

9
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

ACTIVIDAD PROTECTORA DE INMUNOGLOBULINA
INTRAVENOSA, pH 4.25, EN SEPSIS NEONATAL
EXPERIMENTAL POR Klebsiella pneumoniae

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN CASTELLANOS CRUZ

Director de Tesis:
DR. JOSE I. SANTOS PRECIADO

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Contenido	Página
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS	16
HIPOTESIS	16
MATERIAL Y METODOS	17
RESULTADOS	25
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	36
RESUMEN	38
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40
CUADROS	48
FIGURAS	62

C O N T E N I D O

I. INTRODUCCION

II. ANTECEDENTES

II.1 Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25

II.2 Características de Klebsiella pneumoniae

II.3 Factores que condicionan la invasión bacteriana:

- a) Estado general del hospedero
- b) Factores no específicos (sistema de complemento)
- c) Factores específicos (anticuerpos opsonizantes)
- d) Factores de virulencia producidos por la bacteria

III. OBJETIVOS

IV. HIPOTESIS

V. MATERIAL Y METODOS

V.1 In vitro: ENSAYO DE OPSONOFAGOCITOSIS

- a) Preparación de los microorganismos
- b) Preparación de los polimorfonucleares
- c) Inmunoglobulina intravenosa (IGIV) pH 4.25
- d) Fuente de complemento
- e) Método de opsonofagocitosis

V.2 In vivo: ACTIVIDAD PROTECTORA DE LA IGIV pH 4.25

- a) Cinética bacteriana de Klebsiella pneumoniae

- b) Determinación de la dosis letal (DL-100)
- c) Efecto protector de la IGIV pH 4.25

V.3 ANALISIS ESTADISTICO

VI. RESULTADOS

VI.1 In vitro: ENSAYO DE OPSONOFAGOCITOSIS

- a) Klebsiella pneumoniae
- b) Leucocitos Polimorfonucleares
- c) IGIV pH 4.25
- d) Factores del complemento
- e) Opsonofagocitosis

VI.2 In vivo: ACTIVIDAD PROTECTORA DE LA IGIV pH 4.25

- a) Cinética bacteriana
- b) Dosis letal (DL-100)
- c) Efecto protector de la IGIV pH 4.25

VII. DISCUSION

VIII. CONCLUSIONES

IX. RESUMEN

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

XI. CUADROS Y FIGURAS

I. INTRODUCCION:

Las enfermedades infecciosas ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad infantiles en los países en vías de desarrollo, como México (1). Las infecciones bacterianas diseminadas que se manifiestan con septicemia tienen un papel sobresaliente en los recién nacidos, los cuales presentan en las primeras cuatro semanas de vida extrauterina un síndrome clínico conocido como sepsis neonatal que se documenta por el aislamiento de la bacteria en la sangre (2).

Los principales agentes causales de sepsis neonatal son: estreptococos del grupo B y Escherichia coli en los países desarrollados (2); en tanto que en los países en vías de desarrollo, como el nuestro, predominan Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae (3,4).

Existen dos formas de presentación de esta enfermedad: la forma de inicio temprano, que se manifiesta en los primeros cuatro días de vida y con frecuencia es fulminante. Estos pacientes generalmente tienen antecedentes de complicaciones obstétricas como ruptura prematura de membranas, corioamnionitis o fiebre materna preparto; muchos de ellos son prematuros de bajo peso al nacer. El patógeno causal es adquirido del canal de parto durante el nacimiento o, con menos frecuencia, a través de la placenta antes del parto (2,4).

La sepsis neonatal de inicio tardío se presenta después de

los primeros cinco días de vida; la mayoría de estas infecciones se adquiere en los hospitales, por contacto con material y equipo contaminados, así como del personal de cueros portador de bacterias patógenas. De hecho, las infecciones intrahospitalarias predominan como causa de muerte en el recién nacido (4).

La tasa de incidencia de sepsis neonatal es de 1 a 10 casos por cada 1,000 recién nacidos vivos y alcanza una mortalidad de 20% a 50%. Un 25% de los casos se asocia con meningitis como complicación (2).

Klebsiella pneumoniae, que después de Escherichia coli ocupa el segundo lugar como agente causal de bacteriemia primaria en pacientes hospitalizados (5), es también la primera causa de sepsis neonatal en los principales hospitales pediátricos de México (3,6). Esta es una bacteria encapsulada que evade la fagocitosis cuando faltan anticuerpos específicos y cuando los niveles de los componentes C3, C5 y Factor B del complemento son bajos, características que presenta el recién nacido (7,8).

Estudios recientes han sugerido que el uso de una nueva preparación de inmunoglobulina para uso intravenoso, con pH 4.25 (IGIV), puede desempeñar un importante papel en la inmunoprolifaxis y la inmunoterapia de procesos infecciosos graves en el recién nacido, por tal motivo se pretende determinar la utilidad terapéutica de IGIV pH 4.25 en un modelo animal de sepsis neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae.

I I . A N T E C E D E N T E S :

II-1. Inmunoglobulina intravenosa de pH 4.25:

El uso de medidas terapéuticas de inmunidad pasiva representa una alternativa atractiva para el tratamiento de las infecciones bacterianas graves en el recién nacido. Los anticuerpos tipo-específicos han demostrado ser de gran utilidad en la protección contra infecciones por estreptococos del grupo B (9,10), Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae (11) y Pseudomonas aeruginosa (12).

La actividad in vitro de algunos preparados de inmunoglobulina intravenosa y su efecto en modelos animales de infección experimental han sido probados para determinar su utilidad clínica (13). Con base en lo anterior se ha introducido el empleo de preparaciones de inmunoglobulina humana modificada para uso intravenoso, aunadas a los antibióticos adecuados para el tratamiento de infecciones bacterianas neonatales graves (14).

La primera preparación de IgG humana purificada para uso clínico fue la inmuno-seroglobulina (ISG), preparada en 1940 por E. J. Cohn (15) en agua, glicina al 0.3 M, con pH 6.8 y que contenía 70% a 80% de IgG monomérica. La ISG garantizó su aplicación por vía intramuscular y demostró su utilidad en la profilaxis de hepatitis y sarampión (16). Una limitación de la ISG es que sólo puede ser aplicada por vía intramuscular, ya que la presencia de agregados de IgG por vía intravenosa (iv)

produce activación inespecífica del sistema de complemento y reacciones anafilácticas (16).

En 1960 se purificó por primera vez una IgG químicamente modificada para uso intravenoso, con pH 6.8 (Gamimmune, Cutter Biological). La activación inespecífica del complemento fue modificada en esta nueva preparación mediante reducción y alquilación de los puentes disulfuro de la molécula de IgG. Este producto, originalmente formulado con una solución de IgG al 5% en agua, glicina al 0.2 M y maltosa al 10% como agente estabilizador, contiene 50% a 90% de IgG monomérica. Al ser administrada por vía intravenosa no produce efectos colaterales de importancia y es eficaz en la profilaxis de procesos infecciosos en pacientes con agamaglobulinemia (16).

La más reciente preparación de IgG humana para uso intravenoso, con pH 4.25 (Gamimmune N, Cutter Biological), no es modificada químicamente y se obtiene de plasmas humanos por el método de Cohn. Es una solución de IgG al 5% en agua y maltosa al 10%. Más del 99% del contenido proteico es IgG y más del 95% se encuentra en forma monomérica. No presenta agregados o fragmentos; esta propiedad hace que la preparación tenga sólo un 10% de la actividad anticomplementaria que presenta la ISG (16). Su capacidad amortiguadora es de 0.3 mEq/g de proteína o 16.5 mEq/L. La osmolaridad es de 327 mOsm/kg de agua y de 292 mOsm/L de la solución. Presenta la siguiente distribución de subclases de IgG: IgG1 (28.6 mg/ml), IgG2 (4.2 mg/ml), IgG3 (1.2 mg/ml) y

IgG4 (68 mg/ml) (17).

La IGIV pH 4.25 en dosis desde 100 mg/kg hasta 1 g/kg de peso, administrada por vía intraperitoneal a ratas recién nacidas infectadas experimentalmente con estreptococo del grupo B, hace que los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) neutrófilos migren más rápidamente hacia el sitio de localización de la bacteria, acumulándose grandes cantidades en los focos de infección, lo cual limita la diseminación bacteriana y favorece su eliminación (18). La IGIV parece prevenir también el agotamiento de las reservas de granulocitos en la médula ósea, aunque el mecanismo por el que se produce este efecto no está bien definido (18).

La administración de IGIV pH 4.25 en dosis de 500 mg/kg de peso a ratas con bacteriemia por Salmonella typhimurium disminuye la mortalidad de estos animales. Además, esta preparación no causa disminución en el pH de la sangre arterial de las ratas que previamente cursaban con acidosis metabólica; por el contrario, se observa mejoría en el equilibrio ácido-base después de la aplicación de IGIV (19).

La aplicación de IGIV pH 4.25 en dosis de 400 mg/kg a pacientes con inmunodeficiencias primarias, eleva los niveles séricos de IgG hasta un valor promedio de 852 mg/dL sobre los valores previos de IgG y no aparecen efectos colaterales clínicamente importantes durante la infusión (20).

La IGIV pH 4.25 tiene buena actividad in vitro e in vivo.

contra diversas bacterias patógenas comunes, en igual o mayor proporción que la actividad de las preparaciones de IGIV reducidas y alkiladas. Hill y Bathras (14) observaron que la IGIV pH 4.25 tiene excelente actividad opsonizante contra varias bacterias gram-negativas y que esta preparación es capaz de activar opsoninas del complemento, pero también opsoniza directamente a las bacterias y parece tener buena actividad in vitro contra Klebsiella pneumoniae.

El uso de inmunoglobulina intravenosa asociada a los antibióticos en el tratamiento de sepsis neonatal representa una medida coadyuvante de gran utilidad en infecciones graves. La actividad terapéutica de IGIV puede ser resultado del sinergismo entre algunos antibióticos y la gammaglobulina contra bacterias gram-negativas (21). La administración de IGIV es segura y efectiva como medida terapéutica en recién nacidos de pretérmino, de muy bajo peso al nacer y con bajos niveles de IgG (22).

La administración de IGIV pH 4.25 en dosis de 1 g/kg a pacientes neonatos con neutropenia autoinmune produce una elevación en la cuenta total de PMNs neutrófilos, sin interferir en la función de estas células. También en pacientes con deficiencia de células NK se ha observado una buena respuesta a la inmunoglobulina intravenosa (23).

II.2. CARACTERÍSTICAS DE Klebsiella pneumoniae:

Klebsiella pneumoniae es un bacilo gram-negativo, no móvil,

de la familia Enterobacteriaceae. Entre sus características bioquímicas de identificación más importantes produce ácido de inositol, hidroliza la urea, utiliza citrato, no produce ácido sulfhídrico y es ornitina-negativa, arginina-negativa y fenilalanina-negativa. En general, las pruebas del rojo de metilo son negativas y la del Voges-Proskauer positiva (24).

En 1960, Cowan reconoció cinco especies de Klebsiella: K. aerogenes, K. edwardsii, K. ozaenae, y K. rhinoscleromatis. Catorce años después, Buchanan y Gibbons definieron tres especies: K. pneumoniae, K. ozaenae y K. rhinoscleromatis. Finalmente, Naemura y cols en 1979, concluyeron que K. pneumoniae puede incluir a K. aerogenes, K. edwardsii y K. pneumoniae (25).

La estructura de superficie de Klebsiella contiene una pared celular que consta de tres capas: la membrana citoplasmática, una capa de peptidoglicana que mantiene la rigidez y forma de la célula y finalmente la membrana externa, que consiste en un complejo de lipopolisacárido (LPS), fosfolípidos y proteínas (24)

El LPS que constituye el antígeno somático O está compuesto por tres regiones. La parte externa o región I consiste de unidades repetitivas de oligosacáridos, los cuales son la base química de los antígenos O. Esta región es llamada polisacárido-O-específico. La parte intermedia o región II es un oligosacárido llamado oligosacárido COPE, el cual expresa la especificidad antigénica P. La parte más interna o región III es denominada lípido A y es la parte del LPS que por interacción hidrofóbica se

une a las lipoproteínas de la capa externa de la membrana celular bacteriana (24).

Klebsiella se encuentra cubierta en su porción más externa por un polisacárido capsular K de grosor variable y debido a esto forma colonias mucoides, brillantes y de consistencia viscosa. Los polisacáridos capsulares son polímeros lineales compuestos de unidades repetitivas de uno o varios monosacáridos. Los grupos formilo o acetilo que se encuentran presentes en la cápsula pueden funcionar como determinantes antigénicos que causan reacciones cruzadas entre algunas cápsulas de Klebsiella (25).

Por el antígeno K capsular se conocen 77 serotipos diferentes de Klebsiella pneumoniae (26). Mediante el antígeno O somático se han identificado doce serogrupos, pero no se determinan regularmente, ya que las cápsulas bloquean la reacción de aglutinación de los antisueros para el antígeno O (24).

El polisacárido capsular constituye un importante factor de virulencia, ya que mediante esta estructura Klebsiella pneumoniae evade la opsonización por la vía alterna del complemento (27), en forma similar a lo que hace el estreptococo III del grupo B, cuyo mecanismo de evasión se debe a la presencia de ácido siálico al final de las unidades repetidas de carbohidratos (28).

II.3. FACTORES QUE CONDICIONAN LA INVASIÓN BACTERIANA:

Entre los factores que condicionan la invasión bacteriana en

el hospedero se encuentran: la disponibilidad de factores no específicos tales como el sistema de complemento, la presencia o ausencia de anticuerpos opsonizantes específicos, el estado general del hospedero y la importancia de los factores de virulencia específicos producidos por el microorganismo (29).

a). **SISTEMA DEL COMPLEMENTO:** Los factores componentes del complemento, así como los anticuerpos específicos, constituyen las principales opsoninas del suero (28). El sistema del complemento está constituido por glicoproteínas que circulan en el medio extracelular. La interacción de estas moléculas conduce a la producción de fragmentos biológicamente activos que promueven la opsonización de las partículas fagocitables y un efecto lítico directo sobre las membranas celulares de diversos agentes infecciosos y de células extrañas o neoplásicas (28).

Se conocen dos vías de activación del sistema de complemento (28). La vía clásica, que es activada generalmente por complejos antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos participantes son de clase IgM, o de las subclases IgG1, IgG2 o IgG3. Esta vía consiste de cinco proteínas C1q, C1r, C1s, C4 y C2, además de tres proteínas reguladoras: inhibidor de C1 (C1-INH), proteína de unión a C4 (C4BP) y el inactivador C3b/C4b (C3b INA; factor I) (28).

La vía alterna del complemento es activada principalmente por lipopolisacáridos. Cuatro proteínas participan en esta vía: C3, properdina (P) y los factores B y D. Otras dos proteínas: C3b INA (I) y BIH (H) regulan esta vía (28).

Los componentes del complemento activados por la vía alterna pueden unirse directamente a la superficie de la bacteria sin la presencia de anticuerpos. En su función de opsonina, el complemento también puede actuar como un ligando que se une covalentemente a la superficie del microorganismo y al mismo tiempo por unión no covalente a receptores celulares específicos, lo cual aumenta el contacto entre el microorganismo y las células fagocíticas y como consecuencia mejora la fagocitosis (28).

b). **ANTICUERPOS:** En el plasma sanguíneo humano existen cinco clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), de éstas, las más abundantes y mejor conocidas son las IgG. Tienen un peso molecular aproximado de 150,000 daltones y contienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas "pesadas" (H) idénticas con 430 aminoácidos y dos cadenas "ligeras" (L), también idénticas entre sí, con 214 aminoácidos (30).

Cada una de las cadenas tiene una región de secuencia de aminoácidos constante y otra cuya secuencia varía. Estas cadenas están unidas por enlaces disulfuro, constituyendo una estructura en forma de Y flexible. La molécula del anticuerpo dispone además de dos sitios de unión para el antígeno formados por las porciones variables de las cadenas L y H, que además se distinguen por poseer regiones hipervariables con una elevada frecuencia de sustitución de aminoácidos. Los brazos de la Y pueden escindirse por acción de la enzima proteolítica papaina, que rompe a la molécula en tres fragmentos: dos Fab y la fracción

cristalizable o Fc (30).

La molécula de IgG consta de cuatro dominios: tres constantes y un dominio variable. Uno de los dominios constantes de cadenas H (CH1) permite que la molécula de IgG active la vía alterna del complemento. Los anticuerpos se unen a la partícula que opsonizan mediante su sitio de combinación para el antígeno. Después de la formación de este complejo, las células fagocíticas que expresan receptores para Fc reconocen y fagocitan con mayor facilidad las partículas opsonizadas (31).

Hay cuatro subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que se diferencian por pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos y en los enlaces disulfuro. En el suero, la IgG1 está presente generalmente en altas concentraciones, constituye cerca de dos terceras partes de la IgG total y puede jugar un papel importante en la respuesta a antígenos proteínicos. Al igual que la IgG3, la IgG1 se une a receptores para Fc en las células fagocíticas y pueden también activar la vía clásica del complemento por unión a C1 (31).

La IgG3 tiene enlaces disulfuro inter-cadena pesada y constituye un 6% del total de IgG en el suero. Su vida media en el suero es corta y es la más susceptible a la desnaturalización por proteasas. La IgG2 constituye un 25% del total de IgG y ha sido involucrada en la respuesta a antígenos polisacáridos. La IgG4 constituye sólo el 3% del total de IgG en el suero, en la más baja concentración (25 mg/dL). No se une al complemento y es

funcionalmente univalente (31).

c).- **ESTADO GENERAL DEL HOSPEDERO:** Entre los grupos de mayor riesgo de infección por Klebsiella pneumoniae se encuentran los neonatos, debido a las características inmunológicas que presentan.

El sistema inmunológico del recién nacido tiende en general a la supresión (32). La producción de anticuerpos específicos ante un estímulo antigénico es deficiente, lo cual puede deberse a una deficiencia en la presentación y procesamiento de antígenos por sus macrófagos, debido a la inmadurez funcional o a la falta de estimulación previa de los macrófagos no activados (33). También puede influir la excesiva actividad inmunosupresora de sus macrófagos y linfocitos T (32).

La transferencia de IgG a través de la placenta se efectúa principalmente después de las 32 semanas de embarazo, de tal manera que los neonatos prematuros tienen menores niveles de IgG que los recién nacidos de término y por lo tanto, los prematuros exhiben mayor susceptibilidad a las infecciones graves y diseminadas. Los neonatos pueden ser deficientes en anticuerpos protectores IgG debido a la falta de anticuerpos específicos para algunos microorganismos en la madre, lo que parece suceder con los anticuerpos contra polisacáridos capsulares (8).

Algunos componentes del complemento son producidos desde etapas tempranas de la vida fetal, pero en el recién nacido sólo

alcanzan 50% a 75% de los niveles normales del adulto. Las vías clásica y alterna del complemento están afectadas en el neonato y esta deficiencia es más notable en los prematuros (34,35).

El encuentro inicial del microorganismo con fagocitos PMNs, los cuales son la primera línea de defensa celular inespecífica ante las infecciones bacterianas, resulta en la unión del microorganismo a la superficie de la membrana del fagocito y la invaginación de ésta en el fagosoma. Esta interacción conduce a la generación de metabolitos del oxígeno microbicidas y a la fusión de lisosomas con la membrana del fagosoma, seguida por la liberación del contenido lisosomal enzimático, proceso denominado degranulación en los leucocitos PMNs (29).

Cuando el fagosoma se fusiona con los gránulos, la mieloperoxidasa es liberada en la vacuola y en la presencia de iones halógenos, el peróxido de hidrógeno produce una reacción microbicida mediante la halogenación de proteínas, la cual conduce a la formación de aldehído y rompimiento de péptidos. Este sistema es el mecanismo microbicida más potente de los PMNs neutrófilos (29).

La reserva de fagocitos PMNs en la médula ósea en el recién nacido es de cinco a siete veces menor que en el adulto y se agota rápidamente ante una demanda excesiva y una deficiente proliferación medular de precursores de granulocitos durante el curso de una infección grave. Estos factores explican la frecuencia con que los neonatos sépticos cursan con neutropenia y

alto riesgo de muerte (36).

d). **FACTORES DE VIRULENCIA PRODUCIDOS POR Klebsiella pneumoniae**: Las bacterias que poseen polisacárido capsular específico tienden a producir infecciones más graves y de difícil resolución con las medidas de tratamiento antimicrobiano habituales (2). Las estructuras capsulares evitan la opsonización de la bacteria por la vía alterna del complemento (7) y requieren de niveles adecuados de anticuerpos anticapsulares y de la integridad de la vía clásica del complemento para que, mediante una adecuada opsonización, se anule la resistencia que presentan las bacterias encapsuladas a la fagocitosis (34).

Estudios en ratas (37) y en ratones (38) han demostrado que las cepas de Klebsiella pneumoniae que producen mayor cantidad de polisacárido capsular son más virulentas. El grado de bacteriemia y la mortalidad se reduce notablemente al administrar a los animales con infección experimental anticuerpos específicos contra los polisacáridos capsulares de las cepas de Klebsiella pneumoniae inoculadas (39).

Las cepas de Klebsiella pneumoniae que causan infecciones graves en pacientes hospitalizados presentan mayor virulencia (40) y factores de resistencia múltiple a los antibióticos habitualmente empleados en los hospitales (41,42).

Con base en los antecedentes presentados, se hace necesario buscar alternativas para el manejo de las infecciones graves por

esta bacteria en recién nacidos. La finalidad del presente trabajo es, precisamente, determinar la utilidad terapéutica de la IGIV pH 4.25 en animales neonatos con sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae y establecer la capacidad opsonizante de IGIV pH 4.25 contra diferentes cepas de esta bacteria mediante ensayos de opsonofagocitosis *in vitro* con leucocitos PMNs de humanos sanos.

I I I . O B J E T I V O S :

III.1. Determinar in vitro la capacidad opsonizante de la IGIV pH 4.25 sobre 70 cepas de Klebsiella pneumoniae obtenidas de aislamientos de niños hospitalizados.

III.2. Investigar la efectividad terapéutica de la IGIV pH 4.25 en hámster recién nacidos infectados con Klebsiella pneumoniae.

III.3. Establecer la asociación entre la capacidad opsonizante in vitro de la IGIV pH 4.25 y su efecto protector in vivo en hámster recién nacidos con sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae.

I V . H I P O T E S I S :

La IGIV pH 4.25 con cantidad adecuada de anticuerpos opsonizantes contra las bacterias causales de septicemia aumenta la fagocitosis de diferentes cepas de Klebsiella pneumoniae por leucocitos polimorfonucleares humanos in vitro y disminuye la mortalidad de hámster recién nacidos con sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae.

V. MATERIAL Y METODOS:

V.1. In vitro. ENSAYO DE OPSONOFAGOCITOSIS:

La capacidad opsonizante de la IGIV pH 4.25 (Gammimune N, Cutter Biological) se determinó por pruebas de opsonofagocitosis (10,14) con 70 cepas de Klebsiella pneumoniae obtenidas de aislamientos clínicos de pacientes pediátricos hospitalizados, enfrentándolas in vitro con leucocitos PMNs de adultos sanos.

Las cepas de Klebsiella pneumoniae fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México. Treinta y cinco de las 70 cepas correspondieron a aislamientos de hemocultivos y las 35 restantes fueron aisladas de cultivos diversos. Cuatro de éstas fueron obtenidas de coprocultivos, tres de cultivos de líquido cefalorraquídeo (LCR), una de urocultivo y las otras 27 de diversas secreciones (conjuntivales, umbilicales, heridas infectadas, aspirados bronquiales o abscesos).

Estas cepas fueron aisladas en el Laboratorio de Bacteriología utilizando diferentes medios de cultivo según el origen de la muestra. Así, para los hemocultivos se utilizó el medio bifásico de Ruiz Castañeda; las muestras de secreciones diversas y de LCR fueron sembradas en agar sangre, agar chocolate y agar tergitol. Las muestras de coprocultivos se sembraron en agar eosina azul de metileno, agar verde brillante, agar tergitol, agar salmonela-shigela y caldo tetracionato (43). La identificación de las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae se hizo

por medio de pruebas bioquímicas y se corroboró cada una de las cepas antes de ser utilizadas en los ensayos in vitro.

El método de opsonofagocitosis se estandarizó con una cepa de Klebsiella pneumoniae serotipo capsular K:8, obtenida de hemocultivos de varios recién nacidos hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos neonatales del Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social durante una epidemia de sepsis neonatal (44).

a). **PREPARACION DE LOS MICROORGANISMOS:** Las bacterias aisladas fueron incubadas en caldo de soya tripticasa* (CST) a 37 °C durante un cultivo nocturno de 14 a 18 horas. Se inoculó 1 ml de dicho cultivo en 5 ml de CST y se incubó de nuevo a 37 °C durante dos horas y 30 minutos para lograr una fase de crecimiento logarítmico (44).

Cada cultivo se lavó dos veces con solución salina balanceada de fosfatos (SBF) a pH 7.2, centrifugando a 7,500 RPM por 10 minutos. El botón se resuspendió en SBF hasta alcanzar una concentración de 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml mediante nefelometría de McFarland (45) contrastada con mediciones de densidad óptica en un espectrofotómetro (Coleman, Modelo 6/20) a 540 nm de longitud de onda. Finalmente, se hicieron las diluciones correspondientes para obtener 5x10⁶ UFC/ml en solución balanceada de Hanks (SBH) con 0.1 % de gelatina (Gel).

* Bioxón de México

b). **PREPARACION DE POLIMORFONUCLEARES:** Los leucocitos PMNs de sangre venosa de adultos voluntarios sanos se separaron por gradiente de densidad de centrifugación con Ficoll-Hypaque y sedimentación con dextrán, según la técnica de Boyum para separación de células (46). La relación sangre-Ficoll Hypaque fue de 6:1 y el paquete de células resultante de la centrifugación a 1 500 rpm durante 25 minutos fue diluido en solución salina isotónica. La sedimentación de los eritrocitos se logró con la adición de dextrán a 37 °C durante 20 minutos y fueron lisados con solución salina estéril al 0.2% y al 1.6% en forma alterna. Los PMNs se resuspendieron en SBH a una concentración de 1×10^6 células /ml y se midió el porcentaje de viabilidad celular por exclusión de azul de tripano.

c). **IGIV, pH 4.25:** Se utilizó una preparación comercial (Gamimmune N, Cutter Biological) de una solución de IgG al 5% en agua. Mediante la técnica de ELISA se determinó el título de anticuerpos específicos contra el polisacárido capsular K18 de Klebsiella pneumoniae en tres lotes diferentes de IGIV pH 4.25 : 40R10, 40R12 y 40R32.

d). **FUENTE DE COMPLEMENTO:** Se utilizó suero humano normal (SHN) como fuente de complemento, el cual fue adsorbido a 4 °C por dos horas con la bacteria muerta por calor para eliminar los anticuerpos específicos y usarlo como fuente de complemento. Los niveles de factores del complemento, tanto de la vía clásica (C4) como de la vía alterna (factor B-Properidina), se determinaron en

las muestras de SHN mediante nefelometría de láser (Beckman). Es un método cuantitativo mediante el que se determina la concentración de factores de complemento por medio de un analizador de proteínas. La nefelometría de láser mide el incremento en la dispersión de luz de partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo en presencia de factores del complemento en la muestra de SHN.

e). METODO DE OPSONOFAGOCITOSIS: Se utilizó como estándar una cepa de Klebsiella pneumoniae serotipo capsular K:8. Con el fin de determinar la dilución de la IGIV pH 4.25 que tendría mejor actividad opsonizante, se probaron diferentes diluciones de esta preparación: 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 durante la fase de estandarización del método. Como fuente de complemento se utilizó BHN al 1% y al 10%.

En microplacas estériles de 96 pozos de fondo plano (Microtiter, Dynatech) se colocaron por triplicado cinco muestras de 10 microlitros de Klebsiella pneumoniae tomados de una dilución de 5×10^6 UFC/ml, para un total de 5×10^4 UFC en cada uno de estos pozos. La cantidad de bacterias se corroboró mediante siembras masivas de tres muestras de la dilución final en SBH-Gel de Klebsiella pneumoniae sobre placas de agar de soya tripticasa* (AST) al tiempo cero (UFC inicial).

A la primera muestra se adicionaron 10 microlitros de IGIV pH 4.25 y un volumen igual de BHN adsorbido. A la segunda muestra

se adicionaron volúmenes equivalentes de IGIV pH 4.25 y del SHN adsorbido y calentado a 56^o C por 30 minutos para inactivar el sistema del complemento. En la tercera muestra se adicionó adicionalmente SHN adsorbido en un volumen de 10 microlitros.

Todas las muestras se ajustaron a un volumen de 50 microlitros con SBH-Gel y se incubaron a 37^o C en agitación suave y constante durante 30 minutos para facilitar el proceso de opsonización.

A continuación, cuatro de las cinco muestras se adicionaron con volúmenes de 50 microlitros de HBS-Gel con 25×10^4 PMNs, para establecer una relación PMN:bacteria de 5:1 en un volumen final de 100 microlitros por pozo. Las microplacas se incubaron nuevamente a 37^o C durante periodos de 60 y 120 minutos en agitación suave y constante con el propósito de favorecer el proceso de fagocitosis. La muestra número cinco sirvió como control del crecimiento natural de la bacteria en las condiciones de este ensayo in vitro.

Todas las pruebas se hicieron con muestras por triplicado, distribuidas de la siguiente manera:

- A: Bacteria + IGIV + SHN adsorbido + PMNs
- B: Bacteria + IGIV + SHN inactivado + PMNs
- C: Bacteria + SHN adsorbido + PMNs
- D: Bacteria + SHN inactivado + PMNs
- E: Bacteria

Con la finalidad de evaluar los porcentajes de muerte bacteriana entre los diversos procedimientos de opsonización, se tomaron muestras de 10 microlitros de cada pozo a los 60 y 120 minutos, se diluyeron en 10 ml de H₂O destilada estéril y después de mezclar vigorosamente la suspensión en un agitador vórtex, se sembraron muestras de 10 microlitros en placas de AST, las cuales se incubaron a 37 C durante 24 horas. La cuenta de UFC en placa (UFC final) se reportó como el porcentaje de muerte bacteriana en cada muestra, según la siguiente fórmula (39):

$$\text{INDICE DE OPSONOFAGOCITOSIS} = 1 - (\text{UFC final} / \text{UFC inicial}) \times 100$$

Una vez estandarizado el método de opsonofagocitosis, se utilizó la IGIV pH 4.25 del lote 40R10 en una dilución 1:1000 para los ensayos in vitro con las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae. Como fuente de complemento se utilizó SHN al 10%, previamente adsorbido con cada una de las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae.

V.2. In vivo. ACTIVIDAD PROTECTORA DE LA IGIV pH 4.25:

Las pruebas de actividad protectora in vivo de la IGIV pH 4.25 se realizaron en un modelo animal de sepsis experimental con hámster recién nacidos. Se probaron las dos cepas de Klebsiella pneumoniae que presentaron el mayor y el menor índice de muerte bacteriana en los ensayos in vitro de opsonofagocitosis al utilizar la IGIV pH 4.25 como fuente de opsoninas.

a). **CINETICA BACTERIANA:** La fase de crecimiento logaritmico de estas dos bacterias se determinó mediante una cinética de crecimiento bacteriano (47), utilizando siembras en CST de las dos cepas de Klebsiella pneumoniae tomadas de un cultivo líquido de la noche anterior. Se incubaron a 37 C y se tomaron muestras de 5 ml cada hora para medir la turbidez del medio de cultivo por densidad óptica en un espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda, hasta que se alcanzaron las fases estacionarias respectivas. El número de UFC en cada fase de la cinética de crecimiento bacteriano (Figura 1) se estimó mediante nefelometría de McFarland (45).

b). **DOSIS LETAL (DL-100) DE Klebsiella pneumoniae:** En ensayos por separado para cada una de estas dos cepas de Klebsiella pneumoniae, se inocularon a grupos de ocho hámster de uno a tres días de edad por vía subcutánea (sc) en la base de la cola (10,4d) con 10 microlitros de diluciones ascendentes en SBF de la bacteria en fase logaritmica y se observaron los animales durante 10 días para determinar la DL-100, según la mortalidad, mediante el esquema de Reed y Muench (48).

c). **EFFECTO PROTECTOR DE LA IGIV pH 4.25:** Dos grupos de 78 hámster recién nacidos, menores de 48 horas de edad, de ambos sexos y con peso de tres a cuatro gramos, se inocularon por vía sc en la base de la cola con una DL-100 de las cepas de Klebsiella pneumoniae seleccionadas.

Una hora después del enfrentamiento con la bacteria, se

administró por vía intraperitoneal (ip) una dosis de 500 mg/kg de IGIV pH 4.25 a 42 hamster de cada grupo en un volumen de diez microlitros por gramo de peso corporal. A los 36 animales restantes de cada grupo se les inyectó por vía ip un volumen equivalente de SBF pH 7.2.

Los dos grupos de animales se observaron durante 10 días para establecer el porcentaje de sobrevivencia según la bacteria con que fueron infectados y el efecto del tratamiento aplicado en cada uno de los grupos.

V.3. ANALISIS ESTADISTICO:

Las diferencias en los resultados de los ensayos in vitro a los 60 y 120 minutos se analizaron mediante la prueba t de Student para muestras pareadas (49), tomando como grupo de contraste la muestra D. Los resultados del efecto in vivo de la IGIV pH 4.25 se ordenaron en tablas de contingencia de 2 x 2 y se aplicó la prueba chi cuadrada, tomando un valor alfa de significancia menor de 0.05 (50).

V I . R E S U L T A D O S :

VI.1. In vitro. ENSAYO DE OPSONOFAGOCITOSIS:

a). Klebsiella pneumoniae: La cepa utilizada en este estudio para estandarizar el método de opsonofagocitosis fue identificada y serotificada como Klebsiella pneumoniae del serotipo capsular K:8 en el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

La nefelometría de McFarland consta de diez tubos con BaCl₂ al 1% v/v H₂SO₄ al 1% en diluciones de 1:10 hasta 1:100, que dan densidades ópticas que corresponden a concentraciones de 3x10⁸ hasta 3x10⁹. Las lecturas de absorbancia de los diez tubos del nefelómetro de McFarland en el espectrofotómetro correspondieron a la curva que se muestra en la Figura 1.

b). LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES: Los PMNs separados de sangre venosa de adultos sanos tuvieron viabilidad celular de 95% a 98%, determinada por exclusión de azul de tripano.

c). IGIV pH 4.25: La línea de corte para anticuerpos específicos en la prueba de ELISA, tomando como antígeno el polisacárido capsular K:8 de Klebsiella pneumoniae, fue menor de 0.200 para IgG y para IgM en sueros humanos normales a diluciones de 1:10. En cambio, en el lote 40P10 de la preparación de IGIV pH 4.25 en dilución 1:1000 se obtuvieron absorbancias por densidad óptica de 1.645 ± 0.014 para IgG y de 0.002 ± 0 para IgM. Los valores de IgG en los lotes 40P12 y 40P32 también fueron altos,

aunque menores que en el primer lote (Cuadro 1).

d). **FACTORES DEL COMPLEMENTO:** Las muestras de SHN utilizadas presentaron valores normales de los factores C₃ y B-Properdina medidos por nefelometría de lesser, en promedio 25.2 mg/dL de C₃ y 31.8 mg/dL del factor B-Properdina. Estos valores disminuyeron de manera considerable al inactivar por calor las muestras de SHN, como puede verse en el Cuadro 2.

e). **OPSONOFAGOCITOSIS:** La opsonización de la cepa K:8 con IGIV pH 4.25 en dilución 1:1000 dió como resultado un índice de muerte bacteriana del 64% a los 120 minutos. La asociación de IGIV 1:1000 con SHN al 10% produjo un índice de muerte bacteriana del 100% en los ensayos de estandarización del método de opsonofagocitosis. Esta diferencia fue estadísticamente significativa, con un valor de probabilidad menor de 0.001 (Cuadro 3).

Los ensayos in vitro con las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae mostraron índices de muerte bacteriana muy variables para las 35 cepas de hemocultivos, tanto a los 60 minutos de incubación (Cuadro 4), como a los 120 minutos de fagocitosis (Cuadro 5).

Los resultados de muerte bacteriana después de opsonizar las 35 cepas obtenidas de cultivos diversos y exponerlas a la fagocitosis por PMNs humanos, también fueron muy variables a los 60 minutos (Cuadro 6) y a los 120 minutos (Cuadro 7).

El índice de opsonofagocitosis ($X \pm D.E.$) observado con las

35 cepas de Klebsiella pneumoniae aisladas de hemocultivos y opsonizadas con IGIV pH 4.25 en dilución 1:1000 (0.1%) fue de $39.8 \pm 26.0\%$, después de 120 minutos de incubación con los PMNs. Al adicionar SHN al 10%, este índice mejoró significativamente hasta $52.9 \pm 26.5\%$, con un valor de $p < 0.05$, como se puede apreciar en el Cuadro 8 y en la Figura 2.

El índice de muerte bacteriana de las 35 cepas de Klebsiella pneumoniae obtenidas de cultivos diversos después de opsonizarlas con IGIV pH 4.25 al 0.1% y a los 120 minutos de incubación con PMNs fue de $31.8 \pm 26.1\%$. Con la asociación de IGIV 1:1000 y SHN al 10%, el índice aumentó hasta $59.3 \pm 23.8\%$ ($p < 0.001$) (Cuadro 9 y Figura 3).

El promedio global de muerte bacteriana en los ensayos de opsonofagocitosis con las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae tratadas con diferentes fuentes de opsoninas fue siempre menor de 60%. Debido a tales hallazgos, las diferentes cepas probadas se clasificaron como "resistentes", cuando el índice de muerte bacteriana fue menor de 40%; o como "sensibles", cuando mostraron un índice de opsonofagocitosis mayor del 40% de muerte bacteriana (Cuadros 10 y 11).

Cuando se compararon las dos cepas que mostraron respectivamente el patrón de mayor "resistencia" (cepa H-20) y el patrón más "sensible" (cepa K:8) en las pruebas in vitro, las diferencias en el efecto de la opsonización con IGIV al 0.1% y SHN al 10% como fuente de complemento sobre la muerte bacteriana

fueron muy evidentes (Figura 4). A los 60 y a los 120 minutos de incubación con PMNs, se observó más del 90% de muerte bacteriana de la cepa "sensible" (K:S), mientras que el efecto de opsonización fue nulo en el índice de muerte bacteriana de la cepa "resistente" (H-20), tanto a los 60 minutos como a los 120 minutos de fagocitosis por PMNs.

A los 120 minutos de fagocitosis, 17 de las 35 cepas de hemocultivos presentaron un índice de muerte bacteriana mayor al 40% cuando habían sido opsonizadas con SHN al 10%; pero al adicionar IGIV al 0.1% en la fase de opsonización, 25 de estas 35 cepas adquirieron un patrón "sensible", con índices de opsonofagocitosis mayores al 40% de muerte bacteriana. Esta diferencia fue significativa por una prueba de chi cuadrada contrastada contra la muestra que se opsonizó con SHN al 10% inactivado por calor, con un valor de $p = 0.0019$ (Cuadro 10).

En contraste, de las 35 cepas de cultivos diversos, 25 mostraron un patrón "sensible" cuando fueron opsonizadas sólo con la fuente de complemento ($p = 0.0001$). El índice de opsonofagocitosis aumentó en 29 de las 35 cepas cuando se opsonizaron con la asociación de IGIV 1:1000 más SHN al 10%, significativo por chi cuadrada para un valor de p menor de 0.0001 (Cuadro 11).

Las tres cepas de Klebsiella pneumoniae aisladas de LCP presentaron un patrón "resistente" a la opsonofagocitosis con todas las fuentes de opsonización probadas, mientras que las

cinco cepas de coprocultivos presentaron un patrón "sensible".

VI.2. In vivo. ACTIVIDAD PROTECTORA DE LA IGIV pH 4.25:

a). **CINETICA BACTERIANA:** La fase de crecimiento logarítmico de Klebsiella pneumoniae serotipo capsular K:8 se identificó entre las dos y cuatro horas de incubación del cultivo en CST, con un valor medio aproximado de dos y media horas (Figura 5). En tanto que la cepa de Klebsiella pneumoniae nominada H-20, no serotificada, presentó su fase logarítmica de crecimiento entre una y tres horas del cultivo, con un valor medio de una y media horas (Figura 6).

b). **DOSIS LETAL (DL-100):** En los ensayos de infección en hámster recién nacidos para la determinación de las dosis letales de Klebsiella pneumoniae, se obtuvieron una DL-100 igual a 1×10^6 UFC con la cepa K:8 (Cuadro 12) y una DL-100 igual a 1×10^7 UFC con la cepa H-20 (Cuadro 13).

c). **EFFECTO PROTECTOR DE LA IGIV pH 4.25:** En el grupo de los 42 hámster recién nacidos infectados con Klebsiella pneumoniae K:8 y tratados con IGIV pH 4.25 sobrevivieron 21 (50%) animales. En cambio, en el grupo de control sobrevivieron solamente dos (5%) de los 36 animales infectados y tratados con el placebo SBF; esta diferencia fue significativa estadísticamente por un valor de chi cuadrada igual a 18.42 ($p < 0.001$) (Cuadro 14).

Con el propósito de establecer si las diferentes respuestas a la opsonización in vitro con IGIV pH 4.25 guardan relación con

el efecto terapéutico in vivo de esta preparación de IgG, se inocularon 78 hámster recién nacidos con una DL-100 de la cepa de Klebsiella pneumoniae H-20, que mostró un patrón notablemente "resistente" a la opsonofagocitosis in vitro. En el grupo de los 42 hámster neonatos tratados con la IGIV pH 4.25 sobrevivieron 10 (24%) animales, mientras que en el grupo testigo no hubo sobrevivientes. La diferencia estadística fue significativa con un valor de $p < 0.01$ (Cuadro 14).

Al contrastar el efecto in vivo de la IGIV pH 4.25 en los animales recién nacidos infectados con las dos cepas de comportamiento diferente in vitro, se observó mejor efecto terapéutico contra la infección experimental causada por la cepa "sensible" K:8 (sobrevivida del 50%, versus 5% del grupo control) y un efecto menor cuando la infección fue producida por la cepa "resistente" H-20 (sobrevivida del 24%, versus 0% del control). De cualquier manera, el efecto protector de IGIV pH 4.25 en este modelo animal fue estadísticamente significativo para las dos cepas infectantes (Cuadro 14).

VII. DISCUSION:

La ausencia o deficiente cantidad de anticuerpos anticapsulares específicos es uno de los factores más importantes que contribuyen a la mayor susceptibilidad del neonato a las enfermedades infecciosas por bacterias encapsuladas, en especial por Klebsiella pneumoniae (51). Las infecciones nosocomiales por esta bacteria han llegado a ser una de las principales causas de morbilidad y mortalidad neonatales (3).

Diversos estudios han demostrado que las preparaciones de IGIV promueven la actividad bactericida de fagocitos PMNs en ensayos de opsonofagocitosis in vitro (52,53) y que protegen a los animales recién nacidos infectados experimentalmente con estreptococos del grupo B (18) o con Escherichia coli (14); pero no existía información sobre ensayos con infección neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae, ni datos in vitro con un número grande de cepas obtenidas de aislamientos clínicos.

En este estudio hemos evaluado una nueva preparación de IGIV con pH 4.25, que no tiene los efectos indeseables de activación del complemento in vivo presentados por las preparaciones de inmuno-seroglobulina (54). La IgG pura en solución a pH 4.25 no tiene la inestabilidad física que produce la formación de agregados y fragmentos a partir de pH 5.5 y que aumenta en forma proporcional al incremento del pH (16). Además, la IGIV pH 4.25 es una preparación de IgG sin modificación química, que no requiere reconstitución, posee buena capacidad de opsonización y

tiene una adecuada distribución de subclases de IgG (17).

Una de las más importantes funciones biológicas de la IgG es la opsonización de microorganismos, proceso que facilite el reconocimiento de estas partículas biológicas por receptores para la Fc del anticuerpo en la membrana de las células fagocíticas mononucleares y polimorfonucleares, favoreciendo la ingestión y eventual destrucción de tales microorganismos (31). Los ensayos de opsonofagocitosis resultan de gran utilidad para la evaluación in vitro de la actividad funcional de la preparación de IGIV, por medio de la medición de índices de muerte microbiana como el punto final de los procesos de fagocitosis de los microorganismos opsonizados (55).

Los anticuerpos anticapsulares contra Klebsiella pneumoniae K18 identificados por el método de ELISA en la preparación de IGIV fueron altos. Esta observación es congruente con los índices de muerte bacteriana obtenidos en los ensayos de opsonofagocitosis con esta cepa de Klebsiella pneumoniae.

La IGIV pH 4.25 presentó mejor capacidad opsonizante en la dilución 1:1000 que a dilución 1:1, manifestada por un índice más alto de muerte bacteriana. Tal efecto puede deberse a un bloqueo de los receptores Fc en los PMNs de estos ensayos por grandes cantidades de IgG, cuya consecuencia sería una disminución en la capacidad de reconocimiento de las bacterias opsonizadas. Este mecanismo ha sido descrito en las células del sistema fagocítico mononuclear (SFM), las cuales pueden ser bloqueadas con dosis

grandes de IGIV, que se utilizan como una medida terapéutica en púrpuras trombocitopénicas inmunes para disminuir la captación y destrucción de plaquetas por el SFM (56,57).

La diversidad en los índices de opsonofagocitosis de las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae probadas in vitro revela que los requerimientos de opsonización para estas bacterias son diferentes. Además, si bien es cierto que la preparación de IGIV pH 4.25 contiene una gran cantidad de anticuerpos contra varias bacterias gram-negativas (14), es de esperar que no contenga anticuerpos específicos contra todos los serotipos de Klebsiella pneumoniae.

En otros estudios in vitro se han demostrado títulos altos de anticuerpos opsonizantes contra el estreptococo del grupo B tipo III, pero no contra el tipo II (18) y se ha señalado que las inmunoglobulinas hiperinmunes, obtenidas de plasmas donadores con títulos altos de anticuerpos contra las bacterias causales de ciertas infecciones, pueden ser de mayor utilidad que las IGIV convencionales en el tratamiento de procesos infecciosos graves (54). Sin embargo, los lotes de IGIV convencional podrían ser más adecuados si fuesen obtenidos de plasmas de donadores locales, quienes pueden poseer mayor cantidad de anticuerpos contra las bacterias prevalentes en cada medio ambiente particular.

La virulencia de algunos serotipos de Klebsiella pneumoniae puede estar asociada al sitio de infección y ciertos serotipos pueden ser más virulentos que otros o ser comensales en un sitio

y patógenos en otro, ya que la bacteria ataca diferentes órganos con un alto grado de especificidad (40). Diversas bacterias obtenidas de infecciones localizadas parecen ser más sensibles al efecto del complemento que las cepas obtenidas de infecciones sistémicas o diseminadas; tales cepas "serosensibles" se han descrito en estreptococos del grupo B (52), Neisseria gonorrhoeae (58) y Campylobacter sp (59), entre otras.

Los ensayos de opsonofagocitosis de este estudio mostraron que el patrón de sensibilidad a la opsonización con una adecuada fuente de complemento fue mayor en las cepas de Klebsiella pneumoniae provenientes de cultivos diversos que en las obtenidas de hemocultivos. Este efecto mejoró significativamente en los dos grupos de bacterias con la adición de IGIV, pero fue más notable en las cepas de hemocultivos, lo que indica que la preparación de IGIV pH 4.25 parece tener mayor capacidad opsonizante contra cepas obtenidas de pacientes con septicemia que contra las obtenidas de infecciones localizadas.

Los índices de muerte bacteriana aumentaron al opsonizar las cepas de Klebsiella pneumoniae con IGIV pH 4.25 más SHN como fuente de complemento. Esto parece indicar que la IgG, además de funcionar directamente como opsonina, puede activar la vía clásica del complemento y favorecer el depósito de C3b sobre la bacteria. Ambos mecanismos de opsonización facilitarían el contacto entre el microorganismo y las células fagocíticas y como consecuencia la fagocitosis y muerte de la bacteria (60).

Diferentes preparaciones de IGIV tienen un efecto protector en ratas adultas infectadas por Klebsiella pneumoniae, pero solamente a dosis altas de IgG; en cambio, las IGIV hiperinmunes confieren similar protección a dosis muy bajas (5 mg/kg) (39).

El efecto terapéutico de la IGIV pH 4.25 fue evidente en la sepsis neonatal experimental por la cepa de Klebsiella pneumoniae "sensible" a la opsonización, pero este efecto fue poco significativo cuando se infectaron a los hámster recién nacidos con una cepa "resistente" a la opsonización por IGIV. Estos resultados demuestran una correlación positiva entre la capacidad opsonizante de la IGIV pH 4.25 determinada in vitro y su efecto protector in vivo.

El efecto protector de IGIV pH 4.25 en dosis de 1,000 mg/kg en ratas recién nacidas infectadas por estreptococos del grupo B ha resultado en más del 90% de supervivencia, en tanto que dosis de 100 mg/kg confieren un efecto protector menor (18). La IGIV pH 4.25 en dosis de 500 mg/kg protege a ratas recién nacidas con sepsis por Salmonella typhimurium (19) y a ratas adultas infectadas experimentalmente con Pseudomonas aeruginosa (54).

V I I I . C O N C L U S I O N E S :

a). La preparación de inmunoglobulina intravenosa con pH 4.25 tuvo excelente actividad opsonizante contra Klebsiella pneumoniae serotipo capsular K:8, pero mostró actividad variable contra las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae probadas, por lo que se puede concluir que los requerimientos de opsonización para diversas cepas de Klebsiella pneumoniae son diferentes.

b). La actividad opsonizante de la IGIV pH 4.25 para la mayoría de las cepas de Klebsiella pneumoniae probadas mejoró notablemente con la adición de una fuente de complemento, lo cual indica la participación potencializada de estas dos fuentes de opsoninas.

c). El efecto terapéutico de la IGIV pH 4.25 fue notable en los hámster recién nacidos infectados con Klebsiella pneumoniae K:8, pero fue menos importante cuando los animales fueron infectados con Klebsiella pneumoniae H-20, la cepa "resistente" en los ensayos in vitro a la opsonización por IGIV.

d). Los resultados de los experimentos in vivo, así como los de los ensayos in vitro, sugieren que la utilidad terapéutica de esta nueva preparación de IGIV pH 4.25 en la sepsis neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae es dependiente de los niveles de IgG específica contra la bacteria presentes en la preparación de IGIV y de la capacidad opsonizante de tales anticuerpos.

e). El alto contenido de anticuerpos específicos contra Klebsiella pneumoniae en estos preparados de IGIV pH 4.25 y la demostración in vitro de su actividad opsonizante sugieren que esta medida terapéutica coadyuvante puede ser de utilidad clínica en el manejo de los recién nacidos con infecciones graves por Klebsiella pneumoniae.

f). El uso de lotes de IGIV convencional que contengan una cantidad adecuada de anticuerpos opsonizantes demostrada in vitro contra las bacterias prevalentes que causan infecciones graves, se presenta como una alternativa útil y más accesible que las preparaciones de IGIV hiperinmunes para fines de aplicación clínica en humanos.

IX. RESUMEN:

Este estudio se realizó con la finalidad de determinar la efectividad terapéutica de una nueva preparación de inmunoglobulina para uso intravenoso (IGIV) con pH 4.25, en un modelo de sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae en hámster recién nacidos y se correlacionó tal efecto con la capacidad de opsonización de la bacteria por dicha preparación en ensayos de opsonofagocitosis in vitro.

Las pruebas de opsonofagocitosis se hicieron en microplacas con 70 cepas de Klebsiella pneumoniae, obtenidas de aislamientos clínicos de pacientes pediátricos hospitalizados, las cuales se trataron con diferentes fuentes de opsoninas y después se enfrentaron con leucocitos polimorfonucleares de adultos voluntarios sanos.

El efecto protector in vivo de la IGIV se probó en hámster recién nacidos infectados con las dos cepas de Klebsiella pneumoniae que presentaron el mayor y el menor índice de opsonofagocitosis in vitro respectivamente. Una hora después del inóculo de la bacteria, se aplicó una dosis de IGIV (500 mg/kg) y como testigo se utilizó SBF a pH 7.2. Los animales se observaron durante 10 días para establecer el porcentaje de sobrevivencia.

Los índices de opsonofagocitosis, medidos por el porcentaje de muerte bacteriana de cada una de las 70 cepas de Klebsiella pneumoniae, fueron variables cuando se opsonizaron con la IGIV.

Se encontró mejor capacidad de opsonización por IGIV con las cepas de hemocultivos procedentes de infecciones sistémicas que contra las cepas obtenidas de infecciones localizadas. Para la mayor parte de las cepas, la capacidad de opsonización de IGIV mejoró significativamente al adicionar una fuente de complemento.

El efecto terapéutico de la IGIV pH 4.25 fue más notable en los animales con sepsis neonatal experimental producida por una cepa de Klebsiella pneumoniae que mostró un patrón "sensible" en las pruebas de opsonización ($p < 0.001$). En cambio, en los hamster infectados con una cepa "resistente" a la opsonofagocitosis, el efecto terapéutico de la IGIV fue menos significativo ($p < 0.01$).

Los resultados en este estudio mostraron una correlación positiva entre la capacidad opsonizante in vitro de la IGIV pH 4.25 y su efecto protector in vivo en el modelo de sepsis neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Larracilla J, Varas RP, Peñaloza JS, García MM, Dillman CA: Septicemias nosocomiales. Bol Med Hosp Infant Mex 1982; 39:806-11
2. Klein JO, Mancy SM: Bacterial sepsis and meningitis. En: Remington, Klein JO, ed: Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 2a ed. Philadelphia 1983, WB Saunders: 679-735.
3. Martínez AJ, Mancilla J, Santos JI: Sepsis neonatal. Experiencia 1980-1985 del Hospital Infantil de México. Bol Med Hosp Infant Mex (En prensa).
4. Mancilla J: Sepsis neonatal. Monografía. Instituto Nacional de Perinatología, Secretaría de Salud, México. 1985.
5. Montgomerie JZ, Ota JK: Klebsiella bacteremia. Arch Intern Med 1980; 140:525-7.
6. Vargas A, Jasso GL, Gálvez MA: Frecuencia y etiología de las bacteriemias. Rev Mex Pediatr 1980; 47:163-6.
7. Stevens P, Young LS, Adamu S: Opsonization of various (K) E. coli by the alternative complement pathway. Immunology 1983; 50:497-501.
8. Miller ME: The immune response in the neonate. En: Host defenses in the human neonate. New York 1978, Grune & Stratton: 43-58.
9. Santos JI, Shigeoka AQ, Pote NS, Hill HR: Protective efficacy of a modified immune serum globulin in experimental group B

streptococcal infection. J Pediatr 1981; 99:873-9.

10. Fischer GW, Weisman LB, Hemming VG, London WT, Hunter KW Jr, Bosworth JM Jr, Sever JL, Wilson SR, Curfman BL: Intravenous immunoglobulin in neonatal group B streptococcal disease. Am J Med 1984; 76(Suppl):117-23.

11. Cryz SJ Jr, Furer E, Germanier R: Protection against fatal Klebsiella pneumoniae burn wound sepsis by passive transfer of anticapsular polysaccharide. Infect Immun 1984; 45:139-42.

12. Collins MS, Dorsey JH: Comparative anti-Pseudomonas aeruginosa activity of chemically modified and native immunoglobulin G (human), and potentiation of antibiotic protection against Pseudomonas aeruginosa and group B Streptococcus in vivo. Am J Med 1984; 76(Suppl):155-60.

13. Sik K, Wass C, Kang J, Anthony B: Functional activities of various preparations of human intravenous immunoglobulin against type III group B Streptococcus. J Infect Dis 1986; 153:1092-7.

14. Hill HR, Bathras JM: Protective and opsonic activities of a native, pH 4.25, intravenous immunoglobulin G preparation against common bacterial pathogens. Rev Infect Dis 1986; 8(Suppl):396-400

15. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DS, Ashworth JN, Meli M, Taylor HL: Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J Am Chem Soc 1946; 68:459-75.

16. McCue JP, Hein RH, Tenold R: Three generation of immunoglobulin G preparation for clinical use. Rev Infect Dis 1986; 8(Suppl):374-81.
17. Douglas CH: IgG subclass composition of intravenous immunoglobulin preparations: clinical relevance. Rev Infect Dis 1986; 8(Suppl):391-5.
18. Harper TE, Christensen RD, Rothstein G, Hill HR: Effect of intravenous immunoglobulin G on neutrophil kinetics during experimental group B streptococcal infection in neonatal rats. Rev Infect Dis 1986; 8(Suppl):401-8.
19. Emerson TE Jr, Collins MS, Budinger MD: Use of a new, low-pH immunoglobulin G preparation during episodes of bacteremia in the rat. Rev Infect Dis 1986; 8(Suppl):409-19.
20. Pirofsky B: Safety and toxicity of a new serum immunoglobulin intravenous preparation, IGIV pH 4.25. Rev Infect Dis 1986; 8(Suppl):457-63.
21. Dwyer JM: Intravenous therapy with gamma globulin. Adv Intern Med 1987; 32:111-136.
22. Chirico G, Rondini G, Plebani A, Chiara A, Massa M, Ugazio AG: Intravenous gammaglobulin therapy for prophylaxis of infection in high-risk neonates. J Pediatr 1987; 110:417-442.
23. Bussel J, Lalezari P, Filbrico S: Intravenous treatment with gamma-globulin of autoimmune neutropenia of infancy. J Pediatr 1988; 112:298-301.

24. Freeman BA: Bacilos entéricos. En: Microbiología de Burrows, 21a ed. México 1957; Interamericana, 499-516.
25. Orskov I, Orskov F: Serotyping of Klebsiella. En: Methods in Microbiology. New York, Academic Press 1984; 143-164.
26. Orskov I, Fife-Asbury MA: New Klebsiella capsular antigen, K:82, and the deletion of five of those previously assigned. Intern J Syst Bacteriol 1977; 27:386-387.
27. Kasper DL: Bacterial capsule-Old dogmas and new tricks. J Infect Dis 1986; 153:407-415.
28. Joiner KA, Brown EJ, Frank MM: Complement and bacteria. Ann Rev Immunol 1984; 2:461-491.
29. Beaman L, Beaman BL: The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. Ann Rev Microbiol 1984; 33:27-48.
30. Lehninger AL: Estructura de los anticuerpos. En: Bioquímica, 2a. ed. México 1984; Omega, 1015-1020.
31. Berger M: Immunoglobulin G subclass determination in diagnosis and management of antibody deficiency syndromes. J Pediatr 1987; 110:325-328.
32. Soderberg-Warner M, Ank B, Stiehm ER: Lack of supression by concanavalin A activated neonatal mononuclear cells. Pediatr Res 1985; 19:927-929.
33. Murczynska W, Andrzejewski J, Bogunowicz A: Role of

- macrophages in the development of immunological maturity in rat. Nature 1970; 227:721.
34. Johnston RB Jr, Altenburger KM, Atkinson AW Jr, Curry RH: Complement in the newborn infant. Pediatrics 1979; 64(Suppl):781-786.
35. Notarangelo LD, Chirico G, Chiara A, Colombo A, Rondini A, Martini A, Ugazio AG: Activity of classical and alternative pathways of complement in preterm and small for gestational age infants. Pediatr Res 1984; 18:281-285.
36. Christensen RD, Rothstein G: Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. J Pediatr 1980; 96:316-318.
37. Domenico P, Johanson Wg Jr, Strauss DC: Lobar pneumoniae in rats produced by clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Infect Immun 1982; 37:327-335.
38. Cryz SJ Jr, Furer E, Germanier R: Experimental Klebsiella pneumoniae burn wound sepsis: Role of capsular polysaccharide. Infect Immun 1984; 43:440-441.
39. Cryz SJ Jr, Cross AS, Chariatte N, Sadoff JC, Germanier R: Activity of intravenous immune globulin against Klebsiella. J Lab Clin Med 1986; 108:182-189.
40. Riser E, Noone P: Klebsiella capsular type versus site of isolation. J Clin Pathol 1981; 34:552-555.
41. Chugh TD, Chaffoor SA, Kuruvilla AC, Bishbishi EA:

- Colonization and infections of neonates by Klebsiella pneumoniae in an intensive care unit. J Trop Pediatr 1985; 31:200-203.
42. O'Brien TF, Mayer KH, Hopkins JD, Farel JJ, Lee Chao MS, Kent RL: Resistance to antibiotics in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Infect Control 1985; 6:64.
43. Zwadyk P: Opportunistic enterobacteriaceae. En: Microbiology, 17th ed. New York 1980, Appleton-Century-Crofts: 727-736.
44. Mancilla-Ramirez Javier: Depuración reticuloendotelial de Klebsiella pneumoniae en un modelo animal. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas. División de Investigación del Hospital Infantil de México, Universidad Nacional Autónoma de México 1988.
45. Branson D: McFarland nephelometer. En: Methods in clinical bacteriology. Illinois 1980; 106-219.
46. Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 1968; 21(Suppl):77-89.
47. Freeman BA: Desarrollo de la bacteria. En: Microbiología de Burrows, 21a ed. México 1983, Interamericana: 48-55.
48. Reed LJ, Muench H: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg 1938; 27:493-497.
49. Downie NM, Heath RW: Contraste de hipótesis: diferencia de medias. En: Métodos estadísticos aplicados, 3a ed. México 1973, Harla: 182-203.
50. Downie NM, Heath RW: Chi cuadrada de Pearson. En: Métodos

estadísticos aplicados, 3a ed. México 1973, Harla: 212-231.

51. Hill HF: Host defenses in the neonate. Prospects for enhancement. Semin Perinatol 1985; 9:2-11.

52. Baker CJ, Webb BJ, Kasper DL, Edwards MS: The role of complement and antibody in opsonophagocytosis of type II group B streptococci. J Infect Dis 1986; 154:47-54.

53. Furth R, Leijh J, Klein F: Correlation between opsonic activity for various microorganismos and composition of gammaglobulin preparations for intravenous use. J Infect Dis 1984; 149:511-517.

54. Pennington JE: Properties and characteristics of a new immunoglobulin G intravenous preparation. Rev Infect Dis 1986; 8:(Suppl) 371-373.

55. Southwick FS, Stossel TP: Phagocytosis. En: Manual of Clinical Laboratory Immunology, 3a ed. American Society for Microbiology 1986; 326-331.

56. Bussel JB, Kimberly RP, Inman RD, Schulman I, Cunningham-Rundels C, Cheung M, Smithwick EM, O'Malley J, Barandun S, Hilgarther MW: Intravenous gammaglobulin treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 1983; 62:430-436.

57. Imbach P, Jungi TW: Possible mechanisms of intravenous immunoglobulin treatment in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. Blut 1983; 46:117-124.

58. Ross SC, Densen P: Opsonophagocytosis of Neisseria

gonorrhoeae: Interaccion of local and disseminated isolates with complement and neutrophils. J Infect Dis 1985; 151:33-41.

59. Blaser MJ, Smith PF, Kohler PF: Susceptibility of Campylobacter isolates to the bactericidal activity of human serum. J Infect Dis 1985; 151:227-235.

60. Male D: Inflammation and phagocytosis. En: Immunology. New York 1986, Gower Medical Publishing: 73-81.

ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA EL POLISACARIDO CAPSULAR DE *K. pneumoniae* K:8 EN DIFERENTES LOTES DE IGIV pH 4.25 DETERMINADOS POR ELISA.

LOTES	IGIV 1:1,000	
	IgG	IgM
40F10	1.645 ± 0.014	0.002 ± 0.
40F12	1.329 ± 0.028	0.049 ± 0.001
40F32	0.616 ± 0.008	0.102 ± 0.005

CUADRO 1

**NIVELES DE C4 Y FACTOR B EN SUERO HUMANO
NORMAL Y ADSORBIDO O DESCOMPLEMENTADO**

MUESTRA	C4	FACTOR B
VALORES NORMALES*	15-45	17-42
SHN	25.2	25.2
SHN ADSORBIDO	19.1	24.6
SHN S/C ^o	6.8	2.5

* mg/dL.

SHN : Suero humano normal

S/C^o: descomplementado (56 C, 30 min).

CUADRO 2

INDICE DE OPSONOFAGOCITOSIS (%) A DIFERENTES DILUCIONES DE INMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA pH 4.25 (IGIV) Y DE SUERO HUMANO NORMAL (SHN) CONTRA *Klebsiella pneumoniae* K18, DESPUES DE 120 MINUTOS DE INCUBACION CON LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTOS SANOS.

OPSONIZACION	DILUCIONES			
	1:1	1:10	1:100	1:1000
SHN	66	39	40	21
IGIV	16	30	35	66
IGIV+SHN 1%	69	37	27	7
IGIV+SHN 10%	45	48	34	100

CUADRO 3

OPSONOFAGOCITOSIS: MUERTE BACTERIANA (%) DE 35 CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* AISLADAS DE HEMOCULTIVOS, DESPUES DE 60 MINUTOS DE INCUBACION CON LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTOS SANOS

OPSONIZACION

K. pneumoniae

HEMOCULTIVOS	IGIV 1:1,000 +SHN 10%	IGIV 1:1,000	SHN 10%	SHN 10%S/C ¹
1	66.4	66.4	31.8	14.5
2	43.4	0.	59.7	43.4
3	50.7	23.6	25.7	0.
4	100	85.7	100	71.4
5	81.2	68.7	14.6	35.4
6	31.6	0	68.4	47.4
7	7.1	14.3	50	0.
8	85	75	55	55
9	80	40	20	0.
10	75.6	75.6	0.	32.5
11	54.2	4.2	33.3	12.5
12	15.4	61.5	0.	76.9
13	68.4	57.9	42.1	0.
14	100	33.3	0.	16.7
15	33.3	58.3	41.7	75
16	69.2	30.8	61.5	0.
17	35	45	60	35
18	77.6	40.3	0.	4.5
19	88.5	92.3	76.9	53.8
20	0.	0.	20	10
21	100	37.5	50	31.2
22	78.6	0.	57.1	57.1
23	54.5	0.	72.7	0.
24	100	90	60	40
25	98.1	54.7	83	58.5
26	52.9	26.5	82.3	23.5
27	70	90	70	70
28	0.	38.8	56.1	39.5
29	97.8	86.9	45.6	90.2
30	0.	10.5	0.	60.5
31	59.1	72.7	18.2	68.2
32	0.	33.3	40	20
33	70.6	55.9	29.4	0.
34	72.7	54.5	72.7	63.6
35	75.9	48.1	77.8	22.2

IGIV : Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25.
 SHN : Suero humano normal adsorbido.
 SHN S/C¹ : descomplementado (56°C, 30 min).

CUADRO 4

OPSONOFAGOCITOSIS: MUERTE BACTERIANA (%) DE 35 CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* AISLADAS DE HEMOCULTIVOS, DESPUES DE 120 MINUTOS DE INCUBACION CON LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTOS SANOS

OPSONIZACION				
<i>K. pneumoniae</i>				
HEMOCULTIVOS	IGIV 1:1,000 + SHN 10%	IGIV 1:1,000	SHN 10%	SHN 10% S/C ¹
1	51.9	32.3	0.	16
2	30.1	0.	26.3	15.3
3	50.1	27.8	1.8	0.
4	98	42	96	0.
5	92.4	60.9	16.2	51.3
6	53	47	77.3	0.
7	0.	58.5	45.1	40.2
8	41.7	58.3	0.	29.2
9	47.7	55.8	39.6	0.
10	54.6	42.4	0.	16.1
11	35.2	26.5	16	0.
12	37.5	16.7	0.	16.7
13	13.6	0.	12.2	72.7
14	71.4	71.4	71.4	28.6
15	82.3	29.4	4.2	58.8
16	66.7	38.1	57.1	0.
17	40.6	43.5	62.7	0.
18	59.4	38.5	15.6	0.
19	27.3	75	55	55
20	0.	54.4	11.1	32.2
21	0.	3.1	14.1	7.3
22	40.5	0.	64.5	45.2
23	69.4	52.8	36.1	25
24	58.3	16.7	25	33.7
25	85.2	14.8	86.4	64.2
26	38.5	11.5	63.5	0.
27	77.8	88.9	44.4	11.1
28	64.6	15.1	43.1	28.6
29	99	94	94	95.5
30	21.1	0.	36.6	57.7
31	60.7	36.9	40.5	73.8
32	77.5	75	5	27.5
33	53.1	32.6	28.6	20.4
34	84.2	78.9	100	63.1
35	70.7	52.6	62.9	48.3

IGIV : Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25

SHN : Suero humano normal adsorbido

S/C¹ : descomplementado (56°C, 30 min).

CUADRO 5.

OPSONOFAGOCITOSIS: MUERTE BACTERIANA (%) DE 35 CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* DE DIVERSOS AISLAMIENTOS, DESPUES DE 60 MINUTOS DE INCUBACION CON LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTOS SANOS

N. pneumoniae	OPSONIZACION			
	HEMOCULTIVOS IGIV 1:1,000 + SHN 10%	IGIV 1:1,000	SHN 10%	SHN 10% S/C ¹
1	20.8	50	41.7	0.
2	65.6	62.5	68.7	78.1
3	79.3	66.7	55.2	40.2
4	35	35	27.5	47.5
5	61.5	0.	43.3	5.8
6	63.1	78.9	5.3	47.4
7	55	47.5	35	52.5
8	64.7	35.3	82.3	0.
9	45.9	15.3	75.7	24.3
10	70.5	64.2	60.5	0.
11	65.4	1.9	44.2	0.
12	62.2	67.5	62.2	40.5
13	100	40	40	40
14	60.9	52.2	0.	39.1
15	48.3	0.	17.2	62.1
16	73.7	52.6	0.	31.6
17	44.4	0.	7.4	25.9
18	8.2	0.	29.3	41.3
19	16	0.	28	8.
20	43.5	8.7	60.9	8.7
21	80	48.6	82.8	51.4
22	33.3	0.	73.3	30
23	63.6	72.7	0.	45.4
24	62.5	50	0.	62.5
25	70	40	50	70
26	63.6	0.	63.6	63.6
27	36.4	0.	63.6	18.2
28	33.3	0.	33.3	55.5
29	44.4	0.	44.4	0.
30	33.3	50	16.7	0.
31	58.6	44.3	62.8	0.
32	57.7	57.7	53.8	19.2
33	70.4	3.7	63	48.1
34	21	0.	19.3	27.4
35	11.1	22.2	22.2	0.

IGIV : Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25.

SHN : Suero humano normal adsorbido

S/C¹ : descomplementado (56°C, 30 min).

CUADRO 6

OPSONOFAGOCITOSIS: MUERTE BACTERIANA (%) DE 35 CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* DE DIVERSOS AISLAMIENTOS, DESPUES DE 120 MINUTOS DE INCUBACION CON LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTOS SANOS

OPSONIZACION

K. pneumoniae

HEMOCULTIVOS	IGIV 1:1,000 + SHN 10%	IGIV 1:1,000	SHN 10%	SHN 10% S/C ¹
1	77.3	34.1	84.1	31.8
2	92.5	69.8	92.5	69.8
3	68	27.4	57.1	12.3
4	32.4	26.8	12	17.6
5	56.9	30.3	12.4	7.3
6	62.3	48.1	3.8	34
7	64.8	13	38	39.3
8	70.9	0.	69.8	10.4
9	58.9	29.7	60.4	9.9
10	63.3	48.6	57.9	17
11	63.6	0.	60.9	23.2
12	91.4	5.3	87.4	66.2
13	54.5	0.	0.	50
14	5.7	20	0.	50
15	60	0.	67.6	37.2
16	91	76.1	47.8	0.
17	44.9	71.4	73.4	20.4
18	52.7	47.3	23.6	0.
19	20	0.	49.2	64.6
20	83.6	15.5	72.4	18.1
21	73.6	0.	89.1	16.3
22	58.6	0.	72.8	20
23	75.6	36.6	68.3	0.
24	68.2	36.4	72.7	27.3
25	81.1	48.6	86.5	43.2
26	94.6	24.3	89.2	51.3
27	52.2	56.5	30.4	0.
28	69.2	41	75.4	54.9
29	21.6	5.4	56.7	0.
30	0.	30.8	64.2	30.8
31	48.4	42.1	61.6	31.6
32	75.7	45.1	36	11.3
33	64.4	84.9	65.7	50.7
34	12.2	2.9	19.7	0.8
35	66.7	93.3	46.6	36.7

IGIV : Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25.

SHN : Suero humano normal adsorbido.

S/C¹ : descomplementado (56°C, 30 min).

CUADRO 7

INDICE DE OPSONOFAGOCITOSIS ($\bar{X} \pm D.E.$) PARA 35 CEPAS
DE Klebsiella pneumoniae AISLADAS DE HEMOCULTIVOS

OPSONIZACION	MUERTE BACTERIANA (%)	
	60 MINUTOS	120 MINUTOS
IGIV 1:1,000 + SHN 10%	59.8 \pm 31.7 *	52.9 \pm 26.5 *
IGIV 1:1,000	44.9 \pm 29.0	39.8 \pm 26.0
SHN 10%	45.0 \pm 27.2	39.8 \pm 29.4 *
SHN 10% S/C'	35.1 \pm 27.0	29.5 \pm 25.9

IGIV : Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25

SHN : Suero humano normal adsorbido

S/C' : descomplementado (56°C, 30 min).

* p < 0.001 (versus SHN 10% S/C').

CUADRO 8

INDICE DE OPSONOFAGOCITOSIS ($\bar{x} \pm D.E.$) PARA 35 CEPAS
DE Klebsiella pneumoniae DE DIVERSOS AISLAMIENTOS

OPSONIZACION	MUERTE BACTERIANA (%)	
	60 MINUTOS	120 MINUTOS
IGIV 1:1,000 + SHN 10%	52.1 \pm 20.9 *	59.3 \pm 23.8 *
IGIV 1:1,000	30.5 \pm 26.9	31.8 \pm 26.1
SHN 10%	40.9 \pm 24.9	54.6 \pm 26.9
SHN 10% S/C ¹	30.9 \pm 23.6	27.3 \pm 20.5

IGIV : Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25

SHN : Suero humano normal adsorbido

S/C¹ : descomplementado (56°C, 30 min).

* p < 0.001 (versus SHN 10% S/C¹)

CUADRO 9

CEPAS DE Klebsiella pneumoniae AISLADAS DE HEMOCULTIVOS CON MAS DE 40% DE MUERTE BACTERIANA EN LOS ENSAYOS DE OPSONOFAGOCITOSIS.

OPSONIZACION	60 MINUTOS		120 MINUTOS	
	CEPAS SENSIBLES	% MUERTE ($\bar{X} \pm D.E.$)	CEPAS SENSIBLES	% MUERTE ($\bar{X} \pm D.E.$)
IGIV 1:1,000 + SHN 10%	26 *	75.78 \pm 17	25 **	66.0 \pm 17
IGIV 1:1,000	20	65.97 \pm 17	17	61.8 \pm 16
SHN 10%	21	63.9 \pm 15	17	64.9 \pm 19
SHN 10% S/C'	14	63.6 \pm 12	12	60.5 \pm 14

IGIV : Inmunoglobulina intravenosa pH 4.25

SHN : Suero humano normal adsorbido

S/C' : descomplementado (56 °C, 30 min).

(Chi cuadrada versus SHN 10% S/C')

* p = 0.0038

** p = 0.0019

CUADRO 10

CEPAS DE Klebsiella pneumoniae DE DIVERSOS AISLAMIENTOS CON MAS DE 40% DE MUERTE BACTERIANA EN LOS ENSAYOS DE OPSONOFAGOCITOSIS

OPSONIZACION	60 MINUTOS		120 MINUTOS	
	CEPAS SENSIBLES	% DE MUERTE ($\bar{X} \pm D.E.$)	CEPAS SENSIBLES	% DE MUERTE ($\bar{X} \pm D.E.$)
IGIV 1:1,000 + SHN 10%	25 *	62.99 \pm 13	29 **	68.4 \pm 13
IGIV 1:1,000	17	55.6 \pm 11	13	59.4 \pm 17
SHN 10%	20	59.6 \pm 13	25 ***	69.3 \pm 13
SHN 10% S/C ^o	15	53.7 \pm 11	9	55.6 \pm 8.3

IGIV : inmunoglobulina intravenosa pH 4.25

SHN : Suero humano normal adsorbido

S/C : descomplementado (56 C, 30 min)

(Chi cuadrada versus SHN 10% S/C^o)

* p = 0.0157

** p = 0.0000

*** p = 0.0001

CUADRO 11

DOSIS LETAL MAXIMA (DL-100) EN HAMSTER RECIENTE
NACIDOS INOCULADOS CON Klebsiella pneumoniae (K18)

ANIMALES	UFC	MUERTOS	VIVOS	M.A.	V.A.	MORTALIDAD (%)
8	1×10^7	8	0	20	0	100
8	1×10^6	8	0	12	0	100 *
8	1×10^5	4	4	4	4	50

M.A. = mortalidad acumulada

* DL-100

V.A. = sobrevivencia acumulada

CUADRO 12

**DOSIS LETAL MAXIMA (DL-100) EN HAMSTER RECIEN
NACIDOS INOCULADOS CON Klebsiella pneumoniae (H-20)**

ANIMALES	UFC	MUERTOS	VIVOS	M.A.	V.A.	MORTALIDAD (%)
8	1×10^7	8	0	11	0	100 *
8	1×10^6	2	6	3	6	33.3
7	1×10^5	1	6	1	12	7.7

M.A. = mortalidad acumulada

* DL-100

V.A. = sobrevida acumulada

CUADRO 13

EFFECTO in vivo DE IGIV pH 4.25 EN HAMSTER RECIEN NACIDOS
 INFECTADOS CON DOS CEPAS DE Klebsiella pneumoniae

TRATAMIENTO (NUMERO)	<u>K. pneumoniae K:8</u>		<u>K. pneumoniae H-20</u>	
	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS
TESTIGO SBF (36)	34	2	36	0
IGIV pH 4.25 (42)	21	21 *	32	10 **

$$* \chi^2 = 18.415 \quad p < 0.001$$

$$** \chi^2 = 9.831 \quad p < 0.01$$

CUADRO 14

CORRELACION DE NEFELOMETRIA DE McFARLAND CON ESPECTROFOTOMETRIA
POR ABSORBANCIA DE LUZ VISIBLE A 540 nm DE LONGITUD DE ONDA

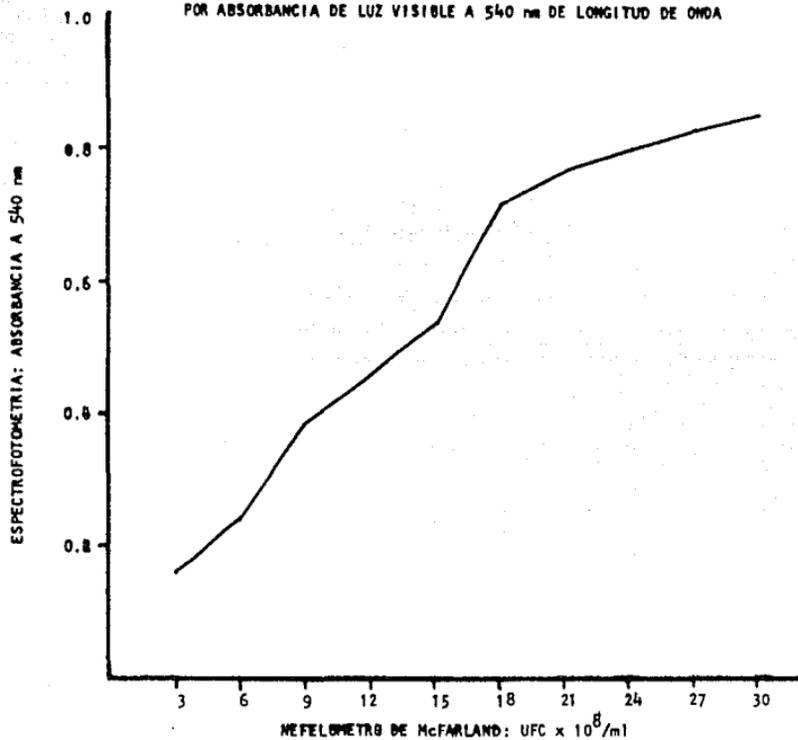


FIGURA 1

ACTIVIDAD OPSONIZANTE DE INMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA pH 4.25 CONTRA

35 CEPAS DE Klebsiella pneumoniae AISLADAS DE HEMOCULTIVOS.

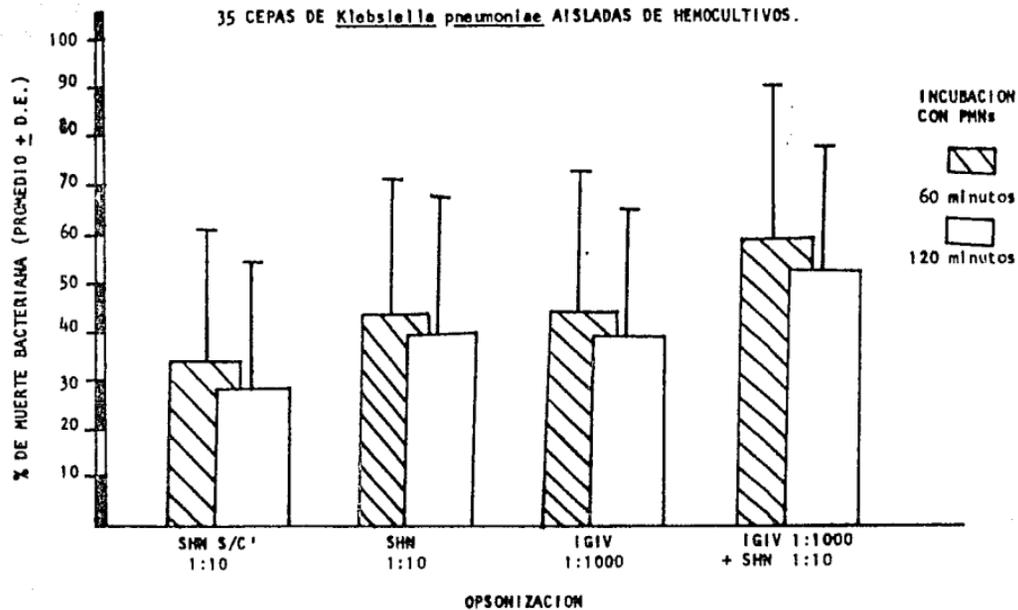


FIGURA 2

ACTIVIDAD OPSONIZANTE DE IMMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA pH 4.25
CONTRA 35 CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* DE DIVERSOS AISLAMIENTOS

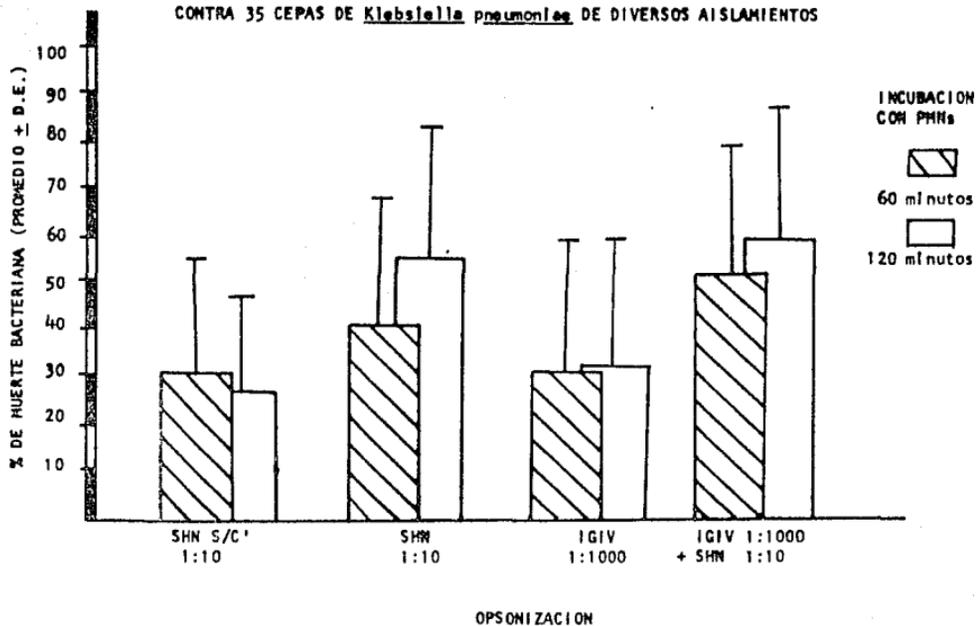


FIGURA 3

ACTIVIDAD OPSONIZANTE DE INMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA

pH 4.25 CONTRA UNA CEPA SENSIBLE Y UNA CEPA RESISTENTE

A LA OPSONOFAGOCITOSIS DE Klebsiella pneumoniae

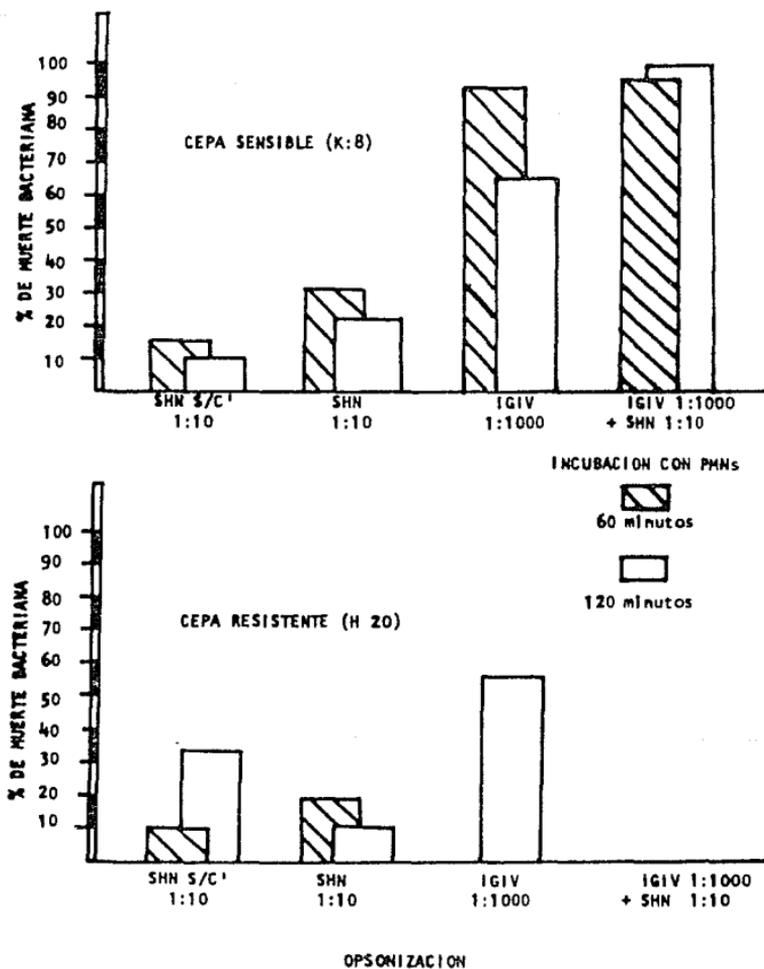


FIGURA 4

CINETICA DE CRECIMIENTO DE Klebsiella pneumoniae (K:8)

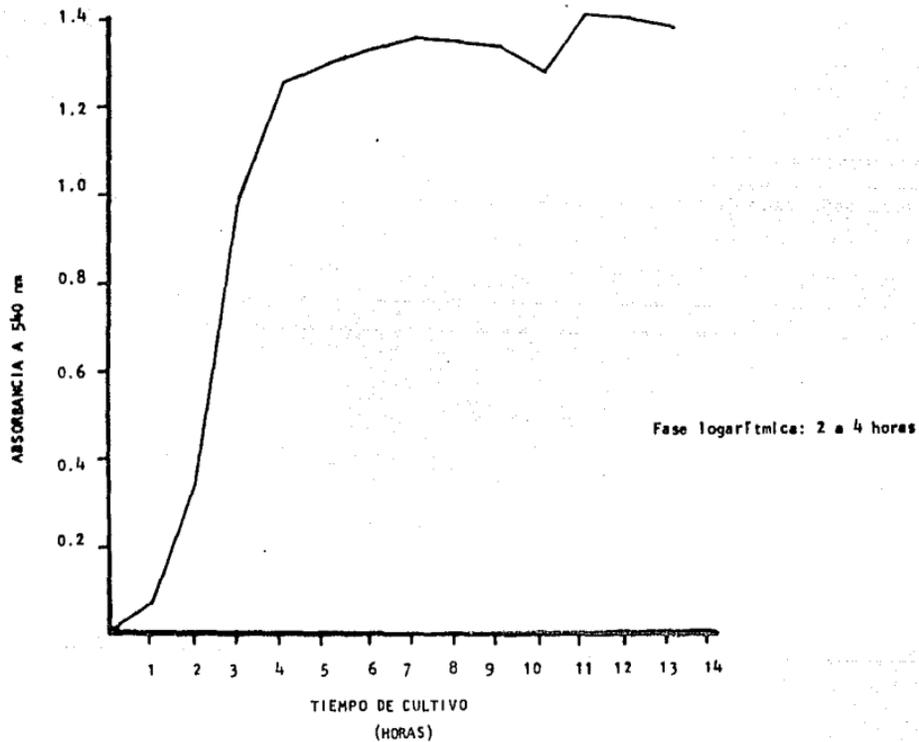


FIGURA 5

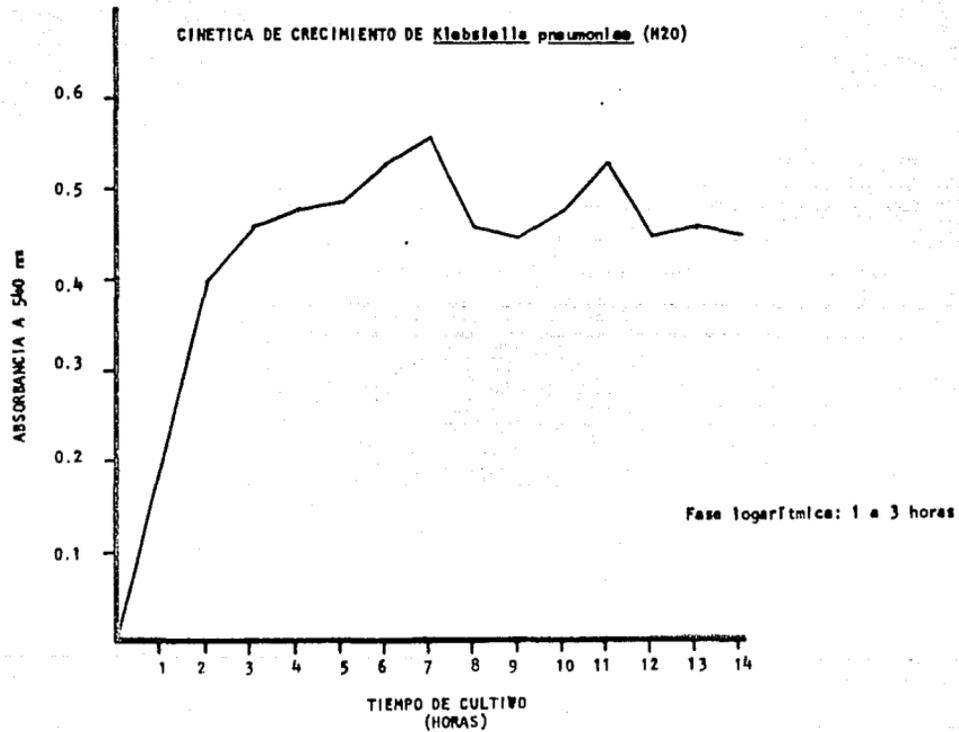


FIGURA 6