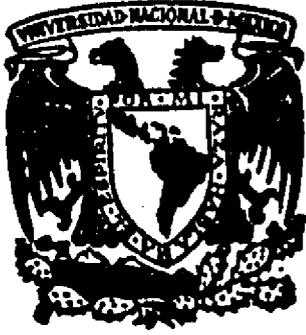


11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

8

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ

20)

SUBTIPOS DE Haemophilus influenzae no tipificable DE
ACUERDO A PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA,
EN CEPAS DE NASOFARINGE Y OIDO MEDIO DE
NIÑOS CON OTITIS MEDIA AGUDA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A
ALBERTO VILLASEÑOR SIERRA
DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO
MEXICO, D.F. 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

J U R A D O

Presidente:	Dr. Onofre Muñoz Hernández
Secretario:	Dr. Hector Guiscafré Gallardo
Primer Vocal:	Dr. Adolfo García Sainz
Segundo Vocal:	Dr. Alejandro Cravioto
Tercer Vocal:	Dr. José Ignacio Santos Preciado
Suplente:	Dr. Salvador Martínez Cairo Cueto
Suplente:	Dr. José Luis Romero Zamora

Agradecimientos:

A ti Rosa, mi esposa, fuente de inspiración y consuelo, por tu incansable apoyo, desvelos, paciencia y permanente aliento. A cada uno de mis hijos, fuente de mi esperanza y estímulo de superación.

A mis padres, origen de mi formación integral y a mis hermanos. A mis suegros, por su callada presencia y apoyo.

Muy especialmente al Dr. José Ignacio Santos Preciado, tutor, maestro y amigo; por su ejemplo, enseñanzas, orientación y apoyo incondicional que me condujeron siempre a una superación constante y a una clara definición académica y científica.

Al Dr. Luis Torregrosa Ferraez, Director del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", y a todos sus Médicos e Investigadores, por su ejemplo y apoyo que hizo posible mi formación científica.

Al Jefe del Dpto. de ONG Dr. Carlos de la Torre y cols. por su apoyo para la realización del proyecto. A la anesthesióloga Pediatra, Dra. Veronica Flores Sánchez por su permanente disposición e inagotable apoyo. A las QFB. Pilar García Roca, Virginia Nava, Silvia Rendon y el Dr. Jesús Casasola, por su valioso consejo y soporte técnico, al Aux. de Lab. Sr. Antonio Benites Rangel por su disponibilidad y ayuda.

A todos y cada uno de los que laboran en los Laboratorios de Inmunoquímica, Virología y Bacteriología intestinal del Hospital Infantil de México, por su invaluable apoyo.

A mis maestros, los Dres. Onofre Muñoz Hernández, Salvador Martínez Cairo Cueto, Adolfo García Sainz y cols, Ma. del Carmen Martínez García, Jesus Reynaga Obregón, Juan Garduño Espinoza, Rafael Hernández López, Jesús Guizar Vázquez, José Ramon Paniagua Sierra, José Dante Amato Martínez; y a cada una de mis compañeras de Maestría que con su ejemplo, apoyo y crítica disciplinaron mi formación.

A la Dra. Carla Odio, J.H.Jorgensen Ph.D., Stanley Maloy Ph.D., David Speert M.D. y todos aquellos investigadores que han dejado una profunda huella en mi formación personal y científica.

A todos los que, haciendo difícil mi caminar, fortalecieron y purificaron mi convicción del ideal académico, permitiendo que me trazara una ruta difícil de cambiar.

A todos los niños, en especial aquellos social, mental o económicamente desprotegidos, origen y fin de mi vocación.

A. M. D. G.

I N D I C E

I.	ANTECEDENTES	
	OTITIS MEDIA AGUDA:	
	Epidemiología	7
	Fisiopatogenia	7
	Microbiología	8
	PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME):	
	Generalidades	8
	Clasificación	9
	PME <u>Haemophilus inf.</u>	9,10
II.	JUSTIFICACION	11
III.	OBJETIVOS	12
IV.	MATERIAL Y METODOS	
	Población de estudio	13
	Criterios de inclusión	13
	Criterios de no inclusión	13
	Criterios de exclusión	13
	Aislamiento de cepas	14
	Tipificación de Hi	14
	Obtención de las PME	15
	Cuantificación de PME	16
	Electroforesis PAGE-SDS	17
	Identificación de subtipos	18
	Cepas de referencia	18
V.	CONSIDERACIONES ETICAS	19
VI.	RESULTADOS	
	Total de niños incluidos	20
	Bacteriología en oído medio	20
	Aislamiento de Hi en NF	21
	Aisl.simultáneo Hi en OM y NF	21
	OMA bilateral	22
	OMA recurrente	22
	Subtipos de Hi en OM y NF	23
VII.	DISCUSION	24-28
VIII.	CONCLUSIONES	29
IX.	REFERENCIAS	30-34
X.	FIGURAS Y CUADROS	35-41
XI.	ANEXOS	42-52

R E S U M E N

La otitis media aguda (OMA), es una causa frecuente de consulta pediátrica y Haemophilus influenzae ocupa el segundo lugar como agente etiológico siendo en su mayoría cepas no capsuladas o no tipificables; asimismo en forma transitoria puede formar parte de la flora normal de nasofaringe en niños sanos o la predominante cuando existe OMA por esta bacteria.

Algunas características ultraestructurales de Haemophilus influenzae no tipificable (HiNT) tales como sus proteínas de membrana externa (PME) en el rango de 32 a 42 Kd de peso molecular, han permitido clasificarlo en 8 subtipos y han sido utilizadas tanto como marcadores epidemiológicos como para establecer mecanismos patogénicos. Diversos estudios realizados en cepas de HiNT de países en desarrollo y desarrollados, muestran heterogeneidad en los subtipos aislados tanto de oído medio como de otras entidades clínicas. Con el fin de conocer los subtipos de Haemophilus influenzae no tipificable en niños con otitis media aguda y su asociación con los aislados en forma pareada de nasofaringe (NF), se estudiaron 57 niños de ambos sexos entre 1 y 13 años de edad. De éstos se aislaron simultáneamente de oído medio y nasofaringe 18 pares de HiNT; en 10 con OMA unilateral y en 4 bilateral. La identificación de subtipos se realizó mediante el perfil de PME obtenido de su corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida dodecilsulfato (PAGE-SDS) al 11 % al ser comparados en el mismo gel con el de los 8 subtipos de referencia donados gentilmente por T. Murpy.

Todas las cepas aisladas de oído medio fueron subtipificables mientras que el patrón de PME de 4 cepas de NF no permitió incluirlas en alguno de los 8 subtipos de referencia (no subtipificables). 14 de los 18 aislamientos pareados fueron subtipificables; en 13/18 (72 %), los subtipos de HiNT fueron idénticos y 1/18 (6 %) diferentes. Los más frecuentemente encontrados fueron el 6, 4 y 5. Aunque el perfil de PME de nuestros aislamientos fue heterogéneo, existió evidencia de restricción clonal ya que en 32 de 36 cepas estuvieron representados 5 de los 8 subtipos descritos (ST 3,4,5,6 y 8), y a diferencia de otros estudios los subtipos aislados mostraron una notable similitud con los descritos en niños con OMA en los E.U. (ST 2,3,4,5,6 y 7). El haber encontrado cepas de NF que no correspondieran a alguno de los 8 subtipos descritos, pudiera explicarse por subtipos diferentes o bien a una mezcla de más de uno en la colonia elegida inicialmente para su estudio. En conclusión; el sistema descrito para clasificar a HiNT en 8 subtipos permitió hacerlo en la totalidad de los HiNT aislados de oído medio y la mayoría de nasofaringe. En el 72 % de los niños con OMA estudiados, el subtipo aislado en oído medio y el que coloniza la NF fue el mismo. Los subtipos aislados mostraron restricción clonal y la similitud con los aislados en E.U. sugiere la presencia de cepas otitogénicas comunes ampliamente distribuidas.

Abreviaturas

OMA =	otitis media aguda
Hi =	<u>Haemophilus influenzae</u>
NT =	no tipificables
HiNT =	<u>Haemophilus influenzae</u> no tipificable
PME =	proteínas de membrana externa
PAGE-DDS =	electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico
OM =	oído medio
NF =	nasofaringe
OMI =	oído medio izquierdo
OMD =	oído medio derecho
NC =	no clasificable
ST =	subtipo

I. ANTECEDENTES

La otitis media aguda (OMA) está considerada como la tercer causa de consulta pediátrica (1), manifestándose con signos y síntomas locales y sistémicos, opacidad y abombamiento de la membrana timpánica y una duración menor a 3 meses (2). La mayor incidencia ocurre en los primeros 36 meses y entre los 6 a 8 años de edad, y en países fríos o templados se presenta con una mayor frecuencia de diciembre a marzo. Ocurre como episodio único en el 82 % de los niños, en el 15 % se refiere un segundo cuadro y hasta un tercer episodio en el 4 % de los niños afectados (3).

Se han considerado varias explicaciones para la alta incidencia de OMA en edades tempranas tales como: a) la inmadurez inmunológica del lactante, b) la disposición anatómica y funcional de la trompa de Eustaquio que facilita la infección por vía ascendente, c) la ausencia de alimentación al seno materno, y d) varios factores relacionados a la alimentación con biberón, como el desarrollo diferente de los músculos faciales que afecta la función de la trompa de Eustaquio, la necesidad de una mayor presión negativa al succionarlo facilitando la aspiración de leche hacia oído medio, y la posición horizontal frecuente en el niño alimentado en esta forma (4,5).

De los agentes etiológicos descritos en OMA, Haemophilus influenzae (Hi) es un de los más frecuentemente aislados (6). Existen cepas capsuladas o tipificables de acuerdo a la aglutinación con antisueros específicos (a-f) y cepas que carecen de cápsula o no tipificables (NT). En la recopilación de 4,675 casos de OMA en Estados Unidos, Suiza y Finlandia, Hi ocupó el segundo lugar con 21 %, siendo en su mayoría NT (7). Otros estudios muestran porcentajes similares (8,6) incluyendo el realizado por Rodríguez en México (5).

Se conoce poco sobre la patogénesis y la epidemiología de las infecciones invasivas debidas a Haemophilus influenzae no tipificable (HiNT) (9), así como el significado del estado de portador nasofaríngeo en niños que varía en distintas series como la descrita en México por Guiscafre (31) de 4 a 6 % y hasta 60 % en otros países; sin embargo, su presencia se asocia a un riesgo mayor de OMA en niños que asisten a guardería (10).

Algunos estudios de patogénesis indican que el desarrollo de anticuerpos específicos por el hospedero así como la marcada diferencia en la adhesividad, invasividad, virulencia y resistencia al efecto bactericida del suero humano mediado por complemento, está relacionada estrechamente con marcadores ultraestructurales y macromoleculares de la bacteria, como es el caso de las proteínas de membrana externa (PME) (9,11,12). Estas fueron inicialmente descritas por Miura y Mizushima en 1968, quienes lograron separar la membrana citoplasmática de *Escherichia coli* (E.coli).

Dichos investigadores definieron la composición de la membrana citoplasmática, que está constituida por proteínas y fosfolípidos, y de la membrana externa que además contiene lipopolisacáridos. Consecutivamente, en 1970 Schnaitman describió las PME de acuerdo con su patrón electroforético en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (PAGE-DDS) y en 1978 Di Rienzo, Nakamura e Inouye propusieron un sistema de nomenclatura único en el que la definición de cada PME fuera en base a su composición química y su movilidad electroforética. En 1980 Osborn y Wu reclasificaron en 3 grupos esta nomenclatura sobre la base de la estructura y función de las PME;

I. Proteínas matrices o porinas (1a-1b); II. Proteínas modificables por el calor (3a); Y III. Lipoproteína de Braun (12).

En el caso de HiNT se han identificado de 10 a 20 PME, con una amplia variabilidad de éstas en distintas cepas (9,13,14,15,16). En 1983 Apicella y cols. (9) en un estudio de 48 cepas analizaron 2 bandas de mayor densidad o proteínas mayores, en un rango de peso molecular de 32,000 a 42,000 daltones, entre las cuales se encontraban bandas intermedias con 8 patrones electroforéticos distintos, mismos que fueron utilizados para clasificar a HiNT en 8 subtipos (ST). Murphy y Bartos en 1988 (17) describieron estas 2 bandas, y la de mayor densidad o proteína principal la llamaron proteína P2 o b/c, reconocida a través de anticuerpos monoclonales, como un sitio blanco para el desarrollo de anticuerpos bactericidas.

La identificación de subtipos de Haemophilus influenzae no tipificable en base a sus proteínas de membrana externa ha sido de gran utilidad por las siguientes razones: a) la técnica para su obtención es reproducible y los resultados útiles para clasificar a este grupo heterogéneo de HiNT b) son estables a manipulaciones experimentales c) su identificación no es dependiente de la fase de crecimiento de la cepa d) no sufren cambios al pasar por medios de cultivo o animales de experimentación e) es útil con fines epidemiológicos y f) su inmunogenicidad puede derivar en el desarrollo de una vacuna (9,11,12,13).

En 1983 Murphy y cols. (9) describen los casos de 3 niños con otitis media aguda por HiNT en los que se aisló el mismo subtipo simultáneamente de oído medio y nasofaringe correspondiendo éstos al 2, 3 y 4 respectivamente.

En 1987, los mismos autores (18) describieron 19 aislamientos simultáneos de HiNT en oído medio y nasofaringe de niños con OMA y otitis media aguda recurrente; en 16/19 aislamientos pareados (84%) el subtipo aislado en oído medio fue igual al de nasofaringe encontrando los subtipos 5, 7 y 6 por orden de frecuencia.

II. JUSTIFICACION

En relación a los subtipos de HiNT aislados de oído medio u otros sitios clínicamente significativos que han aparecido en reportes de la literatura en diversos países es interesante mencionar su variabilidad regional en patologías específicas, posiblemente asociada a una distinta susceptibilidad en el hospedero genéticamente determinada a infectarse por ciertos subtipos (19,20).

En México, la otitis media aguda causada por Haemophilus influenzae no tipificable es probablemente un problema importante, y aunque la cantidad real de niños afectados por esta entidad no la conocemos por el momento, es un motivo frecuente de consulta externa en nuestro Hospital. Por otra parte, en relación a los 2 estudios previos al nuestro en los que se han identificado diversos subtipos de HiNT aislados de oído medio y nasofaringe de niños con otitis media aguda, su tamaño de muestra ha sido pequeño. Por ello, creemos que en nuestro medio, el conocimiento de los subtipos de Haemophilus influenzae no tipificable aislados en oído medio y nasofaringe simultáneamente, es importante para incrementar el conocimiento en epidemiología molecular y mecanismos patogénicos. Además, la realización posterior de un estudio colaborativo multicéntrico nacional con un muestreo representativo de niños con otitis media aguda por HiNT ofrecería un panorama de los subtipos prevalentes y con ello el fundamento para el desarrollo potencial de vacuna vs cepas de Hi no tipificables que incluya los antígenos más frecuentemente aislados.

III. OBJETIVOS

1 - Identificar los subtipos de HINT en base al patrón electroforético de proteínas de membrana externa, de cepas aisladas de nasofaringe y oído medio en niños con otitis media aguda

2 - Asociar los subtipos de HINT identificados, de los aislamientos pareados de nasofaringe, con los de oído medio, en niños con otitis media aguda.

IV. MATERIAL Y METODOS

POBLACION DE ESTUDIO:

Se incluyeron a niños cuyas edades fluctuaron entre 1 mes y 13 años de edad, captados de las consultas de urgencias y otorrinolaringología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", en el periodo comprendido de mayo de 1991 a enero de 1993, en quienes habiéndose realizado el diagnóstico de otitis media aguda, se aislara Haemophilus influenzae no tipificable en forma simultánea de oído medio y nasofaringe. Se consideró el diagnóstico de OMA si el paciente presentaba la tríada de signos otoscópicos consistente en membrana timpánica hiperémica, abombada e hipomóvil a la neumatoscopia, asociada o no con alguno de los siguientes signos y síntomas : fiebre, irritabilidad, dolor de cabeza, apatía, anorexia, vómito, diarrea, otalgia, hipoacusia, vértigo o tinitus (22).

CRITERIOS DE INCLUSION

- Niños entre 1 mes y 13 años de edad con otitis media aguda u otitis media aguda recurrente con membrana timpánica íntegra.

CRITERIOS DE NO INCLUSION

1 - Pacientes con otitis media crónica. 2 - Con membrana timpánica rota. 3.- Que hubieran recibido más de 72 hrs. de antibióticos al llegar a la primera consulta. 4.- Niños con inmunocompromiso.

CRITERIOS DE EXCLUSION

1 - Niños en los cuales no hubiera sido posible tomar o cultivar alguna de las muestras de oído medio o nasofaringe. 2.- Niños cuyos padres o tutores rechazaron participar en el estudio.

AISLAMIENTO DE CEPAS

Cada timpanocentesis fue realizada por el investigador con el niño previamente sedado por un anesthesiólogo pediatra.

TECNICA: El primer paso consistió en la esterilización del conducto auditivo externo con alcohol al 70 % por 3 minutos, tomando posteriormente un cultivo del mismo. La punción de la membrana timpánica se realizó en su cuadrante postero-inferior utilizando un otoscopio de cabezal quirúrgico. La aspiración del oído medio fue hecha con una aguja para punción lumbar del numero 20 doblada en forma de balloneta unida a una jeringa desechable para PPD de 1 ml que funcionó como recipiente (24,25).

Al material obtenido del oído medio (0.1 a 0.2 ml) se le realizó tinción de gram para una orientación terapéutica inicial y se cultivó en placas de gelosa sangre de carnero y gelosa chocolate e incubadas a 35 grados centígrados en atmósfera de 5% de CO₂ (17). Al mismo tiempo, con un isopo estéril humedecido en caldo Stuart, se tomó muestra de nasofaringe, cultivándose en los mismos medios.

TIPIFICACION DE Haemophilus influenzae

Cada aislamiento fue identificado como Haemophilus influenzae por su morfología colonial, visualización microscópica de cocobacilos gram negativos y por requerir factores X y V (hemina y nicotinamida adenina dinucleótido NAD) para su crecimiento. Se consideraron como Hi no tipificables cuando las cepas no aglutinaron con ninguno de los sueros específicos a-f (Phadebact KARO-BIO)

De cada placa de gelosa chocolate con colonias sugestivas de Haemophilus influenzae, tanto de muestras de oído medio como de nasofaringe, se tomaron en forma aleatoria cuando fue posible, de 1 a 6 diferentes colonias para realizar subcultivos de cada una de ellas por separado, realizando posteriormente el corrimiento electroforético, dada la posibilidad de aislar diferentes subtipos de HiNT en la misma muestra de oído medio así como de nasofaringe.

MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE HINT Y OBTENCION DE PROTEINA DE MEMBRANA

Utilizamos el método descrito por Barenkamp y Cols (22). Cada aislamiento fue subcultivado en gelosa chocolate e incubado por 18 a 20 hrs. a 35 grados C. en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Se realizó un inóculo de cada aislamiento en 5 ml de caldo cerebro corazón, enriquecido con hemina (10 mcgr/ml) y nicotinamida adenina dinucleótido (10 mcgr/ml). Después de incubar durante 18 horas, los 5 ml de cultivo se colocaron en 50 ml de caldo cerebro corazón enriquecido con factores X y V en frascos de 100 ml e incubados a 35 grados C. en agitación durante 18-24 hrs.

Las bacterias se colectaron independientemente de la fase logarítmica de crecimiento por centrifugación en una ultracentrífuga BECKMAN L-60 a 40,000 x g por 20 minutos a 4 grados C. y congeladas a -20 grados C. en viales para su uso posterior.

Cada aislamiento bacteriano fue resuspendido en 10 ml de amortiguador de HEPES 0.01 M (pH 7.4) y roto por sonicación (Branson Sonifier 250) a ~ 100 Watts, con 5 periodos de 20 segundos cada uno en tubos de plástico sumergidos en hielo.

Las bacterias intactas y grandes detritus se removieron por centrifugación a 1,700 x g por 30 minutos, y las membranas de las bacterias se colectaron por centrifugación a 100,000 x g por 60 minutos a 4 grados C.

El botón resultante se homogeneizó por agitación y se resuspendió en 1 ml de amortiguador de HEPES 0.01 M, y 1 ml de la sal sódica de N-lauroylsarcosine (Sarcosyl) al 2% en amortiguador de HEPES 0.01 M (v/v) dejando incubar la muestra a temperatura ambiente por 30 minutos para solubilizar las proteínas de membrana interna.

La fracción insoluble al detergente (preparación rica en membrana externa) se colectó por centrifugación a 100,000 x g por 60 minutos a 4 grados C y el botón se resuspendió en 100 microlitros de agua destilada. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (23).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-DDS

La preparación de membrana se ajustó de tal manera que al hacer la dilución en 1:1 con una muestra de amortiguador preparado con TRIS HCl 0.5 M pH 6.8 (5 ml), SDS 10 % (0.5 ml), glicerol (0.5 ml), agua bidestilada (9 ml) y azul bromofenol R 250 (10 mg), se obtuviera una concentración de 15 mcgr de proteína. Se calentó a 100 grados C. por 5 minutos, para después enfriar bruscamente en agua con hielo para facilitar la desnaturalización proteica.

La electroforesis se realizó usando una minicámara (Mighty Small II Mod. SE 250, Hoefer Scientific Instruments) aplicando alícuotas en concentración de ~ 15 microgramos de proteínas a cada ranura de un gel de concentración preparado con 30% de acrilamida y 0.8% de N,N' bisacrilamida, y el gel de separación 11 % de acrilamida y 0.3% N,N' bisacrilamida.

Se aplicaron alícuotas de 1.5 microlitros de proteínas de peso molecular estandarizado (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low-Range 14,400- 97,400 BIO-RAD), en el primer carril de cada gel. La electroforesis se realizó a 4 grados C. y a 30 v hasta que la muestra alcanzó el gel de separación, y se incrementó a 100 v hasta que el rastro del colorante estuvo a 1 mm. del botón externo inferior del gel.

Una vez terminada la electroforesis, cada minigel fue colocado en una solución para tñir concentrada (ácido acético al 10%, Methanol 25 % y azul de Coomassie al 0.25 %) durante una hora. Posteriormente se colocaron en una solución para destañir (Acido acético 10 % y Methanol 25%) con una esponja encima del gel para absorber el colorante y con varios recambios durante 24 hrs.

La identificación en subtipos de las cepas problema se realizó en 2 etapas; en la primera se corrieron en uno de los geles y en forma pareada las PME de las cepas aisladas de oído medio y nasofarínge y en el otro, las de los 8 subtipos de referencia donadas gentilmente por Timothy F. Murphy, M.D. de la sección de enfermedades infecciosas de la Universidad de Buffalo en Nueva York (cuadro 1) para finalmente comparar sus perfiles en forma visual. En la segunda, se realizó otro corrimiento de las PME del subtipo de oído medio o nasofarínge y en forma contigua las del subtipo de referencia que en la primera etapa pareció ser visualmente el más semejante. El procedimiento se repitió hasta que el perfil de bandas de PME entre 32 y 42 Kd de cada cepa problema fue visualmente idéntico al de alguna de las cepas de referencia.

V. CONSIDERACIONES ETICAS:

La timpanocentesis fue realizada una vez que se explicó a los padres o tutores los riesgos y beneficios del procedimiento, claramente señalados por escrito en la carta de consentimiento informado (anexo 1) y que éstos firmaran su aceptación en forma escrita. El area física utilizada para el procedimiento contó con la ayuda de una enfermera pediatra como asistente, oxígeno, carro rojo y todo el material necesario. La sedación estuvo a cargo de una anesthesióloga pediatra, utilizando un derivado benzodiazepínico de acción ultracorta (Midazolam) previa atropinización. El investigador realizó las timpanocentesis después de un año de entrenamiento en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital, con autorización escrita del Jefe del servicio. En ningún caso se presentaron complicaciones durante o después del procedimiento. En todos los casos, el material obtenido del oído medio fue cultivado y las bacterias identificadas, realizando pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Los resultados fueron comunicados a los familiares en su mayoría por vía telefónica, logrando advertir tempranamente sobre cambios en la terapéutica inicial. Los pacientes mayores de 4 años consistentemente refirieron una mejoría o desaparición de la otalgia en forma inmediata posterior al procedimiento. El seguimiento se realizó diariamente durante los primeros 3 días y luego en forma semanal hasta completar un total de 3 meses o antes, si su evolución clínica y los signos otoscópicos mostraban una total recuperación.

VI. R E S U L T A D O S :

El estudio incluyó un total de 57 niños con otitis media aguda, captados en un período de 21 meses comprendidos de mayo de 1991 a enero de 1993; 20 (35 %) del sexo femenino y 37 del masculino (65 %) cuya distribución por grupos de edad mostró una mayor proporción de casos entre los 2 y 4 años de edad (cuadro 2).

Se realizaron un total de 67 timpanocentesis, 10 bilaterales, 22 unilaterales izquierdas y 25 unilaterales derechas, incluyendo las de 2 niños con cuadros de otitis media aguda recurrente. En 2 casos; una niña de 7 años y un niño de 3, los padres no aceptaron la realización del procedimiento por lo que fueron excluidos y manejados empíricamente teniendo una evolución clínica satisfactoria

MICROBIOLOGIA DEL OIDO MEDIO:

Se Logró el aislamiento de bacterias en 41 niños (72 %). Haemophilus influenzae en su totalidad cepas no tipificables, fue la bacteria predominante, aislada en 22; en 18 de un solo oído y en 4 de ambos simultáneamente. S.pneumoniae fue aislada en 13 niños (23 %) y junto con Haemophilus influenzae sumaron el 62 % de los aislamientos. S.aureus, N.sicca, N.subflava y S.pyogenes en orden decreciente, fueron aislados en una proporción global inferior; 10 % (cuadro 3).

AISLAMIENTO DE Haemophilus influenzae DE NASOFARINGE

Se aisló Hi de nasofaringe en 20 (35 %) de los 57 niños, correspondiendo 18 (90 %) a cepas NO TIPIFICABLES y 2 (10 %) del tipo b.

Resulta interesante mencionar que de los 22 niños en que se aisló Haemophilus influenzae no tipificable del oído medio, fue recuperado simultáneamente de nasofaringe en 14 (64 %) ; mientras que de los 35 restantes en que no se aisló Hi de oído medio se encontraron solamente 6 (17 %) portadores nasofaríngeos.

AISLAMIENTO SIMULTANEO DE Haemophilus influenzae DE OÍDO MEDIO Y NASOFARINGE

Definimos como CASO al aislamiento simultáneo de Haemophilus influenzae no tipificable en un oído medio y nasofaringe, dada la posibilidad descrita por Murphy (18) de encontrar en un mismo paciente, subtipos de HINT diferentes en cada uno de ambos oídos.

En nuestro estudio Haemophilus influenzae se aisló en forma pareada de oído medio y nasofaringe en 14 (25 %) de los 57 niños, asociado en 10 con otitis media unilateral y en 4 bilateral; de esta forma, obtuvimos 10 CASOS de 10 niños con otitis media aguda unilateral y 8 CASOS de 4 niños con otitis media aguda bilateral.

OMA BILATERAL:

En relación a los 4 niños que cursaron con afectación de ambos oídos, en ninguno se aislaron simultáneamente subtipos diferentes en ambos oídos.

OMA RECURRENTE:

los casos 9 y 14, correspondieron a un paciente con OMA recurrente, con un cuadro en OMI y posteriormente en OMD con un intervalo de 39 días entre ambos. En los dos episodios, los Hi aislados de oído medio fueron de SUBTIPOS DIFERENTES (ST-3 y 6) respectivamente.

Los casos 13,15-16 y 18, pertenecen a otro niño con OMA recurrente; el primer cuadro en el OMI, el segundo bilateral y un tercero nuevamente en OMI. El intervalo entre el primer y segundo cuadro fue de 23 días y entre éste y el tercero de 15 días. A diferencia del anterior se aisló EL MISMO SUBTIPO (ST-4) en los 3 episodios de OMA (cuadro 4).

SUBTIPOS DE Haemophilus influenzae DE LOS AISLAMIENTOS PAREADOS DE OIDO MEDIO Y NASOFARINGE:

Todos los HiNT aislados de oído medio fueron subtipificables y por orden de frecuencia se encontraron los subtipos 6, 4, 5, 3 y 8. Asimismo en nasofaringe, con excepción de 4 cepas cuyo patrón electroforético de PME no correspondió a ninguno de los 8 subtipos de referencia (no subtipificables), recuperamos los subtipos 6, 4, 5 y 3 en orden decreciente (Cuadro 4).

14 de los 18 aislamientos pareados fueron subtipificables; en 13/18 (72 %) los subtipos aislados de oído medio y nasofaringe fueron idénticos y en 1/18 (6 %) diferentes (Figura 1).

Considerando en su totalidad a los HiNT subtipificables tanto de oído medio como de nasofaringe en 32 de las 36 cepas aisladas, estuvieron representados 5 de los 8 subtipos de referencia. Los más frecuentemente aislados fueron el 6, 4 y 5 mientras que los subtipos 1, 2 y 7 no fueron recuperados en ningún caso (cuadro 5).

VII. D I S C U S I O N :

En nuestro estudio, al igual que en otras series (3,26) la mayor proporción de casos con otitis media aguda ocurrió en el sexo masculino, en los primeros 4 años de vida con un pico a los 2 años y sin predilección por ninguno de los oídos.

Desde el punto de vista microbiológico, la proporción de aislamiento bacteriano en el líquido de oído medio fue también similar (26); sin embargo Haemophilus influenzae y no S. pneumoniae fue la bacteria más frecuentemente aislada, tal vez consecuencia del sesgo de selección propio de un Hospital de 3er nivel de atención, además de haber sido incluidos 2 niños con otitis media aguda recurrente; uno de ellos (caso 13,15-16 y 18), y otro (caso 9 y 14) (cuadro 4) en los que se aisló Haemophilus influenzae en todos sus episodios de OMA.

El estudio de HiNT mediante su perfil electroforético de proteínas de membrana externa descrito por Murphy (9) y mediante el cual es posible identificar al menos 8 subtipos diferentes, fue reproducible y útil para subtipificar a 18/18 (100 %) cepas de HiNT aislados de oído medio y 14/18 (78 %) cepas de nasofaringe.

A pesar de que el perfil de PME de nuestros aislamientos fue heterogéneo, estuvieron representados 5 de los 8 subtipos de referencia en 32/36 (88 %) cepas de HiNT aisladas de oído medio y nasofaringe, mostrando con ello evidencia de restricción clonal.

En esta serie de casos, al igual que lo reportado por otro autor (18), la mayoría (72 %) de los aislamientos simultáneos de HiNT en oído medio y nasofaringe correspondieron al mismo subtipo no encontrando una diferencia estadísticamente significativa al comparar la proporción de aislamientos pareados con el mismo subtipo en ambos estudios. Esto sugiere que en la mayoría de los casos con otitis media aguda por un subtipo dado, los niños generalmente son colonizados simultáneamente en vías respiratorias altas por un solo subtipo de HiNT.

En uno de nuestros pacientes (caso # 14) los HiNT aislados de oído medio y nasofaringe fueron subclasificables, sin embargo el subtipo aislado en oído medio fue diferente al de nasofaringe. Una posible explicación es que en algunos casos (la minoría) la nasofaringe es colonizada por más de un subtipo de HiNT no tomando por azar el mismo subtipo del aislado en oído medio.

Dado que ha sido ampliamente demostrado que los patrones de PME son estables e independientes de la variabilidad de las condiciones in vitro (9), es probable que el no haber aislado en nuestro estudio 3 de los 8 subtipos de referencia conocidos, represente un efecto de sesgo de selección de la muestra, a su tamaño o quizá a una baja frecuencia de asociación de estos subtipos en niños con otitis media aguda.

Los subtipos 3,4,5,6 y 8 de HiNT encontrados en nuestros pacientes mostraron una similitud interesante no reportada previamente, con los aislados en un grupo de niños de diferente raza y región geográfica con otitis media aguda de un estudio realizado en los E.U. ST-2,3,4,5,6 y 7 (18) concordando en 4 (subtipos 3,4,5 y 6) de los 6 aislados en ambos estudios (Figura 2). Esto es de interés ya que a pesar de estas diferencias, ambos concordaron en una proporción importante en la infección por 4 subtipos comunes. Dado la n pequeña de niños y su pobre representatividad en ambos estudios, esta similitud pudiera estar dada por el azar o bien, sugerir que tanto la raza como las diferencias regionales, podrían ser insuficientes para explicar la heterogeneidad de subtipos de HiNT reportada hasta el momento en otros estudios (19,20) y que existirían entonces cepas otitogénicas de *Haemophilus influenzae* con una amplia distribución geográfica.

En algunas cepas aisladas de NF su perfil de proteínas de membrana externa no correspondió a ninguno de los subtipos de referencia (no subtipificables), posiblemente como consecuencia de la mezcla de más de uno en la colonia elegida al azar para su estudio obteniendo así un patron mixto, o bien a la presencia de subtipos diferentes a los 8 de referencia que por su baja frecuencia no han sido descritos.

OMA RECURRENTE:

En los 2 niños con cuadros de OMA recurrente, los subtipos de HiNT aislados del mismo paciente fueron IGUALES si el lapso entre un cuadro y otro fue menor a 30 días, traduciendo REINFECCION por una misma cepa; y DIFERENTES cuando el lapso fue mayor a 30 días y en donde la infección por una cepa diferente fue la regla. Estas observaciones son similares a las descritas por Barenkamp y cols. y otros (18,29), sin embargo nos llama la atención que en uno de nuestros casos con OMA recurrente en el que se aisló el mismo subtipo en 3 ocasiones, el hospedero haya sido aparentemente incapaz de desarrollar inmunidad específica.

OTITIS MEDIA AGUDA Y PORTADORES NASOFARINGEOS:

En los pacientes en los que se aisló HiNT de oído medio, la proporción de recuperación simultánea de HiNT de nasofaringe (64 %) fue casi cuatro veces superior que en los casos en los que no se aisló de oído medio (17 %). Esta observación concuerda con lo descrito por Faden (27) y Long (28) en relación al valor predictivo positivo en la etiología de la otitis media aguda cuando HiNT es aislado en un cultivo de nasofaringe como flora predominante.

Finalmente, el desarrollo de una vacuna para cepas no tipificables debe basarse en antígenos que se conserven entre distintas cepas, capaces de generar anticuerpos protectores y que sean buenos inmunógenos (30). Aunque la PME más prominente, base de la clasificación en 8 subtipos corresponde a P2 y reúne las características idóneas para el desarrollo de una vacuna, su heterogeneidad entre las distintas cepas ha llevado a algunos investigadores a poner su atención sobre otra proteína de membrana externa, la proteína P6 de 16.6 Kd (17) que además de reunir los requisitos de inmunogenicidad y ser capaz de inducir la generación de anticuerpos bactericidas por el hospedero, está conservada en toda la especie Haemophilus incluyendo capsulados.

Por tanto, aunque el desarrollo de una vacuna posiblemente incluirá a la proteína P6 (17,30) la restricción clonal y la concordancia de subtipos de Haemophilus influenzae no tipificables encontrada en nuestros niños con otitis media aguda y su similitud con los de otro estudio en los E.U. (18), nos permite suponer con razonable optimismo que el desarrollo potencial de una vacuna para Hi no tipificables podría ser de utilidad para nuestra población infantil.

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

- En nuestro estudio, los subtipos de Haemophilus influenzae no tipificable aislados de oído medio y nasofaringe fueron los siguientes:

ST 3	n = 3
ST 4	n = 10
ST 5	n = 7
ST 6	n = 11
ST 8	n = 1

Los subtipos 1, 2 y 7 no fueron encontrados

- En su mayoría (72 %), los subtipos de Haemophilus influenzae no tipificable aislados en oído medio de niños con otitis media aguda, fueron IGUALES a los subtipos aislados simultáneamente en nasofaringe.

IX. R E F E R E N C I A S

1. Teele DW, Klein JO, Rosner B, Bratton L, Fisch GR, Mathieu OR, Porter PJ, Starobin SG, Tarlin LD, Younes RP. Middle Ear Disease and the Practice of Pediatrics. Burden During the First Five Years of Life. JAMA 1983;249:1026-1029.
2. Bluestone CD. Definitions, Terminology, and Classification. In: Bluestone CD, Klein JO. Otitis Media in Infants and Children. WB Saunders Company. 1988:1-4.
3. Howie VM, Schwartz RH. Acute Otitis Media. One Year in General Pediatric Practice. Am J. Dis Child 1983;137:155-158.
4. Freijd A, Oxelius VA, Dagoob BR. A Prospective Study Demonstrating an Association Between Plasma IgG2 Concentrations and susceptibility to Otitis Media in Children. Scand J Infect Dis 1985;17:115-120.
5. Rodriguez RS. Otitis Media Aguda Purulenta. Etiologia y tratamiento. En: Rodriguez RS. Infecciones de vias respiratorias superiores en pediatria. Edit. Imprecalli. 1989:95-109.
6. Nelson JD. Changing Trends in the Microbiology and Management of Acute Otitis Media and Sinusitis. Pediatr Inf Dis 1986;5:749-753.

7. Bluestone CD. Microbiology. In: Bluestone CD, Klein JO. Otitis Media in Infants and Children. WB. Saunders Company 1988:45-58.
8. Hendrickse WA, Sheton S, Kusmiesz H, Nelson JD. Biotypes of Haemophilus influenzae Isolated from Middle Ear Fluid of Children With Acute Otitis Media With Effusion. In: Lim DJ, Bluestone CD, Nelson JD, eds. Proceedings of the Fourth International Symposium. Recent Advances in Otitis Media with Effusion. Toronto; B.C. Decker, 1987:328-330.
9. Murphy TF, Dudas KC, Mylotte JN, Apicella MA. A Subtyping System for Nontypable Haemophilus influenzae Based on Outer-Membrane Proteins. J Infect Dis 1983;147:838-846.
10. Henderson FW, Collier AM, Sanyal MA, Watkins JN, Fairclough DL, Clyde WA, Denny FW. A longitudinal Study of Respiratory Viruses and Bacteria in the Etiology of acute Otitis Media with Effusion. N Engl J Med 1982;306:1377-1383.
11. Barenkamp SJ, Granoff DM, Munson RS. Outer-Membrane Protein Subtypes of Haemophilus influenzae Type b and Spread of Disease in Day-Care Centers. J Infect Dis 1981;144:210-217
12. Hernández VRM. Proteínas de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Infectología 1983:371-378

13. Murphy TF, Apicella MA. Antigenic Heterogeneity of Outer Membrane Proteins of Nontypable Haemophilus influenzae in a Basis for a Serotyping System. Infect Immun 1985;50:15-21.
14. Munson RS, Granoff DM. Purification and Partial Characterization of Outer Membrane Proteins P5 and P6 from Haemophilus influenzae Type b. Infect Immun 1985;49:544-549.
15. Murphy TF, Bartos LC. Purification and Analysis with Monoclonal Antibodies of P2, the Major Outer Membrane Protein of Nontypable Haemophilus influenzae. Infect Immun 1988;56:1084-1089.
16. Hansen MV, Musher DM, Baugun RD. Outer Membrane Proteins of Nontypable Haemophilus influenzae and Reactivity of Paired Sera from Infected Patients with Their Homologous Isolates. Infect Immun 1985;47:843-846.
17. Murphy TF, Bartos LC. Human Bactericidal Antibody Response To Outer Membrane Protein P2 of Nontypable Haemophilus influenzae. Infect Immun 1988;56:2673-2679.
18. Murphy TF, Bernstein JM, Dryja DM, Campagnari AA, Apicella MA. Outer Membrane Protein and Lipooligosaccharide Analysis of Paired Nasopharyngeal and Middle Ear Isolates in Otitis Media Due to Nontypable Haemophilus influenzae: Pathogenic and Epidemiological Observations. J Infect Dis 1987;156:723-731.

19. Munson RS, Kabeer MH, Lenoir AA, Granoff DN. Epidemiology and prospects for prevention of Disease Due to Haemophilus influenzae in developing Countries. Rev Infect Dis 1989;11:S588-S597
20. Weinberg GA, Lehmann D, Tupasi T, Granoff DN. Diversity of Outer Membrane Protein Profiles of Nontypable Haemophilus influenzae Isolated From Children from Papua New Guinea and the Philippines. Rev Infect Dis 1990;12:S1017-S1020
21. Bluestone CD. Physiology, Pathophysiology, and Pathogenesis. In Bluestone CD, Klein JO. Otitis Media In Infants and Children. WB. Saunders Company. 1988:15-29.
22. Bluestone CD. Diagnosis. In: Bluestone CD, Klein JO. Otitis Media In Infants and Children. WB. Saunders Company. 1988:69-117
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275
- 24.- Kaplan SL, Feigin RD. Simplified Technique for Tympanocentesis. Pediatr 1978;62:418-419
- 25.- Hoekelman RA. Do you do tympanocenteses ?. Pediatr Ann 1991;20:585-587
- 26.- Paradise JL. Otitis media in Infants and Children. Pediatrics 1980;65:917-943

27.- Faden H, Stanievich J, Brodsky, Bernstein J, Ogra PL. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:623-626

28.- Long SS, Henretig FM, Teter MJ, McGowan KL. Nasopharyngeal Flora and Acute Otitis Media. *Infect Immun* 1983;41:987-991

29.- Barenkamp SJ, Shurin PA, Marchant CD, Karasic RB, Pelton SI, Howie VM, Granoff DM. Do Children with recurrent *Haemophilus influenzae* otitis media become infected with a new organism or reacquire the original strain? *J Pediatr* 1984;105:533-537.

30.- Murphy TF, Campagnari AA, Nelson MB, Apicella MA. Somatic antigens of *Haemophilus influenzae* as vaccine components. *Pediatr Infect Dis* 1989;8:566-568.

31.- Guiscafre GH, García MM, Jaime CM, Trejo y PJA, García M, Hernandez VR, Muñoz O. Frecuencia de *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina en portadores sanos. *Arch Invest Med (Mex)* 1981;12:141-150

X. FIGURAS Y CUADROS :

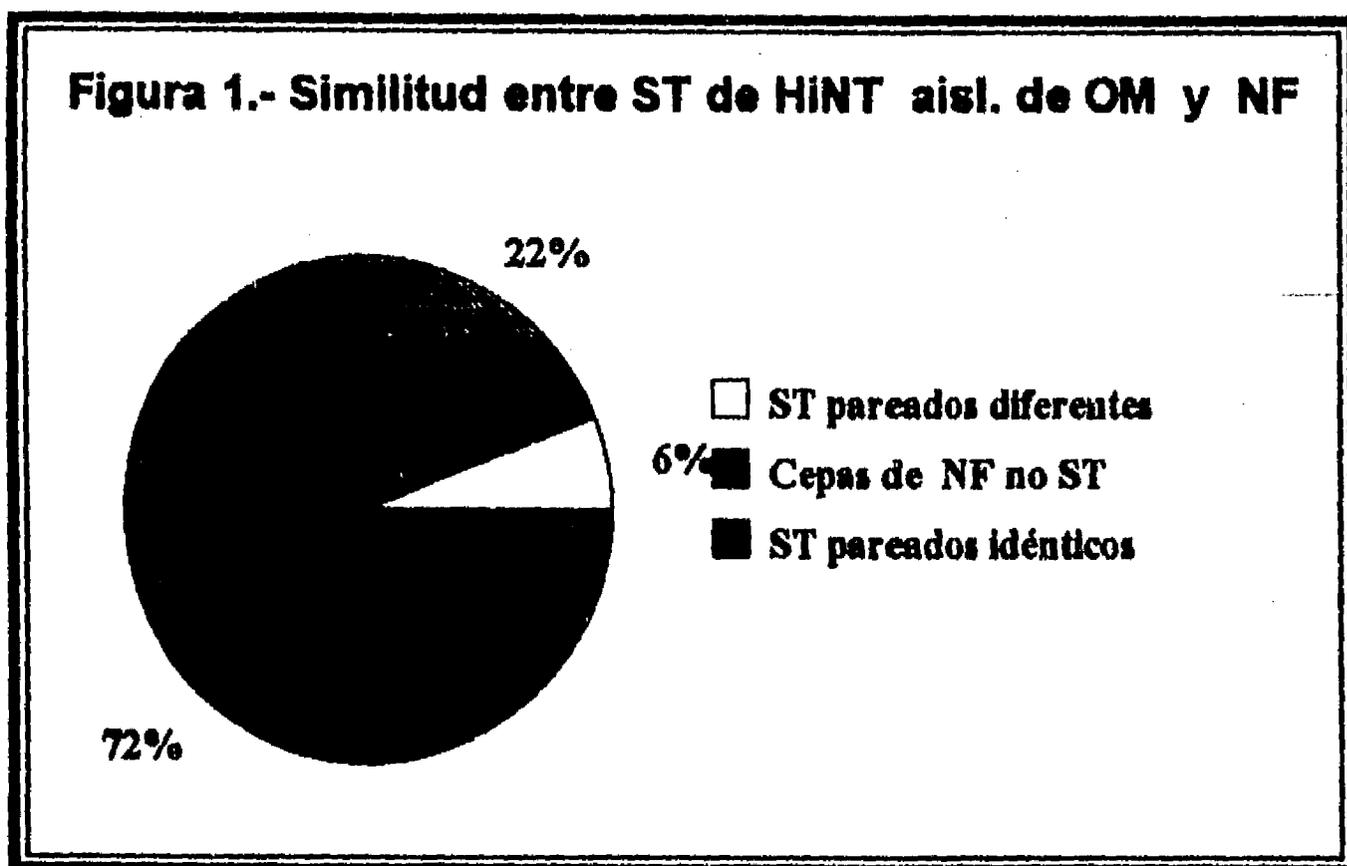
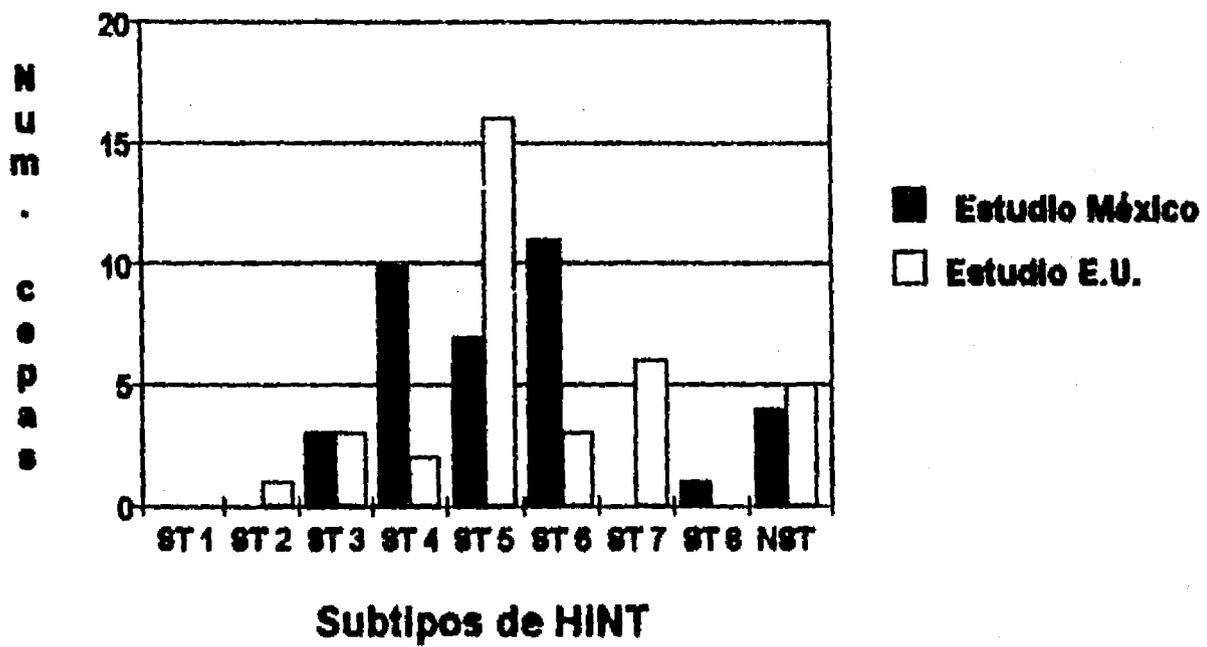


Figura 2.- ST de HiNT en OM y NF de niños con OMA



Cuadro 1

**Cepas de
referencia donadas
por T. Murphy**

subtipo	cepa
1.	1479
2.	2019
3.	7502
4.	C7961
5.	4971
6.	7891
7.	5657
8.	3198

Cuadro 2

Distribución de los casos de acuerdo a edad en años

Años cumplidos	n	(%)
1	5	9
2	11	19
3	6	11
4	9	16
5	3	5
6	8	14
7	3	5
8	4	7
9	4	7
10	3	5
11	0	0
12	0	0
13	1	2
Tot.	<hr/> 57	<hr/> 100

Cuadro 3

Bacteriología del líquido de oído medio obtenido mediante timpanocentesis de 57 niños con otitis media aguda.

PACIENTES n	(%)	BACTERIA AISLADA
22	39	<u>H. influenzae</u>
13	23	S. pneumoniae
3	5	S. aureus
2	3.5	N. sicca, subflava
1	2	S. pyogenes
16	28 %	CULTIVO NEGATIVO

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Cuadro 4

Subtipos de HiNT aislados simultáneamente de oído medio y nasofaringe de niños con OMA

#	CASO	OMI	ST	OMD	ST	NF	ST
A	1	+	6	-	-	+	6
A	2	-	-	+	6	+	6
	3	+	5	-	-	+	NC
	4	-	-	+	5	+	5
B	5	+	6	-	-	+	6
B	6	-	-	+	6	+	6
	7	+	8	-	-	+	NC
	8	+	5	-	-	+	5
C	9	+	3	-	-	+	NC
C	10	-	-	+	3	+	NC
	11	+	4	-	-	+	4
	12	-	-	+	5	+	5
	13	+	4	-	-	+	4
	14	-	-	+	6	+	3
D	15	-	-	+	4	+	4
D	16	+	4	-	-	+	4
	17	-	-	+	6	+	6
	18	+	4	-	-	+	4

*A,B,C,D. = corresponden a los 4 casos con timpanocentesis bilateral

Cuadro 5

**Subtipos encontrados en oído medio
y nasofaringe en 18 CASOS con OMA**

ST	n	ST	n
1	0	5	7
2	0	6	11
3	3	7	0
4	10	8	1
NC	4		

XI. ANEXOS :

(ANEXO # 1)

Fecha _____ de _____ de 199_

Por medio de la presente concedo autorización para que mi hijo(a) _____ sea estudiado y tratado en forma ambulatoria de una infección del oído medio (otitis media aguda) en este Hospital, a sabiendas de que, con el objeto de conocer el tipo de microbio que la ocasiona, y disminuir el dolor de su oído, se extraerá la pus que este contiene bajo sedación a través de la punción de la membrana timpánica (timpanocentesis).

La información que de aquí se derive, será dada a conocer exclusivamente a los padres o tutores del menor y la inclusión en el estudio no implicará ningún gasto extra por parte del familiar. Los riesgos y beneficios de la timpanocentesis se me han explicado a entera satisfacción.

El no aceptar participar en esta investigación, no afectará la atención del niño o de su familia en lo futuro en este Hospital.

SI CONCEDO MI AUTORIZACION PARA QUE A MI HIJO(A) le sea realizada la timpanocentesis.

FIRMA DEL PADRE (MADRE) O TUTOR _____

FIRMA DEL MEDICO QUE OBTIENE EL CONCENTIMIENTO _____

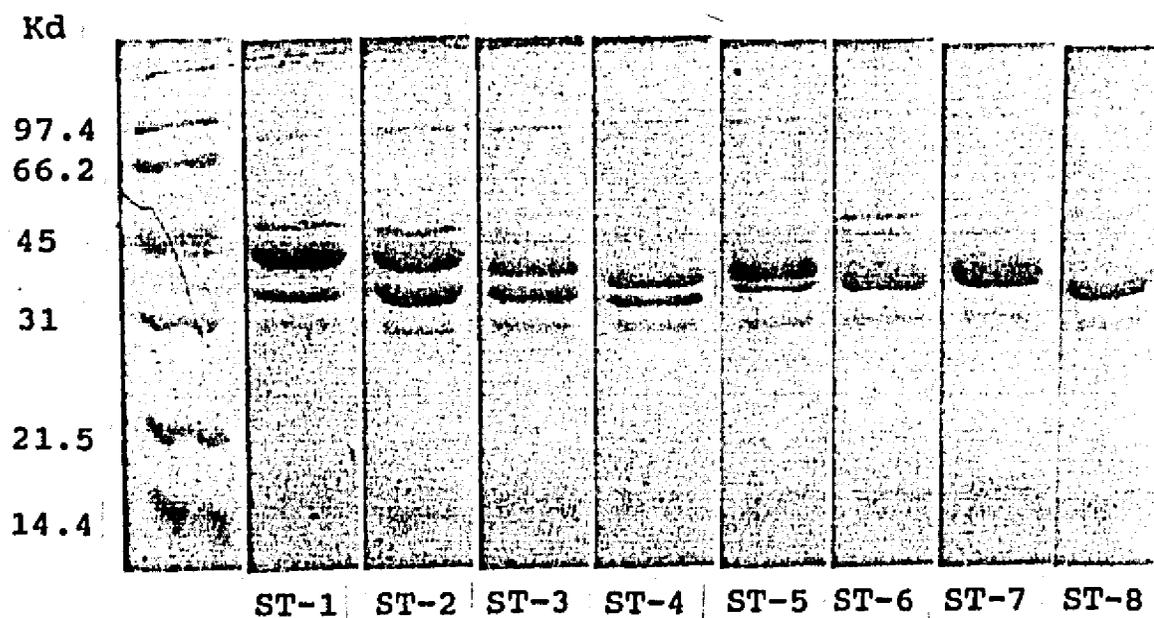
TESTIGO _____

TESTIGO _____

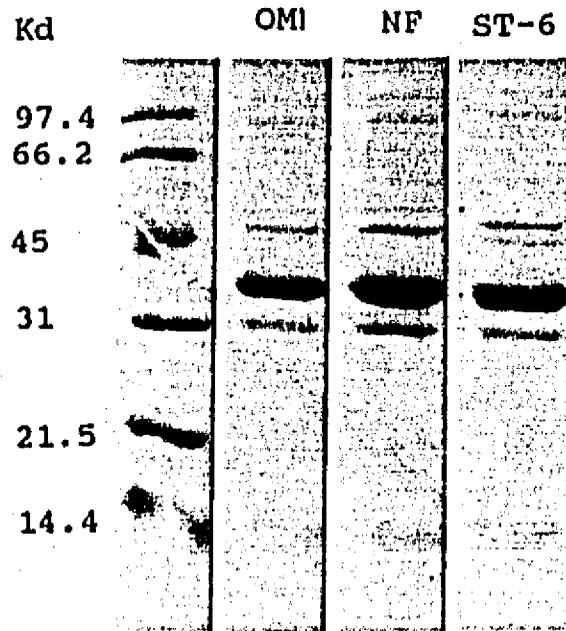
A N E X O # 2

CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO EN PAGE-SDS DE LOS

SUBTIPOS DE HINT DESCRITOS POR MURPHY

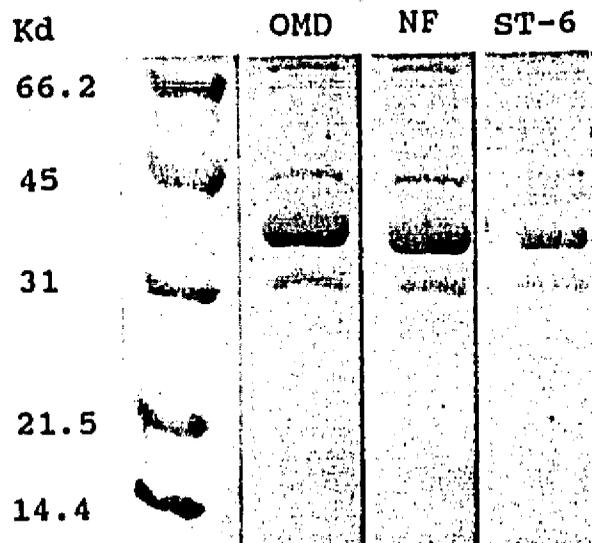


CASO # 1



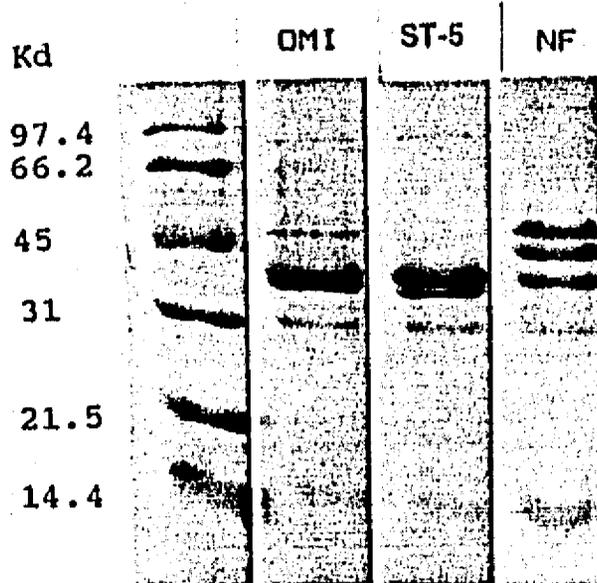
Aislamiento del ST-6
en OM y NF.

CASO # 2



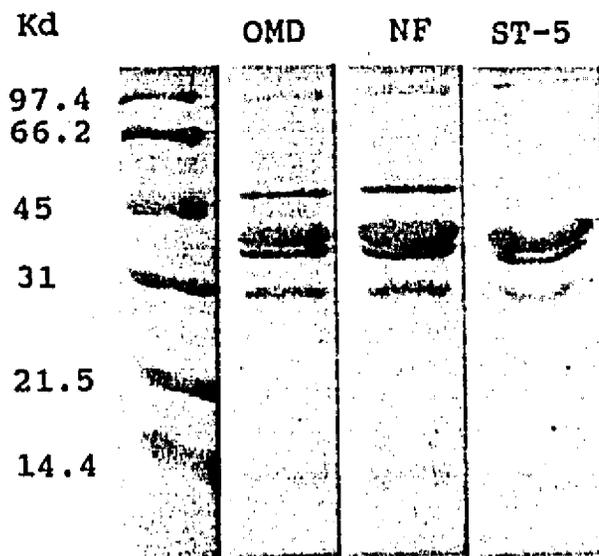
Aislamiento del ST-6
en OM y NF.

CASO # 3



Aislamiento del ST-5 en OM y ST-no clasificabe en NF.

CASO # 4



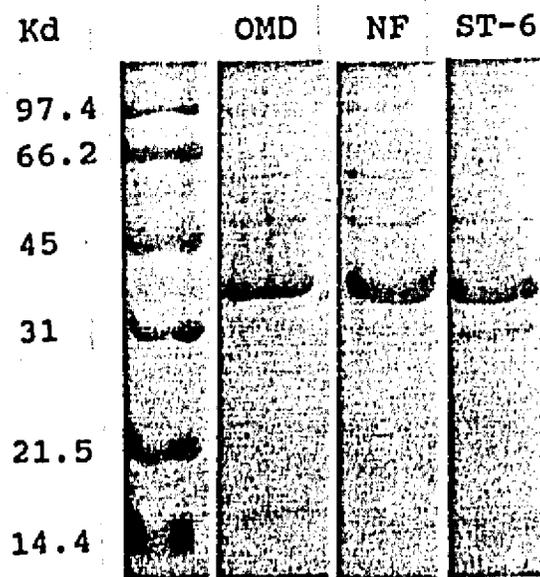
Aislamiento del ST-5 en OM y NF.

CASO # 5



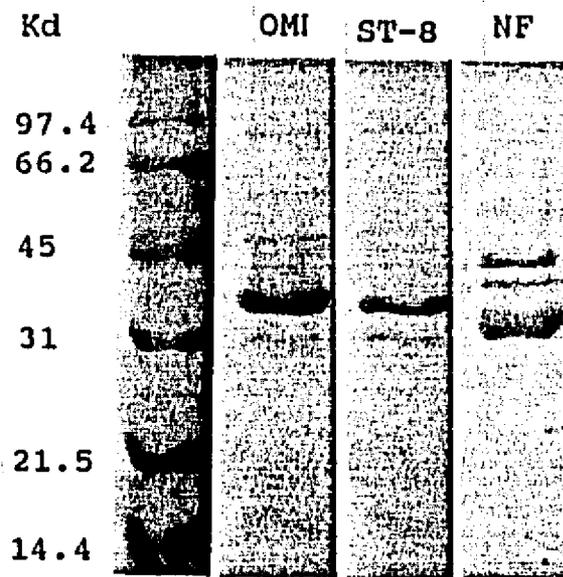
Aislamiento del ST-6
en OM y NF.

CASO # 6



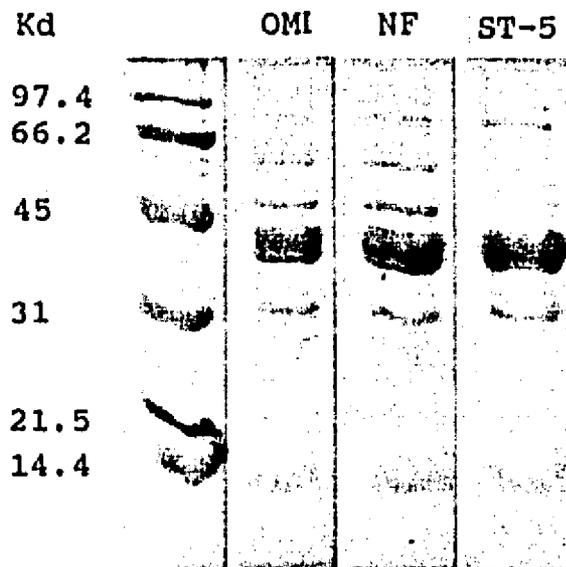
Aislamiento del ST-6
en OM y NF.

CASO # 7



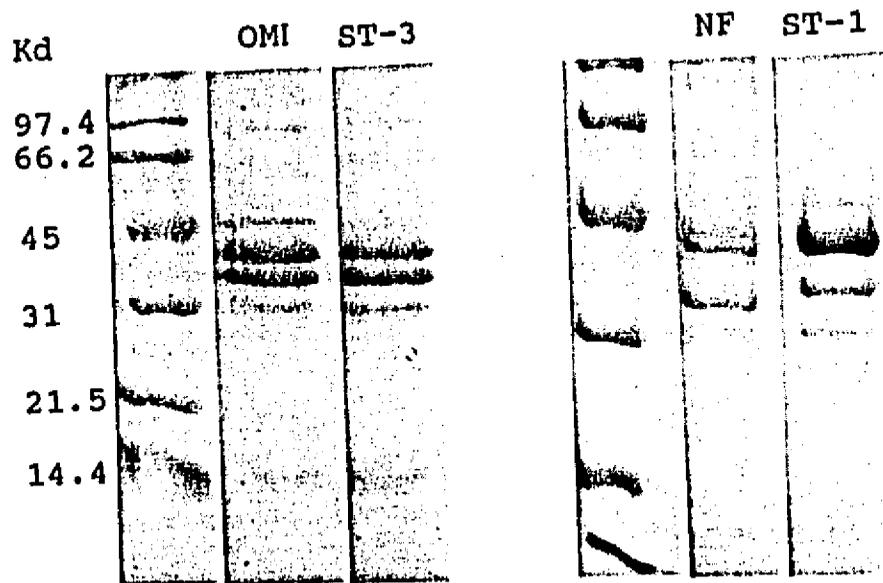
Aislamiento del ST-8 en OM y un ST- no clasificable en NF.

CASO # 8



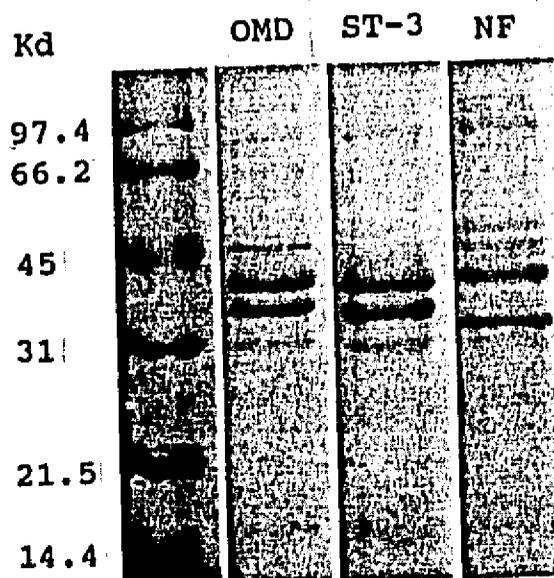
Aislamiento del ST-5 en OM y NF.

CASO # 9



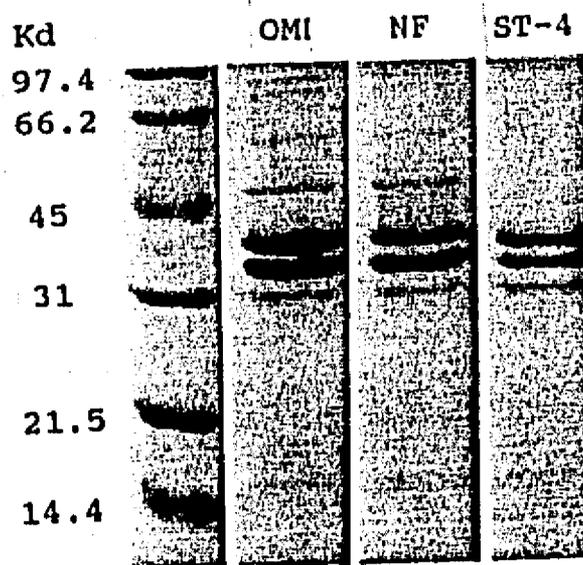
Aislamiento del ST-3 en OM y en NF un ST-no clasificable con una notable similitud al ST-1

CASO # 10



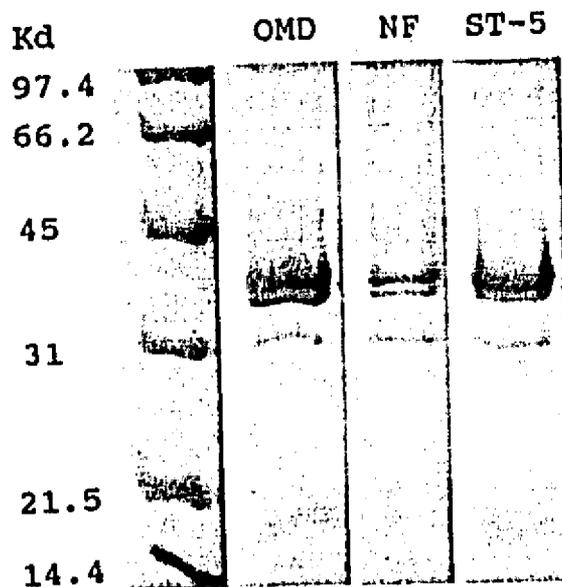
Aislamiento del ST-3 en OM y un ST no clasificable en NF.

CASO # 11



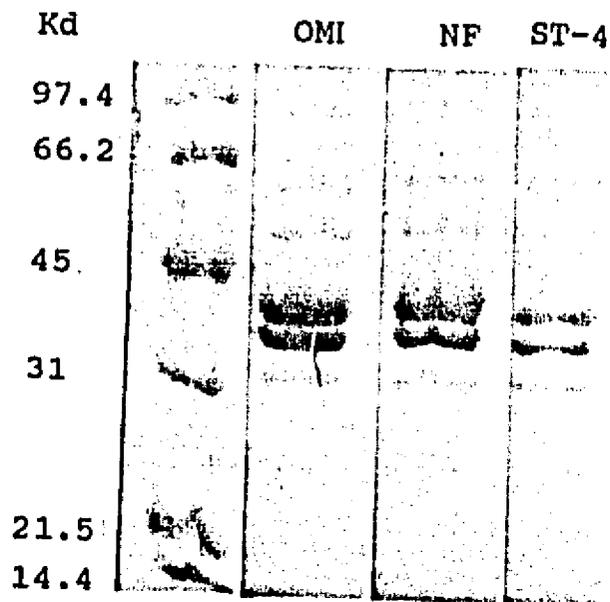
Aislamiento del ST-4 en OM y NF.

CASO # 12



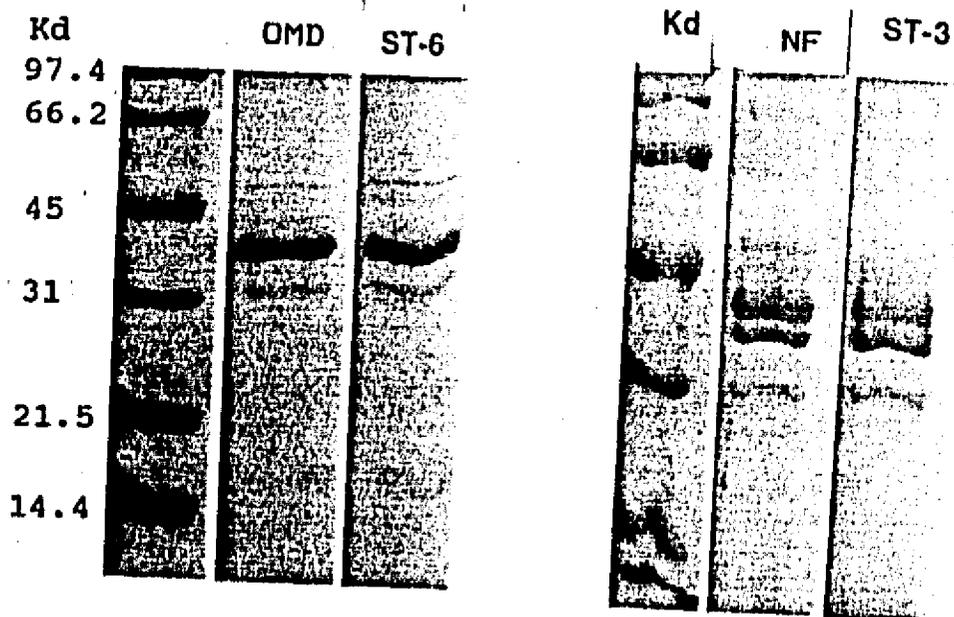
Aislamiento del ST-5 en OM y NF.

CASO # 13



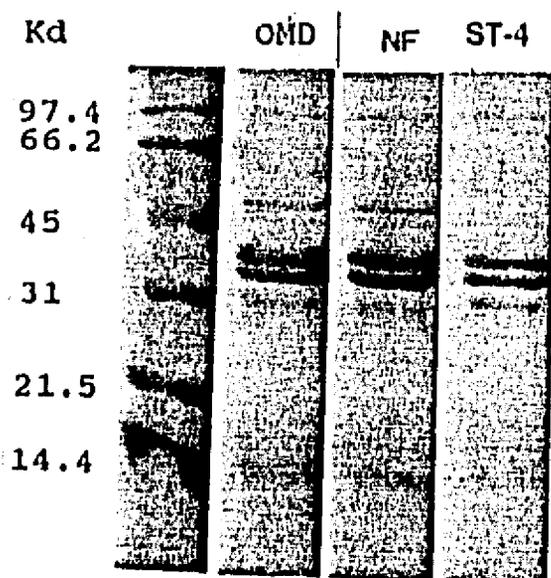
Aislamiento del ST-4 en OM y NF.

CASO # 14



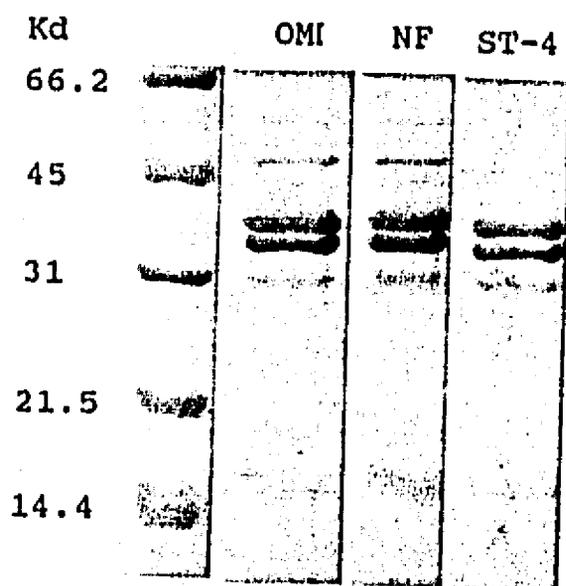
Aislamiento del ST-6 en OM y el ST-3 en NF.

CASO # 15



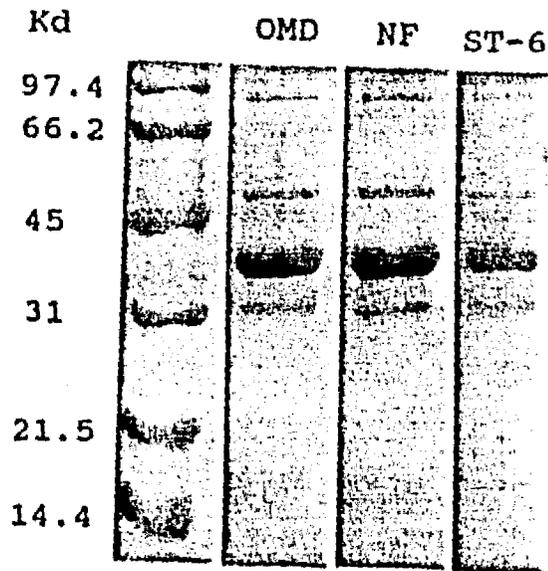
Aislamiento del ST-4
en OM y NF.

CASO # 16



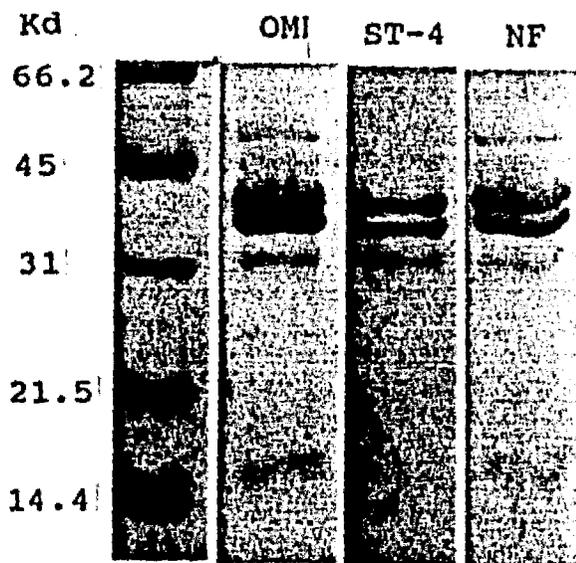
Aislamiento del ST-4
en OM y NF.

CASO # 17



Aislamiento del ST-6
en OM y NF.

CASO # 18



Aislamiento del ST-4
en OM y NF.