysis and rapid detection by one-step multiplex PCR assay of *Haemophilus influenzae* in children with respiratory tract infections in Zhejiang Province, China. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):1–6. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6103868/> PubMed PMID: 30134854.
 80. Quang Tran K, Hung Pham V, Minh Vo C, Minh Pham Q, Minh Nguyen P. Comparison of Real-time Polymerase Chain Reaction and Culture for Targeting Pathogens in Pediatric Severe Community-Acquired Pneumonia. *Turkish Arch*

- Pediatr. 2024;59(4):383–9. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11332497/>
81. Farajzadeh Sheikh A, Rahimi R, Meghdadi H, Alami A, Saki M. Multiplex polymerase chain reaction detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* and their antibiotic resistance in patients with community-acquired pneumonia from southwest Iran. BMC Microbiol. 2021;21(1):1–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02408-7> PubMed PMID: 34906085.
 82. Xirogianni A, Georgakopoulou T, Patsourakos V, Magaziotou I. Impact of a Single-Tube PCR Assay for the Detection of *Haemophilus influenzae* Serotypes a , c , d , e and f on the Epidemiological Surveillance in Greece [Internet]. Vol. 10. 2022;10(7):1367. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/impact-single-tube-pcr-assay-detection-i/docview/2694037327/se-2?accountid=36757>
 83. Jacobson J, Fabri L, Osowicki J, Shanthikumar S, Costa AM, Ortika B, et al. Evaluation of a multiplex-qPCR for paediatric pleural empyema—An observational study in hospitalised children. PLoS One. 2024;19(6 June):1–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0304861> PubMed PMID: 38917227.
 84. Deng W, Xu H, Wu Y, Li J. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage fluid metagenomic next-generation sequencing in pediatric pneumonia. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12(October):1–11. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/diagnostic-value-bronchoalveolar-lavage-fluid/docview/3266181969/se-2?accountid=36757> PubMed PMID: 36389175.
 85. Seth R, Murthy PSR, Sistla S, Subramanian M, Tamilarasu K. Rapid and accurate diagnosis of acute pyogenic meningitis due to *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitis* using a multiplex PCR assay. J Clin Diagnostic Res. 2017;11(9):FC01–4. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5713747/>
 86. Pouladfar G, Dashti AS, Kadivar MR, Jafari M, Pourabbas B, Jamalidoust M, et al. Evaluation of Multiplex Real-time PCR and WHO Criteria for Diagnosing Childhood Bacterial Meningitis in a Tertiary Referral Hospital in Iran. Arch Pediatr Infect Dis. 2022;10(3). Disponible en: <https://brieflands.com/journals/apid/articles/101822>
 87. Cao Y, Wang J, Jiang Y, Xu L, Tian Y, Fan Z, et al. Multiplex droplet digital PCR for the detection and quantitation of *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Front Cell Infect Microbiol. 2025;15(June):1–15. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/multiplex-droplet-digital-pcr-detection/docview/3266995442/se-2?accountid=36757> PubMed PMID: 40621164.

88. Camilla de Gier, Janessa L. Pickering, Peter C. Richmond, Ruth B. Thornton, Lea-Ann S. Kirkham, B. Duplex Quantitative PCR Assay for Detection of *Haemophilus influenzae* That Distinguishes Fucose- and Protein D-Negative Strains. *J Clin Microbiol.* 2016;54(9):2380–3. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/multiplex-droplet-digital-pcr-detection/docview/3266995442/se-2?accountid=36757> PubMed PMID: 27335148.
89. Tabatabaei SR, Mohammadzadeh S, Zahraei SM, Mahmoudi S, Ghandchi G, Hoseini-Alfatemi SM, et al. Effect of *Haemophilus influenzae* Type b Vaccination on Nasopharyngeal Carriage Rate in Children, Tehran, 2019. *Biomed Res Int.* 2021;2021(1). Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/effect-i-haemophilus-influenzae-type-b/docview/2506098370/se-2?accountid=36757> PubMed PMID: 33816612.
90. Li W, Bai Y, Yang C, Sun J, Lu S, Zhao Z. Surveillance of epidemiological characteristics and temporal trends in antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* in pediatric lower respiratory tract infections (2021–2024). *Sci Rep.* 2026;16(1):1–9. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/surveillance-epidemiological-characteristics/docview/3347778059/se-2?accountid=36757>
91. Doxey AC, Abu Mazen N, Homm M, Chu V, Hunjan M, Lobb B, et al. Metatranscriptomic profiling reveals pathogen and host response signatures of pediatric acute sinusitis and upper respiratory infection. *Genome Med.* 2025;17(1). Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/metatranscriptomic-profiling-reveals-pathogen/docview/3201604833/se-2?accountid=36757> PubMed PMID: 40098147.
92. Wang HJ, Wang CQ, Hua CZ, Yu H, Zhang T, Zhang H, et al. Antibiotic Resistance Profiles of *Haemophilus influenzae* Isolates from Children in 2016: A Multicenter Study in China. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2019;2019:6456321. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6710757/>
93. Ni J, Dong J, Li L, Zhao M, Du Z, Li J, et al. RSV-infected children with mixed infections: clinical features and early predictive indicators of codetection with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Front Pediatr.* 2026;14(May):1799724. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/pediatrics/articles/10.3389/fped.2026.1799724/full>
94. Pettigrew MM, Gent JF, Kong Y, Wade M, Gansebom S, Bramley AM, et al. Association of sputum microbiota profiles with severity of community-acquired pneumonia in children. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):1–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1670-4> PubMed PMID: 27391033.

95. Alexandrova AS, Boyanov VS, Gergova RT. Bacterial Profile, Molecular Serotyping, and Key Genetic Determinants for Adhesion, Immune Evasion, and Tissue Spread Among Bulgarian Children with Acute Otitis Media. *Genes (Basel)*. 2025;16(12):1–21. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/bacterial-profile-molecular-serotyping-key/docview/3286301625/se-2?accountid=36757> PubMed PMID: 41465185.

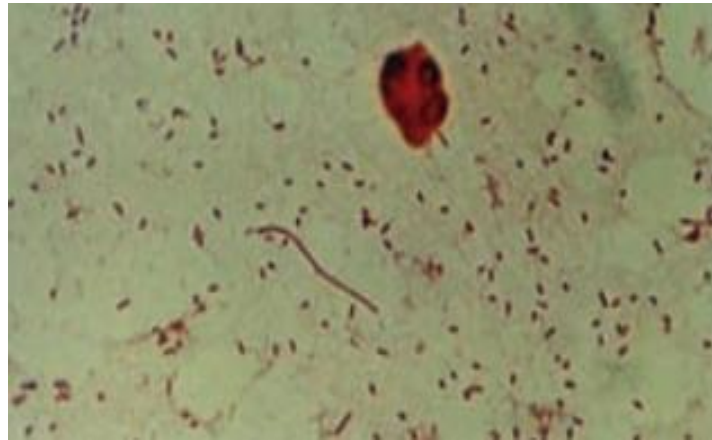
96. Pi H, Lin H, Zhou J, Liu H, Liang S, Zhu R, et al. Targeted next-generation sequencing analysis of pathogens and microecology in pediatric lower respiratory tract infections identifies risk factors for severe community-acquired pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2026;16(April):1796357. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2026.1796357/full> PubMed PMID: 42079749.

97. Agosta M, Cortazzo V, Onori M, Lucignano B, Vrenna G, Rossitto M, et al. An Evaluation of a Syndromic Molecular Panel in Optimising the Microbiological Diagnosis and Antimicrobial Therapy of Suspected Osteoarticular Infections in Paediatric Patients. *Diagnostics*. 2025;15(5):1–17. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11899705/>

98. Moriki D, Tsouprou M, Prountzos S, Koumpagioti D, Kalogiannis M, Alexopoulou E, et al. Bacterial Isolates from Bronchoalveolar Lavage in Pediatric Patients with Protracted Bacterial Bronchitis or Bronchiectasis: A Retrospective Comparative Study. *J Clin Med*. 2025;14(21):1–15. Disponible en: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/bacterial-isolates-bronchoalveolar-lavage/docview/3271045995/se-2?accountid=36757>

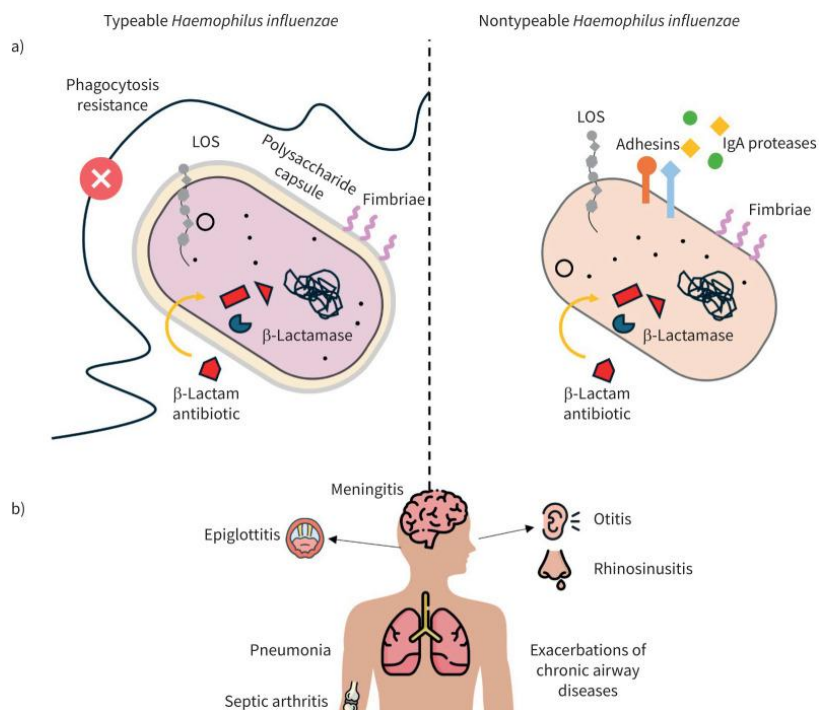
ANEXOS

Anexo 1. Tinción de Gram de *H. influenzae*.



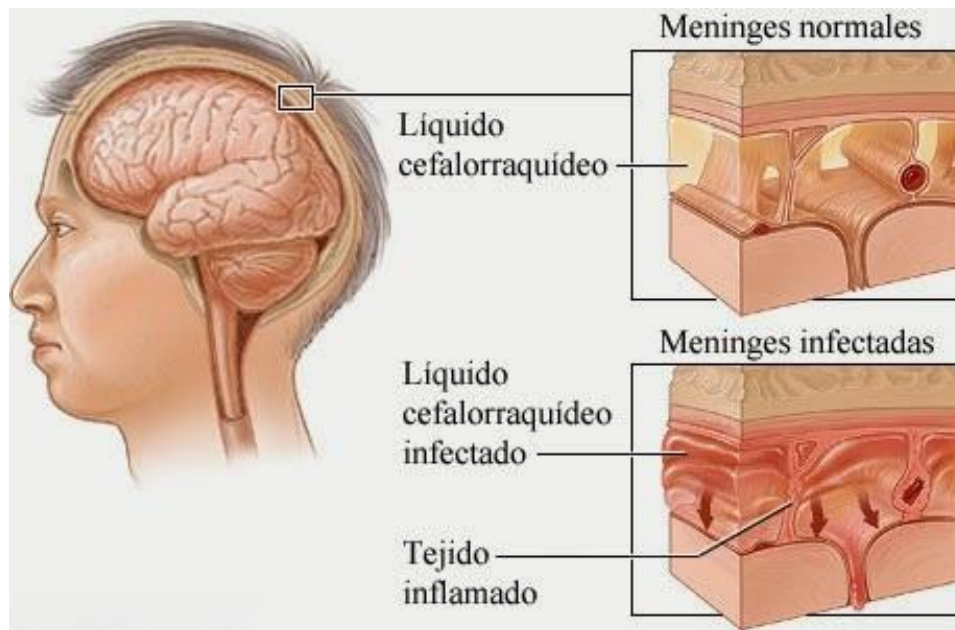
Fuente: <https://cbtis54.edu.mx/wp-content/uploads/2024/04/Microbiologia-Medica-Kenneth-J-Ryan-C-George-Ray.pdf>

Anexo 2. Factores de virulencia y las manifestaciones clínicas de *H. influenzae* tipificable y no tipificable.



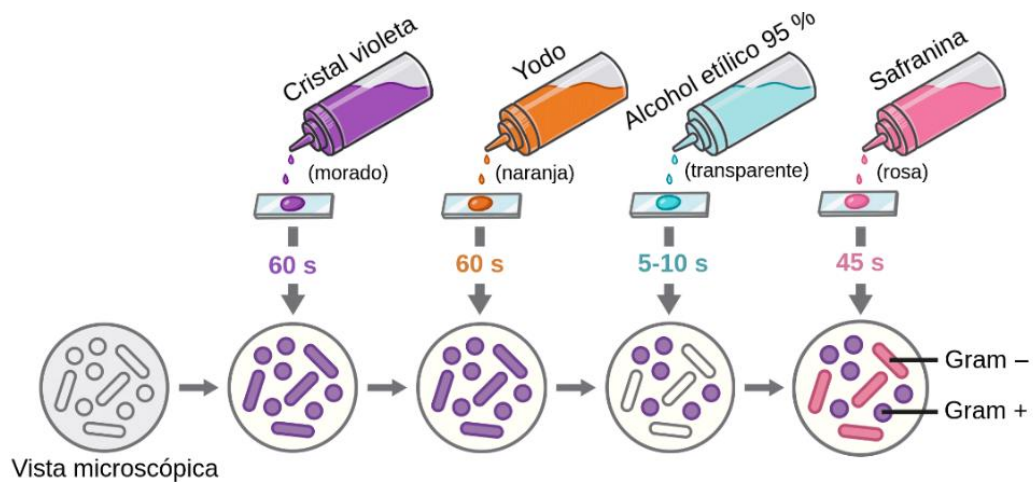
Fuente: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12340525/>

Anexo 3. Infección de las meninges (meninges normales e infectadas)



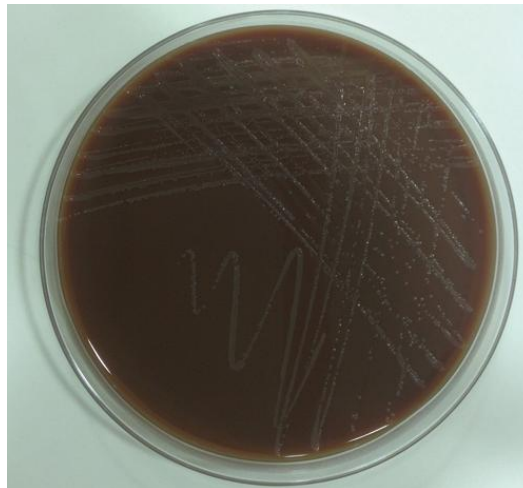
Fuente: <https://www.salutecca.com/meningitis/>

Anexo 4. Reactivos utilizados y protocolo de la Tinción de Gram.



Fuente: <https://theory.labster.com/es/reagents/>

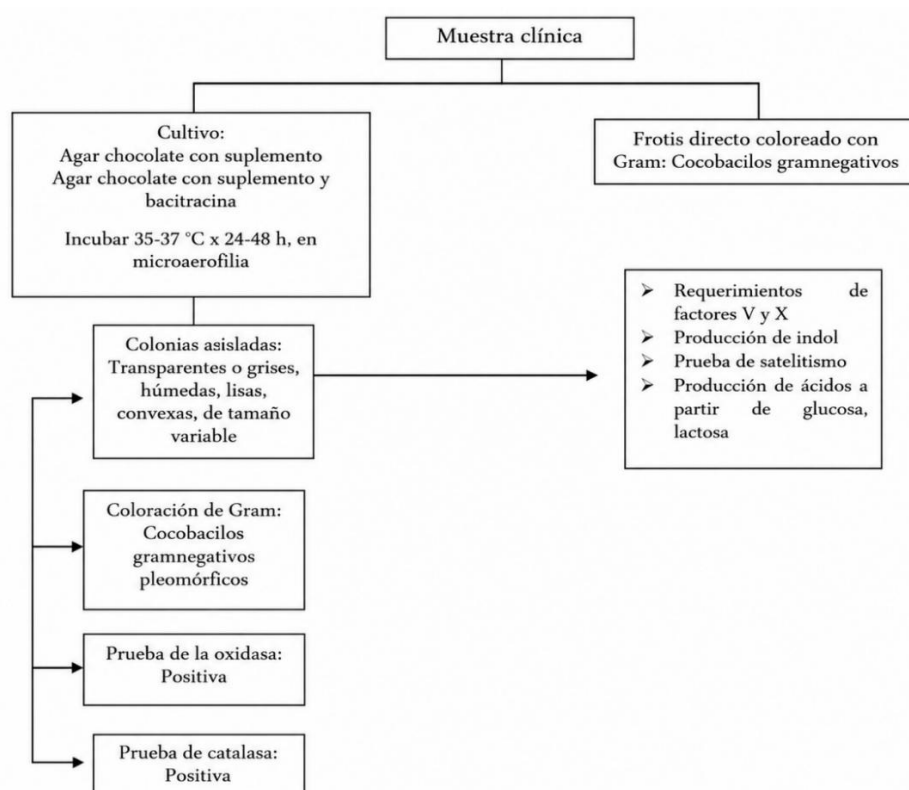
Anexo 5. Colonias de *H. influenzae* en agar chocolate.



Fuente:

https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182013000600015&script=sci_arttext

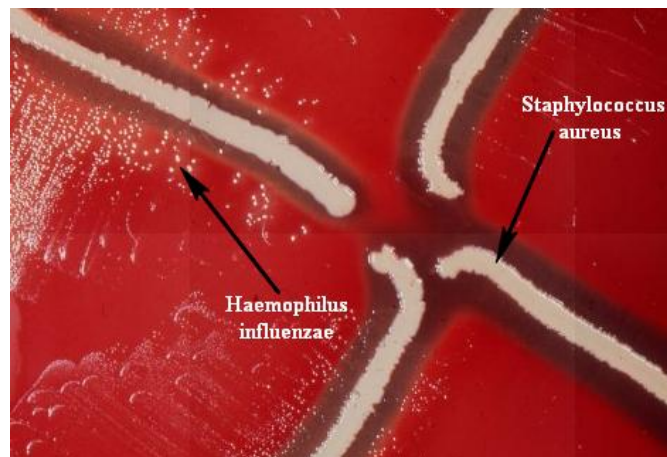
Anexo 6. Esquema de identificación de *H. influenzae*.



Fuente:

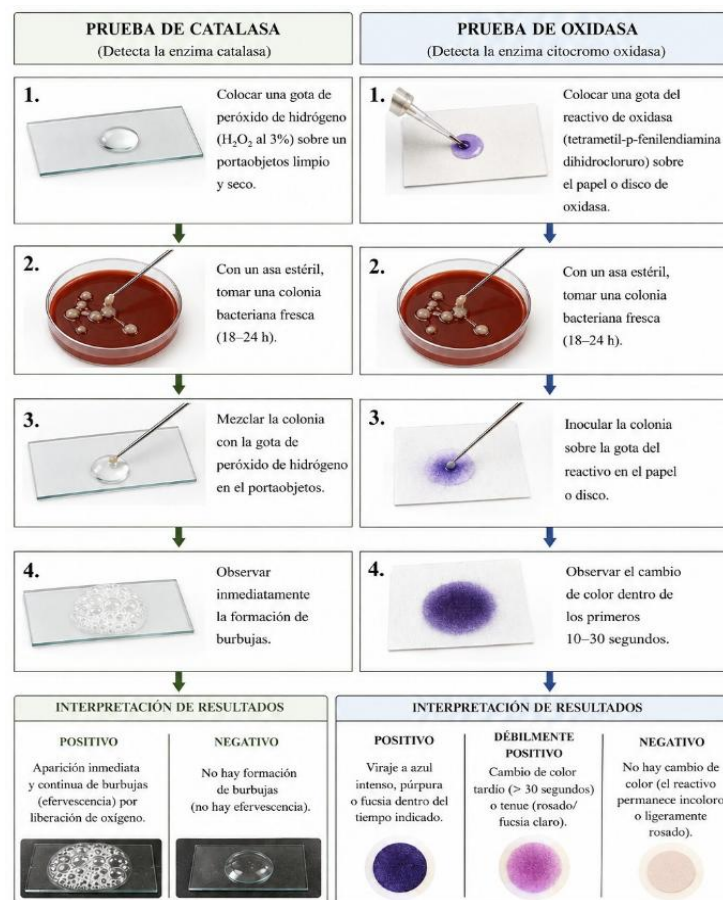
<http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%20libro%20digital/Manual%20de%20Bacteriologia.pdf>

Anexo 7. Prueba de satelitismo para la identificación de *H. influenzae*



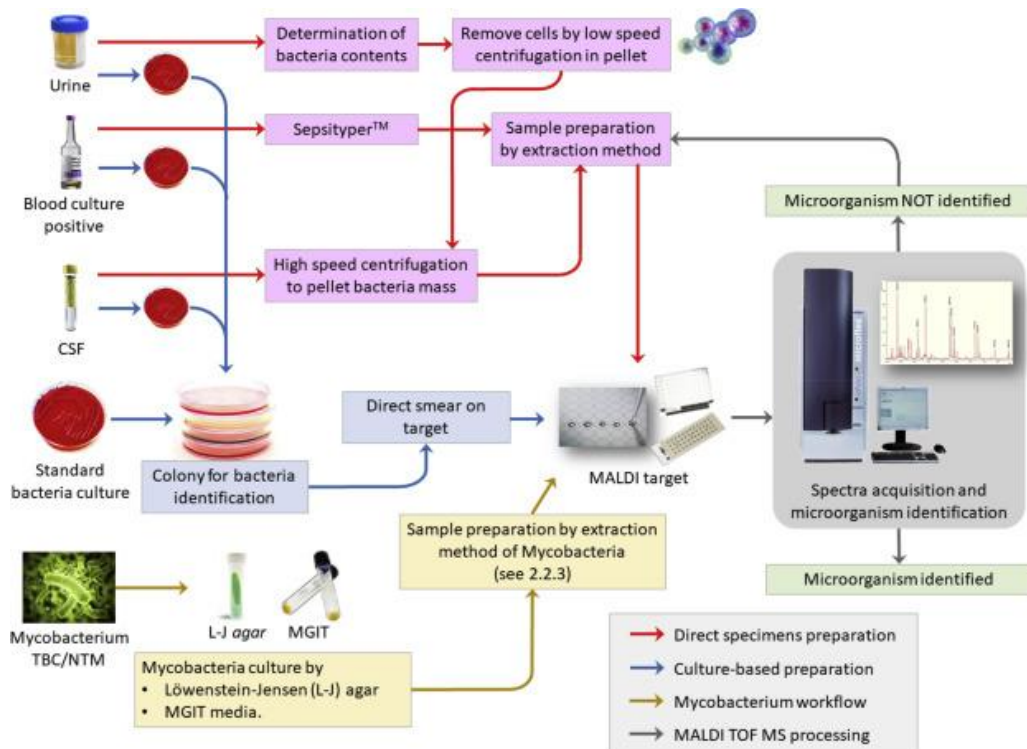
Fuente: <https://www.medical-labs.net/haemophilus-influenzae-diagnosis-using-satellite-test-1659/>

Anexo 8. Procedimiento de la prueba de catalasa y oxidasa



Fuente: https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa_oxidasa.htm

Anexo 9. Flujo de trabajo de identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF MS en un laboratorio clínico.



Fuente:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949819300146?_cf_chl_f_tk=9o7Vt.1klaUgJcd6KkvYSZiv1cmuwMPjHSf.ZQiEF1M-1783052811-1.0.1.1-8rreZ61bkIcNE5stHY4DMzcotirDDi87RZoOhCv.LEE

Anexo 10. Prueba rápida de aglutinación de látex Wellcogen™ para *H. influenzae* b.



Fuente: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R30858801>

Anexo 11. Inserto Prueba rápida de aglutinación de látex Wellcogen™ para *H. influenzae* b.

remel

Wellcogen™ *H. influenzae* b.

ES

REF ZL21/R30858801.....30 pruebas

1 USO PREVISTO

Wellcogen™ *H. influenzae* b es una prueba rápida de aglutinación en látex para uso en la detección cualitativa del antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo b presente en líquidos corporales como consecuencia de una infección o en cultivos de sangre.

2 RESUMEN

H. influenzae tipo b causa infecciones de gran importancia en lactantes y niños pequeños, y también en pacientes de mayor edad. La meningitis es la manifestación más común, pero el organismo también causa una variedad de otras enfermedades, como neumonía, epiglotitis y celulitis^{1,2}. Los organismos infectantes poseen un antígeno de superficie polisacárido específico, polirribosil fosfato, cuya cantidad difunde en los líquidos corporales como suero, líquido pleural y líquido cefalorraquídeo (LCR), y se excreta en la orina. El antígeno en estos líquidos corporales puede detectarse mediante contraelectroforesis inmunológica sensible, contraelectroinmuno-electroforesis e inmunoaglutinación en látex^{4,5,6,7,8,9,12}.

3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El reactivo Wellcogen™ *H. influenzae* b consiste en partículas de látex de poliestireno recubiertas con anticuerpos específicos contra el antígeno de *H. influenzae* tipo b. Estas partículas de látex aglutinan en presencia del antígeno homólogo.

Algunas muestras de líquidos corporales causan reacciones no específicas y agregación de partículas de látex, por lo que se proporciona un látex de control para identificar estas muestras.

4 DEFINICIONES DE SÍMBOLOS

	Número de catálogo
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Contiene reactivos suficientes para <n> pruebas
	Consultar las instrucciones de uso (IFU)
	Límite de temperatura (temperatura de almacenamiento)
	Código de lote (número de lote)
	Utilizar antes de (fecha de caducidad)
	Fabricante
	Añadir agua

5 CONTENIDO DEL KIT, PREPARACIÓN PARA EL USO Y ALMACENAMIENTO

El kit Wellcogen™ *H. influenzae* b incluye reactivos suficientes para realizar aproximadamente 30 pruebas.

Consulte también las **Precauciones**, sección 6.

Todos los componentes deben almacenarse a 2–8 °C, en condiciones bajo las cuales conservarán su actividad hasta la fecha de caducidad del kit.

Antes de usar, lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (18–30 °C) y mezcle.

Devuelva los reactivos sin usar al refrigerador después de su uso.

Instrucciones de uso
Tarjetas de reacción desechables (1 paquete)
Palitos de mezcla desechables (2 paquetes)
Gotero desechable (1 recipiente)
Tapón de goma negro (1)

LÁTEX DE PRUEBA

Látex de prueba

Un frasco gotero (tapa azul claro) que contiene una suspensión al 0,5 % de partículas de látex de poliestireno en solución salina tamponada con glicina, pH 8,2, con azida sódica al 0,1 % como conservante. Las partículas de látex están recubiertas con anticuerpo de conejo no inmune contra el antígeno de *H. influenzae* tipo b.

LÁTEX DE CONTROL

Látex de control

Un frasco gotero (tapa azul oscuro) que contiene una suspensión al 0,5 % de partículas de látex de poliestireno en solución salina tamponada con glicina, pH 8,2, con azida sódica al 0,1 % como conservante. Las partículas de látex están recubiertas con gammaglobulinas de conejo no inmunes.

Las suspensiones de látex se proporcionan listas para usar y deben almacenarse a 2–8 °C en posición vertical hasta la fecha de caducidad del kit. Después de un almacenamiento prolongado, puede ocurrir cierta agregación o secado del látex alrededor de la parte superior del frasco. En estas circunstancias, agite vigorosamente el frasco de látex durante unos segundos hasta que la resuspensión esté completa. NO CONGELAR.

CONTROL +

Control positivo polivalente

Un frasco (tapa roja) que contiene extractos bacterianos liofilizados que incluyen antígeno de una cepa representativa de *H. influenzae* tipo b. Contiene 0,01 % de bronopol antes de la reconstitución y 0,004 % después de la reconstitución.

Reconstituir con 3,6 ml de agua destilada estéril. Después de la adición de agua, dejar reposar el frasco unos minutos y luego agitar para mezclar. Almacenar el antígeno reconstituido a 2–8 °C durante un máximo de 6 meses.

CONTROL –

Control negativo

Un frasco gotero (tapa blanca) que contiene solución salina tamponada con glicina, pH 8,2, con 0,05 % de Bronidox® como conservante.

6 PRECAUCIONES

IVD

Los reactivos son solo para uso diagnóstico in vitro.

Solo para uso profesional.

Precaución: este producto contiene caucho natural seco.

Consulte la Ficha de Datos de Seguridad (MSDS) del material y el etiquetado del producto para obtener información sobre componentes potencialmente peligrosos.

INFORMACIÓN SOBRE SALUD Y SEGURIDAD

- 6.1 Los reactivos de Prueba y Control contienen azida sódica al 0,1 %, la cual está clasificada según la Directiva de la Comunidad Económica Europea (CEE) como muy tóxica (Xn). Las frases de riesgo (R) y de seguridad (S) apropiadas son las siguientes:

Xn	R22	Nocivo si se ingiere
	S36	Usar ropa de protección adecuada

Las azidas pueden reaccionar con el cobre y el plomo utilizados en algunos sistemas de fontanería. Las cantidades utilizadas en este kit son pequeñas; sin embargo, al desechar reactivos que contienen azida, deben enjuagarse con grandes volúmenes de agua.

- 6.2 De acuerdo con los principios de Buena Práctica de Laboratorio, se recomienda enfáticamente tratar los líquidos corporales como potencialmente infecciosos y manipularlos con todas las precauciones necesarias.
- 6.3 Al manipular medios de cultivo sanguíneos para estudios radiométricos, deben seguirse las normas básicas de seguridad radiológica. Estas incluyen:
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en un área designada en un recipiente aprobado.
 - La manipulación de la radiactividad debe realizarse en un área designada.
 - La preparación de materiales radiactivos no debe realizarse en la boca.
 - No deben realizarse actividades como comer, beber o fumar en el área designada.
 - Las manos deben lavarse completamente después de manipular el material radiactivo.

El Oficial Local de Seguridad Radiológica debe ser consultado acerca de los requisitos de eliminación.

- 6.4 Los dispositivos no desechables deben esterilizarse mediante el procedimiento apropiado después del uso; aunque el método preferido es el autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Los desechables deben incinerarse. Los derrames de material potencialmente infeccioso deben eliminarse inmediatamente con papel absorbente y las áreas contaminadas deben limpiarse con un desinfectante estándar o alcohol al 70 %. NO use hipoclorito de sodio. Los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos guantes, deben desecharse como residuos biopeligrosos.

6 PRECAUCIONES (continuación)

- 6.5 No pipetee con la boca. Use guantes desechables y protección para los ojos al manipular las muestras y al realizar el ensayo. Lávese bien las manos al terminar.
- 6.6 Cuando se utilicen de acuerdo con los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio y los estándares de higiene ocupacional, las instrucciones de uso incluidas en estas instrucciones no se consideran que presenten riesgo para la salud.

PRECAUCIONES ANALÍTICAS

- 6.7 No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada.
- 6.8 Los reactivos de látex deben llevarse a temperatura ambiente (18 a 30 °C) antes de su uso. Los reactivos de látex que muestren signos de agregación o "grumos" antes del uso pueden haberse congelado y no deben utilizarse.
- 6.9 Es importante cuando se usan frascos goteros que se mantengan en posición vertical y que las gotas se formen en la punta de la boquilla. Si el volumen de la gota en la punta de la boquilla no es correcto; si esto ocurre, seque la boquilla antes de continuar.
- 6.10 Los reactivos proporcionados en cada kit están estandarizados en cuanto a su desempeño y no deben utilizarse en combinación con reactivos de otro kit que tenga un número de lote diferente.
- 6.11 No toque las áreas de reacción de las tarjetas.
- 6.12 En este ensayo pueden utilizarse rotadores mecánicos. Se han encontrado satisfactorias las siguientes características:
- Rotadores de plataforma plana que funcionen entre 100 y 150 rpm y con un diámetro orbital de 3,0 a 3,4 cm. La tarjeta puede retirarse del rotador y dejarse brevemente antes de la lectura.
 - Rotadores orbitales (también llamados rotadores dimensionales) que funcionen a 25 rpm con un ángulo orbital aproximado de 9 a 10,5 grados o a 18 rpm con un ángulo orbital aproximado de 16 a 17,5 grados.
- 6.13 Evite la contaminación microbiana de los reactivos, ya que esto puede conducir a resultados erróneos.

7 RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- 7.1 Muestras de líquidos corporales (p. ej., LCR, suero, orina) deben analizarse tan pronto como sea posible después de su recolección. Si el análisis no puede realizarse inmediatamente, pueden almacenarse durante la noche a 2 a 8 °C, o por períodos más prolongados a -15 a -25 °C. Si se requieren análisis bacteriológicos de la muestra, estas deben configurarse antes de realizar la aglutinación en látex, para evitar la contaminación.
- 7.2 Los cultivos de sangre pueden tomarse y analizarse después de 18 a 24 horas de incubación a 37 °C y/o tan pronto como se observe crecimiento bacteriano.

8 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

MATERIALES REQUERIDOS PROPORCIONADOS

Consulte **Contenido**, sección 5.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

Baño de agua a punto de ebullición
Centrífuga de laboratorio o filtros de membrana (0,45 µm)
Rotador (opcional — consulte **Precauciones**, sección 6)

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

- 8.1 **Muestras de líquidos corporales** deben calentarse³ antes de las pruebas mediante el procedimiento de Wellcogen™ para minimizar las reacciones no específicas. Se recomiendan los siguientes procedimientos:
- Para LCR y orina, caliente la muestra durante 5 minutos en un baño de agua en ebullición. Enfríe la muestra a temperatura ambiente (18 a 30 °C) y aclare por centrifugación o mediante filtración de membrana (0,45 µm) antes de la prueba. Para máxima sensibilidad, las muestras de orina pueden concentrarse hasta 25 veces en Minicon® B-15 concentrado³. Aclare como se indicó anteriormente antes de la prueba.
 - Para suero, agregue 3 volúmenes de solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 M, pH 7,4 por 1 volumen de suero y caliente durante 5 minutos en un baño de agua en ebullición; enfríe a temperatura ambiente (18 a 30 °C) y aclare³. Una solución EDTA adecuada (10 ml) está disponible (Código No. ZL29/R30164501).
- 8.2 **Cultivos de sangre.** Centrifugue de 1 a 2 ml de muestra para sedimentar los glóbulos rojos; por ejemplo, a 1000 g durante 5 a 10 minutos. Realice la prueba de látex en el sobrenadante.

- 8.3 Si ocurre una reacción no específica con un sobrenadante de cultivo de sangre (consulte **Interpretación de resultados**, sección 10), caliente la muestra en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos, enfríe a temperatura ambiente (18 a 30 °C), aclare por centrifugación y repita la prueba.

PROCEDIMIENTO

Se recomienda leer cuidadosamente la sección de Precauciones, sección 6, antes de realizar la prueba.

NOTA: Si el volumen de la muestra de ensayo es limitado, debe utilizarse primero el Látex de Ensayo y, si se obtiene un resultado positivo, la muestra debe ensayarse luego con el Látex de Control. Si la muestra es insuficiente cuando ambos látex están disponibles, deben ensayarse simultáneamente con el Látex de Ensayo y el Látex de Control.

Paso 1	Procese la muestra como se describe en Preparación de las Muestras Clínicas , sección 8.	
Paso 2	Agite los reactivos de látex.	
Paso 3	Para cada muestra de ensayo coloque 1 gota de Látex de Ensayo en un círculo de una Tarjeta de Reacción y 1 gota de Látex de Control en un círculo separado. Los frascos goteros deben mantenerse en posición vertical para dispensar una gota de tamaño uniforme. (Consulte Precauciones , sección 6).	1 gota
Paso 4	Con un Gotero Desechable, dispense 1 gota (aproximadamente 40 µl) de la Muestra de Ensayo en cada gota de látex.	1 gota
Paso 5	Mezcle el contenido de cada círculo con un Palito de Mezcla y extienda para cubrir completamente el área del círculo. Utilice un palito separado para cada círculo y deséchelo después de usarlo.	
Paso 6	Agite la tarjeta y observe la aglutinación durante 3 minutos como máximo, sosteniendo la tarjeta a una distancia de lectura corta (25 a 35 cm) de los ojos. No utilice una lupa de aumento. Puede usarse agitación mecánica (3 minutos) (consulte Precauciones , sección 6). Los patrones obtenidos deben ser claros y pueden reconocerse en todas las condiciones de iluminación.	3 minutos
Paso 7	Deseche la Tarjeta de Reacción usada en un recipiente para desechos seguro.	

9 CONTROL DE CALIDAD

Los siguientes procedimientos deben realizarse inicialmente con cada envío de kits de ensayo y con cada corrida de muestras de ensayo. En la práctica, puede definirse una corrida como un período de prueba de hasta 24 horas. Cualquier desviación de los resultados esperados indica que puede haber un problema con los reactivos, que debe resolverse antes de continuar con muestras clínicas.

INSPECCIÓN VISUAL

Las suspensiones de látex siempre deben inspeccionarse en busca de aglutinación al gotearlas en la tarjeta de prueba y, si hay evidencia de grumos antes de agregar la muestra de ensayo, la suspensión no debe utilizarse. Después de un almacenamiento prolongado puede ocurrir cierta agregación o secado de látex alrededor de la parte superior del frasco. En estas circunstancias se debe agitar vigorosamente el frasco de látex durante unos segundos hasta que la resuspensión esté completa.

PROCEDIMIENTO DE CONTROL POSITIVO

La reactividad del látex de ensayo puede confirmarse añadiendo Control Positivo Polivalente a un círculo de reacción en el que la Muestra de Ensayo no haya aglutinado el Látex de Ensayo después de 3 minutos de rotación.

Paso 1	Use un Gotero Desechable para añadir 1 gota de Control Positivo al círculo que contiene Látex de Ensayo y muestra.	1 gota
Paso 2	Mezcle con un Palito de Mezcla y deséchelo para un desecho seguro.	
Paso 3	Agite la tarjeta manualmente o con un rotador durante 3 minutos adicionales. Después de este tiempo, debe observarse aglutinación definitiva.	3 min
Paso 4	Deseche la Tarjeta de Reacción usada en un recipiente para desechos seguro.	

PROCEDIMIENTO DE CONTROL NEGATIVO

Si al menos una muestra de ensayo dentro de una corrida da resultado negativo con Látex de Ensayo y Látex de Control (o solo donde no se haya usado Látex de Control), esto constituye un control negativo válido para los reactivos y no se requiere más prueba.

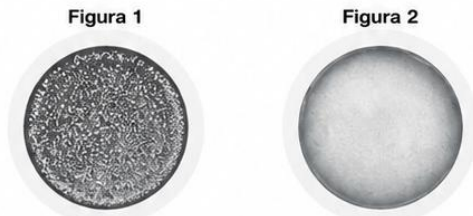
Si una muestra de ensayo aglutina con el Látex de Ensayo y no aglutina con el Látex de Control, entonces la muestra debe ensayarse con el Control Negativo o con un medio de cultivo de sangre no inoculado, según corresponda (consulte debajo).

10 RESULTADOS

LECTURA DE RESULTADOS

Un resultado positivo se indica por el desarrollo de un patrón de aglutinación dentro de los 3 minutos de mezclar el látex con la muestra de ensayo, mostrando claramente grumos visibles del látex (Figura 1).

La velocidad de aparición y la calidad de la aglutinación dependen de la fuerza del antígeno; variando desde grumos grandes que aparecen dentro de unos pocos segundos de la mezcla, hasta grumos pequeños que se desarrollan más lentamente.



En una reacción negativa el látex no aglutina y la apariencia lechosa permanece sustancialmente sin cambios en toda la prueba (Figura 2). Sin embargo, pueden detectarse partículas tenues de granularidad en reacciones negativas, dependiendo de la calidad visual del operador.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Resultado positivo

Una aglutinación clara del Látex de Ensayo acompañada de falta de aglutinación del Látex de Control indica la presencia de antígeno de *H. influenzae* tipo b en el sobrenadante de líquidos corporales o en el cultivo de sangre.

Resultado negativo

La falta de aglutinación en ambos reactivos significa que el antígeno de *H. influenzae* tipo b no es detectable en el fluido de ensayo – no elimina la posibilidad de infección por *H. influenzae* tipo b, y si los síntomas persisten puede ser deseable realizar pruebas adicionales en muestras posteriores o alternativas, o después de concentrar las especímenes de orina.

Resultado no interpretable

La aglutinación visible del Látex de Control, ya sea más fuerte o más débil que el Látex de Ensayo, indica una reacción no específica. Las reacciones no específicas con líquidos corporales pueden eliminarse calentando y aclarando la muestra (consulte **Preparación de las Muestras Clínicas**, sección 8). Si ocurre una reacción no específica con un cultivo de sangre, hierva el sobrenadante durante 5 minutos en baño de agua, enfríe a temperatura ambiente (18 a 30 °C), aclare por centrifugación y repita la prueba.

NOTA: Las pruebas realizadas directamente sobre especímenes clínicos están destinadas a fines de cribado y deben aumentar, no reemplazar, los procedimientos de cultivo. Los resultados deben usarse junto con otros datos, por ejemplo, síntomas, resultados de otras pruebas, impresiones clínicas, etc.

11 LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- 11.1 Un resultado positivo en la prueba depende de la presencia de un nivel detectable de antígeno en el líquido corporal o en el medio de cultivo de sangre.
- 11.2 Se han informado algunos ejemplos de bacterias no relacionadas que poseen antígenos comunes y, con cualquier sistema de prueba inmunológica, la posibilidad de reacciones cruzadas que ocurran en la prueba de látex no puede descartarse (11,12).

12 RESULTADOS ESPERADOS

Las muestras que contienen un nivel detectable de antígeno de *H. influenzae* tipo b formarán una reacción de aglutinación con el Látex de Ensayo.

13 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se realizaron estudios clínicos en laboratorios hospitalarios utilizando muestras de líquidos corporales (frescas y congeladas) y sobrenadantes de cultivos aeróbicos y anaeróbicos de sangre. Se emplearon técnicas culturales tradicionales y radiométricas en ambos estudios de cultivos de sangre. Las muestras de líquido corporal almacenadas no fueron tratadas como se describe bajo **Preparación de las Muestras Clínicas**, sección 8. Pruebas de laboratorio extensivas han demostrado que este procedimiento de calentamiento no produce pérdida de antígeno después del calentamiento.

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de Wellcogen™ *H. influenzae* b se estableció a partir de pruebas en muestras de cultivo positivas para el organismo homólogo. Wellcogen™ *H. influenzae* b detectó el 97 % (117/121) de los cultivos positivos y el 100 % (54/54) de las muestras de cultivo de sangre positivas (Tabla 1).

ESPECIFICIDAD

La especificidad de Wellcogen™ *H. influenzae* b se evaluó utilizando 632 muestras de líquidos corporales (frescas y congeladas) y 1566 muestras de cultivos de sangre de pacientes con meningitis bacteriana o aséptica y otras condiciones no relacionadas.

Los organismos aislados de muestras de líquidos corporales infectadas fueron *Streptococcus pneumoniae*, grupos A, C, Y de *N. meningitidis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus* grupo B y un bacilo coliforme.

La especificidad de Wellcogen™ *H. influenzae* b para detectar antígeno en todos los líquidos corporales probados fue del 99,7 % (630/632). Dos muestras de LCR dieron reacciones positivas con Wellcogen™ *H. influenzae* b; una muestra fue aséptica y de *E. coli* se aisló de la otra.

La especificidad de Wellcogen™ *H. influenzae* b en cultivos de sangre fue del 99,7 % (1561/1566) (Tabla 1). Las bacterias aisladas de los 5 cultivos de sangre positivos fueron: *Staph. aureus*, *E. coli* más *Staph. epidermidis*, *Klebsiella oxytoca* y estreptococo α -hemolítico.

Se obtuvieron reacciones no específicas con un LCR y tres muestras de suero adicionales (que no habían sido tratadas por calor como se indicó). Nueve sobrenadantes de cultivos de sangre dieron reacciones no específicas en la prueba inicial y se eliminaron uno por uno mediante tratamiento por calor de la muestra como se describió en **Preparación de las Muestras Clínicas**, sección 8.

Tabla 1

Resultados de estudios clínicos sobre Wellcogen™ <i>H. influenzae</i> b				
Muestra	Sensibilidad ^a		Especificidad ^b	
	N.º probado	N.º positivo	N.º probado	N.º positivo
LCR	90	87	375 ^c	2 ^d
Suero	21	20	21	0
Orina	10	10	236	0
Cultivo de sangre	54	54	1566 ^e	5 ^f

^a Se aisló *H. influenzae* tipo b.

^b Bacterias distintas de *H. influenzae* tipo b/sin crecimiento.

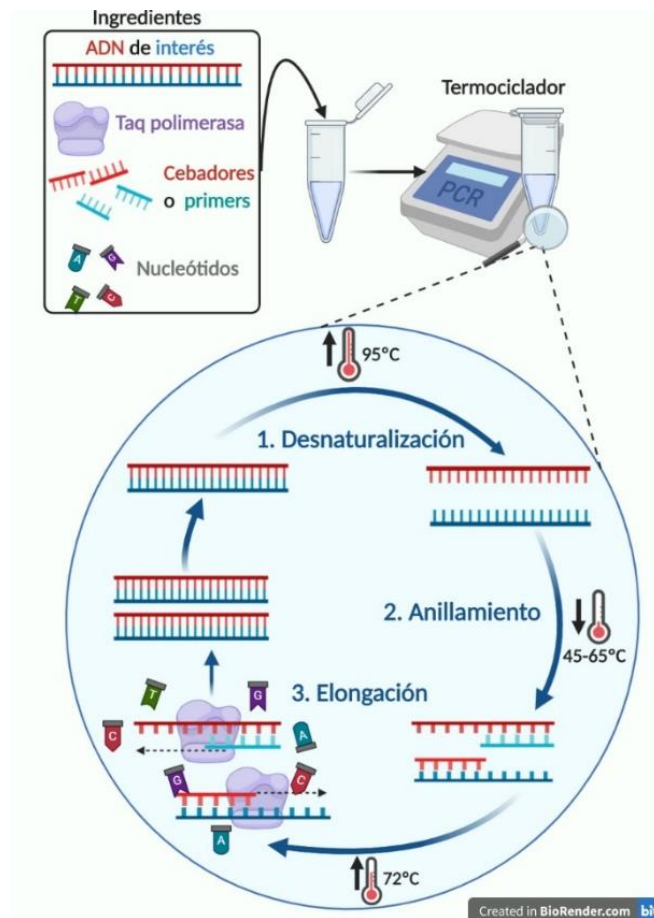
^c Un LCR adicional dio una reacción no específica.

^d LCR aséptico; *E. coli* aislada.

^e Tres sobrenadantes de cultivos de sangre adicionales dieron reacciones no específicas.

^f Una muestra fue aséptica. Otras muestras fueron: *Staph. aureus*; *E. coli* + *Staph. epidermidis*; *Klebsiella oxytoca*; estreptococo α -hemolítico.

Anexo 12. Esquema de una PCR básica.



Fuente: <https://concienciabiosocialblog.wordpress.com/2020/10/30/que-es-una-pcr/>

Anexo 13. Artículos utilizados para la ejecución de los resultados.

Año	Base de datos	Autor	Título en inglés	Título en español
2022	PubMed	Carnalla et al.	Diagnosis of bacterial meningitis caused by <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , and <i>Haemophilus influenzae</i> using a multiplex real-time PCR technique	Diagnóstico de meningitis bacteriana causada por <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> mediante una técnica de PCR en tiempo real multiplex.
2023	Frontiers	Ekinici et al.	<i>Haemophilus influenzae</i> carriage and antibiotic resistance profile in Belgian infants over a three-year period (2016–2018)	Presencia de <i>Haemophilus influenzae</i> y perfil de resistencia a los antibióticos en lactantes belgas durante un período de tres años (2016-2018).
2018	Google Scholar	Fan et al.	Epidemiological analysis and rapid detection by one-step multiplex PCR assay of <i>Haemophilus influenzae</i> in children with respiratory tract infections in Zhejiang Province, China	Análisis epidemiológico y detección rápida mediante ensayo PCR multiplex de un solo paso de <i>Haemophilus influenzae</i> en niños con infecciones del tracto respiratorio en la provincia de Zhejiang, China.
2018	Google Scholar	Beissbarth et al.	Recommendations for application of <i>Haemophilus influenzae</i> PCR diagnostics to respiratory specimens for children living in northern Australia: a retrospective re-analysis	Recomendaciones para la aplicación de diagnósticos por PCR de <i>Haemophilus influenzae</i> en muestras respiratorias de niños que viven en el norte de Australia: un reanálisis retrospectivo.

2018	Google Scholar	O'Brien et al.	Real-time PCR for the diagnosis of invasive <i>Haemophilus influenzae</i> bacteraemia and meningitis in children: A diagnostic accuracy study of over 2,000 samples	PCR en tiempo real para el diagnóstico de bacteriemia y meningitis invasiva por <i>Haemophilus influenzae</i> en niños: un estudio de precisión diagnóstica de más de 2000 muestras.
2020	PubMed	Pimenta et al.	Dried blood spots for <i>Streptococcus pneumoniae</i> and <i>Haemophilus influenzae</i> detection and serotyping among children < 5 years old in rural Mozambique	Muestras de sangre seca para la detección y serotipificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> en niños menores de 5 años en zonas rurales de Mozambique.
2022	MDPI	Bajanca et al.	<i>Haemophilus influenzae</i> Carriage among Healthy Children in Portugal, 2015–2019	<i>Portadores de Haemophilus influenzae</i> entre niños sanos en Portugal, 2015-2019
2021	ProQuest	Supriya et al.	Detection of <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> and <i>Haemophilus influenzae</i> in Culture Negative Cerebrospinal Fluid Samples from Meningitis Patients Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction in Nepal	Detección de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> en muestras de líquido cefalorraquídeo con cultivo negativo de pacientes con meningitis mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex en Nepal
2025	ProQuest	Alexandrova et al.	Bacterial Profile, Molecular Serotyping, and Key Genetic Determinants for Adhesion, Immune Evasion, and Tissue Spread Among Bulgarian Children with Acute Otitis Media	Perfil bacteriano, serotipificación molecular y determinantes genéticos clave para la adhesión, la evasión inmunitaria y la diseminación tisular en niños búlgaros con otitis media aguda

2018	ProQuest	Haddad et al.	Molecular diagnosis of bacterial meningitis by multiplex real time PCR in Tunisian children	Diagnóstico molecular de meningitis bacteriana mediante PCR en tiempo real multiplex en niños tunecinos.
2023	ProQuest	Yuan et al.	Characterization of Serotypes and Molecular Drug Resistance Patterns of <i>Haemophilus influenzae</i> in Kunming Children	Caracterización de serotipos y patrones moleculares de resistencia a fármacos de <i>Haemophilus influenzae</i> en niños de Kunming
2024	PubMed	Tran et al.	Comparison of Real-time Polymerase Chain Reaction and Culture for Targeting Pathogens in Pediatric Severe Community-Acquired Pneumonia	Comparación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y el cultivo para la detección de patógenos en la neumonía grave adquirida en la comunidad en niños.
2024	ProQuest	Jacobson et al.	Evaluation of a multiplex-qPCR for paediatric pleural empyema—An observational study in hospitalised children	Evaluación de una PCR cuantitativa multiplex para el empiema pleural pediátrico: un estudio observacional en niños hospitalizados.
2022	ProQuest	Deng et al	Diagnostic value of bronchoalveolar lavage fluid metagenomic next- generation sequencing in pediatric pneumonia	Valor diagnóstico de la secuenciación metagenómica de nueva generación del líquido de lavado broncoalveolar en la neumonía pediátrica
2022	PubMed	Xirogianni et al.	Impact of a Single-Tube PCR Assay for the Detection of <i>Haemophilus influenzae</i> Serotypes a, c, d, e and f on the Epidemiological Surveillance in Greece	Impacto de un ensayo de PCR en un solo tubo para la detección de los serotipos a, c, d, e y f de <i>Haemophilus influenzae</i> en la vigilancia epidemiológica en Grecia.
2021	ProQuest	Farajzadeh et al.	Multiplex polymerase chain reaction detection of <i>Streptococcus pneumoniae</i> and <i>Haemophilus</i>	Detección mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex de <i>Streptococcus</i>

			<i>influenzae</i> and their antibiotic resistance in patients with community-acquired pneumonia from southwest Iran	<i>pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> y su resistencia a los antibióticos en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad del suroeste de Irán.
2017	PubMed	Seth et al.	Rapid and Accurate Diagnosis of Acute Pyogenic Meningitis Due to <i>Streptococcus Pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> Type b and <i>Neisseria meningitidis</i> Using A Multiplex PCR Assay	Diagnóstico rápido y preciso de meningitis piógena aguda causada por <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y <i>Neisseria meningitidis</i> mediante un ensayo de PCR múltiple.
2022	Google Scholar	Pouladfar et al.	Evaluation of Multiplex Real-time PCR and WHO Criteria for Diagnosing Childhood Bacterial Meningitis in a Tertiary Referral Hospital in Iran	Evaluación de la PCR multiplex en tiempo real y los criterios de la OMS para el diagnóstico de la meningitis bacteriana infantil en un hospital de referencia terciario en Irán.
2025	ProQuest	Cao et al.	Multiplex droplet digital PCR for the detection and quantitation of <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , and <i>Haemophilus influenzae</i>	PCR digital de gotas multiplex para la detección y cuantificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> .
2025	ProQuest	Zhou et al.	Rapid detection of <i>Hemophilus influenzae</i> and <i>Streptococcus pneumoniae</i> simultaneously using a duplex recombinase-aided amplification assay directly from invasive clinical samples	Detección rápida de <i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> simultáneamente mediante un ensayo de amplificación asistida por recombinasa dúplex directamente a partir de muestras clínicas invasivas.

2016	PubMed	Gier et al.	Duplex Quantitative PCR Assay for Detection of <i>Haemophilus influenzae</i> That Distinguishes Fucose- and Protein D-Negative Strains	Ensayo de PCR cuantitativa dúplex para la detección de <i>Haemophilus influenzae</i> que distingue entre cepas fucosa-negativas y proteína D-negativas.
2021	ProQuest	Rafiei Tabatabaei et al.	Effect of <i>Haemophilus influenzae</i> Type b Vaccination on Nasopharyngeal Carriage Rate in Children, Tehran, 2019	Efecto de la vacunación <i>contra Haemophilus influenzae</i> tipo b en la tasa de portadores nasofaríngeos en niños, Teherán, 2019
2026	ProQuest	Li et al.	Surveillance of epidemiological characteristics and temporal trends in antimicrobial resistance of <i>Haemophilus influenzae</i> in pediatric lower respiratory tract infections (2021–2024)	Vigilancia de las características epidemiológicas y las tendencias temporales de la resistencia antimicrobiana de <i>Haemophilus influenzae</i> en infecciones pediátricas del tracto respiratorio inferior (2021-2024)
2025	ProQuest	Doxey et al.	Metatranscriptomic profiling reveals pathogen and host response signatures of pediatric acute sinusitis and upper respiratory infection	El análisis metatranscriptómico revela firmas de respuesta del patógeno y del huésped en la sinusitis aguda pediátrica y la infección de las vías respiratorias superiores.
2019	PubMed	Wang et al.	Antibiotic Resistance Profiles of <i>Haemophilus influenzae</i> Isolates from Children in 2016: A Multicenter Study in China	Perfiles de resistencia a los antibióticos de aislamientos de <i>Haemophilus influenzae</i> en niños en 2016: un estudio multicéntrico en China.
2026	Frontiers	Ni et al.	RSV-infected children with mixed infections: clinical features and early predictive indicators	Niños infectados por el virus sincitial respiratorio (VSR) con infecciones mixtas: características clínicas e indicadores predictivos tempranos de

			of codetection with <i>Streptococcus pneumoniae</i> and <i>Haemophilus influenzae</i>	codetección con <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> .
2016	PubMed	Pettigrew et al	Association of sputum microbiota profiles with severity of community-acquired pneumonia in children	Asociación de los perfiles de microbiota del esputo con la gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad en niños
2026	Frontiers	Pi et al.	Targeted next-generation sequencing analysis of pathogens and microecology in pediatric lower respiratory tract infections identifies risk factors for severe community-acquired pneumonia	El análisis de secuenciación de próxima generación dirigido a patógenos y microecología en infecciones pediátricas del tracto respiratorio inferior identifica factores de riesgo para la neumonía grave adquirida en la comunidad.
2025	PubMed	Agosta et al.	An Evaluation of a Syndromic Molecular Panel in Optimising the Microbiological Diagnosis and Antimicrobial Therapy of Suspected Osteoarticular Infections in Paediatric Patients	Evaluación de un panel molecular sindrómico para optimizar el diagnóstico microbiológico y la terapia antimicrobiana de infecciones osteoarticulares sospechadas en pacientes pediátricos.
2025	ProQuest	Moriki et al.	Bacterial Isolates from Bronchoalveolar Lavage in Pediatric Patients with Protracted Bacterial Bronchitis or Bronchiectasis: A Retrospective Comparative Study	Aislamientos bacterianos del lavado broncoalveolar en pacientes pediátricos con bronquitis bacteriana prolongada o bronquiectasias: un estudio comparativo retrospectivo.