

Haemophilus influenzae no tipificable: mecanismo de destrucción del *biofilm*

Non-typeable Haemophilus influenzae: mechanism of biofilm destruction

María Fernanda Sandoval¹, Daniela María Saade^{1,2}, Alberto Armando Romero¹, Karla Mariela Rodríguez¹, Claudia Margarita Sánchez¹, Karla Isabel Salinas¹, Cecilia Ivette Romero³

1. Estudiante de tercer año de medicina, Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador

2. Licenciada en Bioquímica de la Universidad de Navarra, España

3. Doctora en medicina. Docente de Microbiología en Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador

Correspondencia a:
María Fernanda Sandoval
mafernandasand@gmail.com

Sin fuentes de financiamiento externo

Palabras Clave
Biofilm
Haemophilus influenzae no tipificable
DNAB

Key Words
Biofilm
Non-typeable Haemophilus influenzae
DNAB

Recibido para publicación:
14 de Octubre de 2017

Aceptado para publicación:
26 de Mayo de 2018

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación a este artículo

Citar como:

Sandoval M, Saade D, Romero A, Rodríguez K, Sánchez C, Salinas K, Romero C. Non-typeable Haemophilus influenzae: mechanism of biofilm destruction. Rev ANACEM 2018; 12 (1): 22-29

RESUMEN

Introducción: Haemophilus influenzae tiene como hábitat el aparato respiratorio humano. No existe vacuna contra la variante no tipificable (NTHi) de este, por lo que se ha mostrado una tendencia al incremento de casos en los últimos años. La patogenicidad de NTHi se debe a su habilidad para formar biofilms, por lo que se pretende analizar mecanismos de destrucción del biofilm formado por NTHi. **Metodología:** Se realizó una revisión bibliográfica mediante consultas en las bases de datos, Hinari, MEDLINE y el motor de búsqueda Pub-Med. Se tomaron en consideración artículos originales, ensayos clínicos y artículos de revisión bibliográfica dando prioridad a aquellos publicados en los últimos 5 años. **Desarrollo:** NTHi tiene la capacidad de formar biofilms por medio de proteínas del pili y elementos estabilizadores del ADN extracelular, entre los más importantes están: DNA BII, pili tipo IV, Nucleasa extracelular 2019 y adhesinas de alto peso molecular. El uso de chalconas, EDTA y ADN como quelante de cationes, antiseros contra DNBI y maquinaria luxS más anticuerpos contra Pili IV han demostrado que pueden ser útiles para la erradicación del biofilm. **Conclusión:** Se proponen dos tratamientos novedosos que podrían contribuir en la eliminación del biofilm formado por NTHi, uno es el uso de EDTA y otro los anticuerpos dirigidos a proteínas esenciales en la formación y adhesión del biofilm. Es necesario profundizar en otros estudios con estas propuestas terapéuticas para determinar su uso en el área clínica en un futuro.

ABSTRACT

Introduction: Haemophilus influenzae has the human respiratory system as habitat. There's no vaccine against the non-typeable group (NTHi), as a consequence there has been an increase in the number of cases in the past few years. The pathogenesis of NTHi is caused by its ability to form biofilms, for this reason we pretend to analyze the destruction mechanisms of biofilms formed by NTHi. **Methodology:** A review was made using the databases Hinari, MEDLINE and PubMed. Original articles, clinical trials and reviews that had been published in the last five years were taken in count. **Results:** NTHi has the capacity to form biofilms through pilus proteins and extracellular DNA stabilizers; among the most important we have: DNA BII, type IV pilus, 2019 extracellular nuclease and adhesins of high molecular weight. The use of chalcone, EDTA, DNA as cation chelant, antiserum against DNA BII and luxS plus antibodies against Pili IV has shown potential to eradicate biofilms. **Discussion:** Two new treatments, that could contribute to the removal of biofilms formed by NTHi, are proposed: one of them is the use of EDTA and the other one is the use of antibodies against essential proteins that the bacteria uses in the formation and adhesion of biofilms. Never the less, it is necessary to deepen more in studies about these therapeutic alternatives to determine their use in the clinical area in the future.

INTRODUCCIÓN

Haemophilus influenzae es un cocobacilo Gram negativo cuyo hábitat principal es el aparato respiratorio del ser humano. Las especies de *Haemophilus influenzae* se dividen en dos grupos en base a la ausencia o presencia del polisacárido de cápsula: tipificable o no tipificable (NTHI). En la actualidad, la variante más estudiada corresponde al serotipo B del grupo tipificable, para el cual incluso existe una vacuna que ha mostrado ser efectiva y ha permitido la disminución del número de casos; sin embargo, la ausencia de vacuna contra el grupo no tipificable permite que se sigan identificando casos, incluso mostrando una tendencia al incremento en los últimos años (1).

La recurrencia y cronicidad de las infecciones provocadas por NTHI han sido asociadas con su capacidad para la formación de biofilms. Esto provoca la adherencia de un gran número de bacterias, incluso de otras especies, dando lugar a una estructura difícil de erradicar la cual empeora el curso clínico de la infección, favoreciendo incluso la diseminación hacia la vía respiratoria inferior. Las patologías observadas más frecuentemente por NTHI son otitis media, sinusitis, neumonía, conjuntivitis, exacerbación de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y empeoramiento de los pacientes con fibrosis quística (2).

El NTHI posee distintas estructuras moleculares no observables en el grupo de los tipificables, que se sospecha juegan un papel fundamental en la formación del biofilm. Dentro de estas se encuentran las adhesinas de Alto Peso Molecular (HMW) responsables de la adherencia de la bacteria a las células epiteliales humanas, el ADN extracelular (eADN) que se considera puede ser asimilado y producir proteínas que favorezcan la interacción con las células humanas, la proteína DNABIII encargada de estabilizar el ADN exógeno y transmitirlo, y los pilis de tipo IV que favorecen la adhesión entre una y otra bacteria (1,3). Además del eADN, se han reportado al ácido siálico (Neu5Ac) y la fosforilcolina¹⁴ como 2 componentes lipooligosacáridos (LOS) importantes de NTHi en la formación del biofilm (4).

Se sospecha de otros factores de virulencia implicados que aún no han sido aislados. Por ejemplo, se describe la existencia de una molécula que inhabilita las capacidades de supervivencia de macrófagos por períodos prolongados, la cual disminuye la capacidad de respuesta del sistema inmune contra el patógeno. Es decir, que existirían múltiples factores descritos y no descritos implicados en la formación del biofilm, por lo que la descripción de posibles estrategias para la interacción con estos factores y la destrucción de esta estructura pudieran facilitar la resolución clínica de las enfermedades producidas por este patógeno (5).

Por lo tanto, los objetivos de esta revisión son mostrar qué mecanismos bacterianos promueven la formación del biofilm y que métodos permiten, en la actualidad, destruirlo.

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica de publicaciones científicas internacionales, mediante consultas en las bases de datos, Hinari, MEDLINE y el motor de búsqueda PubMed; en los cuales se ejecutó una búsqueda de lista de términos en el tesoro MeSH tomando en cuenta los operadores booleanos. Las palabras claves utilizadas fueron “*Haemophilus influenzae*”, “NTHi”, “biofilm”, “biofilm destruction”, “NTHi treatment” y distintas combinaciones de las mismas. Se tomaron en consideración artículos originales, ensayos clínicos y artículos de revisión bibliográfica relacionados con el tema propuesto evaluando su calidad mediante el análisis de la variabilidad, fiabilidad y validez de estos, estableciendo prioridad en fuentes con vigencia de publicación menor a 5 años. Los criterios de inclusión y exclusión para la elección de un artículo fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

- Artículos originales, revisiones bibliográficas, casos clínicos.
- Temática principal: *H. influenzae* no tipificable o destrucción de biofilms.
- Resultados coherentes con bases teóricas.
- Información relevante sobre biofilms por *H. influenzae*.
- Artículos publicados en inglés o en español.

Criterios de exclusión:

- Divulgación científica, artículos no publicados en revistas científicas.
- Antigüedad mayor a 15 años.
- Temática principal: *H. influenzae* tipo B.
- Información irrelevante sobre *H. influenzae*.
- Información de otras bacterias distintas a *H. influenzae*, no relacionada con la formación o destrucción de biofilms.

En caso que los artículos cumplieran con los criterios de inclusión, estos se guardaban en un gestor bibliográfico (Zotero) y se analizaban y leían críticamente. Los artículos utilizados por ser los más relevantes fueron 30 de un total de 46 artículos encontrados.

DESARROLLO

Mecanismos que favorecen la formación del biofilm en NTHi

El Biofilm es un agregado característico de bacterias que se recubren en capas adhesivas de matriz extracelular las cuales son producidas por las mismas bacterias. Evolutivamente esta estructura confiere ventajas en la supervivencia de los microorganismos, porque permite la evasión de múltiples mecanismos de defensa inmune y del tratamiento con antimicrobianos tradicionales; características por las cuales estas bacterias producen infecciones crónicas y de difícil manejo. (Fig. 1) Dentro de los patógenos productores

Figura 1. Formación de biofilm: NTHi recluta a los neutrófilos que contribuyen en la formación del biofilm. Esto se da por el proceso de quimiotaxis que ocurre por liberación de mediadores y citoquinas (6).

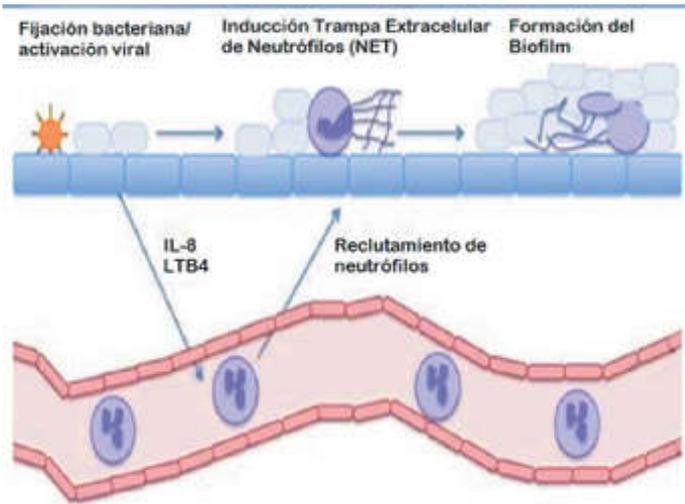
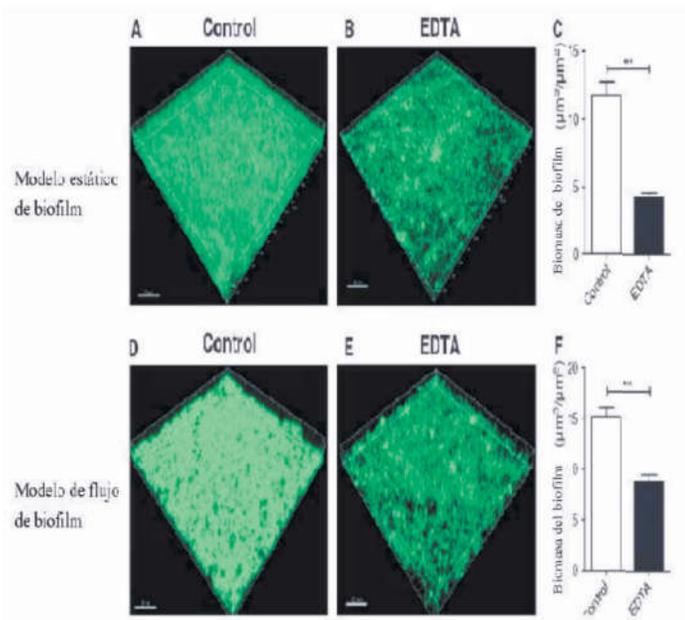


Figura 2. En presencia de EDTA, la biomasa del biofilm se reduce más de la mitad comparado con el control en el modelo estático y se reduce a la mitad en el modelo de flujo (14).



de biofilms tenemos el patógeno *Haemophilus influenzae* no tipificable (6).

Se ha descrito a *H. influenzae* dentro de la flora humana normal de la nasofaringe. Sin embargo, tiene capacidad para migrar al oído medio donde el entorno favorece la producción de infección, en especial para las cepas no tipificables capaces de producir infecciones de larga evolución y difícil resolución debido a la formación de biofilms (7).

Elementos clave en la formación del Biofilm en NTHi

El biofilm puede separarse en células plantónicas y matriz extracelular amorfa. Los ensayos químicos convencionales permiten confirmar la presencia de componentes polisacáridos, proteínicos y eADN. Por ensayos de proteómica se detectaron dieciocho proteínas en el biofilm no presentes en las bacterias plantónicas (8).

Dentro de las sustancias secretadas por las células bacterianas para la formación del biofilm se encuentran adhesinas, proteínas del pili, moléculas de eADN, proteínas estabilizadoras del material nuclear exógeno, nucleasas y otras cuya función es poco conocida. En el caso de NTHi se han descrito en particular a las proteínas del pili y elementos estabilizadores del ADN extracelular como pilares fundamentales en la formación del biofilm (6).

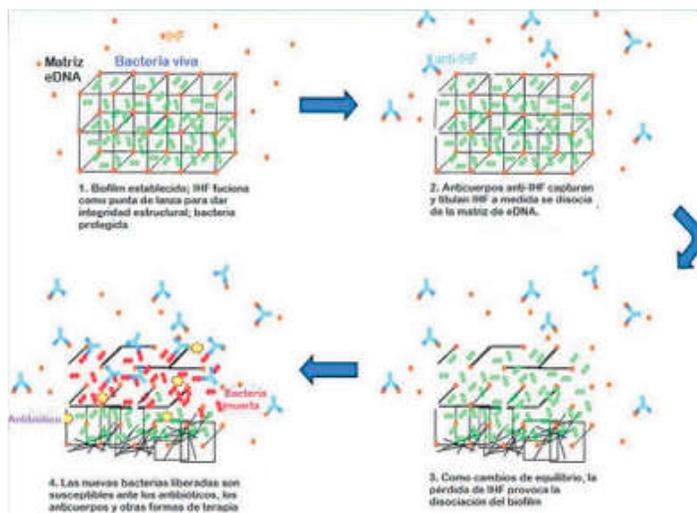
La proteína DNABII funciona como eje de formación al organizarse en la matriz extracelular secretada por NTHi, se considera que esta acompaña al material genético secretado y favorece la transferencia entre una bacteria y otra, activando de esta manera la maquinaria de formación y mantenimiento del biofilm entre bacterias. Además, se ha descrito estos elementos capaces de dirigir la organización del biofilm, pues se enlazan entre las diferentes células formando un eje estructural, en el cual se adhieren otros elementos que estabilizan la unión generando una "coraza" protectora de los diferentes grupos bacterianos. De esta proteína se han caracterizado dos porciones, el factor de integración al huésped (HIF) y las proteínas similares a las histonas (HU), las cuales funcionan como facilitadores para la adhesión a elementos del microentorno humano y estabilizar el material genético exógeno respectivamente (9).

Otro factor importante en el caso del NTHi, es el Pili del tipo A IV, el cual es un polímero filamentosos con alta capacidad para la adhesión, motilidad y colonización, siendo tal la importancia de este factor para la formación del biofilm que los estudios moleculares muestran un incremento en la expresión del gen productor de este elemento durante la formación del biofilm, mostrándose incluso que este incremento posee relación con la incorporación del material genético exógeno el cual es favorecido por el factor DNA-BII (10).

El pili 2 (P2) es una de las principales proteínas extramembranales de *H. influenzae* y se comprobó mediante crecimiento de la bacteria en placas de microtitulación que la expresión de P2 fue muy similar en bacterias plantónicas como en aquellas formadoras de biofilm en cuanto a cantidad, inmunogenicidad y peso molecular. Se observó, además, una marcada disminución en la formación de biofilm con una variante isogénica de *H. influenzae* que no expresaba P2 (11).

Otros elementos participes son la nucleasa extracelular 2019, la cual participa en la fragmentación del material genético y favorece la incorporación de éste en otras bacterias. Las adhesinas de Alto Peso Molecular (HMW) se han reportado en 38-80% de las colonias de NTHi y son responsables de la adherencia de la bacteria a

Figura 3. A medida que el equilibrio se desplaza, la pérdida de la IHF de la matriz induce el colapso estructural del biofilm con la liberación de las bacterias residentes. Las bacterias liberadas son altamente susceptibles a anticuerpos y antibióticos (17).



las células epiteliales humanas, permiten la adhesión firme entre los elementos bacterianos del biofilm o factores adherentes como la proteína E y P6 que juegan un papel en adherencia al biofilm, aunque pudieran jugar un papel más importante, pero se desconoce hasta la fecha. Es destacable en el caso de estas cepas la participación de los cationes divalentes ya que estos contribuyen a la formación del biofilm estabilizando los componentes de la matriz al permitir la formación de interacciones iónicas cruzadas que fijan y vuelven más resistentes los elementos adheridos, siendo en particular la presencia de cationes divalentes los inductores de este efecto (12).

Uso del ácido etilendiaminotetraacético y chalconas como inhibidores de la formación del biofilm

Se investigó la acción de chalconas (cetona aromática) en la inhibición de biofilm de NTHi. La chalcona 8, modificada químicamente, mostró una excelente acción inhibitoria cualitativamente como cuantitativamente. Se probó contra diferentes cepas de NTHi que forman potentes biofilm. Su efecto inhibitorio no es antimicrobiano, sino que afecta directamente los pasos de la formación del biofilm. Es decir, que no provoca la muerte bacteriana, sino que funciona como agente antiadherente interviniendo en las primeras etapas de formación del biofilm y en la formación de nuevos biofilm por bacterias que buscan colonizar nuevos tejidos. Una característica remarcable es su baja toxicidad en células humanas aún a concentraciones activas (13). In vitro se demostró que los diferentes cationes inducen diferentes respuestas. De esta manera, los cationes como Fe, Mn y Zn, inhiben la formación del biofilm; mientras que cationes como el Ca y el Mg (sobre todo este último) inducen la formación del biofilm, incluso a concentraciones séricas normales en el ser humano. Se ha planteado el uso de quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que secuestraría los cationes e impedirían la formación del biofilm. Incluso se ha

observado in vitro, que el tratamiento de antibióticos coadyuvado con EDTA para la eliminación de un biofilm de *H. influenzae* no tipificable, ha sido muy favorable (Fig. 2) (14).

Por otro lado, estudios realizados en *P. aeruginosa* en los que se utilizó grandes cantidades de ADN como quelante de cationes, mostraron el mismo efecto que el uso de EDTA en biofilms formados por NTHi. El mecanismo propuesto fue que se inhibe el crecimiento bacteriano ya que el ADN secuestra los cationes de Mg y Ca; varios genes que se relacionan con la formación del biofilm en *P. aeruginosa*, están controlados por estos dos cationes. La utilización de esta técnica en *P. aeruginosa* permitió que se pudiera estudiar en NTHi como una alternativa terapéutica en el control de las infecciones por NTHi. Este resulta un mecanismo interesante y es motivo de estudio en NTHi para lograr erradicar el biofilm (15).

Utilización de anticuerpos monoclonales contra las proteínas DNABII para la destrucción del biofilm

Las proteínas DNABII se dividen en factor de integración del huésped (IHF) y la proteína similar a histona (HU). Estas proteínas han sido blanco importante para diferentes tratamientos que tienen como objetivo la destrucción del biofilm (Fig. 3) (16).

Escherichia coli posee las proteínas IHF y HU en función al superenrollamiento del DNA. La utilización de antisueros contra un miembro de la familia de las proteínas DNABII de *E. coli* interrumpe rápidamente la formación de la sustancia polimérica extracelular (EPS) de los biofilms (17).

La utilización del antisuero policlonal dirigido contra la proteína IHF de *E. coli* (anti-IHF *E. coli*) en las cepas de NTHi produce un colapso en el biofilm, ya que se ha manifestado in vitro que la utilización de anti-IHF *E. coli* captura las proteínas DNABII que se encuentran en estado "off" es decir cuando no están asociadas con el eDNA de la EPS. Esta acción induce un cambio de equilibrio que causa el retiro de proteínas adicionales DNABII de la matriz del biofilm como por ejemplo aquellos que están en estado "on" es decir, asociados con eDNA de la EPS; causando así el colapso estructural de la matriz biofilm con la liberación de la bacteria. Las bacterias liberadas fueron de 4-8 veces más sensibles a distintos antibióticos (18,19).

Utilización de anticuerpos contra la subunidad mayoritaria de pili tipo IV de manera dependiente de la maquinaria LuxS para la destrucción del biofilm

El Pili tipo IV (Tfp por sus siglas en inglés) son polímeros filamentosos conocidos por tener un rol en la adherencia, competencia, motilidad y colonización. NTHi contiene un pili tipo IV multifuncional, este es expresado por un pequeño juego de genes que es casi la mitad de los que se encuentran en otro tipo de bacterias que expresan Tfp de forma similar. Las funciones antes mencionadas del Tfp hacen que la expresión de este (que se encuentra aumentada al momento que NTHi comienza a formar el biofilm) logre que se

forme un biofilm estable, de buena arquitectura y de gran espesor (20).

El proceso de la formación del biofilm implica una maquinaria celular que induce, mantiene y propaga la biopelícula. La maquinaria LuxS se utiliza como coadyuvante para los anticuerpos dirigidos contra la subunidad mayoritaria de pili tipo IV ya que es un antagonista en el proceso de mantener y propagar el biofilm por ser un sistema de quórum sensing cuya función fisiológica es permitir a la bacteria separarse del biofilm (21).

La utilización de anticuerpos directos contra la proteína DNABII, el factor de integración del huésped (HIF) ha demostrado una alta efectividad en la degradación del biofilm formado por NTHi. La utilización de anticuerpos contra la subunidad mayoritaria PiiA del pili tipo IV acompañado de la maquinaria LuxS ha demostrado la erradicación temprana de la formación del biofilm de NTHi (22).

Un anticuerpo creado en un estudio actúa contra la subunidad mayoritaria PiiA del pili tipo IV que busca hacer una reacción antígeno-anticuerpo para desestabilizar la estructura del biofilm y esta alteración provoca un aumento en la permeabilidad de este, activando así el sistema de contra regulación de formación del biofilm que induce la disgregación del mismo en proporciones más pequeñas o cúmulos bacterianos. Los anticuerpos anti-piliIV funcionan en las bacterias que no poseen pilis mutados o la maquinaria LuxS mutada (22).

Puesto que los anticuerpos dirigidos contra IHF son capaces de interrumpir o erradicar significativamente las biopelículas formadas por NTHi in vitro e in vivo, se sugiere que estos anticuerpos podrían servir como nueva estrategia para hacer a los biofilms susceptibles a la terapia tradicional con antibióticos y a los mecanismos de inmunidad innata y específica (23).

Futurotratamiento y prevención contra Haemophilus influenzae no tipificable

Se ha demostrado que la destrucción del biofilm disminuye los factores de virulencia de la bacteria. Sin embargo, esto no es la resolución del proceso infeccioso que se presenta. Para destruir el patógeno se necesitan antimicrobianos de los cuales se ha descrito que los más utilizados son la azitromicina que ha demostrado tener buena actividad contra exacerbaciones agudas de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, como profiláctico y como tratamiento de la infección. Los resultados demuestran que la azitromicina presenta una acción bactericida intracelular, lo que podría estar relacionado con su capacidad de penetración de tejidos. Estos resultados adquieren importancia debido a que está demostrado que NTHi tiene una presencia intracelular importante, sin embargo, se necesita profundizar la actividad contra los biofilms (24). Sin embargo, una ventaja presentada por el uso de macrólidos es que reducen las exacerbaciones de enfermedad obstructiva crónica (EPOC) y en otras enfermedades pulmonares inflamatorias por su efecto antiinflamatorio (25) (26). Se debe estudiar la resistencia a ellos a largo plazo.

Otro estudio, demostró que la utilización de levofloxacina y de gatifloxacina son eficaces en la erradicación de NTHi en cepas susceptibles y cepas resistentes a meticilina. Pero, no se ha demostrado su eficacia contra los biofilms. Por otra parte, el uso de ampicilina, cefotaxima y eritromicina no mostraron ser eficaces contra infecciones provocadas por NTHi tanto resistente como sensible a meticilina (27).

Las B-defensinas son péptidos cationes antimicrobianos del huésped (AMPs) que son secretadas por las células epiteliales y su potente actividad antimicrobiana permite que se conserve la homeostasis de las barreras epiteliales (28).

En este caso, B-defensina-3 humana (hBD-3) es una AMP capaz de eliminar bacterias Gram- negativas y positivas incluyendo NTHi y se expresa en el oído medio. Utilizando chinchillas se demostró que hBD-3 es capaz de modular la habilidad de NTHi de colonizar las vías aéreas superiores. Una alteración en la actividad biológica de esta defensina altera la homeostasis y aumenta la propagación de la infección por NTHi (28).

Una de las acciones que posee el eADN es que es capaz de secuestrar los AMPs inhibiendo su habilidad para eliminar los microorganismos patógenos. Esto aporta más información sobre como la convivencia de factores de virulencia y moléculas de la inmunidad pueden o no inhibirse entre sí para aumentar la probabilidad de la infección o para erradicarla (29).

Como coadyuvante a la utilización de antimicrobianos se ha propuesto como medida de prevención de infecciones provocadas por este patógeno la utilización de vacunas como, por ejemplo, una vacuna contra las adhesinas HMW1-HMW2 y Hia. Otra propuesta de vacuna puede ser aquella utilizada contra el Pili tipo IV. Se han realizado estudios preclínicos en los que utilizando una forma soluble recombinante de PiiA se obtiene una mejoría más rápida cuando ya existe la enfermedad y hay una reducción de complicaciones, por lo que una vacuna derivada de PiiA podría ayudar a prevenir enfermedades causadas por NTHi (16,30).

CONCLUSIÓN

En los últimos años las infecciones por NTHi han crecido en número y en gravedad lo que ha desviado la atención a un factor de virulencia de gran importancia que es el biofilm. Con la destrucción del biofilm se pretende liberar las células plantónicas que son susceptibles a los antimicrobianos para poder erradicar a la bacteria. Las recientes investigaciones sugieren que ya existen diferentes formas de destruir este biofilm; sin embargo, aún no son utilizadas en la práctica clínica. Esto se debe a costos de utilización o producción o se debe a que aún no han sido aprobados del todo. Una combinación en la utilización de estos destructores de biofilm con los antimicrobianos tradicionales utilizados contra este patógeno podría ser la clave para reducir el número de infecciones que han visto su auge en los últimos años, siempre cuidando que la resistencia a estos nuevos tratamientos no se desarrolle tan rápidamente.

mente. Según estas investigaciones, la clave se encuentra en investigar los distintos factores de virulencia bacterianos que promueven la formación del biofilm de modo a identificar la forma en que actúan y crear antagonistas capaces de destruirlos.

Uno de los tratamientos es la utilización de quelantes como EDTA que tiene como diana los cationes divalentes cuya implicación se ha estudiado como potenciador de la formación del biofilm al conferirle estabilidad. Esta es una diana interesante y requiere futuros estudios in vivo para comprobar su eficacia y comprender mejor el mecanismo de acción por el cual se da la destrucción del biofilm. Otro de ellos es la utilización de los anticuerpos dirigidos a proteínas esenciales en la formación y adhesión del biofilm en NTHi como DNABII.

Por otra parte, los estudios en esta bacteria podrían abrir la posibilidad de estudiar este tipo de terapias en otras bacterias de difícil erradicación o resistentes a los antimicrobianos tradicionales adaptándolas a los factores de virulencia propios de cada género y especie bacterianas. Esto generaría una salida a los problemas de resistencia bacteriana que se observan cada vez más en los centros hospitalarios y en los diferentes países.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Garmendia J, Martí-Lliteras P, Molerés J, Puig C, Bengoechea J. Genotypic and phenotypic diversity in the noncapsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *International Microbiology* [Internet]. 2012 [citado 2 de abril de 2017]; 15(4). Disponible en: <http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/65851>
- (2) Szelestey BR, Heimlich DR, Raffel FK, Justice SS, Mason KM. *Haemophilus* Responses to Nutritional Immunity: Epigenetic and Morphological Contribution to Biofilm Architecture, Invasion, Persistence and Disease Severity. *PLoS Pathog* [Internet]. Octubre de 2013 [Citado 2 de abril de 2017]; 9(10). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3795038/>
- (3) Milad Shahini S, Davar Siadat S, Vaziri F, Davari M, Fateh A, Pourazar, et al. Distribution and Diversity of hmw1A Among Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Isolates in Iran. *Avicenna J Med Biotech*. [Internet] 2016 [citado 2 de abril de 2017]; 8(2): 99-102 Disponible en: <http://www.ajmb.org/pdf/en/fulltext/241.pdf>
- (4) Domenech M, Pedrero-Vega E, Prieto A, García E. Evidence of the presence of nucleic acids and B-glucan in the matrix of non-typeable *Haemophilus influenzae* in vitro biofilms. *Sci Rep*. [Internet]. Noviembre 2016 [Citado 20 de junio de 2017]; 6: 36424. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5090351/>
- (5) King PT, Sharma R. The Lung Immune Response to Nontypeable *Haemophilus influenzae* (Lung Immunity to NTHi). *J Immunol Res* [Internet]. 2015 [Citado 2 de abril de 2017]; 2015:706376. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26114124>
- (6) Langereis JD, Hermans PWM. Novel concepts in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1 de septiembre de 2013 [Citado 2 de abril de 2017]; 346(2):81-9. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/1574-6968.12203>
- (7) Wu S, Li X, Gunawardana M, Maguire K, Guerrero-Given D, Schaudinn C, et al. Beta-Lactam Antibiotics Stimulate Biofilm Formation in Non-Typeable *Haemophilus influenzae* by Up-Regulating Carbohydrate Metabolism. *PLoS One* [Internet]. 9 de julio de 2014 [Citado 2 de abril de 2017]; 9(7). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4090067/>
- (8) Wu S, Baum MM, Kerwin J, Guerrero-Given D, Webster S, Schaudinn C, et al. Biofilm-specific extracellular matrix proteins of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Pathog Dis* [Internet]. Diciembre 2014 [Citado 20 de junio de 2017]; 72(3): 143-160. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262604/>
- (9) Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol* [Internet]. junio de 2015 [Citado 2 de abril de 2017]; 96(6):1119-35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464964/>
- (10) Bakaletz LO, Baker BD, Jurcisek JA, Harrison A, Novotny LA, Bookwalter JE, et al. Demonstration of Type IV Pilus Expression and a Twitching Phenotype by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* [Internet]. marzo de 2005 [Citado 2 de abril de 2017]; 73(3):1635-43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1064948/>
- (11) Murphy T, Kirkham C. Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiology* [Internet] abril 2015 [Citado 20 de junio de 2017]; 2:7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC113772/>
- (12) Ikeda M, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells. *BMC Microbiology* [Internet]. 2015 [Citado 2 de abril de 2017]; 15:263. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-015-0600-8>
- (13) Kunthalert D, Baothong S, Khetkam P, Chokchaisiri S, Suksamrarn A. A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Microbiol Immunol* [Internet]. 1 de octubre de 2014 [Citado 12

- de abril de 2017];58(10):581-9. Disponible en : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1348-0421.12194/full>
- (14) **Cavaliere R, Ball JL, Turnbull L, Whitchurch CB.** The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiologyopen* [Internet]. Agosto de 2014 [Citado 12 de abril de 2017];3(4):557-67. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287182/>
- (15) **Lewenza S.** Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* [Internet]. Febrero 2013 [Citado 12 de abril de 2017]. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00021/full>
- (16) **Novotny LA, Jurgisek JA, Ward MO, Jordan ZB, Goodman SD, Bakaletz LO.** Antibodies against the majority subunit of Type IV pili disperse nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms in a LuxS-dependent manner and confer therapeutic resolution of experimental otitis media. *Mol Microbiol* [Internet]. abril de 2015 [12 de abril de 2017];96(2):276-92. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4423401/>
- (17) **Goodman SD, Obergfell KP, Jurgisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, et al.** Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol* [Internet]. Noviembre de 2011 [Citado 12 de abril de 2017];4(6):625-37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716265>
- (18) **Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurgisek JA, Akbar R, et al.** Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor mediated disruption of bacterial biofilms. *Mol Microbiol* [Internet]. septiembre de 2014 [Citado 12 de abril de 2017];93(6):1246-58. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160410/#R7>
- (19) **Rice PA, Yang S, Mizuuchi K, Nash HA.** Crystal Structure of an IHF-DNA Complex: A Protein-Induced DNA U-Turn. *Cell* [Internet]. Diciembre 1996 [Citado 20 de junio de 2017]; 87: 1295-1306. Disponible en: [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)81824-3?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400818243%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)81824-3?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400818243%3Fshowall%3Dtrue)
- (20) **Jurgisek J, Bookwalter J, Baker B, Fernandez S, Novotny L, Munson R et al.** The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper respiratory tract. *Mol. Microbiol.* [Internet]. 23 de julio 2007 [Citado 14 de abril de 2017];65(5):1288-99. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2007.05864.x/full>
- (21) **Mokrzan E, Ward M, Bakaletz L.** Type IV Pilus Expression Is Upregulated in Nontypeable *Haemophilus influenzae* Biofilms Formed at the Temperature of the Human Nasopharynx. *Journal of Bacteriology* [Internet]. Octubre 2016 [Citado 14 de abril de 2017];198(19):2619-30. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/198/19/2619.short>
- (22) **Novotny LA, Bakaletz LO.** Intercellular adhesion molecule 1 serves as a primary cognate receptor for the Type IV pilus of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Cellular Microbiology* [Internet]. Febrero 2016 [Citado 14 de abril de 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1111/cmi.12575/full>
- (23) **Brandstetter KA, Jurgisek J, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S.** Antibodies directed against Integration Host Factor Mediate Biofilm Clearance from Nasopore®. *Laryngoscope* [Internet]. Noviembre 2013 [Citado 20 de junio de 2017]; 123(11): 2626-2632. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060527/>
- (24) **Euba B, Molerés J, Viadas C, Barberán M, Caballero L, Grilló M-J, et al.** Relationship between Azithromycin Susceptibility and Administration Efficacy for Nontypeable *Haemophilus influenzae* Respiratory Infection. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. mayo de 2015 [Citado 15 de abril de 2017];59(5): 2700-12. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4394783/>
- (25) **Uzun S, Djamin RS, Kluytmans J, E Van't Veer N, Ermens AAM, Pelle A, et al.** Influence of macrolide maintenance therapy and bacterial colonisation on exacerbation frequency and progression of COPD (COLUMBUS): Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* [Internet]. 2012 [Citado 20 de junio de 2017]; 13:82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3478173/>
- (26) **Steel HC, Theron AJ, Cockeran R, Anderson R, Feldman C.** Pathogen- and Host- Directed Anti-Inflammatory Activities of Macrolide Antibiotics. *Mediators Inflamm.* [Internet]. Junio 2012 [Citado 20 de junio de 2017]; 2012:584262. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388425/>
- (27) **Kaji C, Watanabe K, Apicella MA, Watanabe H.** Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates within biofilms. *Tohoku J Exp Med* [Internet]. febrero de 2008 [Citado 15 de abril de 2017]; 214(2):121-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285669>
- (28) **Jones EA, McGillivray G, Bakaletz LO.** Extracellular DNA within a nontypeable *Haemophilus influenzae* induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *J Innate Immun* [Internet]. 2013 [Citado 15 de abril de 2017]; 5(1):24-38. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640559/>
- (29) **Cho C, Chande A, Gakhar L, Bakaletz LO, Jurgisek JA, Ketterer M, et al.** Role of the Nuclease of Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Dispersal of Organisms from Biofilms. *Infect Immun* [Internet]. marzo de 2015 [Citado 15 de abril de 2017];83(3):950-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4333478/>

- (30) Rempe KA, Porsch EA, Wilson JM, St. Gemme III JW. The HMW1 and HMW2 Adhesins Enhance the Ability of Nontypeable Haemophilus influenzae To Colonize the Upper Respiratory Tract of Rhesus Macaques. *Infection and immunity* [Internet]. Octubre 2016 [Citado 15 de abril de 2017]; 84(10): 2771-2778. Disponible en: <http://iai.asm.org/content/84/10/2771.full>