

11237

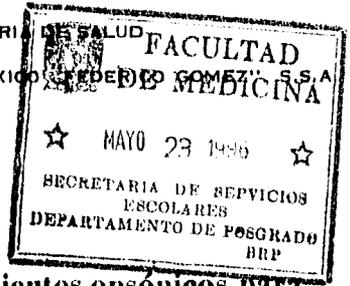


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

191
209

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ S.S.A



Evaluación de los requerimientos opsonicos para la fagocitosis de *Streptococcus pneumoniae* por los leucocitos polimorfonucleares de niños y adultos sanos mediante un ensayo de quimioluminiscencia

T E S I S

PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN PEDIATRIA MEDICA

REALIZADA POR:

DRA. ROSA MARIA WONG CHEV

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO

Jose Ignacio Santos



1996

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 esta 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.

A mis padres, César y Alberto
por su apoyo incondicional

A Michael por su cariño y comprensión

Al Dr. José Ignacio Santos por su ejemplo
y ayuda para la realización de ésta tesis

Al Dr. Gerardo Martínez, Catalina y Angelica
por su apoyo para la realización de ésta tesis

INDICE

	Página
Introducción	1
Marco teórico	3
La respuesta inmune	3
Los polimorfonucleares	3
El sistema de complemento	4
Evaluación de los mecanismos oxidativos	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
Metabolismo y requerimientos de crecimiento.....	7
Morfología	7
Antígenos de superficie: polisacáridos capsulares.....	8
Toxinas	9
Autolisinas	9
Antecedentes	11
Objetivos:	
General	20
Específicos	20
Hipótesis	21
Material y métodos:	
Tamaño de la muestra	22
Población	22
Obtención de polimorfonucleares	23
Obtención de la muestra	23
Separación de polimorfonucleares	23

Censo de polimorfonucleares	24
Obtención y preparación de la bacteria	24
Evaluación de la actividad fagocítica	28
Resultados	29
Discusión	35
Conclusiones	38
Bibliografía	40.

INTRODUCCION

El *Streptococcus pneumoniae* es un germen patógeno frecuente en la edad pediátrica, es causante de infecciones de vías aéreas superiores simples como otitis, sinusitis, hasta infecciones graves como neumonía, meningitis, sepsis, osteomielitis y celulitis.

En una infección intervienen varios mecanismos de defensa del huésped incluyendo la inmunidad celular y humoral. En la inmunidad humoral intervienen los anticuerpos, complemento y citocinas las cuales son secretadas por varias células; en la inmunidad celular intervienen células de defensa que incluyen linfocitos T y B, células NK, granulocitos y monocitos/macrófagos los cuales son derivados de precursores del sistema hematopoyético.

La función fagocítica del sistema monocito-macrófago es el proceso por medio del cual las células de éste sistema engloban y destruyen intracelularmente partículas y células identificadas como extrañas al organismo. Durante la destrucción intracelular se genera un evento bioquímico descrito como "estallido respiratorio", en éste fenómeno se observa un incremento en el consumo de oxígeno y la activación de una oxidasa que reduce el oxígeno molecular hasta anión superóxido, el cual se transforma en peróxido de hidrógeno que, junto con los contenidos enzimáticos de los lisosomas actúan juntos dentro del fagosoma para degradar los microorganismos ingeridos.

Los polimorfonucleares (PMN) o granulocitos son células cuya función principal es la destrucción de microorganismos extraños al organismo humano. Para realizar ésta función se requiere de una serie de eventos coordinados que culminan en la ingestión y destrucción de los patógenos invasores. Para que la función fagocítica del PMN sea adecuada se requiere de la participación de elementos presentes en el suero humano conocidos como opsoninas. La opsonización se refiere al proceso por el cual los microorganismos u otras partículas son recubiertas por anticuerpos y/o complemento u otros factores y preparados para el "reconocimiento" e ingestión por los fagocitos. La eficiencia de éste proceso como mecanismo de defensa contra la infección depende de: 1) la capacidad de los anticuerpos específicos, complemento y otras proteínas para inducir éstos sucesos, 2) la presencia y capacidad de fagocitosis de PMN, monocitos y macrófagos del

hospedero y 3) la susceptibilidad de los organismos para ser destruidos dentro de las células una vez que han sido ingeridos.

En éste estudio se evalúa la fagocitosis de PMN de niños y adultos sanos retados *in vitro* con *Streptococcus pneumoniae* bajo diferentes condiciones de opsonización , midiendo el estallido respiratorio por medio de quimioluminiscencia.

Este estudio tiene como objetivo contribuir al mejor entendimiento de la patogénesis de la infección por *Streptococcus pneumoniae* que es un gérmen etiológico frecuente en las infecciones graves de los niños.

MARCO TEORICO

LA RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune está compuesto por 2 tipos de inmunidad: la inmunidad celular y la inmunidad humoral. La inmunidad celular comprende a los linfocitos T y B, células NK, granulocitos, monocitos y macrófagos, éstas células son derivadas de una línea pluripotencial que da lugar a las diferentes líneas celulares. La inmunidad humoral está dada por los anticuerpos, complemento y otras citocinas que son secretadas por diferentes células del sistema inmune, en la respuesta inmune hay interacción entre células y componentes humorales.

Los polimorfonucleares

Los granulocitos o polimorfonucleares se originan en la médula ósea donde pasan por varias etapas antes de alcanzar su estado maduro, una vez maduro es liberado hacia la sangre, la vida promedio del polimorfonuclear en sangre periférica es de 8 a 12 horas, mide de 10 a 12 μ de diámetro, tiene un núcleo multilobulado que puede estar unido por filamentos, el citoplasma contiene abundantes gránulos, existen 2 tipos de gránulos: los gránulos azurófilos que son los que inicialmente aparecen contienen por lo menos 6 enzimas hidrolíticas además de peroxidasa, y los gránulos específicos que aparecen posteriormente no contienen enzimas lisosómicas sino una sustancia bactericida y fosfatasa alcalina.¹

Las células fagocíticas juegan un papel importante en la defensa del huésped ante infecciones bacterianas, las funciones de éstos se dividen en 2 categorías: la primera es la remoción de microorganismos patógenos, la segunda es el aclaramiento de células viejas o dañadas de los tejidos. Un microorganismo virulento puede ser fagocitado por un proceso no específico que no requiere la participación de anticuerpo o activación del complemento, sin embargo algunos patógenos sí lo requieren para su depuración eficiente, a la interacción de éstos con la bacteria para su fagocitosis se denomina opsonización, y consiste en un

mecanismo por medio del cual hay modificación de las fuerzas físicas de la bacteria por anticuerpo o complemento favoreciendo la fagocitosis, C3b y anticuerpos específicos son las opsoninas más importantes. Para que haya movilización de los leucocitos es necesaria su adhesión al endotelio capilar, el movimiento de los leucocitos es generado por la actividad de microfilamentos de actina, miosina y proteínas asociadas que regulan la contracción y relajación de las partes en movimiento de la célula y son controladas por la concentración local de calcio. Los leucocitos muestran respuesta locomotora a factores del microambiente que determinan la velocidad de movimiento a lo que se denomina quimiotaxis, ésta puede estar dada por albúmina, y a factores que atraen a los leucocitos llamados factores quimiotácticos, la bacteria puede producir factores quimiotácticos llamados citotaxinas, sin embargo tiene un efecto débil, el mayor factor quimiotáctico es C5a, un componente de complemento, aunque también se describen otros como leucotrieno B4, factor activador de plaquetas y linfocinas²

Una vez que el neutrófilo llega al lugar de infección engloba a la bacteria por la membrana celular del polimorfonuclear y queda en un saco membranoso dentro del citoplasma llamado fagosoma, los gránulos específicos y azurófilos del PMN se fusionan con el fagosoma a lo que se denomina degranulación, y el agente extraño es destruido por la acción de las enzimas hidrolíticas, además por medio de la mieloperoxidasa existe formación de derivados de oxígeno (anión superóxido, singletes de oxígeno, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) que son altamente tóxicos para la bacteria, a la formación de éstos derivados oxidativos se denomina estallido respiratorio¹.

El sistema de complemento

El complemento está compuesto por proteínas séricas que funcionan en forma integrada y ordenada, sirven como mediadores de la inflamación y defensa del huésped. Los microorganismos pueden activar los componentes por medio de 2 vías, la clásica y la alterna.

a) *Vía clásica.*- La activación de la vía clásica es iniciada por la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, la porción Fc del anticuerpo se une y activa el primer componente del complemento

(C1), C1 está compuesto por 3 proteínas diferentes denominadas C1q, C1r, C1s. C1q se une al anticuerpo llevando a la activación de C1r y C1s, C1s activado activa C4 y C2 que forma un complejo bimolecular (C4b,2a), que divide C3 en 2 fragmentos C3a y C3b, C3a puede actuar como anafilotoxina, C3b puede liberarse a la circulación e inactivarse o se une a la célula y puede actuar como opsonina o une C5 para que actúe C5 convertasa y separe C5 en C5b que une C6, C7, C8 y C9 formando el complejo de ataque a la membrana produciendo citólisis. Esto está regulado por varios mecanismos: C1s puede ser inhibido por el inhibidor de C1 estearasa, la porción C2a de la enzima C4b,2a y C4b,2a,3b sufre disociación en temperaturas fisiológicas, otra proteína controladora es la que une C4, por lo que la activación de C3 a C9 se lleva a cabo en forma controlada y está limitado a la vecindad de la sustancia iniciadora (superficie microbiana).

b) *Vía alterna.*- La activación de C3 a C9 es iniciada por una enzima que divide a C3 y es distinta de C4b,2a. La C3 convertasa es un complejo bimolecular constituido por C3b y el factor B de la vía alterna (C3b,Bb) La forma activada del factor B es generado por el factor D. Puede haber producción de C3b si éste se une a la superficie bacteriana y se une a Bb puede haber una enzima divisoria de C3b y una convertasa creándose una C5 convertasa que lleva a la formación del complejo de ataque a la membrana. La enzima es muy lábil a temperatura fisiológica, una de las proteínas de la vía clásica es la properdina que funciona para estabilizar la enzima retardando su lisis. Otras 2 proteínas el factor H y el factor I actúan inhibiendo la C3 convertasa inactivando C3b unido a la célula creando iC3b.

La activación de la vía clásica con la creación de C3b lleva a activación de la vía alterna.

La activación del complemento por cualquiera de las vías produce productos biológicamente activos que son importantes en la generación de una respuesta inflamatoria y en la defensa del huésped contra infección. Al activarse C3 y C5 se produce C3a y C5a que se libera a la sangre, tienen actividad anafilotóxica y son capaces de liberar histamina de los mastocitos, contrayendo músculo liso, y promoviendo aumento de la permeabilidad capilar, ésta función es importante durante la respuesta inicial a una infección. C5a también interactúa directamente con las células fagocíticas para producir varios cambios: es un factor quimiotáctico potente que causa el movimiento dirigido de polimorfonucleares y monocitos, C5a favorece la adherencia de las células fagocíticas al endotelio vascular, C5a causa agregación de leucocitos

polimorfonucleares y leucostasis in vivo, un proceso que puede causar daño inmunopatogénico al huésped durante la infección. C3b actúa como una opsonina potente cuando se une a la superficie de los organismos, los macrófagos que tienen receptores para C3b en su superficie liberan sus enzimas granulares en respuesta a estimulación con C3b, los linfocitos B que también poseen receptores para C3b liberan una linfocina de célula B que es quimiotáctica para monocitos posterior a la exposición a C3b³.

Evaluación de los mecanismos oxidativos

Existen pruebas para medir el estallido respiratorio: la determinación de superóxido, con la medición de la reducción de ferrocitocromo C a la forma ferrosa, el peróxido de hidrógeno se puede detectar por su reacción con peroxidasa o por la oxidación de donadores de hidrógeno utilizando rojo fenol. Otros métodos incluyen quimioluminiscencia y reducción del nitroazul de tetrazolio.

La quimioluminiscencia es el fenómeno luminiscente secundario a la generación de especies oxidativas que despiden electrones (O_2^- , H_2O_2 , O_2) esto durante la fagocitosis de los polimorfonucleares. Esta respuesta se amplifica con luminol (5-amino,2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) y lucigenina. La respuesta amplificada por luminol refleja la actividad de la mieloperoxidasa. Cuando éste sustrato es oxidado se origina el anión aminofalato que es inestable, al pasar al estado de reposo emite luz como mecanismo de pérdida de energía, en ésta forma se magnifica la luminiscencia. La quimioluminiscencia es utilizada para análisis de fagocitosis de leucocitos, también es útil para evaluar la integridad del metabolismo celular⁴.

Streptococcus pneumoniae

El *Streptococcus pneumoniae* es un coco gram positivo, también llamado diplococo, puesto que por lo general aparece en pares. Tiene las siguientes características:

Metabolismo y requerimientos de crecimiento.

El neumococo es similar a otras especies de Streptococo en que el metabolismo es fermentador, el producto final principal es el ácido láctico. El neumococo es un anaerobio facultativo, el oxígeno u otro aceptor de hidrógeno puede alterar los productos finales del metabolismo de los carbohidratos. El organismo carece de citocromos y usa oxígeno a través del sistema enzimático de flavoproteínas. El peróxido de hidrógeno es el producto final de ésta reacción y puede acumularse ya que el neumococo no produce catalasa o peroxidasa para su degradación. Por lo que en cultivos se debe agregar una fuente de catalasa como los eritrocitos. Se reduce su viabilidad si se deja secar a temperatura ambiente o se coloca en solución fisiológica estéril. Para su crecimiento óptimo se requiere un pH de 7.8 (6.5-8.3) y una temperatura de 37°C (25°C-42°C). Del 5 al 10% requieren dióxido de carbono para su crecimiento en agar. Los cultivos se aclaran durante incubación prolongada debido a lisis celular.

Morfología

El neumococo es un coco gram positivo que puede ser esférico u oval. Típicamente es en forma de lanceta y se encuentra en pares (diplococo) también puede aparecer único o en cadenas cortas. No tiene movimiento y no forma esporas.

Las colonias en agar son suaves, brillantes, en forma de domo, con un diámetro de 0.5 a 1.5 cm. Los organismos encapsulados especialmente el tipo 3 forman colonias mucoides en agar. Después de 48 horas de incubación el centro de la colonia se colapsa debido a autólisis, produciendo una forma de dona o umbilicada. Si la incubación excede 72 horas el sobrante del organismo se autolisa espontáneamente y sólo queda una depresión en el agar. Las colonias producen una decoloración verdosa en el agar sangre (hemólisis alfa) pero si se incuba en condiciones de anaerobiosis hay hemólisis beta, debido a la neumolisina O sensible a oxígeno. Existen pruebas para diferenciar el neumococo de otros streptococos como serla el disco sensible de otocin, en el que se observa un halo inhibitorio en caso de neumococo y la solubilidad en

bilis la cual aumenta la lisis de las colonias puesto que la bilis estimula una amilasa encargada de causar lisis.

La reacción de Neufeld Quellung es una reacción de precipitinas capsulares, provee identificación rápida del neumococo. Se mezcla la bacteria, antisuero antineumococo y azul de metileno se observa en el microscopio la cápsula teñida de azul.

Antígenos de superficie: polisacáridos capsulares

Las sustancias capsulares del neumococo son polisacáridos complejos que forman gel hidrofílico en la superficie del organismo. Los polisacáridos capsulares son antigénicos y forman la base para la clasificación del neumococo en serotipos. Existen 84 serotipos reconocidos. Los polisacáridos capsulares se pueden demostrar por aglutinación, precipitación y reacción de quellung, pueden ser detectados en sangre, líquido cefalorraquídeo, y orina por contrainmunolectroforesis. El tamaño capsular es mayor durante la fase logarítmica de crecimiento y se encuentra reducida en la fase estacionaria del crecimiento debido a la difusión del polisacárido en el medio. Las concentraciones aumentadas de glucosa estimulan la producción de la cápsula, pero puede ser tóxico por la producción de ácido láctico. La patogenicidad del neumococo se relaciona principalmente con los polisacáridos capsulares. Los organismos encapsulados son virulentos para humanos y animales, los organismos sin polisacáridos capsulares no lo son. Algunos serotipos son más virulentos que otros, como los tipo 1,2,3,4,7,8,12 y 14. El mecanismo por el cual los polisacáridos capsulares son responsables de la virulencia está basado en su propiedad antifagocítica.

Substancia C o polisacárido C. Esta sustancia es un ácido tricarboxílico que contiene colina y galactosamina 6-fosfato y es un mayor constituyente de la pared celular. Es análogo pero antigénicamente distinto del carbohidrato específico de grupo del estreptococo hemolítico. La sustancia C forma una porción del antígeno de Forssman. Se precipita con una β -globulina en la presencia de calcio. Esta β -globulina es llamada proteína C reactiva (PCR). La unión de PCR al polisacárido C puede activar complemento y puede mediar la fagocitosis.

Antígeno proteico M. Este antígeno es tipo específico y es independiente de la especificidad conferida por los polisacáridos capsulares. No tiene efecto antifagocítico.

Antígeno proteico R. Fue aislado inicialmente de neumococo sin cápsula, está localizado sobre o cerca de la superficie celular y es antígenicamente similar al polisacárido C.

Toxinas

La *neumolisina* es una proteína ácida que está inmunológicamente relacionada con las hemolisinas O oxígeno lábiles del streptococo hemolítico, *Clostridium tetani* y *Clostridium welchii* y es responsable de la beta hemólisis cuando el neumococo crece en forma anaerobia. Se libera durante la autólisis, tiene un peso molecular de 63,000 y es destruida por calor e inactivada con oxígeno.

Principia productor de púrpura. Esta sustancia causa púrpura y hemorragia dérmica en animales de experimentación, se asocia al mucopéptido de la pared celular y se libera durante autólisis.

La *neuraminidasa* es una proteína de bajo peso molecular que se produce durante la fase logarítmica de crecimiento, es antigénico y específico de especie, ésta enzima es letal para el ratón. Esta enzima puede contribuir a la invasividad del neumococo en el tejido del huésped.

Autolisinas

La pared celular del neumococo se lisa durante periodos prolongados de incubación. La lisis también ocurre en la presencia de agentes activos de superficie y agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared celular. La base para la lisis es la liberación de N-acetilmuramyl-l-alanina amidasa. Esta autolisina divide la unión entre ácido murámico y alanina en el peptidoglicano de la pared celular. Colina es un componente del ácido teicoico en la pared celular del neumococo, si la etanolamina es substituida por colina las células neumocócicas son resistentes a la amidasa y no hay autólisis a pesar de la presencia de penicilina (tolerancia del antibiótico), neumococo en presencia de etanolamina forma cadenas largas debido a que hay falla para dividirse y transformarse. La autolisina no sólo juega un papel importante

en la actividad bactericida antimicrobiana sino también en la división celular y separación, competencia por la transformación genética y la infección por el bacteriófago ³.

ANTECEDENTES

La infección severa por neumococo tuvo un índice de mortalidad muy alto en la era preantibiótica, y aún en nuestros tiempos persiste con un índice de morbimortalidad muy importante, el por qué de las infecciones a pesar de contar con antibióticos y vacunas para el germen nos lleva a estudiar la patogenia.

Las defensas inmunológicas del huésped contra *Streptococcus pneumoniae* incluyen la producción de anticuerpos anticapsulares específicos y activación del complemento, ambos funcionan como opsoninas, la fagocitosis es el mecanismo de defensa principal contra neumococo, el mecanismo de fagocitosis del neumococo aún no está bien establecido, aparentemente hay varias citocinas como interferon gamma, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, e interleucina 8, que aumentan la función de los neutrófilos ⁶.

Para que exista una fagocitosis óptima, por parte de los PMN con la muerte intracelular subsecuente de la mayoría de las bacterias, es necesario que exista la opsonización; el proceso de opsonización es aquel por medio del cual partículas extrañas al organismo interactúan con opsoninas que se encuentran en el suero para su mayor captación y fagocitosis por medio de los PMN y macrófagos, éstas opsoninas pueden estar dadas por complemento y/o anticuerpos u otras partículas ^{7,8,9}. Schweinle describe una tercera opsonina que sugiere puede ser properdina ⁹. La opsonización puede ser iniciada por la unión de anticuerpos específicos, que actúan como ligando entre una partícula extraña y las células fagocíticas, mayor fagocitosis ocurre si se une C3b que es un componente del complemento ^{7,10}. Gucian, Christensen y Fine describen que los macrófagos y PMN tienen receptores para C3 e IgG, y que el depósito de C3 y/o IgG en la superficie microbiana facilita la fagocitosis de la mayoría de las bacterias, en pacientes inmunocompetentes es posible que existan anticuerpos específicos que opsonizan la bacteria no siendo el complemento crítico para la fagocitosis, pero en pacientes inmunocomprometidos, en la opsonización interviene principalmente la vía alterna del complemento ^{7,11}. Gardner y cols. demostraron que la opsonización con anticuerpos específicos aumentan la actividad bactericida, esto en presencia de complemento, sin complemento la fagocitosis de PMN también se ve disminuida a pesar de haber

anticuerpos, también sugieren que la concentración de anticuerpos influye en la respuesta fagocítica en una manera directamente proporcional^{12,13}. Musher y cols y Vicarsson y cols encontraron que posterior a la aplicación de la vacuna del neumococo se aumentan los niveles de anticuerpos específicos para los serotipos implicados en la vacuna, sin embargo no hay una mayor capacidad de opsonización a pesar de haber anticuerpos específicos^{14,15}. Lortan y cols encontraron que posterior a vacunación hay un aumento de IgM e IgG₂ que son los anticuerpos anti-neumococo predominantes, IgA e IgG₁ se encuentran en títulos muy bajos, no se encontró relación de fagocitosis con anticuerpos tipo IgM e IgA, sin embargo IgG₁ e IgG₂ correlacionaron significativamente con la fagocitosis en presencia de complemento, encontraron que IgG₂ a títulos altos puede funcionar por medio de la interacción (independiente de complemento) con el receptor Fcγ de los polimorfonucleares¹⁶. Vicarsson y cols describen que la opsonización del neumococo se lleva a cabo por medio de anticuerpos anti-polisacárido de la capsula del neumococo¹⁵. Se ha demostrado que la opsonización con suero hiperimmune se amplifica con complemento, mientras que en el suero no inmune la opsonización es mediada principalmente por complemento. El fragmento activo C3b puede ser generado por el complemento por activación de la vía alterna en ausencia de anticuerpo específico o por la activación del complemento por la vía clásica por medio de inmunoglobulinas^{11,17,18,19,20}. Los requerimientos de opsonización del neumococo varían dependiendo de la cepa. Es posible que la opsonización de las bacterias esté mediada por la vía clásica del complemento en concentraciones altas y que conforme el suero se diluye por debajo de una concentración crítica de componentes del complemento se disminuye la activación por la vía clásica, dando como resultado la opsonización por la vía alterna²¹. Hayashi y cols demuestran mediante su estudio de quimioluminiscencia de PMN rotados con diferentes serotipos de neumococo que los neumococos encapsulados son resistentes a fagocitosis en ausencia de opsonización²². En pacientes con drepanocitosis existe disminución de la actividad opsonica para neumococo mediada por ambas vías (la clásica y alterna) del complemento²³. Bjornson y Lobel sugieren que la disminución de la actividad opsonica mediada por la vía alterna en niños con drepanocitosis se relaciona con niveles bajos de anticuerpos anticapsulares tipo IgG e IgM²⁴. Winkelstein describe que el ácido teicoico que es un polímero componente de la pared celular de los gram positivos más que el peptidoglucano (otro componente de la pared) es el responsable de la activación del complemento por la vía alterna²⁵. Hostetter y cols describen

que la interacción opsónica entre la bacteria y C3b se lleva a cabo a través de un sitio de unión labil localizado en la cadena delta de la molécula C3b, que se realiza por medio de una unión en el sitio thiolester, el cual es un determinante esencial en la interacción opsónica y que sólo la forma C3 con thiolester intacto es capaz de efectuar la unión opsónica de C3b a la bacteria patógena²⁶. Hostetter describe que los serotipos de neumococo difieren en los polisacáridos capsulares, y difieren también en la cantidad y sitio de unión covalente de C3b, y en su proceso degradativo, éstas diferencias pueden explicar la variación en los patrones de resistencia a fagocitosis y estimulación en la producción de anticuerpos, la naturaleza antifagocítica de la capsula del neumococo puede residir no en la inhibición del depósito de C3b, sino en su capacidad de permitir el depósito y la degradación proteolítica del fragmento C3b unido a la cápsula que falla como ligando para receptores fagocíticos⁸. Algunos serotipos de *Streptococcus pneumoniae* son capaces de fijar C3b por la vía clásica a través de la proteína C reactiva (PCR)¹⁹. La proteína C reactiva es una proteína sérica que muestra gran aumento aun hasta 1000 veces en respuesta a infección, traumatismo o inflamación, ésta reacciona con el componente fosforilcolina del polisacárido C de la pared celular del neumococo, y ésta reacción lleva a activación del complemento y por medio de ésta, protección contra infección por neumococo²⁷. Mold y cols describen que la PCR es protectora en la bacteremia neumocócica experimental en ratones^{28,29,30} aunque aún no se ha dilucidado su forma de acción, aparentemente es debida a activación de complemento, sin embargo Cludwin y cols encontraron que el depósito de PCR por debajo de la capsula no aumenta la fagocitosis, creen que la PCR puede ser un inmunomodulador que puede afectar directamente las funciones de los neutrófilos y macrófagos que tienen receptores para PCR, éstos autores proponen que la PCR promueve la fagocitosis por un efecto independiente de complemento en las células fagocíticas¹⁰. Posterior al depósito de C3b en la superficie del organismo como consecuencia de activación del complemento, el C3b unido es sujeto a degradación por el factor I que en presencia del factor H separa C3b en iC3b, los neutrófilos humanos, expresan 2 receptores fagocíticos mayores para iC3b y C3b, el receptor de complemento tipo 1 (RC1) se encuentra expresado en eritrocitos, neutrófilos, monocitos, linfocitos B, podocitos glomerulares, células dendríticas foliculares, y algunos linfocitos T, RC1 se une preferentemente a C3b, pero también puede unir iC3b y C4b, el receptor de complemento tipo 3 (RC3) une sólo iC3b y es expresado en neutrófilos, monocitos, linfocitos granulares grandes, y células dendríticas foliculares., la

virulencia de los diferentes serotipos de neumococo difieren en la cantidad, localización y degradación de la unión covalente de C3b. Gordon y cols encontraron que RC3 es el receptor fagocítico más importante para el neumococo virulento y posterior a la unión de iC3b a su receptor en PMN existe liberación de superóxido, mieloperoxidasa y lactoferrina³¹.

Se ha descrito que dependiendo de la virulencia puede haber activación de complemento por la vía alterna, con activación de productos de complemento y anafilotoxinas y los complejos C_{3b}, que causan cambios de la permeabilidad vascular y daño celular, esto puede estar relacionado con la patogenia en la inflamación y edema que acompaña la infección por este organismo³². También se describe lisis del neumococo inducida por antibiótico que causa liberación de productos de la pared bacteriana, que también contribuyen a la inflamación^{33,34}, conforme haya mayor liberación de los componentes de la pared bacteriana habrá mayor daño tisular³⁴. Los agentes inflamatorios reconocidos por los receptores del huésped son aparentemente polímeros de ácido teicoico que se encuentran en la membrana (antígenos de Forssman) que se liberan en el medio a pesar de que no hay autólisis y los complejos ácido teicoico-glicopeptido altamente polimerizado que se liberan inicialmente en el tratamiento con penicilina³⁵. El factor activador plaquetario (FAP) es un mediador de la inflamación aguda producido por macrófagos, neutrófilos, plaquetas y células endoteliales en respuesta a un insulto, actúa en diferentes tipos de células como neutrófilos, eosinófilos, monocitos, células musculares, fibroblastos, células endoteliales, neumocitos tipo II, y neuronas, induce aumento de permeabilidad vascular con exudación de proteínas y acumulación de plaquetas y leucocitos; a nivel pulmonar causa broncoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular y exudación de proteínas, así como agregación plaquetaria, se ha implicado en la liberación de citocinas como el factor de necrosis tumoral. Cabellos y cols. encontraron que FAP también es responsable de la inflamación a nivel del espacio subaracnoideo cuando es liberado en respuesta a infección por neumococo, siendo la fosforilcolina (un componente de la pared del neumococo, que no se encuentra en otros gram positivos) determinante para la actividad biológica del FAP, a nivel de SNC causa aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y edema cerebral, y a dosis más altas se acompaña de leucocitosis, aparentemente induce leucotaxis dependiente de CD18 únicamente en SNC, también encontraron que los anticuerpos anti pared neumocócica pueden disminuir la efectividad de FAP durante la inflamación a nivel pulmonar³⁶, los

neumocitos tipo II son rápidamente activados por IL-1 con la aparición de receptores en la célula para FAP³⁷. El factor de necrosis tumoral (FNT) es una citocina potente que aumenta la fagocitosis y actividad antifúngica en PMN así como la citotoxicidad dependiente de anticuerpo contra células blanco cubiertas con anticuerpos específicos, los monocitos/macrófagos son considerados como la fuente primaria de FNT, éstos reaccionan inmediatamente ante antígenos bacterianos, principalmente lipopolisacáridos, otras células se implican en su producción como son células NK y linfocitos, Djeu y cols mencionan que los PMN también producen ésta citocina y en ocasiones tiene una función autócrina, el FNT también está implicado en la patogénesis de la inflamación producida por neumococo³⁸.

El neumococo por lo general entra por la nasofaringe al huésped, un paciente puede portar hasta 4 serotipos³⁴ ahí se une a las células epiteliales, se ha sugerido a las adhesinas del neumococo como causantes de ésta interacción, Geelen y cols describen que posterior a la exposición del neumococo a células endoteliales, hay cambios pronunciados en la morfología de éstas, con separación de la capa basal y destrucción de las células, éstos efectos citopáticos son causados por componentes de la pared celular y son inhibidos por anticuerpos anti-Interleucina 1 (IL 1) y anti-factor de necrosis tumoral, concluyen que el neumococo se une rápidamente a las células endoteliales humanas y que la pared celular es determinante importante en ésta interacción, causando cambios morfológicos que llevan a pérdida de la integridad de la barrera. Estos efectos citopáticos aparentemente están mediados por citocinas, principalmente IL 1 y FNT³⁹. Existen 3 morfologías de las colonias de neumococo: opaca, semitransparente y transparente, la opaca no coloniza la nasofaringe, la transparente coloniza en forma estable y efectiva la nasofaringe por medio del reconocimiento del disacárido N-acetilglucosamina β 1-3 galactosa³⁷. Se ha sugerido que la colonización con neumococo puede promover inflamación bronquial y se ha encontrado que los pacientes con cultivos intrabronquiales positivos para neumococo tienen niveles altos de mieloperoxidasa e IL-8⁴⁰.

Cuando existe una infección por neumococo hay una migración de PMN la cual está mediada por factores quimiotácticos por ejemplo C5a.¹¹ Tows y Vial describen que se requiere C5 para reclutamiento temprano óptimo de PMN, sin embargo existen otros factores quimiotácticos que podrían ser productos de macrófagos, derivados de la lipoxigenasa como los ácidos 5- y 11-monohidroxiicosatetraenoico, o podrían ser productos bacterianos que pueden funcionar como quimiotácticos, esto lo observaron al utilizar suero de

ratón con C5 y otro sin C5, encontrando que hay migración de neutrófilos más rápida con el suero que contiene C5, sin embargo con el suero sin C5 también se observó migración celular⁴¹. Se ha descrito que el PMN es la célula principal encargada de fagocitar al neumococo, Hof y cols. reportan un estudio en el que los macrófagos no fueron capaces de fagocitar neumococo en forma efectiva con adecuada opsonización, comparado con los PMN que sí tienen una capacidad adecuada para fagocitar este germen^{42,43}. Bakaletz y cols encontraron disminución de la fagocitosis de neumococo por macrófagos de oído medio en comparación con otros gérmenes⁴³.

Cuando los PMN engolfan los microorganismos, éstos sufren una serie de cambios metabólicos denominados estallido respiratorio⁴⁴. La muerte microbiana en granulocitos incluye la participación de compuestos reactivos formados en el metabolismo oxidativo inducido por la fagocitosis, así como constituyentes microbicidas de los gránulos citoplásmicos. La mieloperoxidasa, junto con peróxido de hidrógeno y un halido, constituyen un sistema microbicida intragranulocítico potente. La mieloperoxidasa es una enzima microbicida que requiere H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) como sustrato y un halido como cofactor para producir microbicidas oxidantes. La activación del metabolismo microbicida resulta en quimioluminiscencia que se correlacionan con el estallido respiratorio⁴⁵.

Los polisacáridos capsulares de los gram positivos juegan un papel importante en la virulencia confiriendo resistencia e inhibiendo la fagocitosis de PMN, un determinante primario de la virulencia del neumococo es la cápsula, los serotipos de neumococo encapsulado son resistentes a la acción bactericida del complemento y en ausencia de anticuerpos específicos es poco fagocitada y digerida por PMN^{44,46}. Se ha descrito que existe inhibición de la fagocitosis por material obtenido de la cápsula⁴⁷, esto se comprobó por Dhingra y cols cuando agregaron material de la cápsula del neumococo por sonificación y midieron la fagocitosis de PMN, encontrando que hay una disminución en la capacidad de opsonización del suero con una resultante disminución de la capacidad bactericida, en una relación directamente proporcional (a mayor cantidad de material capsular mayor inhibición de la fagocitosis), encontraron que la fagocitosis con suero inactivado a 56°C por 30 minutos no afectaba la fagocitosis⁴⁸. En otro estudio Sebag y cols encontraron que la fagocitosis del neumococo se aumentaba a una temperatura corporal de 39°C, comparado con 37°C y que

por arriba de 39°C. no había ningún efecto en la fagocitosis, hasta podría ser perjudicial puesto que se fomenta bacteremia por *E. coli*⁴³.

Se ha descrito un componente de la cápsula del *Streptococcus pneumoniae* denominado neumolisina, que es una toxina citolítica suhidryl activada, termolábil, que disminuye su actividad en pH ácido³⁹ y es liberada conforme la respuesta inflamatoria culmina en lisis del neumococo³⁷, Johnson y cols encontraron que ésta enzima a concentraciones mínimas estimulan la migración leucocitaria y la secreción lisosomal de enzimas, sin embargo a concentraciones mayores existe inhibición de la migración espontánea y quimiotaxis de los PMN, además de muerte celular y lisis³⁰. Paton y cols. describen que la neumolisina inhibe el estallido respiratorio de PMN, inhibe la actividad microbicida dependiente de oxígeno y la migración de los PMN, aún a dosis extremadamente bajas⁴⁴. Ferrante y cols. encontraron que la neumolisina inhibe la respuesta de los linfocitos a mitógenos en forma irreversible, que puede ser prevenido con pretratamiento de la toxina con colesterol y no está relacionada con un efecto citotóxico en los linfocitos, aparentemente la neumolisina actúa en la fase inicial de la respuesta inmune y no tiene efectos en los linfocitos encargados de la síntesis de DNA o en la síntesis y secreción de inmunoglobulinas, la inhibición de la respuesta linfocitaria mediada por neumolisina se cree que se relaciona a efectos en la membrana³¹. Mitchell y cols describen que a concentraciones tóxicas de neumolisina, puede haber activación del complemento por la vía clásica independientemente de anticuerpo³². Perry y cols encontraron inhibición del estallido respiratorio de PMN por algún componente soluble del neumococo, agregaron el sobrenadante de la bacteria en crecimiento en fase logarítmica encontrando inhibición de la producción de superóxido, la cual no se inhibía cuando se filtraba el sobrenadante, sin embargo la bacteria en fase de autólisis a pesar de centrifugación inhibía el estallido respiratorio, lo que evidencia que existe un factor soluble que se libera durante autólisis, y es diferente de neumolisina ya que las cepas no productoras de neumolisina también producen inhibición del estallido respiratorio, éste factor se ha implicado como mecanismo de defensa del neumococo y podría explicar en parte el daño residual mínimo que caracteriza a la neumonía por neumococo⁶, describen que éste factor inhibidor de la degranulación de neutrófilos es termolábil, no es inactivado en condiciones ácidas, es insensible a catalasa, tiene un peso molecular muy bajo y es activo durante la fase logarítmica de crecimiento³³. Otro componente del neumococo, una lisina

sulphydryl-activada, es la estreptolisina O, que ha sido implicada en la muerte de leucocitos, supresión de la actividad quimiotáctica y de la migración espontánea de neutrófilos. La toxina theta, otro agente citolítico inhibe la quimiotaxis de neutrófilos⁵⁴. Otras proteínas han sido descritas como determinantes de la virulencia en infección por neumococo, éstas son la proteasa de IgA, neuraminidasa y autolisina que es la hidrolasa de la pared celular responsable de la lisis del neumococo y de la actividad lítica de los antibióticos β -lactámicos, otra proteína de superficie la proteína A es una molécula antigénicamente variable de función desconocida con características estructurales similares a aquellas expuestas en la superficie, se cree que es un antígeno protector³⁷

El *Streptococcus pneumoniae* es afectado por el ciclo de crecimiento bacteriano, muchas propiedades bacterianas como el tamaño celular, el volumen celular, los requerimientos metabólicos, la susceptibilidad para daño térmico, los antígenos de superficie, la carga de la superficie varían durante éste. Brown y cols reportan que existe una diferencia en la fagocitosis del neumococo, siendo ésta más resistente in vivo e in vitro en la fase logarítmica que en la fase estacionaria de crecimiento, además es mayor el aclaramiento en la fase estacionaria que en la fase logarítmica, esto se asocia a mayor secuestro hepático y disminución de los requerimientos de opsonización por complemento. Sugieren que es posible que existan factores de superficie asociados con estructuras capsulares, que facilitan o interfieren con la colonización de la mucosa y son decisivos para la patogenia de los serotipos de neumococo⁵⁴.

Se ha descrito un componente de la pared celular del neumococo, que tiene actividad inhibidora de la elastasa del neutrófilo, la elastasa es una proteasa capaz de digerir elastina, colágena tipo III y IV, proteoglicanos y fibronectina se ha implicado como medidora de daño al tejido conectivo en enfermedades inflamatorias y junto con otras proteasas como catepsina G y collagenasa así como oxidantes formados por la acción de la mieloperoxidasa son las responsables del daño tisular a nivel pulmonar, éste factor inhibidor hace que la destrucción pulmonar sea menor en neumonía por neumococo, las diferentes cepas de neumococo varían en el contenido del inhibidor de elastasa y en su capacidad de liberar éste agente extracelularmente, ésta variabilidad explica la propensión a producir daño pulmonar permanente como secuela de neumonía dependiendo del tipo de neumococo^{55,56,57}.

El neumococo es un germen frecuentemente aislado de otitis media y sinusitis aguda, a ese nivel la concentración de pO_2 es casi de cero por lo que se realizó un estudio en donde se evaluó la fagocitosis de neumococo por PMN en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, Tlore y cols encontraron que en condiciones aeróbicas los PMN atacan los lípidos de la membrana bacteriana por medio de una peroxidación de los ácidos grasos insaturados dependiente de oxígeno, éste proceso causa daño irreversible en la membrana y contribuye a la actividad bactericida, los leucocitos también atacan el ácido teicoico de la pared bacteriana, el RNA y DNA en condiciones anaeróbicas y aeróbicas, además durante la anaerobiosis se desarrolla en los fagosomas un ambiente ácido letal para el neumococo. Aparentemente los PMN también poseen funciones bactericidas independientes de oxígeno⁵⁸. Durante la otitis media por éste germen existe migración de PMN al oído medio y a ese nivel liberan sus productos oxidativos metabólicos, Kawana y cols encontraron que al inocular neumococo no viable hubo disminución en la habilidad de los PMN para la producción de mieloperoxidasa aunque después hubo recuperación de la producción de la misma, encontraron que en la fase inicial de infección se encuentran productos metabólicos de los neutrófilos como lisozima, metabolitos del ácido araquidónico, y oxidantes⁵⁹.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los mecanismos fagocíticos de los leucocitos polimorfonucleares de niños y adultos sanos retados in vitro con *Streptococcus pneumoniae* opsonizado con diferentes sueros, y bajo diferentes condiciones.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar las condiciones óptimas para evaluar los mecanismos fagocíticos de polimorfonucleares retados in vitro con *Streptococcus pneumoniae*: Con complemento y/o con anticuerpos, la bacteria sin opsonizar, la bacteria con desnaturalización de la cápsula por medio de ebullición, la bacteria muerta con calor (en autoclave) y la relación óptima bacteria:PMN para un ensayo de quimioluminiscencia.

Evaluar los mecanismos fagocíticos de polimorfonucleares de niños y adultos sanos retados in vitro con *Streptococcus pneumoniae* opsonizado con suero hipogamaglobulinémico.

Evaluar los mecanismos fagocíticos de polimorfonucleares de niños y adultos sanos retados in vitro con *Streptococcus pneumoniae* opsonizado con suero hiperinmune.

Evaluar los mecanismos fagocíticos de polimorfonucleares de niños y adultos sanos retados in vitro con *Streptococcus pneumoniae* opsonizado con suero autólogo.

HIPOTESIS

La quimioluminiscencia de leucocitos polimorfonucleares se inhibe cuando se agrega el sobrenadante junto con *Streptococcus pneumoniae* opsonizado con suero hiperinmune y suero hipogamaglobulinémico, independientemente del tiempo que se incuba la muestra, puesto que en el sobrenadante se encuentran los factores inhibidores del estallido respiratorio que se liberan al interactuar el complemento y/o anticuerpo con la pared bacteriana.

Cuando se agrega *Streptococcus pneumoniae* opsonizado retirando el sobrenadante se obtiene una respuesta de quimioluminiscencia adecuada ya sea con suero hiperinmune o suero hipogamaglobulinémico, puesto que se retiran los factores inhibidores del estallido respiratorio.

La respuesta quimioluminiscente de PMN en niños y adultos sanos con *Streptococcus pneumoniae* opsonizado ya sea con suero hiperinmune o hipogamaglobulinémico debe ser adecuada ya que se opsoniza por activación del complemento ya sea por la vía alterna o por la vía clásica con ayuda de los anticuerpos.

La respuesta quimioluminiscente de PMN de niños y adultos sanos con *Streptococcus pneumoniae* opsonizado con suero autólogo va a variar de acuerdo a exposición previa al neumococo y el serotipo.

MATERIAL Y METODOS

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se realizaron ensayos de separación de polintonucleares y quimioluminiscencia en adultos sanos voluntarios para estandarización de la técnica. Se tomó una población de 8 niños sanos y 8 adultos sanos voluntarios.

POBLACION

Las muestras de niños sanos se obtuvieron de pacientes que acudieron al hospital programados para cirugía electiva (estomatología, cirugía de labio y paladar, cirugía ortopédica, cirugía plástica u otra cirugía programada) para la realización de estudios preoperatorios, los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- 1) Edad: De 3 meses a 15 años
- 2) Sexo: Ambos
- 3) Sanos (programados para cirugía electiva)
- 4) Consentimiento por escrito de los padres

Criterios de exclusión

- 1) Infección al momento de tomar la muestra para el estudio o en los 15 días previos
- 2) Leucopenia

Las muestras de adultos sanos fueron obtenidas del banco de sangre por adultos sanos voluntarios, que acudían para donación de sangre, los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- 1) Edad: Mayores de 20 años
- 2) Sexo: Ambos
- 3) Sanos

Criterios de exclusión

- 1) Infección al momento de la toma de muestra o en los 15 días previos
- 2) Leucopenia

OBTENCION DE POLIMORFONUCLEARES

Obtención de la muestra:

Se extrajeron de los pacientes 5 ml de sangre en jeringas desechables de plástico, colocándose posteriormente la sangre en tubos de poliestireno con 0.1 ml de heparina.

Separación de polimorfonucleares mediante la técnica de Boyum⁶⁰

Se agregó a los 5 ml de sangre 5 ml de solución fisiológica al 0.9% agregándose en el fondo del tubo 3 ml de ficoll-hypaque, se centrifugó a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 25 minutos, se desechó el plasma, la capa de mononucleares y el ficoll-hypaque, quedando la capa de eritrocitos y polimorfonucleares, se agregó solución lítica (EDTA, NaHCO₃, NH₄Cl, agua destilada, a un pH de 7.2) en una relación 1:5, dejando reposar por 5 minutos, se centrifugó a 1,500 rpm por 10 minutos, desechando el sobrenadante, quedando el botón de PMN en el fondo, se agregó 1 ml de solución lítica, llenando el tubo con solución fisiológica, se centrifugó a 1,500 rpm por 10 minutos, desechando el sobrenadante, se realizó un

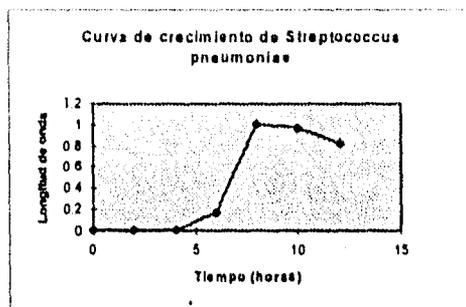
último lavado con solución fisiológica, centrifugando a 1,500 rpm por 5 minutos. Se suspendió el botón de polimorfonucleares en un ml de suspensión balanceada de Hanks (pH 7.2).

Conteo de polimorfonucleares:

Se confirmó la viabilidad de los polimorfonucleares mayor del 97% mediante exclusión de azul tripano y conteo en cámara de Newbauer (relación 1:5 , 20 µl de la suspensión de polimorfonucleares más 80 µl de colorante azul tripan) contando un cuadrante y multiplicando por 5 y por 10,000, para obtener el número total de PMN. Se realizó el ajuste para obtener una concentración final por ml de 3×10^6 PMN.

OBTENCION Y PREPARACION DE LA BACTERIA

Se realizó una curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* ATCC cepa 49619 para obtener la fase logarítmica tardía (ver tabla no. 1), en el caso del *Streptococcus pneumoniae* se alcanzó alrededor de las 8 horas. Para la realización de ésta se sembró el neumococo que se encuentra congelado a -70°C en leche, en una placa de agar sangre, una vez que hubo crecimiento se siembra (un asa de 0.001 ml) en 50 cc de BHI (Brain Heart Infusion) el cual es un medio de cultivo para cocos patógenos y otros microorganismos, dejando incubar en estufa a 37°C, en un medio rico en CO₂ obtenido por medio de jarras de anaerobiosis. Se realizó la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman a una longitud de onda de 600 nm, realizando mediciones cada 2 horas obteniendo la curva de crecimiento, se realizaron diluciones de la fase logarítmica tardía, sembrando en placas de agar sangre por triplicado de las últimas 3 diluciones para conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) hasta obtener un número constante, correspondiendo a una absorbancia de 0.850 a 18×10^7 UFC por mililitro.



Para los ensayos se ajustó la absorbancia a 0.850 nm en el espectrofotómetro. Se centrifugó a 6,000 rpm en centrifuga refrigerada a 4°C por 10 minutos, se tiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados más con solución fisiológica al 0.9% centrifugando a 6,000 rpm por 5 minutos, suspendiendo finalmente la bacteria en solución balanceada de Hanks con un pH de 7.2.

Se realizaron varios ensayos con diferentes condiciones de opsonización y preparación de la bacteria:

Ensayo no. 1: Se realizó opsonización de la bacteria con suero hiperinmune y suero hipogamaglobulinémico incubada a 37°C por 30 minutos agregando 18×10^7 de bacteria suspendida en 900 μ l Hanks + 100 μ l de suero (al 10%) en tubos ependorff se tomó 333 μ l de la bacteria opsonizada para obtener una concentración de 6×10^7 de bacteria con 3×10^5 de PMN agregando la bacteria opsonizada junto con el sobrenadante, preparando los siguientes tubos por duplicado:

- a) PMN sin bacteria
- b) PMN + bacteria opsonizada a 37°C con suero hiperinmune
- c) PMN+ bacteria opsonizada a 37°C con suero hipogamaglobulinémico

Ensayo no. 2: Se realizó opsonización de 18×10^7 de bacteria suspendida en 900 μ l Hanks con suero hiperinmune incubado a 4°C para opsonización únicamente con anticuerpos e inactivar complemento, opsonización de bacteria con suero hipogamaglobulinémico incubado a 37°C durante 30 minutos para opsonizar con complemento únicamente, opsonización de la bacteria con suero hiperinmune a 37°C durante

30 minutos para opsonizar con complemento e inmunoglobulinas, se agregó la bacteria opsonizada junto con el sobrenadante, se inactivó la bacteria con calor por medio de ebullición durante 10 minutos. Se prepararon los siguientes tubos por duplicado con una concentración de bacteria de 6×10^7 más 3×10^5 de PMN:

- a) PMN
- b) PMN + bacteria en ebullición por 10 minutos
- c) PMN+ bacteria opsonizada con suero hiperimmune a 37°C por 30 minutos
- d) PMN+ bacteria opsonizada con suero hipogamaglobulinémico a 37°C por 30 min.
- e) PMN+ bacteria opsonizada con suero hiperimmune a 4°C por 30 minutos

Ensayo no. 3: Se realizó opsonización con suero hiperimmune 100 μ l + 18×10^7 de bacteria suspendida en 900 μ l Hanks a 37°C durante 5, 15 y 30 minutos. Se inactivó la bacteria con ebullición durante 10 minutos, se dejó la bacteria sin opsonizar ni calentar y se tomó como control zymozan, realizándose los siguientes tubos por duplicado con una concentración de bacteria de 6×10^7 más 3×10^5 de PMN:

- a) PMN + zymozan
- b) PMN + bacteria sin opsonizar ni calentar
- c) PMN + bacteria en ebullición por 10 minutos
- d) PMN + bacteria opsonizada con suero hiperimmune a 37°C por 30 minutos
- e) PMN + bacteria opsonizada con suero hiperimmune a 37°C por 15 minutos
- f) PMN + bacteria opsonizada con suero hiperimmune a 37°C por 5 minutos

Ensayo no. 4: Se realizó opsonización con suero hiperimmune a 37°C por 30 minutos agregando el sobrenadante, la bacteria se inactivó por medio de ebullición durante 10 minutos y en autoclave por 20 minutos, se usó la bacteria sin opsonizar ni calentar, y un control con zymozan. se prepararon los siguientes tubos por duplicado con una concentración de bacteria de 6×10^7 más 3×10^5 de PMN:

- a) PMN
- b) PMN + zymozan
- c) PMN + bacteria sin calentar u opsonizar

- d) PMN + bacteria en autoclave por 20 minutos
- e) PMN + bacteria en ebullición por 10 minutos
- f) PMN + bacteria opsonizada con suero hiperinmune a 37°C por 30 min.

Ensayo no. 5: Se realizaron diferentes concentraciones de bacteria y cada concentración con y sin opsonización de la bacteria con suero hiperinmune a 37°C por 30 minutos, posterior a la opsonización de la bacteria con suero hiperinmune a 37°C en baño María durante 30 minutos, se centrifugó a 6000 rpm a 4°C desechando el sobrenadante y suspendiendo en 1 ml de solución balanceada de Hanks para colocar la bacteria opsonizada a interactuar con los PMN, se prepararon los siguientes tubos por duplicado:

- a) PMN + zymozan.
- b) relación bacteria: PMN 200:1 (6×10^7 : 3×10^5)
- c) relación bacteria: PMN 500:1 (15×10^7 : 3×10^5)
- d) relación bacteria: PMN 1000:1 (3×10^8 : 3×10^5)
- e) relación bacteria: PMN 200:1 opsonizada con suero hiperinmune a 37°C
- f) relación bacteria: PMN 500:1 opsonizada con suero hiperinmune a 37°C
- g) relación bacteria: PMN 1000:1 opsonizada con suero hiperinmune a 37°C
- h) PMN + bacteria inactivada en autoclave por 20 minutos
- i) PMN + bacteria en ebullición por 10 minutos

Los siguientes ensayos se realizaron con PMN de adultos y niños sanos con la bacteria opsonizada de 3 formas distintas:

- 1) 18×10^7 de bacteria suspendida en 900 μ l Hanks + 100 μ l de suero hiperinmune
- 2) 18×10^7 de bacteria suspendida en 900 μ l Hanks + 100 μ l de suero hipogamaglobulinémico
- 3) 18×10^7 de bacteria suspendida en 900 μ l Hanks + 100 μ l de suero autólogo

Se colocó en tubos ependorff incubando en baño María durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugó en refrigeración a 4°C desechando el sobrenadante y resuspendiendo en 1 ml de solución balanceada de Hanks.

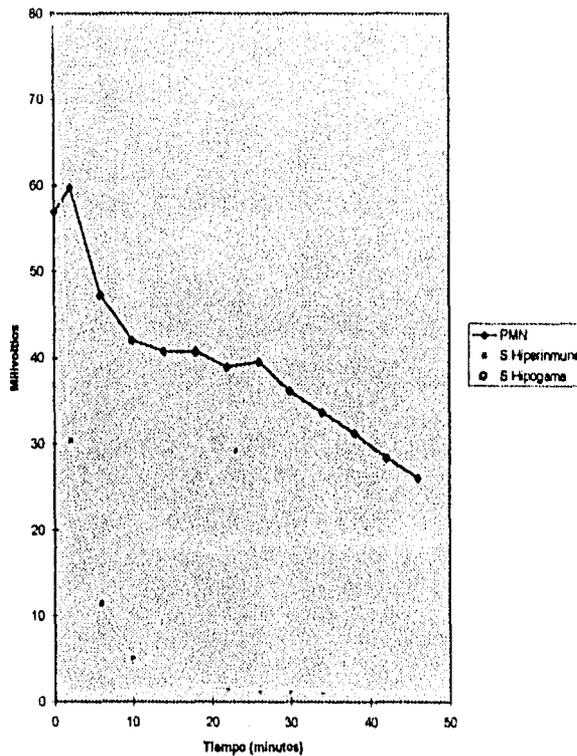
EVALUACION DE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA

La evaluación del metabolismo oxidativo o producción de intermediarios de oxígeno se realizó por un ensayo de quimioluminiscencia de acuerdo al método de Müller. La evaluación se realizó en las células estimuladas con la bacteria opsonizada en diferentes maneras. Las lecturas de quimioluminiscencia se efectuaron en un luminómetro LKB-Wallac 1250, el cual contiene un fotomultiplicador que convierte los fotones liberados en unidades de corriente eléctrica, de tal forma que la quimioluminiscencia es expresada en milivoltios (mv) por número de células⁶¹. Se puso a interactuar 3×10^5 PMN con 6×10^7 de la bacteria opsonizada con diferentes sueros en una relación bacteria:PMN 200:1, se agregó luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona, A8511, Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri) para amplificar la respuesta, completando el tubo con solución balanceada de Hanks haciendo un total de 1 ml.

RESULTADOS

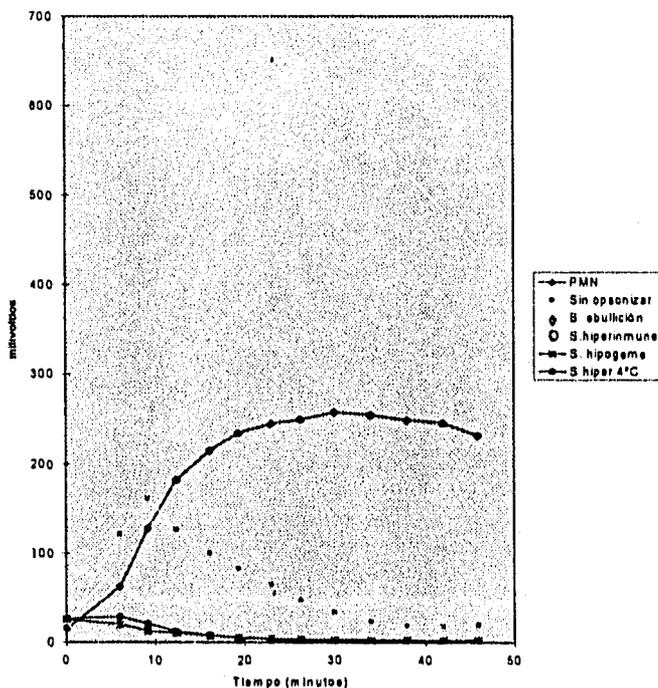
En el primer ensayo se realizó la medición de la quimioluminiscencia tomando 3 variables: PMN sin estímulo, PMN + bacteria opsonizada con suero hiperimmune, PMN + bacteria opsonizada con suero hipogamaglobulinémico, agregándose el sobrenadante junto con la bacteria opsonizada, hubo inhibición de la quimioluminiscencia de los PMN con la bacteria opsonizada con suero hiperimmune y el suero hipogamaglobulinémico como se observa en la gráfica:

Evaluación del mecanismo oxidativo de PMN tratados con neumococo



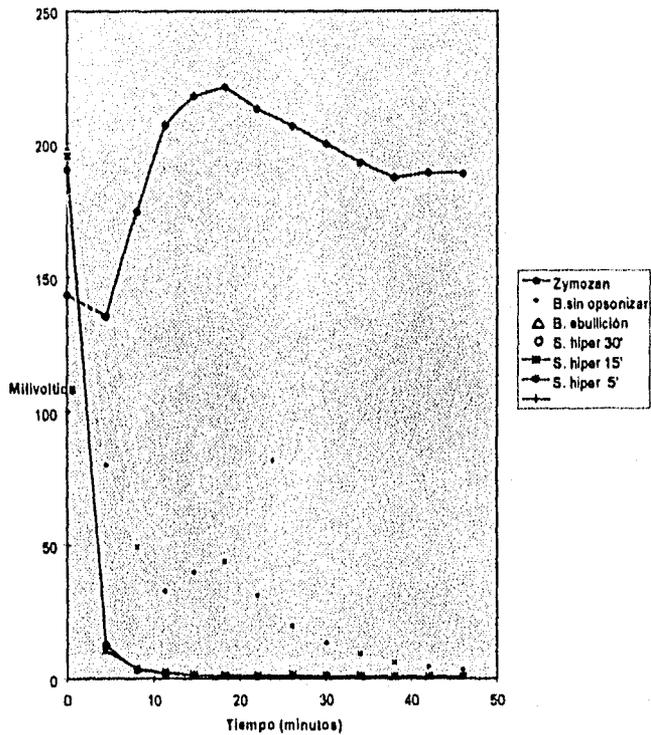
En el segundo ensayo se puso a interactuar la bacteria sin opsonizar, la bacteria en ebullición por 10 minutos junto con el sobrenadante, la bacteria incubada con suero hiperinmune a 37°C por 30 minutos (como fuente de complemento y anticuerpos) junto con el sobrenadante, la bacteria incubada con suero hipogamaglobulinémico a 37°C por 30 minutos (como fuente de complemento sin anticuerpos) junto con el sobrenadante, y la bacteria opsonizada con suero hipergamaglobulinémico a 4°C por 30 minutos para inactivar complemento (como fuente de anticuerpos) junto con el sobrenadante con PMN, tomando como control PMN+zymozan. La bacteria inactivada con calor presentó el mayor pico siendo éste hasta de 651.39 mv, zymozan un pico de 229.3 mv, la bacteria simple tuvo un pico inicial de 156.5 mv que posteriormente bajó y los PMN con bacteria opsonizada con suero hiperinmune a 4°C y 37°C y suero hipogamaglobulinémico presentó inhibición de la quimioluminiscencia, como se aprecia en la gráfica:

Evaluación de quimioluminiscencia de PMN reidos con naumococo



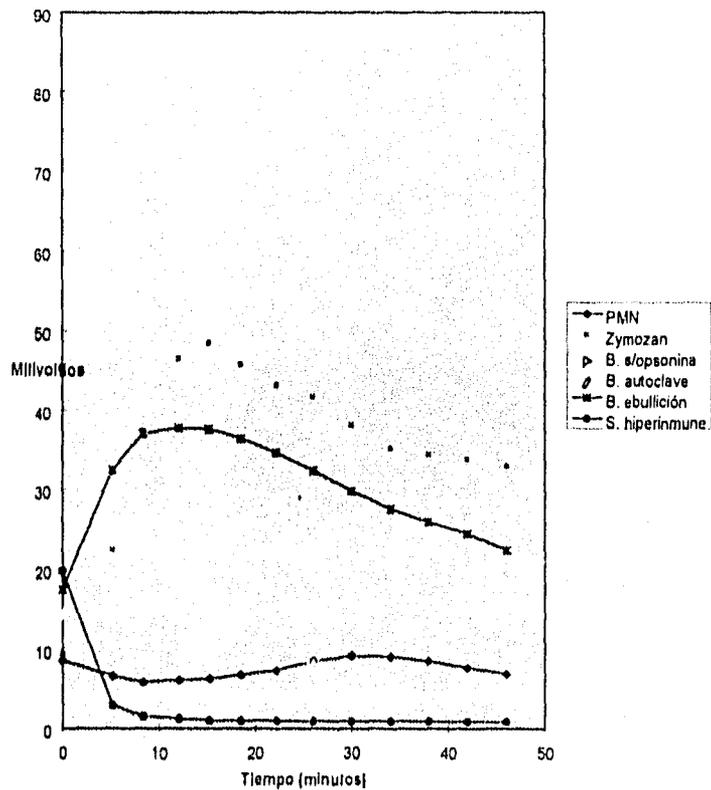
En el tercer ensayo se puso a interactuar los PMN con suero hiperinmune incubado a 37°C en diferentes tiempos (5, 15 y 30 minutos) para ver si la respuesta inhibitoria era dependiente del tiempo de incubación con la interacción de opsoninas, tomando como control zymozan, y comparando también con la bacteria en ebullición por 10 minutos para desnaturalización de la cápsula y la bacteria sin opsonizar. La bacteria en ebullición tuvo un pico de respuesta constante de 189.59 mv, la bacteria sin opsonizar tuvo un pico de 205.9 mv con declinación posterior, zymozan 196.19 mv constante, y los PMN con bacteria opsonizada con suero hiperinmune a diferentes tiempos tuvo inhibición del estallido respiratorio, como se observa en la gráfica:

Evaluación de la quimioluminiscencia de PMN retados con neumococo



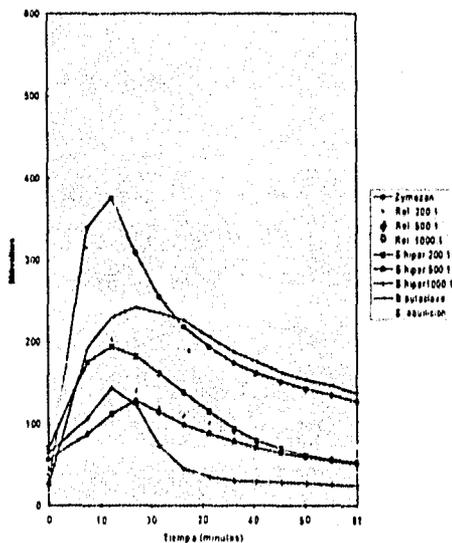
En el cuarto ensayo, se puso a interactuar los PMN con zymozan, la bacteria sin opsonizar, la bacteria en ebullición por 10 minutos, la bacteria muerta por calor en autoclave por 20 minutos, y la bacteria opsonizada con suero hiperinmune a 37°C por 30 minutos junto con el sobrenadante. Zymozan dió un pico de 46.82 mV, la bacteria sin opsonizar dió una curva bimodal con 2 picos el máximo de 49.04 mV, la bacteria muerta en autoclave dió el pico máximo con 74.89 mV, la bacteria en ebullición dió un pico de 33.78 mV, los PMN dieron una línea constante de 9.29 mV, y la bacteria opsonizada con suero hiperinmune nuevamente dió inhibición del estallido respiratorio como se muestra en la gráfica:

Evaluación de la quimioluminiscencia de PMN retados con neumococo



En el quinto ensayo para determinar la relación óptima bacteria polimorfonuclear se puso a interactuar la bacteria con los polimorfonucleares a diferentes concentraciones. 200:1, 500:1, 1000:1 sin opsonizar y opsonizada con suero hiperinmune por 30 minutos a 37°C y en ésta ocasión se deseó el sobrenadante después de incubarla la bacteria por 30 minutos y se resuspendió en Hanks. En este ensayo se obtuvieron respuestas adecuadas, zymosan dió un pico de 392.39 mv, la bacteria sin opsonizar con una relación 200:1 dió un pico de 315.6 mv, la bacteria sin opsonizar con una relación 500:1 dió un pico de 381 mv, la bacteria sin opsonizar con una relación 1000:1 dió un pico de 577.39 mv, la bacteria muerta en autoclave dió un pico de 242.9 mv, la bacteria opsonizada con suero hiperinmune con relación 200:1 dió un pico de 153.69 mv, la bacteria opsonizada con suero hiperinmune con relación 500:1 dió un pico de 128.5 mv, la bacteria opsonizada con suero hiperinmune con relación 1000:1 dió un pico de 144.19 mv, como se observa en la gráfica: La bacteria opsonizada dió la mayor respuesta con una relación 200:1 aunque no hubo diferencias significativas con mayor concentración, la bacteria sin opsonizar dió el mayor pico a mayor concentración siendo la relación 1000:1 la mayor respuesta.

Evaluación de la quimiluminiscencia de PMN rotados con neumococo



Los ensayos posteriores se realizaron con la bacteria opsonizada con suero hiperinmune, suero hipogamaglobulinémico y suero autólogo en niños y adultos sanos, se prontediaron los picos máximos y los resultados fueron los siguientes:

Evaluación de la quimioluminiscencia de PMN de niños sanos retados con neumococo

	S. Hiperinmune	S. Hipogama	S. Autólogo	Promedio
1	91.40	128.40	53.07	90.96
2	99.50	98.65	85.35	94.50
3	137.90	70.47	112.69	107.02
4	73.62	65.18	60.25	66.35
5	201.59	187.49	119.19	169.42
6	163.29	146.05	19.39	109.58
7	61.83	49.51	90.95	67.43
8	297.24	186.95	282.89	255.69
Promedio:	140.80	118.59	102.97	120.12

Nota: Los valores están expresados en milivoltios

Evaluación de la quimioluminiscencia de PMN de adultos sanos retados con neumococo

	S. hiperinmune	S. hipogama	S. autólogo	Promedio
1	129.39	94.78	25.73	83.30
2	105.24	114.8		110.02
3	100.56	92.59	78.51	90.55
4	80.84	65.98	92.85	79.82
5	104.81	42.65	77.03	74.83
6	265.6	251.99	247.95	255.18
7	444.99	379.34	301.55	375.29
8	91.66	91.17	92.02	91.82
Promedio:	165.39	141.66	130.78	145.08

Nota: Los valores están expresados en milivoltios

DISCUSION

Se han descrito varios componentes de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* como inhibidores de la fagocitosis de los polimorfonucleares; tal vez la más estudiada sea la neumolisina que es una toxina termolábil que inhibe la migración de neutrófilos, la quimiotaxis, el estallido respiratorio de neutrófilos y macrófagos^{44,50}. Esta toxina se libera conforme existe lisis de la bacteria. En éste estudio, en los ensayos en los que se agregó la bacteria opsonizada junto con el sobrenadante resultante de la opsonización hubo inhibición del estallido respiratorio. Posterior a cada ensayo se realizaron siembras en agar sangre para verificar que estuviera la bacteria viable y que no hubiera contaminación con otro patógeno, en los ensayos en que hubo inhibición del estallido respiratorio al agregar el sobrenadante se obtuvo crecimiento de neumococo puro, lo que indica que se encontraba viable. Dhingra observó inhibición del estallido respiratorio al agregar componentes de la cápsula obtenidos por sonicación, en una relación directamente proporcional⁴⁸. Perry describe un factor inhibidor diferente de neumolisina, éste lo observó al encontrar inhibición del estallido respiratorio en cepas no productoras de neumolisina, sugiere que éste factor inhibidor es termolábil y se encuentra en la cápsula, aunque menciona que se libera durante la autólisis⁶. En éste estudio posterior a la interacción de anticuerpos y/o complemento con la bacteria (ensayos 1 a 4) en donde se agregó la bacteria opsonizada con suero hiperinmune o hipogamaglobulinémico junto con el sobrenadante, se observó inhibición de la respuesta oxidativa, siendo éste efecto independiente de tiempo como puede observarse en el ensayo no. 3 en donde se puso a interactuar la bacteria junto con suero hiperinmune durante 5, 15 y 30 minutos, observando la misma respuesta inhibitoria a diferentes tiempos de opsonización.

El fenómeno inhibitorio del estallido respiratorio probablemente se inhibe con calor, esto se observa en los ensayos 2, 3 y 4 en donde se puso a interactuar los PMN con la bacteria en ebullición por 10 minutos para desnaturalización de la cápsula y la bacteria en autoclave por 20 minutos obteniendo respuesta adecuada, inclusive el pico máximo de quimioluminiscencia se obtuvo con la bacteria muerta en autoclave, es posible que la temperatura tenga un rol importante en las defensas del huésped contra éste patógeno, Seberg y Dhingra describen que hay una mejor respuesta de fagocitosis en presencia de fiebre en el huésped

^{48,49} y la termolabilidad de éste fenómeno inhibitor puede ser importante en la infección in vivo. Se han descrito otras enzimas como estreptolisina O que causa muerte en leucocitos y disminución de la actividad quimiotáctica, o una toxina theta que causa inhibición de quimiotaxis, y otras como neuraminidasa, proteasa de IgA y autolisina sin embargo no se describe bien su papel en el mecanismo oxidativo y aun no está bien clara su función. Es probable que el fenómeno de inhibición de la respuesta oxidativa de PMN retados con neumococo observado en éste estudio sea por neumolisina u otro factor diferente, es necesario continuar los estudios para identificar si se trata de un factor inhibitor de la actividad microbicida que puede jugar un papel muy importante en la virulencia y patogénesis del organismo.

Al poner a interactuar la bacteria sin opsonizar ni calentar se observó un pico tardío de respuesta quimioluminiscente, ésto contrario a lo descrito por Hayashi que describe que no hay fagocitosis de neumococo en ausencia de opsonización²². Se describe en la literatura que para que haya una fagocitosis adecuada debe haber opsonización por medio de anticuerpos específicos y/o complemento ya sea por su activación por la vía clásica o la alterna^{7,8,9,11,17,18,19,20,22}. En éste estudio se obtuvo respuesta adecuada tanto con bacteria opsonizada con suero hiperinmune (como fuente de complemento y anticuerpos) como con bacteria opsonizada con suero hipogamaglobulinémico (como fuente de complemento).

En el ensayo no. 5 con el propósito de establecer la relación óptima bacteria:PMN se puso a interactuar PMN junto con diferentes concentraciones de bacterias ya que Hayashi en su ensayo utilizó una relación bacteria:PMN de 1000:1²² y otros autores describen diferentes concentraciones de bacteria, por lo que se realizaron los ensayos con concentraciones de 200:1, 500:1, 1000:1, con la bacteria sin opsonizar y opsonizada con suero hiperinmune, en la bacteria sin opsonizar el pico máximo estuvo dado por la relación 1000:1 siendo éste de 577.99 mv, el de 500:1 de 381 mv y 200:1 de 315.6 mv, en la bacteria opsonizada con suero hiperinmune desechando el sobrenadante, la mayor respuesta se obtuvo con la relación 200:1 con un pico de 153.69, comparado con 500:1 con un pico de 128.5 y 1000:1 con un pico de 144.19, no hubo diferencias significativas con mayor concentración de bacteria por lo que se tomó 200:1 como una relación adecuada para realizar los ensayos de quimioluminiscencia.

En los ensayos realizados con PMN de niños y adultos sanos con bacteria opsonizada con suero hiperinmune, suero hipogamaglobulinémico y suero autólogo, los valores variaron mucho entre unos y

otros, pero esto es debido al estado inmune y la respuesta que varía de persona a persona. En general lo que se pudo observar es que no hay diferencias significativas en la respuesta quimioluminiscente con bacterias opsonizadas con suero hiperinmune o suero hipogamaglobulinémico en el mismo paciente, esto puede ser debido a que hay opsonización adecuada por activación del complemento ya sea por la vía clásica o por la vía alterna. En cuanto a la respuesta con suero autólogo, ésta fue muy variable, en algunas personas fue mayor y en otras menor comparado con la respuesta de los PMN interactuando con la bacteria opsonizada con los sueros hiperinmune e hipogamaglobulinémico, estas variaciones pueden ser debidas a exposición previa al tipo de neumococo con que se realizó el estudio, si tuvo contacto previo, es posible que tenga anticuerpos específicos de serotipo por lo que la opsonización es más eficiente y la respuesta oxidativa mayor.

CONCLUSIONES

El estallido respiratorio de polimorfonucleares retados con neumococo es inhibido cuando existe opsonización con anticuerpos y/o complemento de la bacteria y probablemente se trate de algun fenómeno inhibitorio dependiente del sobrenadante, ésto en base a que cuando se realizaron los ensayos poniendo a interactuar los polimorfonucleares y las bacterias opsonizadas junto con el sobrenadante se observó inhibición del estallido respiratorio y cuando se desechó el sobrenadante y se puso a interactuar la bacteria opsonizada con los polimorfonucleares hubo una respuesta de quimioluminiscencia adecuada. Apparently se trata de un fenómeno aún no bien identificado, pero es posible que sea por neumolisina o algún factor diferente, como ha sido descrito por otros autores quienes también encuentran inhibición del estallido respiratorio con cepas no productoras de neumolisina⁶.

Este fenómeno inhibitorio se observa cuando se somete la bacteria al calor puesto que cuando se desnaturizó la cápsula de la bacteria con ebullición durante 10 minutos hubo una respuesta de los polimorfonucleares y al matar a la bacteria por medio de calor en autoclave durante 20 minutos la respuesta fué aún mayor a pesar de agregar el sobrenadante.

El que exista algun fenómeno inhibitorio dependiente del sobrenadante durante la interacción del complemento y/o anticuerpo con la capsula bacteriana, se sustenta en base a que la bacteria sin opsonizar dió una respuesta de quimioluminiscencia tardía, y cuando se agregó la bacteria opsonizada junto con el sobrenadante hubo inhibición total de la quimioluminiscencia. Esta interacción es independiente del tiempo, ya que cuando se puso a interactuar los PMN junto con la bacteria opsonizada con suero hiperimmune incubado a diferentes tiempos (5, 15 y 30 minutos de incubación a 37°C) agregando el sobrenadante hubo la misma respuesta inhibitoria.

La concentración ideal para la evaluación del estallido respiratorio con *Streptococcus pneumoniae* es mantener una relación PMN:bacteria de 1:200 cuando ésta se encuentra opsonizada. En éste estudio hubo mejor respuesta con ésa relación aunque la diferencia fué mínima en comparación a las relaciones 1:500 y

ESTA TESIS NO DEBE
SER USADA SIN EL CONSENTIMIENTO DE LA COMISIÓN

1:1000. Cuando la bacteria no está opsonizada la mayor respuesta se obtuvo a mayor concentración siendo la máxima respuesta con una relación 1:1000.

No hubo diferencias significativas en las respuestas oxidativas de los PMN interactuando con las bacterias opsonizadas con suero hiperinmune o suero hipogamaglobulinémico en niños y adultos sanos, esto puede deberse a que con suero hiperinmune se cuenta con anticuerpos y complemento necesarios para la opsonización y fagocitosis adecuada, activándose el complemento por la vía clásica y en el suero hipogamaglobulinémico hay activación del complemento por medio de la vía alterna, por lo que con ambas condiciones hay una respuesta oxidativa adecuada. Con suero autólogo la respuesta es variable y va a depender de la exposición previa del paciente al serotipo de neumococo con el que está interactuando.

Es necesario continuar el estudio de la patogenia de *Streptococcus pneumoniae* puesto que es un germen causante de infecciones graves, que se presenta frecuentemente tanto en niños como en adultos. Conforme más conocimiento se adquiera acerca de los mecanismos de invasión y patogenia, tendremos mayor posibilidad de encontrar un tratamiento y profilaxis adecuados para disminuir la morbi-mortalidad causante de éste germen

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ham et al: Tratado de histología 7a. edición, 1983. Ed. Interamericana. México. pp 312-318
- 2) Wilkinson PC: Leukocyte locomotion and chemotaxis: effects of bacteria and viruses. *Reviews of Infect Dis* 1980, 2(2):293-318
- 3) Winkelstein JA: Complement and the host's defense against the Pneumococcus. *Clinical reviews in microbiology* 1984 11(3):187-208.
- 4) Steele RW: Clinical applications of chemiluminescence of granulocytes. *Rev Infect Dis*, 1991. 13:918-925.
- 5) Mandell, Douglas, Bennett. Principles and practice of Infectious diseases. 2a. edición, 1985. Ed. Wiley Medical USA. pp. 1142-1145
- 6) Perry FE, Elson CJ, Greenham LW et al: Interference with the oxidative response of neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 1993;48:364-369
- 7) Lockwood CM: Immunological functions of the spleen. *Clinics in Haemathology* 1983;12(2):449- 465
- 8) Hostetter M: Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J Infect Dis* 1986;153(4):682-693
- 9) Schewinle JE: Pneumococcal intracellular killing is abolished by polysaccharides despite serum complement activity. *Infect Immun* 1986;54(3):876-881
- 10) Chudwin DS, Artrip SG, Korenblit A, et al: Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1985;50(1):213-217
- 11) Guckian JC, Christensen GD, Fine DP: The role of opsonins in recovery from experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1980;142(2):175-190
- 12) Gardner SE, Anderson DC, Webb BJ et al: Evaluation of *Streptococcus pneumoniae* type XIV opsonins by phagocytosis associated chemiluminescence and a bactericidal assay. *Infect Immun* 1982;35(3):800-808

- 13) Gentry MJ, Snitily MU, Preheim LC: Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* measured in vitro and in vivo in a rat model of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *J Infect Dis*. 1995;171:350-355
- 14) Musher DM, Chapman AJ, Goree A et al: Natural vaccine-related immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1986;154(2):245-256
- 15) Vicarsson G, Jónsdóttir Y, Jónsson S, et al: Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* *J Infect Dis*, 1994;170:592-599
- 16) Lortan JE, Kaniuk AS, Monteil MA: Relationship of in vitro phagocytosis of serotype 14 *Streptococcus pneumoniae* to specific class and IgG subclass antibody levels in healthy adults. *Clin Exp Immunol* 1993;91:54-57
- 17) Tofte RW, Peterson PK, Kim Y et al: Influence of serum concentration on opsonization by the classical and alternative complement pathways. *Infect Immun* 1980;27(2):693-696
- 18) Mathay KK, Mentzer WC, Wara DW et al: Evaluation of the opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* serotypes VII, XIV and XIX by chemiluminescence assay. *Infect Immun*. 1981;31(1):228-235
- 19) Braconier JH, Odeberg H, Sjöholm AG: Granulocyte phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in properdin-deficient serum. *Infect Immun*, 1983;40(1):219-224
- 20) Munro CS, Stanley PJ, Cole PJ et al: Assessment of biological activity of immunoglobulin preparations by using opsonized micro-organisms to stimulate neutrophil chemiluminescence. *Clin Exp Immunol* 1985;61:183-188
- 21) Edwards M, Stark JM: The ability of smooth and rough strains of *Streptococcus pneumoniae* to activate human complement by the alternative pathway. *J Med Microbiol*, 1977;11:7-14
- 22) Hayashi K, Lee DA, Quie PG: Chemiluminescent response of polymorphonuclear leukocytes to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in suspension and adhered to glass. *Infect Immun* 1986;52(2):397-400
- 23) Bjornson AN, Lobel JS, Harr KS: Relation between serum opsonic activity for *Streptococcus pneumoniae* and complement function in sickle cell disease. *J Infect Dis* 1985; 152(4):701-709

- 24) Bjornson AB, Label JS: Direct evidence that decreased serum opsonization of *Streptococcus pneumoniae* via the alternative pathway in sickle cell disease is related to antibody deficiency. *J Clin Invest* 1987;79:388-398
- 25) Winklestein JA, Tomasz A: Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J of Immunol* 1978;120(1):174-178
- 26) Hostetter MK, Krueger RA, Schmeling DJ: The biochemistry of opsonization: central role of the reactive thioester of the third component of complement. *J Infect Dis*, 1984;150(5):653-661
- 27) Holzer TJ, Edwards KM, Gewurz H et al: Binding of C-reactive protein to the pneumococcal capsule on the cell wall results in differential localization of C3 and stimulation of phagocytosis. *J of Immunol* 1984;133(3):1424-1429
- 28) Mold C, Du Clos S, Nakayama M et al: C reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis. *Ann NY Acad Sci* 1982;389:251-262
- 29) Mold C, Nakayama TJ, Holzer H, et al: C-reactive protein is protective against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Exp Med* 1981;154:1703-1708
- 30) Yother J, Volanakis JE, Briles DE: Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* in mice. *J Immunol* 1982;128:2374-2376
- 31) Gordon DL, Johnson GM, Hostetter MK: Ligand receptor interactions in the phagocytosis of virulent *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis* 1986;154(4):619-626
- 32) Giebink GS, Verhoef J, Peterson PK, et al: Opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* types VI, XVIII, XXIII and XXV. *Infect Immun*, 1977;18(2):291-297
- 33) Tuomanen E, Pollack H, Parkinson A, et al: Microbiological and clinical significance of a new property of defective lysis in clinical strains of pneumococci. *J Infect Dis*, 1988;158(1):36-43
- 34) Tuomanen EI, Austrian R, Masure R: Pathogenesis of pneumococcal infection. *New Engl J Med*, 1995;332(19):1280-1283
- 35) Tomasz A, Sukkonen K: The nature of cell wall-derived inflammatory components of pneumococci. *Ped Infect Dis J*. 1989;8(12):902-903

- 36) Cabellos C, MacLutyre DE, Forrest M, et al: Differing roles for platelet-activating factor during inflammation of the lung and subarachnoid space. *J. Clin Invest* 1992;90:612-618
- 37) Cundell D, Masure HR, Tuomanen EI: The molecular basis of pneumococcal infection: a hypothesis. *Clin Infect Dis* 1995;21(suppl 3):S204-S212
- 38) Djeu JY, Serbousek D, Blanchard DK: Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1990;76(7):1405-1409
- 39) Geelen S, Bhattacharya C, Tuomanen E: The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* 1993;61(4):1538-1543
- 40) Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, et al: Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell product in bronchial lavage fluid. *Thorax* 1995;50:360-365
- 41) Toews GB, Vial WC: The role of C5 in polymorphonuclear leukocyte recruitment in response to *Streptococcus pneumoniae*. *Am Rev Resp Dis* 1984;129:82-86
- 42) Hof DG, Repine JE, Peterson PK, et al: Phagocytosis by human alveolar macrophages and neutrophils: qualitative differences in the opsonic requirements for uptake of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* in vitro. *Am Rev Resp Dis* 1980;121:65-71
- 43) Bakalatz LO, De Maria TF, Lim DJ: Phagocytosis and killing of bacteria by middle ear macrophages. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;113:138-144
- 44) Paton JC, Ferrante A: Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity and migration by pneumolysin. *Infect Immun* 1983;41(3):1212-1216
- 45) Allen RC, Mills EL, McNitt TR, et al: Role of myeloperoxidase and bacterial metabolism in chemiluminescence of granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *J Infect Dis* 1981;144(4):344-348
- 46) Roberts LS, Saunders FK, BouInois GJ: Bacterial capsules and interactions with complement and phagocytes. *Biochem Soc Transactions* 1988;17:462-464
- 47) Braconier JH, Odeberg H: Granulocyte phagocytosis and killing of virulent and avirulent serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J Lab Clin Med* 1982;100:279-287

- 48) Dhingra RK, Williams R, Reed WP: Effects of pneumococcal mucopeptide and capsular polysaccharide on phagocytosis. *Infect Immun* 1977;15(1):169-174
- 49) Sebag J, Reed W, Williams R: Effect of temperature on bacterial killing by serum and by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1977;16(3):947-954
- 50) Johnson MK, Boese-Marrazzo D, Pierce WA: Effects of pneumolysin on human polymorphonuclear leukocytes and platelets. *Infect Immun* 1981;34(1):171-176
- 51) Ferrante A, Rowan B, Paton JC: Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun*. 1984;46(2):585-589
- 52) Mitchell TJ, Walker JA, Saunders FK, et al: Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties. *Biochimica et biophysica Acta* 1989;1007:67-72
- 53) Perry FE, Elson CJ, Mitchell TJ et al: Characterisation of an oxidative response inhibitor produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 1994;49:676-683
- 54) Brown EJ, Hosca SW, Frank MM: Reticuloendothelial clearance of radiolabelled pneumococci in experimental bacteremia: correlation of changes in clearance rates, sequestration patterns, and opsonization requirements at different phases of the bacterial growth cycle. *J of the reticuloendothelial Soc.* 1981;30(1):23-31
- 55) Vered M, Dearing R, Janoff A: A new elastase inhibitor from *Streptococcus pneumoniae* protects against acute lung injury induced by neutrophil granules. *Am Rev Resp Dis* 1985;131:131-133
- 56) Vered M, Simon SR, Janoff A: Subcellular localization and further characterization of a new elastase inhibitor from pneumococci. *Infect Immun* 1985;49(1):52-60
- 57) Nogare RD, Vial WC, Toews GB: Bacterial species-dependent inhibition of human granulocyte elastase. *Am Rev Resp Dis* 1988;137:907-911
- 58) Thore M, Löfgren S, Tärnvik A, et al: Anaerobic phagocytosis, killing, and degradation of *Streptococcus pneumoniae* by human peripheral blood leukocytes. *Infect Immun* 1985;47(1):277-281

- 59) Kawana M, Kawana C, Yokoo T, et al: Oxidative metabolic products released from polymorphonuclear leukocytes in middle ear fluid during experimental pneumococcal otitis media. *Infect Immun* 1991;59(11):4084-4088
- 60) Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21(suppl 97):77
- 61) Muller-Peddinghaus R: In vitro determination of phagocyte activity by luminol and lucigenin-amplified chemiluminescence. *Int J Immunopharmacol* 1984;6:455.