

00361

13

221



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROTEINAS INMUNOGENICAS DE
Haemophilus influenzae b.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (Biología)

P R E S E N T A

PATRICIA GOMEZ DE LEON CRUCES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990



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.

INDICE DE CONTENIDO.

	PAGINA
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	42
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA.....	51

INTRODUCCION

EL MICROORGANISMO.

Los miembros del género *Haemophilus* son parásitos estrictos tanto de humanos como de otros vertebrados. Algunas especies tienen un papel patogénico reconocido, el prototipo de ellas es el *Haemophilus influenzae* cuyas cepas pueden estar presentes en las vías respiratorias superiores de individuos de poblaciones sanas del 15 al 50% (Turck 1982).

Pittman en 1931, reportó por primera vez la existencia de cepas capsuladas y no capsuladas e identificó a los seis serotipos de *H. influenzae*, designándolos en base al tipo polisacárido capsular con las letras de la "a" a la "f". Ella observó también que los organismos del serotipo "b", eran la causa más frecuente de enfermedades graves.

Haemophilus influenzae tipo b (Hib), es un cocobacilo inmóvil no esporulado, pleomórfico en sus estadios tardíos de crecimiento. Se le encuentra con mayor frecuencia en la nasofaringe de niños lactantes y menores de seis años. Posee una cápsula constituida por un polímero lineal de ribosil ribitolfosfato (PRP) llamado polisacárido capsular b. Para su crecimiento requiere de un medio complejo que contenga nicotinamida adenina-dinucleótido (factor V) y hemina (factor

X). Comúnmente posee plásmidos de tamaño variable que codifican para B-lactamasas y acetiltransferasas, la frecuencia con que se aíslan estas cepas resistentes a los antibióticos de uso común, ha complicado el tratamiento de las infecciones invasivas causadas por *Hinb* (Solotorovsky y Lynn 1978).

PATOGENESIS DE LA ENFERMEDAD.

La patogénesis de la meningoencefalitis y otras enfermedades causadas por *Hinb*, tales como: epiglotitis, neumonía, otitis media, artritis séptica, celulitis y pericarditis entre otras, es similar a la de otras bacterias capsuladas. Para que la enfermedad meningítica tenga lugar, deben ocurrir una serie de eventos secuenciales (Turk 1982); el proceso se inicia cuando la bacteria se disemina de un individuo a otro, a través de pequeñas gotas de saliva expulsadas durante el estornudo o acceso de tos del enfermo o portador asintomático (Halsey y cols. 1980; Turck 1982). Enseguida y previo a la invasión de los tejidos del huésped, se presenta el proceso de colonización, a este respecto, se ha demostrado tanto en animales de laboratorio como en humanos (Moxon 1982) que los serotipos capsulados de *H. influenzae* pueden colonizar la nasofaringe y persistir ahí por varias semanas. A pesar de que en algunas cepas de *Hin* la presencia de cápsula está asociada con su sobrevivencia en epitelios mucosos, aún no

se ha comprobado que ésta, tenga algún papel en los mecanismos de patogenicidad (Lampe y cols. 1982).

La siguiente fase en la evolución de la enfermedad implica la invasión bacteriana del torrente sanguíneo, conocido como bacteremia. Varios informes sobre estudios hechos con animales coinciden en que existe una relación estrecha entre el tamaño del inóculo y la bacteremia. Animales inmunizados pasivamente con anticuerpos anticapsulares, son protegidos en contra de la invasión sanguínea (Weller y cols. 1978; Siber y cols. 1980). Con estos modelos experimentales, se determinó que la bacteremia sostenida después de la colonización nasofaríngea solamente ocurre con cepas de *Haemophilus* que elaboran cápsula tipo b, en contraste con lo que ocurre con los serotipos heterólogos (a, c, d, e y f), los cuales son incapaces de sobrevivir e invadir al torrente sanguíneo.

Varios autores coinciden en que la infección por Hib, ocurre por vía sanguínea y que la magnitud de la bacteremia es una condicionante previa a la invasión del sistema nervioso central (SNC) (Moxon y Murphy 1978; Moxon y cols. 1980; Smith 1982). El hecho de que los primeros hallazgos histopatológicos en el proceso de la inflamación meníngea, se observen en regiones no contiguas a la nasofaringe, apoya la idea de que la diseminación de este organismo, es por vía hemática. Los factores relativos al

huésped (edad, estado inmune, sexo, estado nutricional, etc.), influyen en la ocurrencia e intensidad de la bacteremia modificando la probabilidad de que se produzca o no la meningitis. Específicamente la inmunización pasiva y/o activa, facilitan la eliminación de las bacterias en el torrente sanguíneo y como consecuencia reducen la posibilidad de la adquisición de una meningitis.

Otro componente superficial bacteriano, el lipopolisacárido (LPS) de Hib, puede ser importante en la patogénesis de la enfermedad meningítica, ya que experimentalmente se ha observado la producción de inflamación meníngea después de la inoculación de este componente (Syrogiannopoulos y cols. 1988).

La estructura patogénica más relevante de Hib es el polisacárido capsular, el cual actúa como un "escudo" en contra de las proteínas del complemento. En contraste con la actividad lítica del complemento hacia los otros cinco serotipos capsulares de Hib, el serotipo b requiere de anticuerpos específicos para iniciar las actividades de protección mediadas por el complemento (Crosson y cols. 1976; Barra y cols 1988). El papel que puedan jugar las proteínas de las membranas de la pared celular (PME) como estructuras importantes en la patogenicidad de *H. influenzae*, no ha sido esclarecido todavía (Robbins y cols. 1981; Grannoff y Weinberg 1988; Musser y cols. 1985).

Hay evidencias experimentales, de que las fimbrias capacitan al microorganismo para adherirse a las superficies mucosas del huésped (Guerina y cols.1982; Pichichero y cols. 1982; Apicella y cols.1984), pero el papel de esta estructura en la invasión del torrente sanguíneo no ha sido determinado.

H. influenzae, así como otras bacterias invasivas del tracto respiratorio, producen proteinasas que degradan IgA. Su sustrato es la inmunoglobulina humana IgA subclase 1. Esta enzima, rompe una secuencia específica de aminoácidos de la región bisagra del anticuerpo, lo que posiblemente bloquea los mecanismos locales de inmunidad específica del huésped, facilitando la penetración de la bacteria a los tejidos (Bricker y cols.1983).

Estudios sobre prevalencia de la resistencia de *H. influenzae* a los agentes antimicrobianos de mayor uso en México, (Guiscafré y cols.1981; Trejo y cols.1981; Conde y Calderón 1988), muestran que en los últimos años se han seleccionado cepas resistentes a los mismos. Los mecanismos de resistencia a los antibióticos en este patógeno se han relacionado con la presencia de plásmidos. Se ha propuesto que estos plásmidos se transfieren entre cepa y cepa mediante mecanismos de transformación y de transducción. El determinante genético involucrado en la resistencia a las penicilinas es el transposón Tn1, que codifica para una betalactamasa, enzima

que rompe al anillo betalactámico de las penicilinas. La resistencia al cloranfenicol está dada por la enzima acetiltransferasa (Smith y Kelsey 1987), al trimetoprim, está mediada por la dihidroxifolato reductasa (de Groot y cols.1988).

FACTORES EPIDEMIOLOGICOS.

La epidemiología de las enfermedades causadas por *H. influenzae* es de gran relevancia en el ámbito de la salud pública mundial. En México, no se dispone de la información adecuada sobre tasas de morbilidad por enfermedades producidas por *H. influenzae*. Existen reportes sobre la frecuencia de casos de meningocefalitis bacteriana purulenta en niños hospitalizados menores de 5 años, que indican que *H. influenzae* se presenta con una frecuencia de cerca del 30% en relación con otros agentes etiológicos bacterianos (Calderón y cols.1985; Arredondo y cols.1987; González y cols.1988; López y cols. 1990). Molinari (1970) reportó que *H. influenzae* b fué la primera causa de meningocefalitis purulenta, durante un año de estudio. La mortalidad de niños con meningocefalitis por *H. influenzae* internados en hospitales pediátricos de la ciudad de México es del 7% (Mascareñas, datos no publicados). A pesar de que la mortalidad ha disminuido por el tratamiento adecuado y oportuno con antimicrobianos, del 35 al 50% de los pacientes que se recuperan, sufren serias secuelas neurológicas resultantes de

la meningitis, entre las más comunes están el retraso mental y del desarrollo, ceguera, sordera, hidrocefalia, parálisis espástica y ataxia entre otras (Sell y cols.1972; Muñoz y cols.1978; Bonadio 1987).

Haemophilus influenzae es el agente causal de 20,000 casos de meningoencefalitis por año en los Estados Unidos y 5,000 casos de otras enfermedades invasivas y bacteremia sin foco séptico (Fraser 1982). Estudios prospectivos recientes basados en la sobrevivencia de la población afectada, denotan que 1 de cada 200 niños, tiene la probabilidad de adquirir alguna enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* antes de cumplir los 5 años (Centers for Disease Control,1985). La tasa anual para meningoencefalitis en ese país , es de 50 casos por cada 100,000 habitantes, de los cuales la mayoría corresponden a niños menores de 5 años. Turck, (1982) ha reportado que de la población de adultos sanos en los E.U.A., un 2 a 4% son portadores de *H.influenzae* en el tracto respiratorio superior.

Existen diversas publicaciones, que han enfocado sus estudios sobre los factores de riesgo. En la mayoría de ellas se establece que la edad, es un factor importante que influye sobre la ocurrencia de la infección meningítica por Hib (Fraser y cols.1973), el grupo más afectado es el que comprende a niños de seis a once meses de edad, en contraste con el 75% de casos de otras enfermedades invasivas por Hib,

que corresponde a niños menores de veinticuatro meses (Granoff y Munson 1986). Existen otros factores del huésped que favorecen la enfermedad como los genéticos, el estado inmune, el estado nutricional, el sexo, etc. (Feldman y cols. 1976; Warren y Tyler 1979).

CONTROL DE LA ENFERMEDAD.

Actualmente, existen dos vacunas para la prevención de las enfermedades invasivas causadas por *H. influenzae*, sin embargo ninguna de ellas protege a los niños menores de 24 meses, período de edad donde es mayor el riesgo (Anderson y cols. 1972; Granoff y Munson 1986; Harrison y cols. 1989).

La primera vacuna está constituida por el polisacárido capsular tipo b y fué evaluada inicialmente en niños finlandeses (Peltola y cols. 1984). Esta vacuna es inmunogénica cuando se administra a niños mayores de 2 años, sin embargo los menores de esta edad no responden eficientemente con títulos protectores de anticuerpos contra el poliribosilribitol- fosfato (PRP) (Granoff y Munson 1986; Insel y cols. 1987). Por lo tanto, se intentó la evaluación de otra vacuna, la cual consiste del polisacárido capsular de Hibn acoplado al toxoide diftérico. Este complejo tampoco resultó efectivo ya que no protege a niños menores de 18 meses (Shneerson y cols. 1984; Centers for Disease Control 1985; Granoff y Munson 1987). Además, un estudio sobre casos

de epiglotitis entre niños vacunados y no vacunados, mostró una mayor proporción de pacientes con epiglotitis por Hib en los niños vacunados (Marchant y cols.1989; Heterington 1989).

Al parecer, la inmunidad protectora en contra de las enfermedades por Hib, está mediada en gran parte por anticuerpos anticapsulares, estos poseen in vitro actividad opsonizante y bactericida mediada por el complemento, y previenen de infecciones experimentales (Schneerson y cols. 1980 y 1984; Käythy y cols.1983; Musher y cols.1986).

En virtud de que los resultados obtenidos con la aplicación de estas vacunas en niños menores de 24 meses no han sido satisfactorios, prevalece la necesidad de investigar otras estructuras antigénicas de este microorganismo, como posibles candidatos para inducir respuestas protectoras.

Los antígenos superficiales no capsulares de Hib que pudieran considerarse como candidatos para la elaboración de vacunas son: los lipopolosacáridos (LPS), las fimbrias y las proteínas que se encuentran en la membrana externa de este patógeno. Se conoce relativamente poco acerca de la estructura antigénica y del potencial inmunogénico del LPS y de las fimbrias de Hib (Anderson y cols.1972; Apicella y cols.1984; van Ham y cols.1989). Recientemente se está investigando a dichas proteínas sobre su utilidad como marcadores epidemiológicos (Loeb y Smith 1982; Takala y cols. 1989) y su posible inmunogenicidad tanto en animales como en

humanos (Lam y cols.1980; Hansen y cols. 1982; Gulig y cols.1984; Kimura y cols. 1985; Takala y cols. 1989).

Evidencias obtenidas a partir de estudios hechos con sueros humanos (Anderson y cols.1972) y de animales de laboratorio (Granoff y Rockwell 1978), han indicado que los anticuerpos específicos en contra de componentes superficiales no capsulares de *Hinb*, parecen tener un papel importante en la inmunidad humoral en contra de la enfermedad sistémica por *Hinb*. Antisuero tanto de conejos, ratas y ratones como de humanos, preadsorbidos con PRP y/o LPS, no pierden su capacidad de eliminar a la bacteria en sangre, mediante mecanismos opsonizante y bactericida (Hansen y cols.1982; Granoff 1987). Anticuerpos monoclonales obtenidos en animales y dirigidos hacia las proteínas de membrana externa (PME) de *Hinb*, demostraron actividad protectora en el modelo experimental de ratas lactantes (Hansen y cols.1981).

Otros estudios experimentales han demostrado que las proteínas de membrana externa de *Hinb*, a diferencia de las de membrana interna, inducen un estado de protección más eficiente contra el reto de 500 X DL 50 del microorganismo virulento (Lam y cols.1980). Granoff y Munson (1986), aislaron una proteína de 43 kDa, que protegió animales lactantes contra bacteremia por *Hinb*. Otros investigadores han obtenido los mismos resultados contra una PME con peso molecular de 98 kDa (Munson y cols.1983).

Sueros de humanos preadsorbidos con PME pierden la capacidad de fijación de C3, la cual reside en la fracción IgG del suero, se concluye por lo tanto de estos resultados que las opsoninas predominantes en estos sueros, son anticuerpos dirigidos en contra de las PME (Heterington y cols.1989).

Actualmente no se dispone de un agente biológico eficaz para la protección de la población infantil más susceptible a la enfermedad meningítica por Hib. Si consideramos que la frecuencia de este padecimiento es muy alta y que el número de secuelas neurológicas resultantes es significativo, además de tomar en cuenta el aumento de cepas resistentes a los antimicrobianos, el desarrollo de nuevas vacunas sigue aun siendo el objetivo de investigaciones tendientes a lograr un antígeno adecuado para ser utilizado en la inmunoprofilaxis de esta enfermedad fatal e incapacitante.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo consistió en la identificación de las proteínas de membrana externa de *Haemophilus influenzae* b, que son reconocidas con una mayor frecuencia por anticuerpos IgG de niños con meningoencefalitis producida por este microorganismo, con el propósito de contar con la información preliminar que contribuya a la elaboración de nuevas vacunas o reactivos de diagnóstico.

Los objetivos específicos fueron:

- Establecer el patrón electroforético de las PME de cepas de Hinf, para su comparación como cepas de referencia, con los perfiles electroforéticos de cepas prevalentes en la población de niños mexicanos.
- Identificar a las PME de Hinf que son reconocidas con una mayor frecuencia por los anticuerpos IgG, presentes en los sueros de niños sin antecedentes de meningoencefalitis.
- Contar con la información inicial que contribuya a la elaboración de mejores vacunas en contra de Hinf.
- Identificar la antigenicidad de dichas proteínas para

su posible utilización en procedimientos específicos
de diagnóstico de enfermedades invasivas por Hib.

MATERIAL Y METODOS.

CEPAS BACTERIANAS.

Se emplearon dos cepas bacterianas de *Haemophilus influenzae* serotipo b: HU y H2, ambas se aislaron del líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningoencefalitis. La primera fue donada por la Dra Celia Alpuche del Hospital infantil de México "Federico Gómez", la segunda procede de la colección de cepas aisladas en el Hospital Raritan Valley, Greenbrook N. J., E.U.A., misma que se utilizó como cepa de referencia.

Las cepas bacterianas se conservaron liofilizadas en leche descremada estéril al 20 % ó en glicerol al 20 % y se almacenaron a - 70° C hasta el momento de su uso.

PRUEBAS DE IDENTIFICACION.

Los criterios que se tomaron para determinar la identidad del microorganismo fueron: i) tinción de Gram, ii) requerimientos nutricionales de los factores de crecimiento: nicotinamida adenina-dinucleótido (factor V) y hemina (factor X) iii) serotipificación con antisuero b específico (Difco) iv) producción de ornitina descarboxilasa e indol, ambas pruebas se verificaron en medio MIO al cual se

le añadió líquido de Fildes al 3 % (Fildes, 1920), la ornitina se apreció por el vire del indicador a un color púrpura y la producción de indol se detectó añadiendo unas gotas de reactivo de Kovacs y la producción de ureasa se detectó en el medio caldo urea, enriquecido con líquido de Fildes.

AISLAMIENTO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE PARED CELULAR (PME).

Las cepas liofilizadas o conservadas en glicerol, se sembraron sobre placas frescas conteniendo gelosa infusión de cerebro corazón (agar BHI-Bioxon), suplementado con líquido de Fildes al 5% y se incubaron a 37 °C durante 18 h. Para la obtención de la biomasa celular bacteriana se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 250 ml de caldo infusión cerebro-corazón (BHI-Bioxon) suplementado con líquido de Fildes al 5 % (Fildes 1920), los matraces se inocularon con un volumen del 2 % de una suspensión bacteriana crecida previamente durante 16 horas en el mismo medio líquido y se incubaron con agitación a 37 °C durante 12 h. Una vez que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento logarítmico tardío, las células se cosecharon en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B a 11,000 x g durante 10 min. Los paquetes celulares se resuspendieron y se centrifugaron dos veces con amortiguador de Tris 0.01M, pH 7.5 para su lavado. Se almacenaron en congelación a -70°C.

La membrana externa de la pared celular, se aisló empleando el método de Yamato y cols. (1975). Las células se descongelaron y se resuspendieron en 30 ml de Tris 0.01M, pH 7.5, se sonicaron a 4°C durante 5 periodos de 15 seg, a 100W. Este material se centrifugó a 25,000 x g durante 20 min, el sobrenadante se decantó y se tomaron muestras alicuotas de 8.5 ml que se colocaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa conteniendo 7 ml de sacarosa al 15 % (p/v) en Tris 0.01M-EDTA 0.01M, pH 7.5 y un colchón en el fondo de 4 ml de sacarosa al 70 % (p/v) en Tris 0.01M-EDTA 0.01M, pH 7.5. El gradiente de sacarosa se centrifugó a 60,000 x g durante 6 h, en una ultracentrifuga Beckman L5-50E a 4 C . La fracción membranal ubicada en la interfase, se colectó y se le denominó fracción de membrana total (FMT). La FMT se resuspendió y se dializó contra Tris 0.01M pH 7.5 durante 24 h. Posteriormente, se centrifugó a 65,000 x g durante 60 min. El sedimento se resuspendió en 6 ml y este volumen se aplicó a un gradiente discontinuo de sacarosa conteniendo 2.5 ml de sacarosa al 15 % (p/v), 7.5 ml de sacarosa al 50 % (p/v) y 3.5 ml de sacarosa al 70 % en el mismo amortiguador de Tris-EDTA. Se centrifugó a 20,000 x g durante 14 h, la fracción situada en la interfase entre el 50 y el 70 % de sacarosa, rica en proteínas de membrana externa se dializó contra Tris 0.01M-EDTA 0.01M durante 36 h. Las muestras se liofilizaron y se almacenaron a -70 °C.

La concentración de proteínas de la fracción PME, se

determinó por el método de Lowry y cols. (1951). Como estándar se usó albúmina bovina (Sigma).

EXTRACCION DEL LIPOPOLISACARIDO (LPS).

Para obtener el LPS de *H. influenzae* b HU, se usó el método de Westphal (Kwapinski, 1972). La masa bacteriana crecida en medio líquido durante 12 h a 37 °C, se cosechó por centrifugación y se resuspendió en 20 ml de agua bidestilada. Se añadieron 32 ml de fenol al 95% (Merck) (previamente licuado con calor), esta mezcla se incubó en baño de agua con agitación durante 30 min a 68 °C, después se centrifugó a 3,000 x g durante 15 min; el sobrenadante se decantó y el sedimento se lavó con 20 ml de agua bidestilada. La parte acuosa se mezcló con el primer sobrenadante y se dializó durante dos días contra agua corriente y durante un día contra agua destilada para eliminar el fenol residual. Después, se centrifugó a 6,000 x g durante 15 min, el volumen del sobrenadante se redujo hasta 20 ml mediante liofilización y se le agregó un volumen igual de alcohol etílico frío. El precipitado formado se separó por centrifugación a 6,000 rpm durante 15 min y al sobrenadante se le añadieron 5 volúmenes más de alcohol etílico frío. El lipopolisacárido se sedimentó por centrifugación a 7,000 rpm durante 15 min, se resuspendió en agua bidestilada, se liofilizó y se almacenó a 4 C hasta su uso.

SUEROS PROBLEMA.

Con la finalidad de identificar a las PME de *Haemophilus influenzae* b cepa HU, que son reconocidas por anticuerpos IgG de niños enfermos, se estudiaron mediante inmunolectrotransferencia 16 sueros de pacientes entre 5 meses y 10 años de edad internados en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", a causa de meningoencefalitis por *Haemophilus influenzae* tipo b. En todos los casos el diagnóstico de la enfermedad se confirmó por coagulación positiva mediante la prueba de Latex y por cultivo a partir de líquido cefalorraquídeo. De los casos confirmados por cultivo y serología positivos, se obtuvieron los sueros a partir de muestras de sangre.

De estos sueros, 9 de ellos fueron obtenidos durante la fase aguda de la enfermedad, (los primeros 15 días). Los restantes se obtuvieron de niños convalecientes y se tomaron entre los días 30 y 40, después del inicio de los síntomas. Todos los sueros se mantuvieron a -70°C , hasta el momento de su uso.

SUEROS TESTIGO.

Se incluyeron en este grupo, sueros de 20 niños entre 3 meses y 8 años de edad, sin antecedentes de

meningoencefalitis , internados por problemas quirúrgicos o por otras causas no infecciosas. Estos sueros se almacenaron en congelación hasta su uso.

SUEROS DE RATON.

Un grupo de 6 ratones blancos suizos de la cepa CD-1, con peso de 25 g \pm 2 g, se inmunizaron por vía subcutánea cada 7 días durante 4 semanas con 50 μ g de LPS de Hib cepa HU, resuspendidos en solución salina fisiológica de NaCl 0.15M, cada 7 días durante 4 semanas, siete días después de la última inmunización los ratones se sangraron por punción cardíaca y el suero obtenido, se almacenó a -70 C.

ELECTROFORESIS.

Las PME de ambas cepas de Hib, se separaron por electroforesis según el método de Laemmli (1970), usando poliacrilamida al 3 %, pH 8.0 en el gel concentrador y al 10 %, pH 6.8 en el gel separador. Estos geles se prepararon a partir de una solución madre conteniendo poliacrilamida al 30 % y N,N-bis-metilenacrilamida al 0.8 %. Las concentraciones finales de N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) fueron 0.03 % en el gel separador y 0.3 % en el gel concentrador. Las muestras proteicas se resuspendieron en un amortiguador de solubilización conteniendo 0.06 ml de azul de bromofenol, 0.3 ml de de amortiguador Tris 0.5M, pH 6.8, 0.6 ml de

glicerol al 50 % y 0.6 ml de SDS al 10 %. Después de añadir a este amortiguador concentraciones de 50 ó 600 ug de proteína, las muestras se calentaron a ebullición durante 5 min. Los estándares de peso molecular que se corrieron en cada gel paralelamente con las PME, fueron:

o lactalbúmina de leche bovina (14.2 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), albúmina bovina (66 kDa) y fosforilasa b (97.4 kDa). Las proteínas se sometieron a electroforesis aplicando al gel un voltaje constante de 100 v durante 2.5 h. Un segmento del gel se tiñó con solución de azul de Coomassie al 0.05% en ácido acético glacial para determinar la eficiencia de la separación, mientras que el resto del gel se sometió a inmunoelectrotransferencia.

Los pesos moleculares de las PME de ambas cepas de H. influenzae b, se determinaron interpolando sus movilidades relativas (Rf) en una curva previamente elaborada para los estándares, en la que se graficaron los valores Rf de cada uno de ellos en contra de su peso molecular conocido, en donde:

Distancia entre la parte superior del gel y la banda.

Rf= -----

Distancia de la parte superior del gel al frente de azul de bromofenol.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Para la electrotransferencia de los antígenos protéicos (PME) de Hib cepa HU, se siguió el método de Towbin y cols. (1979).

Antes de iniciar el procedimiento, el gel y el papel de nitrocelulosa (0.45 µg de poro, Bio-Rad Laboratories.) se sumergieron durante diez minutos en el amortiguador de transferencia que contenía :Tris 4.5 g, glicina 23 g, metanol 120 ml y 600 ml de agua bidestilada. Posteriormente se ensamblaron el gel y el papel de nitrocelulosa entre dos papeles filtro, y se acomodaron en una cámara de transferencia (Hoeffer Scientific Instruments), de tal forma que el gel quedara orientado hacia el ánodo. La transferencia se realizó en presencia del mismo amortiguador durante 1 hora y media, aplicando una corriente de 65 mA/cm.

Después de la transferencia, el gel se separó y se tiñó con azul de Coomassie como se describió arriba, el papel de nitrocelulosa se incubó durante tres horas en Tris-HCl 0.01M y NaCl 0.15M (TBS) conteniendo leche descremada al 4 % para bloquear y 0.02% de nitrato de sodio (azida de sodio). Para determinar la fidelidad de la transferencia de las proteínas, se tiñeron tiras de nitrocelulosa sin bloquear, con: amido negro al 0.5 % en metanol, ácido acético glacial y agua destilada 5:1:5, después de 3 min, se destiñeron con una solución conteniendo metanol, ácido acético glacial y agua

bidestilada 20:90:100.

Para la detección inmunológica de las proteínas en el papel de nitrocelulosa (no bloqueado ni teñido), las tiras se lavaron con amortiguador TBS y se incubaron durante dos horas en presencia del suero de pacientes, diluido 1:50 en amortiguador TBS conteniendo leche descremada al 5% . Enseguida se lavaron durante 5 min, para posteriormente incubar por 2 h en presencia del conjugado de peroxidasa a IgG de cabra anti-IgG humana (BioRad), en una dilución 1:1500 en el mismo amortiguador TBS. Después de la incubación con el segundo anticuerpo, las tiras se lavaron 3 veces durante 10 min en TBS y un lavado con amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 6.8 (TB) durante 5 min. Para demostrar la formación de complejos inmunes, se agregó el sustrato de la peroxidasa, el 4-cloro-1 naftol (Sigma Chem. Lab.) al 0.3 % en 1 volumen de metanol, 4 volúmenes de AT y H₂O₂ al 30 % y se esperó hasta que aparecieran las bandas. Las proteínas del gel, se correlacionaron con las transferidas al papel de nitrocelulosa y se determinaron los pesos moleculares de las PME reconocidas como antígenos por los anticuerpos presentes en los sueros probados.

Con la finalidad de determinar la presencia de LPS bacteriano que pudiera copurificarse con las proteínas de membrana externa, los preparaciones protéicas se sometieron a una electroforesis y se probaron por

inmunolectrotransferencia con sueros de ratones hiperinmunizados con LPS de la cepa HU de Hib en diluciones 1:50, para estos ensayos se utilizó suero de conejo anti IgG de ratón (Sigma), en diluciones 1:1000.

INMUNODIFUSION.

Con la finalidad de determinar la presencia de anticuerpos séricos producidos en ratón CD-1 hacia el LPS de H. influenzae cepa HU, el suero de los animales inmunizados como se describió antes, se sometió a inmunodifusión en gel de acuerdo con el método de Duchterlony (1972).

El gel se preparó con agarosa al 1% en amortiguador de fosfatos 0.05M, pH 6.8 conteniendo NaCl 0.02M y Mertiolate al 0.01%. Se prepararon geles de aproximadamente 2 mm de grosor sobre portaobjetos, con un sacabocados se hicieron orificios de 3 mm de diámetro. A cada pozo se añadieron muestras alícuotas de 25 µl. El antígeno LPS (370 µg) se colocó en los pozos centrales y el suero de ratón anti-LPS o un suero testigo de ratón sin inmunizar, en los pozos periféricos.

El suero sin diluir o sus diluciones hechas en amortiguador de fosfatos 0.05M, pH 6.8 se distribuyeron como se indica en la figura 8. La inmunodifusión se efectuó .

durante 48 h a temperatura ambiente, enseguida se procedió al lavado de los geles en solución salina isotónica al 0.9% durante cuatro días. Después, se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 37°C por 24 h. Finalmente, los geles se tiñeron durante 45 min en una solución de amido negro al 0.1% en ácido acético al 10%. El exceso de colorante se eliminó con un lavado de ácido acético al 10%.

RESULTADOS.

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO.

Las características macroscópicas, microscópicas y serológicas de las cepas HU y H2 utilizadas para este estudio, fueron consistentes con la especie *Haemophilus influenzae* y el serotipo b. En base a las pruebas bioquímicas de identificación, ambas cepas pertenecen al biotipo I descrito por Kilian (1976).

ELECTROFORESIS.

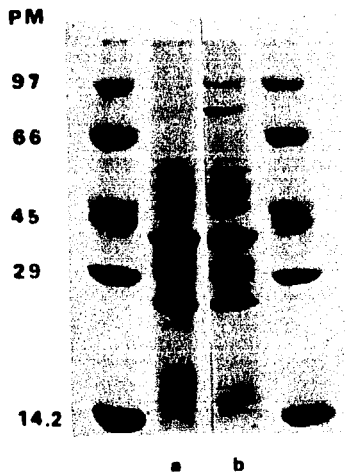
Se realizó el análisis electroforético de las proteínas de membrana externa de las cepas H2 y HU de *Haemophilus influenzae* serotipo b, a cada uno de los geles preparados se añadieron 50 ug de proteína de cada cepa. Se estimaron los pesos moleculares de las bandas más intensas, por comparación de sus movilidades en el gel con las de estándares de peso molecular conocido (Fig 1). Los resultados mostraron 12 bandas de proteína de la cepa H2 y 14 de la cepa HU. Las PME de la cepa HU mostraron un perfil protéico similar al subtipo 1L de acuerdo con el sistema de subclasificación de Barenkamp y cols. (1981), tanto por el patrón evidenciado por las proteínas con pesos moleculares

entre 25 y 40 kDa, como por la presencia de una proteína de 49 kDa. La cepa H2 de referencia mostró un patrón similar al subtipo 1H del mismo sistema de subclasificación para las cepas del serotipo b (Barenkamp y cols. 1981).

Los pesos moleculares de las proteínas de la cepa H2 fueron de 16, 27, 35, 36.5, 39, 43, 47, 49, 52, 57, 79 y 82 kDa, los pesos moleculares de la cepa HU fueron de 16, 27, 28.5, 33, 35, 36.5, 43, 47, 49, 52, 57, 82, 96 y 100 kDa. Los perfiles electroforéticos de ambas cepas mostraron algunas proteínas de más de 100 kDa, aunque estas se encontraban en baja cantidad (Fig 1).

Al comparar el perfil electroforético de las proteínas de ambas cepas, se observó que las bandas de proteína con pesos moleculares de 28.5, 33, 96 y 100 kDa presentes en la cepa HU no estuvieron presentes en la cepa H2. Asimismo, se observó que las bandas de proteína con pesos moleculares de 37 y 79 kDa presentes en la cepa H2 no estaban presentes en la cepa HU. De acuerdo con lo anterior, la cepa HU mostró un 84.6% de homología con respecto a la cepa H2 usada como cepa de referencia (para hacer este cálculo se estimaron las correspondencias entre las bandas de ambas cepas). Las proteínas que se observaron en mayor concentración fueron las de 27 y 43 kDa (Fig 1).

FIGURA 1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRI-
LAMIDA-SDS, DE LAS PME DE LAS CEPAS
H2 Y HU DE Haemophilus influenzae b.



Fotografía de un gel teñido con azul de Coomassie. Se colocaron 50 μ g de proteína (PME) a cada carril. (a) cepa de referencia H2; (b) cepa HU. El peso molecular de los estándares utilizados, se indica con las flechas.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Sueros Problema

Las PME de la cepa HU de *Haemophilus influenzae* b separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa, fueron confrontadas con sueros de pacientes en fase aguda y de convalecientes para analizar cualitativamente la respuesta de anticuerpos hacia esos antígenos. Las bandas de proteínas reconocidas por cada suero, fueron identificadas mediante su comparación con las bandas correspondientes a los antígenos protéicos de la cepa HU, presentes en tiras testigo de papel de nitrocelulosa que se tiñeron con amido negro al 0.5%.

El análisis permitió hacer una estimación cualitativa de la reacción antígeno-anticuerpo, con base en la intensidad de color observada para cada uno de los antígenos sobre las tiras de nitrocelulosa, para ello se dieron valores de cero unidades arbitrarias (UA) en donde no hubo reacción; 1 UA cuando se observó una reacción débil; 2 UA cuando la reacción fué moderada y 3 UA cuando la reacción fué intensa (Figs 3,4 y 6).

Los resultados mostraron heterogeneidad en el

reconocimiento de las PME de paciente a paciente: algunos sueros reaccionaron con pocas moléculas, otros reaccionaron con la mayoría de ellas. De los 16 sueros de pacientes estudiados, 15 tuvieron anticuerpos de la clase IgG detectables en contra de las PME de H.influenzae b y solamente un suero de un paciente en fase aguda resultó ser negativo. Los pesos moleculares de la bandas reconocidas por los pacientes variaron entre 27 kDa y una proteína de 100 kDa.

Los sueros de pacientes en fase aguda de la enfermedad, eran de niños con edades entre 7 meses y diez años, 8 de los 9 sueros probados, tuvieron anticuerpos IgG que reaccionaron con 2 o más proteínas de membrana externa de Hinb; el número de proteínas que los anticuerpos reconocieron varió entre 2 y 9. Los sueros reaccionaron más frecuentemente hacia las proteínas de 27 (88.8%), 36.5 (66.6%), 52 (66.6%) y 96 (66.6%) kDa (el porciento se estimó en base al número se sueros que mostraron respuesta positiva de reconocimiento hacia cada PME, con respecto al número total de sueros de cada grupo estudiado), cuadro 1. No se detectaron reacciones de anticuerpos hacia las proteínas de 28.5, 33, 47 y 100 kDa (cuadro 1). No hubo correlación entre la edad del paciente y el número de proteínas reconocidas, ni con el peso molecular de éstas. La respuesta de anticuerpos con algunos de los sueros obtenidos durante la fase aguda mediante el método de inmunoelectrotransferencia (IET), se muestran en la figura 2.

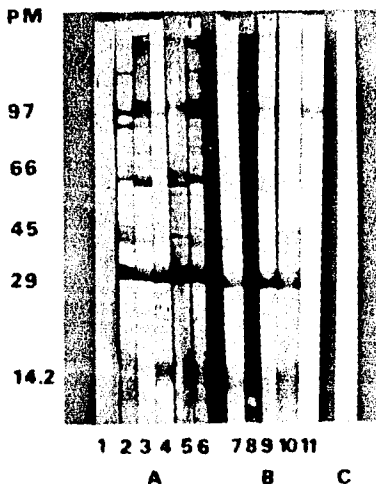
CUADRO 1. ANTICUERPOS DE CLASE IgG PRESENTES EN SUEROS DE NIÑOS CON MENINGOENCEFALITIS POR Hib, QUE REACCIONARON CON PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE H.influenzae b CEPA HU.

PME (kDa)	Número de pacientes fase aguda*		Número de pacientes convalec.*		Número de niños testigo *	
		(%)		(%)		(%)
	a		b		c	
16	0/9	0	0/7	0	0/20	0
27	8/9	88.8	6/7	85.7	10/20	50
28.5	0/9	0	2/7	28.5	0/20	0
33	0/9	0	0/7	0	0/20	0
35	2/9	22.2	4/7	57	0/20	0
36.5	6/9	66.6	3/7	42.8	11/20	55
43	5/9	55	5/7	71.4	1/20	5
47	0/9	0	1/7	14.2	0/20	0
49	2/9	22.2	2/7	28.5	0/20	0
52	6/9	66.6	4/7	57	0/20	0
57	3/9	33.3	5/7	71	7/20	35
82	5/9	55	3/7	42	0/20	0
96	6/9	66.6	7/7	100	3/20	15
100	0/9	0	2/7	28.5	0/20	0
>100	2/9	22.2	4/7	57	0/20	0

* Número de sueros que reaccionaron contra proteínas de membrana externa, sobre el número total de sueros probados para cada grupo.

En el grupo testigo, se incluyeron 20 sueros de niños sin antecedentes de meningoencefalitis.

FIGURA 2. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PME DE Haemophilus influenzae b CEPA HU, EN PRESENCIA DE SUEROS DE PACIENTES CON MENINGITIS.



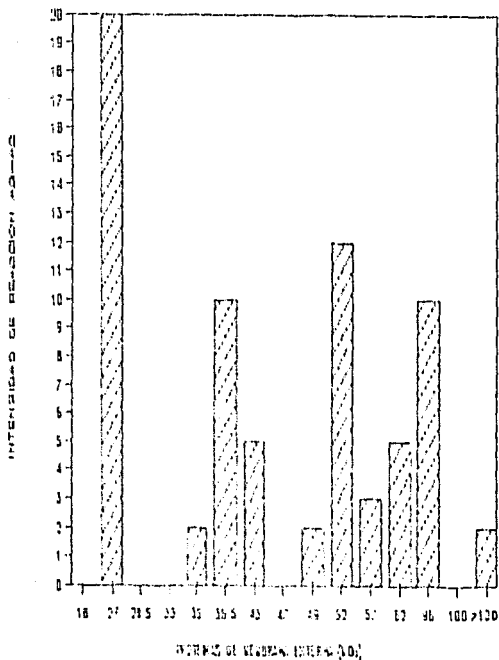
Se muestran las bandas de proteínas reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros estudiados. A) sueros de pacientes en fase aguda (1-6), el suero 1 no mostró reconocimiento de las PME; B) sueros de pacientes en fase convaleciente (7-11); C) con el propósito de verificar la ausencia de LPS en las PME transferidas, se incluyó este control con suero de ratón hiperinmune anti-LPS, bajo estas condiciones no se detectó contaminación con LPS.

La concentración de IgG en los sueros probados se estimó cualitativamente en función de la intensidad de color debida a la concentración de los reactantes (antígeno-anticuerpo) en el papel de nitrocelulosa. La figura 3 muestra que la reacción antígeno anticuerpo fué más intensa para las bandas de: 27, 36.5, 52 y 96 kDa. La proteína de 27 kDa fué la que tuvo la mayor intensidad de reacción con un valor de 20 unidades arbitrarias (UA), seguida de las de 52 kDa y 36.6 kDa con 12 UA y finalmente la de 96 kDa con 10 UA.

Todos los sueros de pacientes convalecientes cuyas edades oscilaron entre 5 meses y 10 años, tuvieron anticuerpos IgG dirigidos en contra de varias proteínas de membrana externa de Hib. El número de proteínas reconocidas por suero, varió entre 3 y 10. La respuesta fué muy diversa entre suero y suero, sin embargo, los sueros reaccionaron más frecuentemente hacia las proteínas de 27 (85.7%), 43 (71.4%), 57(71%) y 96 kDa (100%). No se detectaron respuestas de anticuerpos hacia las proteínas de 16 y 33 kDa (Cuadro 1). En estos sueros tampoco hubo una correlación entre la edad de los pacientes y el número de proteínas reconocidas, ni el peso molecular de las mismas. La respuesta de anticuerpos IgG presentes en algunos de los sueros convalecientes estudiados que reaccionaron con PME, se muestra en la figura 2.

Las proteínas que reaccionaron con mayor intensidad

FIGURA 3. ESTIMACION CUALITATIVA DE LA INTENSIDAD DE LA REACCION ANTIGENO (PME)-ANTICUERPO (IgG), MOSTRADA POR LOS SUEROS DE LOS PACIENTES EN FASE AGUDA DE LA ENFERMEDAD



Se graficaron valores arbitrarios* de acuerdo con las intensidades de reacción Ag-Ac observadas en el papel de nitrocelulosa (PME-IgG humana]-anti IgG humana peroxidada), para cada una de las FME, en presencia de los sueros de niños en fase aguda.

* Los valores arbitrarios son una estimación aproximada de la concentración de anticuerpos presentes en los sueros de los niños (se asignaron valores de 0 en donde no hubo reacción; 1 cuando se observó una reacción débil; 2 cuando la reacción fué moderada; 3 cuando la reacción fué intensa).

con los sueros convalecientes, fueron las de 27, 52 y 96 kDa (Fig 4).

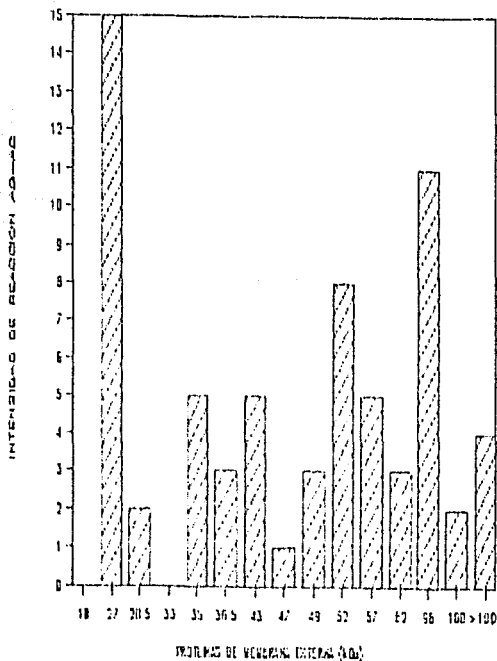
Comparativamente con los sueros de pacientes en fase aguda, los sueros de pacientes convalecientes presentaron respuestas de mayor frecuencia hacia las proteínas de 28.5, 35, 43, 47, 49, 57, 96, 100 y hacia una proteína de más de 100 kDa. Las PME de 28.5, 47 y 100 kDa, reaccionaron exclusivamente con los sueros de pacientes convalecientes. En contraste los sueros de pacientes en fase aguda respondieron con una mayor frecuencia hacia una proteína de 36.5 kDa. Ninguno de los sueros probados reaccionó con la proteína de 33 kDa.

Sueros Testigo:

En este estudio, se examinó la reacción hacia las PME de H1N1 cepa HU con 20 sueros de niños sanos. Los resultados mostraron también heterogeneidad en el reconocimiento de las PME entre los sueros testigo. De los 20 sueros probados, 18 tuvieron anticuerpos IgG detectables contra las proteínas de H. influenzae b.

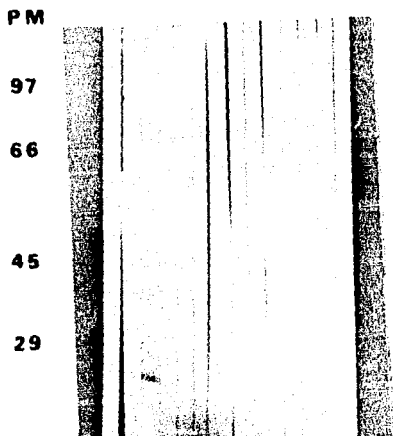
La respuesta de anticuerpos IgG de sueros de niños con edades entre 6 meses y 8 años, estuvo dirigida hacia las bandas antigénicas de 27, 36.5, 43, 57 y 96 kDa (fig 5). Los antígenos que fueron reconocidos con mayor frecuencia fueron

FIGURA 4. ESTIMACION CUALITATIVA DE LA INTENSIDAD DE LA REACCION ANTIGENO (PME)-ANTICUERPO (IgG), MOS - TRADA POR LOS SUEROS DE PACIENTES CONVALESCIENTES.



Se graficaron valores arbitrarios* de acuerdo con las intensidades de reacción Ag-Ac observadas en el papel de nitrocelulosa (C PME-IgG humana-anti-IgG humana peroxidada), para cada una de las PME, en presencia de los sueros de pacientes convalécientes. * Los valores arbitrarios son una estimación aproximada de la concentración de anticuerpos presentes en el suero de los pacientes convalécientes (se designaron valores de 0 en donde no hubo reacción; 1 cuando se observó una reacción débil; 2 cuando la reacción fué moderada; 3 cuando la reacción fué intensa).

FIGURA 5. INMUNELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PME DE Haemophilus influenzae b CEPA HU, EN PRESENCIA DE SUEROS DE NIÑOS TESTIGO.

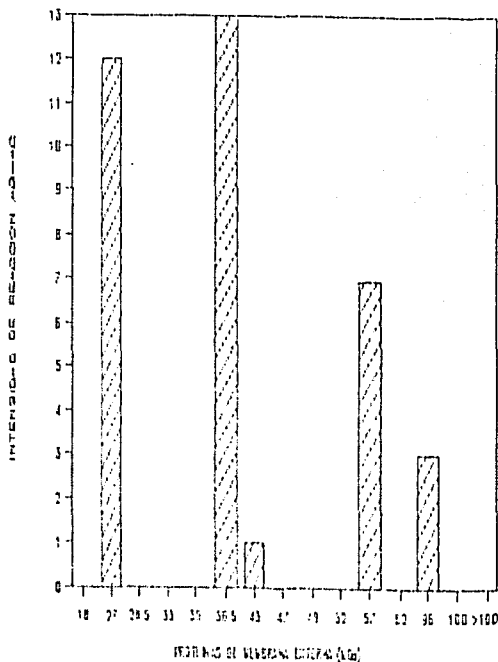


La fotografía muestra las bandas de proteína reconocidas por los anticuerpos de clase IgG, presentes en 14 de los 20 sueros del grupo **testigo**. Los pesos moleculares de los estándares se muestran a la izquierda.

las proteínas de 27 y 36 kDa, no hubo reconocimiento hacia el resto de las proteínas. El número de proteínas por cada suero hacia las que los anticuerpos reaccionaron, osciló entre 1 y 3. La mayoría de los sueros respondieron con una frecuencia del 55% o menor (cuadro 1). La respuesta de anticuerpos IgG en estos sueros presentó cierta correlación con la edad, todos los niños de 2 años y menores presentaron una respuesta de anticuerpos hacia las proteínas de 27 y 36.5 kDa. Los antígenos que presentaron una mayor intensidad de reacción con los sueros testigo fueron también las de 27 y 36.5 kDa (figura 6).

Hay que hacer notar que un 50% de los sueros de niños testigo, reconocieron a la PME de 27 kDa, que comparándolo con el reconocimiento por los sueros de pacientes en fase aguda y sueros controles, fué mayor en estos últimos con 88.8 % y 85.7% respectivamente (figura 7 y cuadro 1). En este mismo sentido, el 55% de los niños testigo reconoció a la PME de 36.5 contra un 66.6% y un 42.8% de los sueros de pacientes en fase aguda y de pacientes convalecientes respectivamente. Finalmente la proteína de 57 kDa, también fué reconocida por los sueros de niños testigo con un 35% y por los sueros de convalecientes en un 75% (figura 7).

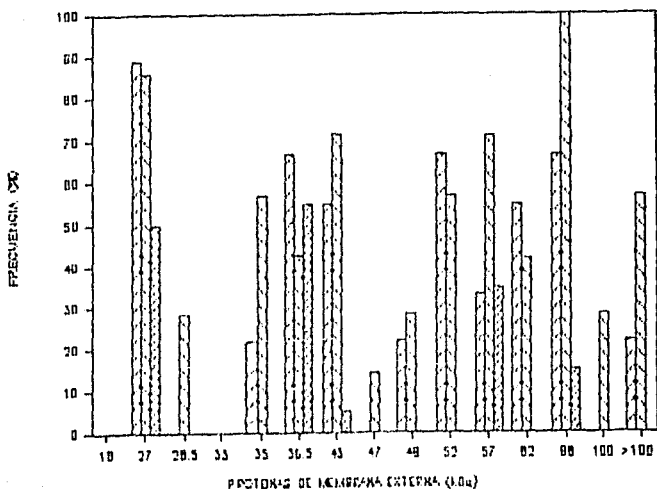
FIGURA 6. ESTIMACION CUALITATIVA DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN ANTIGENO (PME)-ANTICUERPO (IgG), MOSTRADA POR SUEROS DE NIÑOS TESTIGO.



Se graficaron valores arbitrarios* de acuerdo con las intensidades de reacción Ag-Ab observadas en el papel de nitrocelulosa [PME-IgG humana]-anti-IgG humana peroxidada), para cada una de las PME, en presencia de los sueros de niños testigo.

* Los valores arbitrarios son una estimación aproximada la concentración de anticuerpos IgG presentes en los sueros de los niños testigo (se asignaron valores de 0 en donde no hubo reacción; 1 cuando se observó una reacción débil; 2 cuando la reacción fué moderada; 3 cuando la reacción fué intensa).

FIGURA 7. PORCIENTO DE LA RESPUESTA DE RECONOCIMIENTO DE LAS PME DE HINB CEPA HU, POR ANTICUERPOS IgG PRESENTES EN LOS SUEROS DE NIÑOS ENFERMOS Y SANOS.

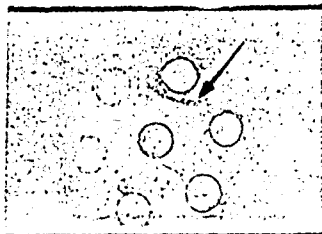


Porcentaje de reconocimiento de las PME en función de su peso molecular. ▨ sueros de pacientes en fase aguda probados; ▩ sueros de pacientes convalecientes; ▤ sueros de niños del grupo testigo.

INMUNODIFUSION.

Las pruebas de inmunodifusión efectuadas para descartar la posible contaminación de LPS en las PME, mismas que se realizaron con anticuerpos anti-lipopolisacárido producidos en ratón de la cepa CD-1, evidenciaron solo una banda definida de precipitación entre la preparación antigénica de LPS de H.influenzae b cepa HU y los anticuerpos presentes en el suero hiperinmune sin diluir de estos animales. La banda visible que corresponde al precipitado formado por la reacción entre el LPS y su anticuerpo correspondiente anti-LPS de Hinfb cepa HU, se muestra en la figura 8.

FIGURA 8. INMUNODIFUSION DEL LIPOPOLISACARIDO (LPS) DE H. influenzae CEPA HU, EN PRESENCIA DE SUERO DE RATON ANTI-LPS.



Fotografía de un gel de inmunodifusión. A los pozos exteriores se añadieron sueros (hiperinmune de ratón anti LPS) sin diluir y diluidos 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, iniciando en el el pozo superior y en el sentido de las manecillas del reloj. El pozo central se cargó con 379 µg de antígeno (LPS). La banda de reacción antígeno-anticuerpo, se indica con la flecha.

DISCUSION.

Los ensayos electroforéticos de las proteínas de membrana externa, aisladas a partir de las cepas HU y H2 de *Haemophilus influenzae* b, mostraron un patrón electroforético semejante al de otros reportes previos (Granoff y Munson 1986; Barenkamp y cols. 1981).

Algunos autores han reportado contaminación de sus preparaciones de PME con LPS de Hinb (Loeb y Smith 1982; Claesson y cols. 1983). Las pruebas de inmunoelectrotransferencia y de inmunodifusión para determinar la posible presencia de lipopolisacárido en el extracto de PME, aquí resultaron negativas de acuerdo con la sensibilidad del método empleado. Esto conduce a interpretar que en la preparación de las PME no se copurificaron otros componentes antigénicos como el lipopolisacárido, resultado que confirma la reacción entre anticuerpos IgG de sueros de pacientes y las proteínas de membrana externa de Hinb. De ser esto cierto, nosotros pudimos estudiar reacciones antígeno-anticuerpo que probablemente estén relacionadas con protección, es decir que las proteínas de membrana externa pudieran ser inmunógenos importantes en la protección contra la infección por este microorganismo.

Estudios preliminares de algunos investigadores han

mostrado que anticuerpos séricos hacia las PME de Hib, son protectores en el modelo de rata lactante (Hansen y cols. 1982; Kimura y cols. 1985; Myerowitz y cols. 1978 ; Shenep y cols. 1983). Existen otros datos que sugieren que anticuerpos séricos en contra de antígenos no capsulares, tienen un papel importante en contra de la enfermedad invasiva por Hib (Loeb y Smith, 1982). La importancia que juegan los anticuerpos dirigidos hacia las PME de H. influenzae b en la inmunidad protectora en contra de la enfermedad invasiva por este microorganismo, al parecer radica en las actividades opsonica y bactericida mediadas por el complemento (Hansen y cols. 1981; Granoff y cols. 1978).

La clase de anticuerpos que generalmente está involucrada en estos procesos de protección contra la enfermedad por Hib es la IgG, esta es producida comunmente durante la fase aguda de la enfermedad y es estimulada preferentemente por antígenos protéicos (Granoff y Munson 1986). El propósito fundamental de esta tesis, se orientó a la determinación de anticuerpos de clase IgG presentes en sueros de niños enfermos y no de otras inmunoglobulinas séricas, las razones principales de dicha selección se apoyan en los conceptos que a continuación se mencionan:

- La protección en humanos en contra de la enfermedad invasiva por Hib, se ha asociado principalmente a una

respuesta humoral de anticuerpos de clase IgG. (Granoff y Munson 1986).

- Los anticuerpos IgG anti-PME, han demostrado una actividad opsónica para fagocitos neutrófilos, más eficiente que la detectada con anticuerpos IgM (Gray 1990)

- La actividad protectora a largo plazo, se ha asociado con anticuerpos IgG y la respuesta a la mayoría de los antígenos proteicos es fundamentalmente IgG, de la subclase IgG1 (Vella y cols.1990)

- La respuesta primaria hacia antígenos proteicos (timo dependientes), se inicia con la producción de inmunoglobulinas clase IgM, y generalmente después de un periodo de 7-10 días, se manifiestan las inmunoglobulinas de clase IgG (periodo que corresponde a la fase aguda), la cual persiste y es dominante incluso durante la fase de convalecencia.

La presencia de anticuerpos que reaccionaron con proteínas de membrana externa de Hib en sueros de niños sin antecedentes de meningoencefalitis, podría explicarse debido a:

- La existencia de epitopos de reacción cruzada entre H1nb y otras especies bacterianas.
- Que pudieran ser anticuerpos de reacción cruzada hacia epitopos compartidos entre cepas de *H. influenzae*, de otros serotipos diferentes del b ó de no tipificables.
- Que fueran anticuerpos adquiridos transplacentariamente o durante el período de lactancia.
- Que fueran anticuerpos preexistentes, inducidos durante una enfermedad previa o una infección subclínica por H1nb.

La respuesta de anticuerpos IgG en sueros de niños testigo mostró cierta correlación con la edad, todos los niños menores de dos años presentaron respuestas de anticuerpos hacia las PME de 27 y 36.6 kDa en contraste, los sueros de niños enfermos, respondieron en forma independiente de la edad.

Los ensayos de inmunoelectrotransferencia, evidenciaron que las proteínas fueron antigénicas en niños con enfermedad meningítica, ya que todos los sueros de pacientes en fase aguda y la mayoría de los sueros de pacientes convalecientes, tuvieron respuestas de IgG hacia varias proteínas de membrana

externa.

De acuerdo con las 15 proteínas de la cepa HU evidenciadas en los geles electroforéticos, los sueros de pacientes convalecientes reconocieron a 13 de ellas, en tanto que los sueros de fase aguda solo a 10. En cambio, los sueros del grupo testigo reconocieron a 5 proteínas solamente. La diversidad de estas respuestas pudo haber sido influenciada por factores tales como la edad, estado nutricional, genéticos, concentración de cada una de las proteínas durante el periodo de enfermedad, infecciones virales o parasitarias coexistentes, etc.

Si bien las concentraciones de anticuerpos séricos no fueron determinadas en este estudio, la intensidad de reacción observada aquí, pudo estar relacionada con la concentración de anticuerpos en los sueros analizados. La intensidad de reacción antígeno-anticuerpo evidenciada con los sueros de niños en fase aguda, fué menor que aquella observada con los sueros de pacientes convalecientes, esto concuerda con los hallazgos de Claesson y cols. (1983), quienes reportaron que los anticuerpos séricos IgG estimados por la prueba de ELISA (inmunoensayo enzimático en placa), fueron positivos pero con títulos bajos en las muestras tomadas al inicio de la enfermedad, mientras que los sueros de los mismos niños analizados durante su convalecencia, mostraron un título significativamente mayor.

Gulig y cols. (1984), utilizando el método de radioinmunoprecipitación para el análisis de anticuerpos específicos hacia una PME de 100 kDa, en un estudio cronológico de esta respuesta de anticuerpos, reportaron su aparición inicial en el suero hacia el día 15 de la infección y este título se incrementó gradualmente hasta el día 36. Estos datos concuerdan con los hallazgos aquí reportados, ya que el 22% de los sueros de pacientes en fase aguda así como el 57% de los sueros de convalecientes, respondieron con anticuerpos IgG hacia una proteína semejante aunque un poco mayor de 100 kDa.

Los hallazgos de otros investigadores (Erwin y Keny. 1984), han mostrado que frecuentemente existen anticuerpos hacia dos proteínas, una de 51 y otra de 60 kDa presentes en los sueros de pacientes en fase aguda. Comparativamente en este estudio se encontraron más frecuentemente anticuerpos en sueros de fase aguda que en sueros de fase convaleciente pero hacia tres proteínas, siendo estas las de 27, 52 y 96 kDa. Estos resultados podrían explicarse parcialmente en base a las diferencias en los procedimientos del aislamiento de membrana (extracción con LiCl) y/o en la metodología usada para detectar interacciones entre PME y los anticuerpos (radioinmunoensayo).

La preparación de las PME usada aquí, fué una fracción constituida por diferentes proteínas, todas ellas

reaccionaron con una amplia variedad de anticuerpos de los niños. Para determinar el papel de los anticuerpos IgG hacia las proteínas individuales, sería necesario purificarlas y determinar mediante IET, los anticuerpos dirigidos hacia cada una de dichas PME.

Aunque el propósito de este trabajo no consistió en determinar la prevalencia de anticuerpos en el período comprendido entre el inicio de la enfermedad y la convalecencia, se sugiere que para la realización de estudios subsecuentes, se realicen determinaciones de anticuerpos presentes en los sueros de fase aguda y convaleciente de un mismo sujeto (muestras pareadas).

Hubiera sido deseable realizar las determinaciones cuantitativas para estimar la concentración de anticuerpos IgG presentes en los sueros de pacientes y de niños sanos estudiados, sin embargo, se efectuó una estimación cualitativa que fué suficiente para establecer que tanto los sueros en fase aguda, como los sueros en fase de convalecencia de niños enfermos mexicanos, tuvieron actividad de anticuerpos IgG dirigidos hacia un gran número de PME de Hinb. Además, permitió inferir que estos determinantes antigénicos, aparentemente estuvieron accesibles al sistema inmune durante el proceso de la enfermedad, dada la habilidad de estos niños para desarrollar una respuesta de anticuerpos.

CONCLUSIONES.

Los perfiles de las proteínas de membrana externa aisladas a partir de las cepas HU y H2 de Hinb, presentaron un patrón electroforético típico en gel de poliacrilamida-SDS, que concuerda con lo reportado en la literatura para otras cepas de Hinb.

Se observó variabilidad cualitativa individual en la respuesta de anticuerpos, hacia cada una de las PME de la cepa HU empleada.

Los anticuerpos IgG presentes en sueros de niños testigo reconocieron a cinco PME, con una frecuencia de reconocimiento menor que con los sueros de enfermos.

Los resultados del grupo testigo mostraron tener una relación entre la edad de los niños y su respuesta hacia las PME.

La mayoría de los pacientes en fase aguda y todos los pacientes convalecientes, tuvieron una respuesta de anticuerpos de clase IgG hacia diferentes PME de la cepa de Hinb usada.

Los sueros de pacientes en fase de convalecencia, reconocieron a un número mayor de PME, en contraste con los

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

sueros en fase aguda (15 y 13 proteínas respectivamente). Tres de estas PME fueron reconocidas exclusivamente por los pacientes convalecientes.

La mayoría de las PME fueron reconocidas con mayor frecuencia por los sueros de pacientes convalecientes que por los sueros de fase aguda.

No hubo correlación entre la edad de los pacientes con meningoencefalitis y el número de las proteínas reconocidas, ni con su peso molecular.

Los anticuerpos IgG de pacientes y niños testigo, que se estudiaron aquí, fueron anticuerpos que reaccionaron con PME y no con el LPS de *H. influenzae* b.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.. Anderson P, Peter G, Johnston R Jr, Wetterlow L y Smith D
Immunization of humans with polyribophosphate, the
capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b.
J.Clin.Invest. 51:39-44, 1972.
- 2.. Arredondo J, Espinoza L. y Zepeda H. Infecciones por
Haemophilus influenzae problema actual en pediatria. *Bol.*
Med.Hosp.Infant.Mex. 12: 777-785, 1987.
- 3.. Apicella MA, Shero M, Dudas KC, Stack R, Klohs W,
Lascolea LS, Murphy TF y Mylotte JM. Fimbriation of *Hae-*
mophilus species isolated from the respiratory tract of
adults. *J.infect.Dis.* 150:40-43, 1984.
- 4.. Barenkamp SJ, Munson RS Jr y Granoff DM. Subtyping
isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer
membrane protein profiles. *J.infect.Dis.* 143:668-675,
1981.
- 5.. Barra A, Schultz D y Audiburi P. Measurement of anti-
Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide
antibodies by ELISA. *J.Immunol. Methods.* 115:111-117,
1988.
- 6.. Bonadio WA. Cerebral herniation syndrome as the
presenting sign of *Haemophilus influenzae* meningitis.
Pediatr.Emerg.Care. 3:253-255, 1987.
- 7.. Bricker J, Mulks MH, Plaut AG, Moxon ER y Wright A. IgA-1
proteases of *Haemophilus influenzae*; cloning and
characterization in *Escherichia coli* K-12. *Proc.Natl.Acad*
Sci. (USA). 80:2681-2685, 1983.
- 8.. Calderón E, Carmolina M, Salas P y Conde C.
Epidemiología de las infecciones por *Haemophilus influen-*
zae. *Infectología (Méx).* 11:37-45, 1985.
- 9.. Centers for Disease Control. Polysaccharide vaccine for
prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease.
MMWR. 34:201-205, 1985.
10. Centers for Disease Control. Recommendations of the
immunization practices advisory committee. Update:
prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. *MMWR*
36:529, 1987.

11. Claesson BA, Lagergard T, Trollfors B, Gotherfors L y Jodal U. Serum antibody response to surface antigens in childrens with invasive *Haemophilus influenzae* infections. *J.Clin.Microbiol.* 15:2339-2343, 1983.
12. Conde C, Calderón E. Meningitis caused by ampicillin and chloramphenicol-resistant *Haemophilus influenzae*. *Pediatr Infect.Dis.J.* 7:369-370, 1988.
13. Crosson FJ Jr, Winkelstein JA y Moxon ER. Participation of complement in the non immune host defence against experimental *Haemophilus influenzae* type b septicemia and meningitis. *Infect.Immun.* 14:882-887, 1976.
14. De Groot R, Campos J, Moseley SL y Smith AL. Molecular cloning and mechanism of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob.Agents.Chemother.* 32:477-484, 1988.
15. Erwin AL y Kenny GE. Isolates of *Haemophilus influenzae* type b show antigenic variation in a major outer membrane protein. *Infect.Immun.* 46:570-577, 1984.
16. Feldman RA, Koehler RE y Fraser DW. Race specific differences in bacterial meningitis deaths in the United States, 1962-1968. *Am.J.Publ.Health.* 66: 392- 396, 1976.
17. Fraser DW, Darby CP, Koeler RE, Jacobs CF y Feldman RA. Risk factors in bacterial meningitis Charleston County South Carolina. *J.Infect.Dis.* 127: 271-277, 1973.
18. Fraser DW. *Haemophilus influenzae* in the community and the home. En: Sell CH, Wright PF, eds. *Haemophilus influenzae: Epidemiology immunology and prevention of disease.* New York: Elsevier Biomedical, 1982:11-32.
19. Fildes P. A new medium for the growth of *B. influenzae*. *Br.J.Exp.Pathol.* 1:129-130, 1920.
20. Gonzalez N, Torales A y Gomez D. *Infectología Clínica Pediátrica.* México, D.F.: Editorial Trillas, 1988:266-249.
21. Granoff DM y Rockwell R. Experimental *Haemophilus influenzae* type b meningitis: immunological investigation of the infant rat model. *Infect.Immun.* 20:705-713, 1978.
22. Granoff DM y Munson RS Jr. Prospects for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease by immunization. *J.Infect.Dis.* 153: 448-461, 1986.
23. Granoff DM. Host and bacterial factors associated with *Haemophilus influenzae* type b disease in Minnesota children vaccinated with type b polysaccharide vaccine. *J.Infect.Dis.* 159:908-916, 1987.

24. Granoff DM y Weinberg A. IgG subclass response to immunization with Haemophilus influenzae type b polysaccharide - outer membrane protein conjugate vaccine. *Pediatr. Res.* 24: 180-185, 1988.
25. Gray BM. Opsonophagocidal activity in sera from children immunized with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine (Meningococcal Protein Conjugate). *Pediatrics.* 85:694-697, 1990.
26. Guerina NG, Langerman S, Clegg HW, Kessler TW, Goldman DA y Gildsorf JR. Adherence of piliated Haemophilus influenzae type b to oropharyngeal cells. *J. Infect. Dis.* 146:564 A, 1982.
27. Guiscafré H, Garcia M, Jaime M, Trejo J, García H y Hernandez R. Frecuencia de Haemophilus influenzae resistente a ampicilina y Streptococcus pneumoniae resistente a penicilina en portadores sanos. *Arch. Invest. Med. (Méx)* . 12:141-151, 1981.
28. Gulig P, McCracken G, Holmans P y Hansen E. Immunogenic proteins in cell-free culture supernatants of Haemophilus influenzae type b. *Infect. Immun.* 44:41-48, 1984.
29. Hansen EJ, Frich CF, McDade RL y Kenneth HI. Identification of immunogenic outer membrane proteins of Haemophilus influenzae type b in the infant rat model system. *Infect. Immun.* 32:1004-1092, 1981.
30. Hansen E, Robertson S, Gulig P, Frich C y Haanes E. Immunoprotection of rats against Haemophilus influenzae type b disease mediated by monoclonal antibody against a Haemophilus outer-membrane protein; *Lancet* i:366-367, 1982.
31. Harrison LH, Broome CV y Hightower AW. Haemophilus influenzae type b polysaccharide vaccine an efficacy study. *Pediatrics.* 84:255-261, 1989.
32. Halsey NA, Korock C, Johansen TL y Glode MP. Intralitter transmission of H. influenzae type b in infant rats and rifampin eradication of nasopharyngeal colonization. *J. Infect. Dis.* 142:739-743, 1980.
33. Heterington SV. Antibody to the outer membrane proteins is the dominant opsonic antibody in normal human serum against H. influenzae type b. *Immunology.* 67:87-91, 1989.
34. Insel RA, Gellin B, Broome C y Smith D. IgG2 subclass deficiency presenting as H. influenzae b (HIB) disease, after immunization with HIB vaccine. *Pediatr. Res.* 21:312 A, 1987.

35. Käythy H, Peltola H, Karanco V y Makela PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect. Dis.* 147:1100-1103, 1983.
36. Kilian MA. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* 93:9-62, 1976.
37. Kimura A, Gulig F, McCracken G, Lofthus T y Hansen E. A minor high-molecular-weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infect. Immun.* 47:255-259, 1985.
38. Kwpiinsky VB. Preparation of flagellar antigens, preparation of Vi antigen and lipopolysaccharide preparation. En: "Methodology of immunochemical and immunological research". New York: John Willey and sons, 1972: 38-39.
39. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227: 680-685, 1970.
40. Lam J, Granoff D, Gildsorf J y Costerton J. Immunogenicity of outer membrane derivatives of *Haemophilus influenzae* type b. *Curr. Microbiol.* 3:359-364, 1980.
41. Lampe RH, Mason ED Jr, Kaplan SL, Umstead CL, Yow MD y Feigin RD. Adherence of *Haemophilus influenzae* to buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 35: 165-172, 1982.
42. Loeb M y Smith D. Properties and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b outer membrane proteins. En: Sell SH, Wright FF, eds. *Haemophilus influenzae: Epidemiology, immunology and prevention of disease.* New York: Elsevier Biomedical. 1982:15-18.
43. López P, Gómez D, Sequeira M y Moreno J. Actualidades en Meningitis bacteriana. *Infectología (Méx).* 10:75-89, 1990.
44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
45. Marchant CD, Band E, Froeshle JE y Mc Verry PH. Depression of anticapsular-antibody after immunization with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria conjugate vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:508-511, 1989.

46. Molinari JL. Estudio bacteriológico sobre meningoencefalitis bacteriana aguda. Rev.Fac.Med.(Méx). XIII:371-373, 1970.
47. Moxon ER y Murphy PA. Haemophilus influenzae bacteremia and meningitis resulting from survival of a single organism. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA). 75:1534-1536, 1978.
48. Moxon ER, Goldthorn JF y Schwartz AD. Haemophilus influenzae b infection in rats: the effect of splenectomy on blood stream and meningeal infection after intravenous and intranasal inoculation. Infect.Immun. 27:872-875, 1980.
49. Moxon ER. Infection in a rat model. En: Sell SH, Wright PF eds. Haemophilus influenzae: Epidemiology, immunology and prevention of disease. New York: Elsevier Biomedical. 1982: 59-71.
50. Munson R, Kabeer H, Lenoir A, Granoff D. Epidemiology and prospects for prevention of disease due to Haemophilus influenzae in developing countries. Rev. Infect. Dis. 3:528-538, 1983.
51. Muñoz O, Fierro H, Sobrino J, López G y Castro G. Secuelas intelectuales a largo plazo en niños con meningoencefalitis purulenta. Bol.Med.Hosp.Infant.(Méx) 7:719-725, 1978.
52. Musher D, Goree A, Murphy T, Chapman A, Zahradnik J, Apicella A y Baughn R. Immunity to Haemophilus influenzae type b in young adults: correlation of bactericidal and opsonizing activity of serum with antibody to poliribosyl-ribitol-phosphate and lipooligosaccharide before and after vaccination. J.Infect.Dis. 154:935-943, 1986.
53. Musser JH, Granoff DM, Pattison FE y Selander RK. A population genetic framework for the study of infectious diseases caused by serotype b strains of H. influenzae. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA). 82:5078-5082, 1985.
54. Myerowitz RL, Norden CW y Demchack TA. Significance of non-capsular antigens in protection against experimental Haemophilus influenzae type b disease: cross-reactivity. Infect.Immun. 21:619-626, 1978.
55. Ouchterlony Q. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. En: "Progress in allergy". New York: S Karger, 1972:1-78.

56. Peltola H, Käythy H, Virtanen M y Mäkela PH. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. *N.Engl.J.Med.* 310:1566-1569, 1984.
57. Pichichero ME, Loeb M, Anderson P y Smith DH: Do pilli play a role in pathogenicity of *Haemophilus influenzae* type b ?. *Lancet.* 2:960-962, 1982.
58. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J.Exp.Med.* 53:471-492,1931.
59. Robbins J, Schneerson R y Pittman M. *Haemophilus influenzae* b infections. En: *Bacterial Vaccines.* Germanier R, Orlando, Fl. 1981: 326-339.
60. Schneerson R, Barrera O, Sutton A y Robbins JB. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J.Exp.Med.* 152:361-376, 1980.
61. Schneerson R, Robbins JB, Chu C, Sutton A, Vann W, Vickers JC, London WT, Curfman B, Hardegree MO, Shiloach J y Tostagi SC. Serum antibody responses of juvenile and infant Rhesus monkeys injected with *Haemophilus influenzae* type b and *Pneumococcus* type 6A capsular polysaccharide-protein conjugates. *Infect.Immun.* 45:582-591,1984.
62. Schneerson R, Rodriguez LP, Farke CJ JR y Robbins JB. Immunity to disease caused by *Haemophilus influenzae* type b II. Specificity and some biologic characteristics of the natural infection-acquired, and immunization-induced antibodies to capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J.Immunol.* 107:1081-1084, 1987.
63. Sell S, Merrill R, Doyne E y Zinsky E. Long-term sequelae of *Haemophilus influenzae* meningitis 1972; *Pediatrics.* 49:206-211, 1972.
64. Shenep JL, Munson RS Jr, Barenkamp SJ y Granoff DM . Further studies of the role of noncapsular antibody in protection against experimental *Haemophilus influenzae* type b bacteremia. *Infect.Immun.* 42:257-263, 1983.
65. Siber GR, Schur PM, Aisemberg AC, Weitzman SA y Schiffman G. Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N.Engl.J.Med.* 303:178-182,1980.

66. Smith A. Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* meningitis. En: Sell SH, Wright PF, eds. *Haemophilus influenzae: Epidemiology immunology and prevention of disease*. New York: Elsevier Biomedical. 1982:90-109.
67. Smith MD y Kelsey MC. Demonstration of a functional variant of chloramphenicol acetyltransferase in *Haemophilus influenzae*. *J.Med.Microbiol. (USA)*. 29:263-268, 1989.
68. Solotorovsky M y Lynn M. *Haemophilus influenzae*: immunology and immunoprotection. *CRC.Crit.Rev.Microbiol.* 6:1-32, 1978.
69. Syrogiannopoulos GA, Hansen EJ, Erwin AL, Munford RS, Rutledge J, Reisch JS y McCracken GH JR. *Haemophilus influenzae* type b lipooligosaccharide induces meningeal inflammation. *J.Infect.Dis.* 157:237-244, 1988.
70. Takala A, van Alphen L, Musser JM, Selander R, Eskola J, Mäkela H. Bacteriologic epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b strains causing invasive infections in Finland. *J.Infect.Dis.* 160:237-242, 1989.
71. Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci (USA)*. 76:4350-4354, 1979.
72. Trejo J, Guiscafré H, García H, Jaime M, González S y Muñoz O. Sensibilidad de *Haemophilus influenzae* a la ampicilina y al cloranfenicol en niños de la ciudad de México. *Bol.Med.Hosp.Infant.(Mex)*. 38:79-86, 1981.
73. Turck DC. Clinical importance of *Haemophilus influenzae*-1981. En: Sell SH, Wright PF, eds. *Haemophilus influenzae: Epidemiology immunology and prevention of disease*. New York: Elsevier Biomedical, 1982: 3-9.
74. van Ham M, Mooi R, Sindhunata G, Maris R y van Alphen L. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Haemophilus influenzae* fimbrial genes establishes adherence to orofaryngeal epithelial cells. *EMBOJ.* 8:3535-3540, 1989
75. Vella P, Staub J, Armstrong J et al. Immunogenicity of a new *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (Meningococcal Protein conjugate) (PedvaxHIB). *Pediatrics*. 85:668-675, 1990.
76. Warren CW y Tyler CW. Social status and season of birth. A study of a metropolitan area in the southeastern United States. *Soc. Biol.* 26:275-288, 1979.

77. Weinberg GA, Granoff DM, Nohm MH y Shackelford PG. Functional activity of different IgG subclass antibodies against type b capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *J.Immunol.* 136:4232-4236, 1986.
78. Weller PF, Smith AL, Smith TH y Anderson P. Roll of immunity in the clearance of bacteremia due to *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect.Dis.* 138:427-436, 1978.
79. Yamato I, Anraku Y y Hirosawa K. Cytoplasmic membrane vesicles of *Escherichia coli*. 1. A simple method for preparing the cytoplasmic and outer membranes. *J.Biochem. (Tokyo)*. 77:705-718, 1975.