



25

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“CAMBIOS EN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL HACIA
ANTIGENOS DE *Staphylococcus aureus* INDUCIDOS POR
LA APLICACION DE UNA VACUNA BACTERIANA EN
PACIENTES CON FARINGITIS RECURRENTE.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N:
GINA STELLA GARCIA ROMO
ALEXANDER PEDROZA GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. en C. VICTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRON

COASESORES:
Q. F. B. MISAEL GONZALEZ IBARRA
DR. en C. ABEL CIPRIAN CARRASCO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

250661
1998

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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
 GOBIERNO FEDERAL
 SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Cambios en la respuesta inmune humoral hacia antígenos de Staphylococcus

aurus inducidos por la aplicación de una vacuna bacteriana en pacientes con dermatitis recurrente.

que presenta al paciente: Gina Stella García Bero

con número de cuenta: 915603-8 para obtener el TITULO de:

Química Farmacéutica Bioteca

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
 "POR MI RAZA HERCEA EL ESPIRITU"

Cuautitlan local, Edo. de Méx., a 12 de febrero de 1978

PRESIDENTE M.A.R. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Dr. Marco S. Vega López

SECRETARIO Dr. Víctor M. Zendejas Ruizón

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Patricia Campos Peón

SEGUNDO SUPLENTE M.A.R. María Guadalupe Sosa

[Handwritten signatures and initials over the printed names]



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTÓNOMA DE
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Cambios en la respuesta inmune humoral hacia antígenos de Staphylococcus aureus inducidos por la aplicación de una vacuna bacteriana en pacientes con faringitis recurrente.

que presenta el pasante: Alexander Pedroza González
 con número de cuenta: 9156098-2 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI PAZ HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 12 de febrero de 1998

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>
VOCAL	<u>Dr. Marco A. Vega López</u>
SECRETARIO	<u>Dr. Victor M. Zendejas Buitrón</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Patricia Campos Peón</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>H.V.Z. Angel G. Martínez Sosa</u>

[Firmas manuscritas de los miembros del jurado]

AGRADECIMIENTOS

Por sus valiosos consejos y por el tiempo dedicado a las asesorías para la realización de este trabajo agradecemos a el Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón y a el Q.F.B. Misael González.

Agradecemos a Q.F.B. Karina López Valladares, Q.F.B. Carlos Moya Ochoa, M. en C. Raúl Donís, al equipo de trabajo del Dr. J. A. Montaráz por su amable colaboración durante la fase experimental.

A el laboratorio de alergia e inmunología del Hospital Juárez de México S.S. por las facilidades otorgadas para la evaluación clínica y tratamiento de los pacientes.

A todas aquellas personas que de alguna manera formaron parte de este trabajo.

GINA Y ALEXANDER 1998.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Historia	2
2. <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	
2.1. Generalidades	4
2.2. Definición y clasificación	4
2.3. Características	4
3. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	
3.1. Epidemiología	7
3.2. Patogenia	7
3.3. Toxinas citolíticas	8
3.4. Enterotoxinas	9
3.5. Otras enzimas y proteínas estafilococales	9
3.6. Mecanismos de defensa del hospedero	10
3.7. Mecanismos de evasión del <i>S. aureus</i> hacia la respuesta del hospedero	12
3.8. Diagnóstico	13
3.9. Tratamiento	16
3.10. Faringitis	17
4. PROTOCOLO	
4.1. Justificación	19
4.2. Hipotesis	21
4.3. Objetivos	21
4.4. Material y Métodos	22
4.5. Resultados	55
4.6. Discusión	81
4.7. Conclusiones	88
5. APÉNDICE : Preparacion de soluciones y reactivos	89
Referencias	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características Bioquímicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Cuadro 2. Identificación de <i>S. aureus</i> en los pacientes en estudio	29
Cuadro 3. Esquema de vacunación	35
Cuadro 4. Condiciones estandarizadas para la técnica de ELISA	37
Cuadro 5. Curva patrón de IgA totales	40
Cuadro 6. Curva patrón para IgA anti- <i>S. aureus</i>	43
Cuadro 7. Curva patrón para IgG totales	46
Cuadro 8. Densidad óptica. de las diferentes subclases de IgG anti- <i>S. aureus</i>	48
Cuadro 9. Concentraciones de las subclases de IgG anti <i>S. aureus</i>	49
Cuadro 10. Curva patrón para IgG ₁ anti- <i>S. aureus</i>	50
Cuadro 11. Curva patrón para IgG ₂ anti- <i>S. aureus</i>	51
Cuadro 12. Curva patrón para IgG ₃ anti- <i>S. aureus</i>	53
Cuadro 13. Pruebas de control de proceso de la vacuna bacteriana de <i>S. aureus</i>	55
Cuadro 14. Pruebas de esterilidad y pureza de la vacuna de <i>S. aureus</i>	55
Cuadro 15. Identificación de <i>S. aureus</i> en pacientes con faringitis recurrente	56
Cuadro 16. Grupo de individuos testigos	57
Cuadro 17. Identificación de <i>S. aureus</i>	58
Cuadro 18. Pruebas Intradérmicas	59
Cuadro 19. Inmunoglobulinas totales del grupo testigo	61
Cuadro 20. Inmunoglobulinas totales de los pacientes	61
Cuadro 21. Valores de IgA anti- <i>S. aureus</i> del grupo testigo	63
Cuadro 22. Valores de IgA anti- <i>S. aureus</i> para los pacientes	65
Cuadro 23. Valores de IgG ₁ anti- <i>S. aureus</i> en el grupo testigo	67
Cuadro 24. Valores de IgG ₁ anti- <i>S. aureus</i> en el grupo de pacientes	69
Cuadro 25. Valores de IgG ₂ anti- <i>S. aureus</i> en el grupo testigo	71
Cuadro 27. Miligramos de IgG ₃ anti- <i>S. aureus</i> en el grupo testigo	75
Cuadro 28. Miligramos de IgG ₃ anti- <i>S. aureus</i> en el grupo de pacientes	76
Cuadro 29. Valores de densidad óptica de IgG ₄ anti- <i>S. aureus</i> en los pacientes	78
Cuadro 30. Resultados finales del grupo de pacientes	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras constituyentes del <i>Staphylococcus</i>	6
Figura 2. Determinación de la concentración de antígeno	37
Figura 3. Representación esquemática de la técnica de ELISA-STAPH	39
Figura 4. Gráfica de la curva patrón de IgA	41
Figura 5. Gráfica de la curva patrón de IgA anti- <i>S. aureus</i>	44
Figura 6. Gráfica de la curva patrón de IgG totales	47
Figura 7. Curva patrón de IgG ₁ anti- <i>S. aureus</i>	50
Figura 8. Curva patrón de IgG ₂ anti- <i>S. aureus</i>	52
Figura 9. Curva patrón de IgG ₃ anti- <i>S. aureus</i>	53
Figura 10. Valores de Inmunoglobulinas totales	62
Figura 11. Gráfica de IgA anti- <i>S. aureus</i> grupo testigo	64
Figura 12. Gráfica de IgA anti- <i>S. aureus</i> grupo pacientes	66
Figura 13. Gráfica de IgG ₁ anti- <i>S. aureus</i> grupo testigo	68
Figura 14. Gráfica de IgG ₁ anti- <i>S. aureus</i> grupo pacientes	70
Figura 15. Gráfica de IgG ₂ anti- <i>S. aureus</i> grupo testigo	72
Figura 16. Gráfica de IgG ₃ anti- <i>S. aureus</i> grupo testigo	74
Figura 17. Gráficas de IgG ₃ anti- <i>S. aureus</i> en ambos grupos	77
Figura 18. Gráfica de IgG ₁ anti- <i>S. aureus</i> en el grupo pacientes	79

LISTA DE ABREVIATURAS

A.T.	Antes del tratamiento.
bac/mL	Bacterias por mililitro.
cm	Centímetro.
dL	Decilitro.
D.O., DO	Densidad óptica.
D.S.	Desviación estándar.
D.T.	Después del tratamiento.
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente de enzima ligada.
F(ab)	Fracción de unión a antígeno.
Fc	Fracción cristalizable.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico.
Ig	Inmunoglobulina (s).
IL	Interleucina.
INF γ	Interferón gamma.
kDa	kilo daltons.
mg	Miligramo.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
mL	Mililitro.
mm	Milímetro.
μ m	Micrómetro.
O.M.S.	Organización Mundial de la Salud.
OPD	Orto-fenilendiamino.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
PMN	Polimorfonucleares.
r p.m.	Revoluciones por minuto.
S.S.F.	Solución salina fisiológica
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa.
UI	Unidades internacionales.
UT	Unidades tuberculínicas.



RESUMEN

La faringitis recurrente continúa siendo un problema de salud pública. El microorganismo que predomina como agente causal es el *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A. La principal problemática en el tratamiento ha consistido en el fracaso para erradicar al microorganismo causal. Esta incapacidad del tratamiento se ha relacionado a diversos factores de entre los cuales sobresale la presencia de microorganismos productores de β -lactamasa que posiblemente protegen al *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A. El más común de estos microorganismos es el *Staphylococcus aureus*.

En el presente trabajo se estudiaron los cambios inmunológicos en pacientes con faringitis recurrente producidos por la aplicación de una vacuna bacteriana a base de *S.aureus* Cowan 1 muerto por calor.

Se determinó que la frecuencia de *S. aureus* en pacientes con faringitis recurrente fue del 41%, en tanto que en la población normal (grupo testigo) fue del 23%. Por medio de un ensayo inmunoenzimático se detectaron los cambios en los niveles de anticuerpos IgA, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ hacia *S.aureus* Cowan 1. Se encontró que solamente los niveles de anticuerpo IgG₁ en los pacientes era menor que los niveles presentados en el grupo testigo. Los demás anticuerpos tuvieron los mismos niveles séricos en ambos grupos. Además se observó que los anticuerpos IgG₁ e IgG₂ son los que se elevan significativamente con el tratamiento en tanto que los otros anticuerpos cuantificados no sufren cambios. En cuanto al estado clínico de los pacientes la vacuna provocó una marcada disminución en el número de episodios de faringitis así como en la duración de los mismos.

Se concluye que los anticuerpos IgG₁ e IgG₂ son los responsables de la mejoría clínica en el grupo de pacientes con faringitis, a los cuales se les aplicó una vacuna bacteriana de *S.aureus* Cowan 1. Siendo los anticuerpos IgG₁ los más importantes por encontrarse en bajos niveles antes del tratamiento y por aumentar significativamente al término del mismo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia

Desde la antigüedad las enfermedades infecciosas eran consideradas de origen sobrenatural y enviadas como castigo de los dioses. Los conceptos de contagio e higiene no eran del todo desconocidos, ya que los leprosos eran desterrados y aislados para evitar que todo un pueblo enfermara. En 1546 un italiano de nombre Francastoro afirmó que la sífilis era transmitida por gérmenes vivientes; reconocía tres formas de contagio: por contacto directo, objetos inanimados y a través del aire^{2,64}.

La observación directa de los microorganismos debió esperar hasta el siglo XVII cuando el holandés Anton Van Leewenhoek fabricó lentes de vidrio lo suficientemente poderosos para observar y describir microbios⁶⁴.

Los primeros intentos para proteger en contra de una infección fueron hechos hacia la viruela por chinos y árabes a través de un proceso llamado variolización (inoculación de costras y líquido vesicular provenientes de lesiones de individuos con viruela). En 1796 Edward Jenner observó que las ordeñadoras de vacas que habían sido infectadas con el virus de vacuna (viruela de las vacas) no se enfermaban de la viruela que atacaba a los humanos. A partir de lo cual inoculó material de lesiones de vacas infectadas en humanos, observando que al ser expuestos al agente causal de la viruela humana no enfermaban^{12,18,59}.

Con los trabajos realizados por Louis Pasteur se ampliaron los conceptos sobre la microbiología e inmunología. Entre sus trabajos más importantes se encuentran el descubrimiento de la causa de la fermentación, el proceso de pasteurización, la teoría de que algunas enfermedades son causadas por microorganismos y el más importante el desarrollo de la vacuna antirrábica. Pasteur fue quien en honor a los trabajos de Jenner denominó vacunación al proceso de inmunizar individuos en contra de enfermedades infecciosas^{2,18,64}.

El médico alemán Robert Koch fue el primero en obtener microorganismos puros a partir de cultivos mixtos. Desarrollo 4 postulados para demostrar que cada enfermedad contagiosa era provocada por un microorganismo específico^{2,9,11,64}.

Hacia el año de 1878 R. Koch descubre la presencia de bacterias del género *Staphylococcus* en pus humano y en 1880 Pasteur los cultiva en medio líquido . un año después Alexander Ogston demostró su patogenicidad en ratón y cobayo. Rosenbach en 1884 describe dos especies de *Staphylococcus*: *S. pyogenes (aureus)* y *S. albus (epidermidis)*. En 1930 Juhanelle los clasificó con base a su estructura antigénica, y en 1942 Fisk los clasifica por medio de bacteriofagos¹⁹.

El interés por este género como patógeno para el hombre surgió en 1928 en Australia cuando 16 de 21 niños inoculados con antitoxina diftérica procedentes de un mismo vial enfermaron a las 5 - 7 horas, con vómitos, diarrea, fiebre alta, obnubilación, cianosis y convulsiones, y de ellos 12 murieron a los 2 días. El resultado de los estudios sugirió que estas muertes eran debidas a la toxina elaborada por los *Staphylococcus* que contaminaron el vial¹⁹.

Actualmente los *Staphylococcus* son considerados como patógenos humanos y las infecciones locales por *S. aureus* son muy comunes, entre las enfermedades más importantes que causan están: osteomielitis, meningitis, otitis media, endocarditis y bacteremias^{14,25,31}.

2. STAPHYLOCOCCUS

2.1. Generalidades

Los cocos Gram positivos junto con las enterobacterias son los microorganismos más asociados con las infecciones humanas. Las bacterias Gram positivas contienen una gran cantidad de glucopéptido y una baja concentración de lípidos en su pared celular. Esto permite que retengan el colorante cristal violeta durante la tinción de Gram. Las bacterias Gram positivas son más resistentes a la desecación y a la acción de sustancias químicas, los antibióticos que mejor actúan sobre estas bacterias son aquellos que inhiben la síntesis de la pared celular. Las infecciones humanas que causan se propagan por contacto directo y por penetración a través de pequeños traumatismos en la piel y las mucosas. La respuesta inflamatoria que producen se caracteriza por la acumulación de pus en el sitio de infección, a lo cual se le denomina reacción piogénica¹⁰.

2.2. Definición y clasificación

El nombre de *Staphylococcus* deriva del griego *staphyle* (racimo) y *kokkos* (grano), y significa cocos que se agrupan en racimos. Los *Staphylococcus* pertenecen a la familia *Micrococcaceae*, constituida por bacterias Gram positivas agrupadas en pares o grupos, no formadoras de esporas, no presentan motilidad y son catalasa positivos^{10,64}.

2.3. Características

El género *Staphylococcus* está compuesto por bacterias esféricas Gram positivas que se agrupan en racimos, los cultivos viejos pueden observarse como Gram negativas. Su diámetro varía entre 0.5 - 1.5 micrómetros, son inmóviles, anaerobios facultativos y catalasa positivos^{14,64}. La pared celular de los *Staphylococcus* está constituida de péptido glican y ácidos teicóicos, el péptido glican se forma de unidades repetidas de N-acetil glucosamina y ácido N-acetilmurámico, estas unidades se unen cruzadamente por puentes de pentaglicina. Los ácidos teicóicos dependiendo de la especie contienen ribitol o glicerol unido a un azúcar o un aminoglucósido¹⁰.

Los microorganismos de este género obtienen su energía por glucólisis. Un amplio rango de hidratos de carbono pueden ser utilizados, bajo condiciones anaerobias el principal producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico; y en condiciones aeróbicas el principal producto del metabolismo de los hidratos de carbono es ácido acético con pequeñas cantidades de CO_2 ¹⁰.

Los *Staphylococcus* crecen más rápido y abundantemente en condiciones aerobias. el rango de temperatura de crecimiento es de 6.5 - 46.0 °C siendo 37°C la temperatura óptima. el rango de pH es de 4.2 - 9.3 siendo a un pH de 7.0 cuando el crecimiento es más abundante. Crecen en cualquier medio de cultivo de laboratorio porque no son bacterias exigentes^{10,20,64}. Producen colonias circulares de 1-2 mm de diámetro de aspecto cremoso. liso. opaco y el color de la colonia depende de la producción de pigmentos carotenoides que van del amarillo claro al naranja¹⁹.

El principal patógeno del género es *Staphylococcus aureus*. el cual posee acción hemolítica. produce la enzima coagulasa y fermenta el manitol (cuadro 1). Las principales fuentes de infección son las lesiones humanas accesibles. fomites contaminados y los aerosoles^{29,64}.

Cuadro 1. Características Bioquímicas de *Staphylococcus aureus*⁴⁴

Prueba Bioquímica	Resultado
Catalasa	+
Hemólisis. ASC 5%	α/β -hemólisis
Oxidasa	-
Reducción de nitrato	+
Motilidad	-
Glucosa	A (aeróbico / anaeróbico)
Manitol	A (aeróbico / anaeróbico)
Coagulasa	+

+ = positivo; - = negativo; A = ácido; ASC = Agar Sangre de Carnero.

3. *Staphylococcus aureus*

Son microorganismos esféricos de 0.8 - 1.0 μm de diámetro. pueden encontrarse en forma individual o en pares y se dividen en más de un plano formando racimos irregulares. Su membrana celular contiene glucolípidos (mono y diglucosil-diglicéridos) y fosfolípidos (lisil-fosfatidil-glicerol, fosfatidil-glicerol y cardiolipina). La pared celular contiene fósforo orgánico, glucosamina, ácido murámico, glicina, lisina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, alanina y pequeñas cantidades de treonina, prolina, valina y leucina; los ácidos teicóicos son del tipo ribitol. Estos elementos están distribuidos en las tres estructuras de la pared celular que es el péptido glican, ácidos teicóicos y la proteína A. Un componente adicional de algunas cepas es la presencia de un polisacárido capsular^{10,46,53}.

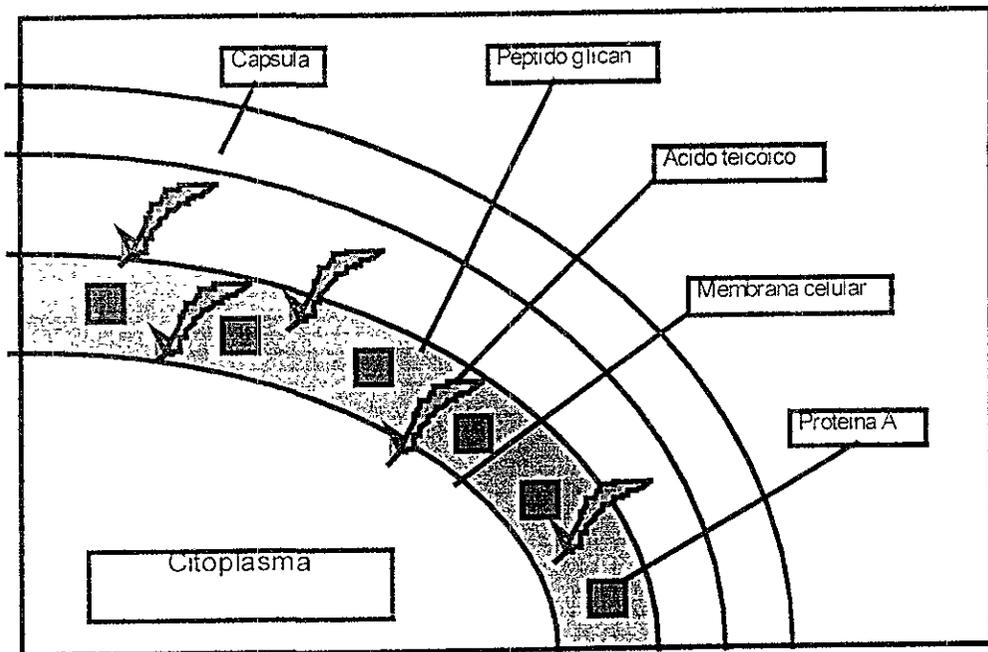


Figura 1. Estructuras constituyentes del *Staphylococcus aureus*².

3.1. Epidemiología

El *Staphylococcus aureus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es considerado parte de la microflora normal del humano y de animales. su principal reservorio es el humano, donde es transportado en forma asintomática en vías respiratorias altas. colonizan en grandes cantidades la buco y nasofaringe, también se encuentra en el tubo digestivo. Puede producir enfermedades en casi todos los órganos y tejidos del cuerpo. las principales afecciones son abscesos, meningitis, furunculosis, osteomielitis, supuración de heridas, neumonía, pericarditis, otitis media e intoxicación por alimentos^{10,19 67}.

El *S. aureus* es la principal causa de infecciones hospitalarias, dando origen a infecciones asociadas con implantes de prótesis y catéteres. Las más severas infecciones asociadas a las bacteremias por *S. aureus* son osteomielitis, endocarditis invasiva y septicemia⁴³.

3.2. Patogenia

El proceso patológico se presenta como una respuesta inflamatoria aguda, más tarde aparece necrosis central y se forma un absceso. La infección aparece frecuentemente como complicación de traumas accidentales y quirúrgicos, de quemaduras y de enfermedades crónicas como la Diabetes mellitus⁸. El paso inicial de la infección es la adhesión y colonización de la superficie de los tejidos por *S. aureus* que se adhiere a los tejidos a través de receptores específicos. Se ha reportado una proteína de 72 kDa en la superficie de *S. aureus* que se une específicamente a la fibronectina de los tejidos endoteliales, a la sialoproteína de los huesos y a la colágena^{33 53}.

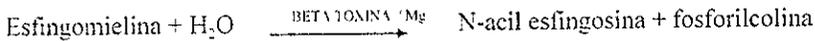
Una vez que el *S. aureus* se establece en la superficie de los tejidos se multiplica y coloniza el sitio de infección. Para sobrevivir en los tejidos colonizados el *S. aureus* produce diversas toxinas².

3.3.Toxinas citolíticas

Son 4 las hemolisinas que produce *S. aureus* : alfa, beta, gama y delta que se diferencian por el tipo de hemólisis que producen en eritrocitos de humano y conejo. una sola cepa es capaz de producir más de un tipo de hemólisis ^{10,64}.

La alfa-hemolisina es la que se detecta con mayor frecuencia a partir de los aislamientos, posee un efecto letal y dermonecrótico en conejos⁵⁷, tiene la capacidad de lesionar macrófagos y plaquetas. sin embargo se ha observado que los monocitos presentan resistencia a esta toxina. Su peso molecular es de 28 kDa. la reacción de la toxina con los eritrocitos involucra dos pasos, primeramente la interacción inicial entre toxina-célula con la liberación de potasio y segundo la lisis de la célula con liberación de hemoglobina⁶⁴.

La beta-hemolisina rompe la membrana de los eritocitos¹⁰. tiene especificidad por la esfingomielina que se encuentra en la parte externa de la bicapa lipídica de la membrana eritocitaria. la degradación de la esfingomielina es la causa de la lisis⁶⁴. como se muestra en la siguiente reacción:



La delta-hemolisina está compuesta por subunidades de bajo peso molecular. posee actividad de detergente. propiedad importante ya que es la causa de su efecto sobre las membranas de los eritrocitos. La toxina puede lesionar eritrocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas⁶⁴.

La gama-hemolisina posee gran actividad hemolítica sobre los eritrocitos de humanos, conejo y carnero pero aún no se conoce su mecanismo de acción. esta toxina consta de 2 componentes de los cuales por lo menos uno es inhibido por polímeros sulfonados como el agar. por ello no se observa actividad hemolítica cuando se inocula en placas de agar sangre. El

hallazgo de altos niveles de anticuerpos neutralizantes para la toxina gama en la enfermedad estafilococal ósea humana sugiere un posible papel para la toxina en el estado patológico⁶⁴.

La leucocidina, conocida como sustancia de Panton-Valentine, es una toxina capaz de destruir a polimorfonucleares, está compuesta por 2 proteínas denominadas F y S (del inglés fast y slow respectivamente), su acción es sinérgica y no aditiva, es decir cada componente solo es inactivo^{19,64}.

3.4. Enterotoxinas

El envenenamiento por alimentos contaminados con *S. aureus* es producido por enterotoxinas, al momento se han identificado 6 tipos (A, B, C₁, C₂, D y E). Son un grupo de proteínas globulares simples de cadena única, con pesos moleculares que varían de los 28 a 35 kDa. Las enterotoxinas A y D se asocian con más frecuencia a intoxicación alimentaria y la B con infecciones intrahospitalarias, su mecanismo de acción se desconoce aún⁶⁴. Las enterotoxinas constituyen un grupo de antígenos que pueden provocar fuertes respuestas inmunológicas, por lo que se les ha denominado superantígenos¹¹.

3.5. Otras enzimas y proteínas estafilococales

La enzima coagulasa es producida por todas las cepas de *S. aureus*, la cual es relativamente termoestable ya que resiste temperaturas de hasta 60° C por 30 minutos. Coagula el plasma en forma similar a la activación de protrombina a trombina. La coagulasa se halla presente en dos formas, libre y fija. La fija está unida a la pared celular y convierte al fibrinógeno en fibrina sin intervención de otros factores plasmáticos, por otro lado la coagulasa libre es una sustancia semejante a la trombina que se halla presente en los filtrados de cultivos^{21 46}.

La proteína A está presente en más del 95% de las cepas y constituye el 7% de la pared celular, se une covalentemente al péptido glican y se distribuye uniformemente a través de la pared celular^{12 36}. Tiene un peso molecular aproximado de 56 kDa, aunque existen diferentes

variantes con pesos moleculares de 45 a 57 kDa¹³. Esta proteína contribuye a la resistencia de *S. aureus* a la fagocitosis. este efecto se atribuye a su capacidad de unirse a las inmunoglobulinas G de la mayoría de los mamíferos incluyendo el humano³².

Otro factor de patogenicidad importante es la cápsula que tiene acción antifagocítica. los polisacáridos capsulares son producidos por más del 90% de las cepas de *S. aureus* y se encuentran unidos covalentemente. Se han identificado 11 serotipos. el 1 y el 2 se encuentran en cepas mucoides que son altamente capsuladas. los demás serotipos se encuentran en cepas microcapsuladas. de los cuales en estudios epidemiológicos realizados en Europa, E.U.A. e Israel el 5 y el 8 son aislados en aproximadamente el 70% de los pacientes infectados con *S. aureus* . teniendo mayor frecuencia el serotipo 8 con 53% en tanto que el serotipo 5 se aísla en el 22%^{34,40,57,65}.

3.6. Mecanismos de defensa del hospedero

Para evitar la entrada de *S. aureus* dentro del organismo las primeras barreras que se presentan son las fisicoquímicas donde participa la piel como una barrera física. cuya continua descamación de las capas más superficiales disminuye su colonización. En las mucosas, principalmente en las vías respiratorias. el moco y algunas sustancias bactericidas como la lisozima aunados al movimiento de los cilios son los primeros mecanismos defensivos en contra de bacterias como *S. aureus*⁵⁹.

Cuando *S. aureus* logra colonizar los tejidos. la primera línea de defensa está constituida por los polimorfonucleares (PMN). en particular por los neutrófilos que fagocitan y matan a la bacteria¹⁵⁹. Para que se realice este proceso los fagocitos llegan al sitio de infección atraídos por factores quimiotácticos (factores del complemento: C5a y C3a. LTB4, algunos metabolitos del ácido araquidónico. el factor activador de plaquetas y algunas citocinas). Al inicio de la infección los fagocitos son atraídos por componentes bacterianos. el *S. aureus* tiene un efecto quimiotáctico sobre los PMN¹⁷. Los fagocitos para llevar a cabo su función bactericida deben ser capaces de reconocer al *Staphylococcus*. este reconocimiento es dependiente de las interacciones

de las opsoninas con la superficie celular de *S. aureus* y con los receptores de los fagocitos. El microorganismo es engullido formándose el fagosoma que al fusionarse con los lisosomas constituyen el fagolisosoma, y se activan varios mecanismos de destrucción dependientes e independientes de oxígeno^{36 51}.

La fagocitosis y muerte de *S. aureus* es dependiente de anticuerpos y complemento, por ello el mecanismo de eliminación es la fagocitosis por PMN para lo cual la opsonización es requerida^{17,32}. El complemento se activa por ambos mecanismos (alterno y clásico), y constituye la principal fuente de opsoninas de cepas no capsulares⁴⁶. Los anticuerpos que opsonizan a la bacteria son de la clase IgG¹⁷. Cuando el *S. aureus* es fagocitado por los macrófagos, estos últimos producen factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que estimula a los neutrófilos para aumentar su reconocimiento hacia los estafilococos, a la vez que aumentan su actividad bactericida. La actividad estimulante ocurre dentro de los primeros 30 minutos en que los neutrófilos interactúan con el TNF- α y sólo se presenta en aquellos neutrófilos que todavía no han entrado en contacto con el *S. aureus*²⁶.

El mejoramiento en el reconocimiento por los fagocitos hacia la bacteria está dado por un aumento en la expresión de receptores CR3 y CR4 que reconocen al componente C3b del complemento que está opsonizando a la bacteria. El incremento de la actividad bactericida de los neutrófilos está dado por que el TNF- α estimula la liberación de los gránulos azurófilos que contienen catepsina G, defensinas y el sistema de la mieloperoxidasa (MPO), todas estas sustancias son capaces de matar directamente al *S. aureus*²⁶.

Cuando los neutrófilos están en contacto con el *S. aureus* opsonizado disminuye su capacidad de respuesta al TNF- α , por una disminución en la expresión de los receptores peptídicos de 75 kDa y 55 kDa que se unen al TNF- α , creándose así un sistema de autorregulación para la actividad de los neutrófilos durante la infección por *S. aureus*²⁷.

Por otro lado el *S. aureus* puede estimular la producción de interferon gama (INF- γ) a partir de células CD16⁺ (Natural Killer) y aumentar la expresión de sus receptores para IL-2. El

INF γ promueve la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) clase 2 sobre macrófagos incrementado de esta forma su capacidad de célula presentadora de antígeno, con lo cual se desencadena una respuesta inmunológica que estará orientada a la producción de anticuerpos y células de memoria específicas contra el *S. aureus*^{51,59,66}.

3.7. Mecanismos de evasión del *S. aureus* hacia la respuesta del hospedero

El *S. aureus* cuenta con una variedad de mecanismos que evaden la respuesta de defensa del hospedero. Los polisacáridos capsulares tienen gran relevancia porque las cepas capsuladas son más resistentes a la fagocitosis que las no capsuladas; la cápsula evita que los anticuerpos o el complemento, depositados en la pared celular, sean reconocidos por los fagocitos^{28,36}. Las inmunoglobulinas G pueden atravesar la cápsula y depositarse sobre la pared celular, lo mismo sucede con el complemento. Se ha estimado que la concentración de polisacáridos en la cápsula es de 1.5 - 2% por lo cual su consistencia es similar a un gel de agar con poros que permiten el paso de moléculas como las IgG y el componente C3b del complemento. El hecho que impide la fagocitosis es que la cápsula forma una barrera que evita que los fragmentos Fc γ de las inmunoglobulinas y el C3b sean reconocidos por los receptores de los fagocitos^{28,36,65}.

Otro factor de gran importancia es la proteína A que es un constituyente de la pared celular que tiene la capacidad de reaccionar con la fracción Fc de las gama globulinas^{22,28}. Otra propiedad reportada de la proteína A es la capacidad que tiene de unirse no solamente a la fracción Fc γ de las inmunoglobulinas, sino que además puede unirse a las porciones F(ab) de IgG e IgM, en aproximadamente el 30 % de los sueros humanos. La interacción de la proteína A con las IgM de superficie de las células B, provoca una estimulación proliferativa de estas células, también la interacción con la IgG de superficie produce el mismo efecto, pero a diferencia de la IgM el efecto proliferativo depende en mayor proporción de la unión al fragmento Fc⁵².

Por último la liberación de enterotoxinas del *S. aureus* quizá sea un mecanismo eficaz para evitar una reacción inmunológica específica, debido a que las enterotoxinas inducen una activación policlonal de células T, y la mayoría de éstas no son específicas para el

microorganismo invasor. Estas enterotoxinas o también llamados superantígenos se unen directamente a las moléculas MHC clase II y a la porción V β del receptor TCR que se localiza fuera del sitio convencional de unión a antígenos^{41 45}.

El sistema inmunológico, para combatir estos mecanismos de evasión, produce anticuerpos contra estos componentes bacterianos, los anticuerpos capsulares son de tipo específicos y son necesarios para la fagocitosis de las cepas capsuladas, el complemento carece de relevancia por que, como se mencionó anteriormente, la cápsula impide que interactúe con los fagocitos^{34 65}. Los anticuerpos anti-proteína A parecen sólo disminuir ligeramente la tasa de mortalidad en ratas inmunizadas³².

3.8. Diagnóstico

Por ser *Staphylococcus aureus* uno de los principales microorganismos patógenos para el humano es necesario realizar un diagnóstico adecuado y preciso³³. Como ya se ha mencionado *S. aureus* puede ser aislado a partir de procesos supurativos, por ejemplo: furúnculos, abscesos, heridas, neumonías entre otros; una vez tomado el exudado del sitio de infección debe sembrarse e incubarse para su aislamiento e identificación^{33 37}.

Cultivo:

Se recomienda que el exudado se siembre primeramente en agar sangre de carnero (5%), por ser un medio enriquecido para el óptimo crecimiento de *S. aureus*, permite la producción de pigmento y se puede observar la α -hemólisis producida por este microorganismo. Las colonias características de *S. aureus* en éste medio miden de 1 - 2 mm de diámetro, son grandes, brillantes y cremosas con el pigmento que puede ir de amarillo claro a naranja⁴⁵.

Los medios selectivos para el aislamiento de *S. aureus* se basan en su capacidad de desarrollo en presencia de altas concentraciones de sales, para ello se utiliza el medio de sales manitol (SM) que contiene una gran cantidad de cloruro de sodio (7.5%) y D-manitol¹⁰. La capacidad para producir ácido a partir de manitol es una característica de *Staphylococcus aureus*.

Las colonias de *S aureus* se desarrollan en el medio formando un halo amarillo que indica la formación de ácido como producto de la fermentación del manitol. el ácido provoca el vire del indicador rojo de fénol que contiene el medio^{10,40,43}. Posteriormente se sigue la forma de rutina para el diagnóstico que es a través de pruebas microbiológicas.

Tinción de Gram:

Las bacterias Gram positivas tienen un elevado contenido de glucopéptido y baja concentración de lípidos en su pared celular. Los alcoholes y otros solventes no penetran dicha pared lo que permite que retengan el colorante cristal violeta diferenciándose de las bacterias Gram negativas las cuales por su alto contenido de lípidos no retienen el colorante y su pared permite la entrada de solventes⁴⁰.

Interpretación:

Bacterias Gram positivas: Se observan al microscopio teñidas de color violeta.

Bacterias Gram negativas: Se observan teñidas de color rojo.

Catalasa.:

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Químicamente la catalasa es una hemoproteína, de estructura similar a la hemoglobina. excepto que los cuatro átomos de hierro están en estado oxidado. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo de los carbohidratos. si se deja acumular es letal para las células bacterianas^{10,43,44}. Por lo cual, la presencia de esta enzima en las bacterias, sirve para degradar el H₂O₂ que es tóxico para las mismas. como se ilustra en la siguiente reacción:



Interpretación:

a) Positiva: la rápida aparición y producción de burbujas de gas o efervescencia indican una reacción positiva.

b)Negativa: Ausencia total de gas.

Controles. El reactivo peróxido de hidrógeno debe ensayarse con microorganismos de control positivos y negativos antes de hacer la prueba a bacterias desconocida^{40,44}.

Precauciones:

- Las bacterias a prueba no deben provenir de crecimiento en agar sangre, ya que la presencia de eritrocitos pueden dar un resultado falso positivo.
- Las colonias deben provenir de un cultivo puro.
- Es importante el orden del procedimiento.
- El crecimiento para la prueba de la catalasa debe ser de un cultivo de 18-24 horas. las colonias más viejas pueden dar falsos negativos⁴⁰.

Coagulasa.

Ante el reconocimiento de una colonia de *Staphylococcus* que ha resultado positiva a la prueba de la catalasa, la primera consideración es saber si el microorganismo es o no *Staphylococcus aureus*. Se sabe que dentro de la familia *Micrococaceae* sólo el *S. aureus* produce coagulasa por lo que en la mayoría de los laboratorios se utiliza como prueba definitiva^{40,43}.

La coagulasa es una enzima proteínica de composición química desconocida. se halla presente en dos formas libre y fija, las cuales presentan diferentes propiedades y requieren técnicas separadas de identificación⁴³.

La coagulasa fija es también conocida como el "factor de aglutinación" (Prueba del portaobjeto): La coagulasa fija está unida a la pared celular bacteriana. los hilos de fibrina que se forman entre las células bacterianas al agregar plasma provocan la aglutinación.

Interpretación:

1. Una reacción positiva se detecta usualmente entre 15 - 20 segundos, con la aparición de un sedimento granular o la formación de grumos blancos.

2. Negativa: ésta prueba se considera negativa si la aparición de grumos es tardía (mayor a 1 minuto). todos los cultivos que den resultados negativos deben ser sometidos a la prueba en tubo ya que algunas cepas sólo producen coagulasa libre^{40,44}.

Coagulasa libre (Prueba en tubo): La coagulasa libre es una sustancia semejante a la trombina. Se halla presente en filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma en un tubo se forma un coágulo visible.

Interpretación:

1. Positiva: Se forma coágulo o filamentos de fibrina definidos.
2. Negativa: Ausencia total de coágulo.
3. Controles: La coagulabilidad del plasma utilizado puede comprobarse añadiendo una gota de CaCl_2 al 5% a 0.5 ml de plasma de conejo^{40,44}.

En laboratorios de referencia e investigación se utilizan métodos de biología molecular como el PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) para establecer el origen del brote epidémico⁵. Estas técnicas se han desarrollado para sustituir otros métodos de tipificación como es la fagotipificación, la cual se utiliza también para establecer el origen del brote epidémico, ésta técnica se caracteriza por utilizar virus que infectan específicamente cepas de *S. aureus* lisándolas^{5,43 60}.

3.9. Tratamiento

El uso indiscriminado de antibióticos es el responsable del desarrollo de muchas cepas de *Staphylococcus* resistentes⁶². Es esencial determinar la sensibilidad del germen infectante a los medicamentos disponibles. el tratamiento quimioterapéutico debe ser intenso, puesto que la resistencia puede aparecer con rapidez¹⁹.

La resistencia bacteriana implica el fracaso de la terapéutica. Desde la fabricación del fármaco se conocen las bacterias que naturalmente son resistentes a dicho fármaco, sin embargo también existe lo que se denomina como resistencia adquirida, las bacterias se pueden volver resistentes a algún antibiótico en el transcurso del tiempo por dos mecanismos básicos⁴⁸:

1) Por mutación espontánea de su cromosoma, en una primera etapa aparecen pocas bacterias resistentes. pero a medida que el antibiótico actúa favorece el desarrollo de las células resistentes hasta obtener un cultivo puro de células resistentes al antibiótico⁴⁸.

2) Por incorporación de material genético extracromosómico la cual se denomina resistencia transferida por plásmidos. La diferencia entre la resistencia adquirida y la natural es que la adquirida sólo se presenta en algunos integrantes de la especie o cepa⁴⁸.

3.10. FARINGITIS

La faringe se divide anatómicamente en nasal o epifaringe y bucal. La mucosa faríngea contiene mucho tejido linfoide disperso o agrupado formando glándulas linfáticas. como la faríngea, las palatinas, la tubárica y la lingual. En conjunto el tejido linfático faríngeo constituye el anillo de Waldeyer. Las inflamaciones de las glándulas linfáticas faríngeas se denominan anginas o amigdalitis⁴.

Los trastornos de las vías respiratorias como la faringitis, son la causa principal de que los pacientes acudan al médico. La faringitis puede ser aguda o crónica⁶⁷.

Faringitis aguda. Este tipo de faringitis suele acompañar a los catarros de las vías respiratorias altas (traqueobronquitis) su etiología principal son los adenovirus y el *Streptococco* beta hemolítico, el cual es de suma importancia ya que puede ser el prelude de un brote de fiebre reumática y debe ser tratada mediante antibióticos específicos para garantizar la erradicación del estreptococo beta hemolítico y evitar las secuelas ya mencionadas^{1,67}.

Faringitis crónica. Es un padecimiento muy frecuente. se distinguen tres formas anatomoclínicas: Catarral (la más común), hipertrófica y atrófica. Se desarrolla sobre todo por la influencia de noxas crónicas, principalmente en los fumadores y bebedores de alcohol, también en todos los individuos que por obstrucción nasal tienen que respirar por la boca⁴.

La faringitis catarral se caracteriza por tumefacciones de los folículos produciendo numerosas granulaciones grises en ocasiones ulceradas. La faringitis hipertrófica, se caracteriza por un aumento en la viscosidad de la mucosa. La faringitis atrófica, se caracteriza por la palidez y el aspecto lacado de la mucosa, aparece conjuntamente con rinitis atrófica y se observa comúnmente en individuos desnutridos⁴.

Sintomatología

Los síntomas clínicos de la faringitis aguda son los siguientes: Temperatura oral superior a 38°C, hipertrofia de los ganglios linfáticos cervicales, exudado faringoamigdalino⁷.

En el caso de la faringitis crónica sus síntomas son locales: ardor, carraspera, sensación de sequedad en la garganta, tos matutina acompañada a veces de pequeños esputos mucosos, fetidez del aliento y catarro de las paredes posteriores y laterales de la faringe, donde la mucosa está muy roja, venas dilatadas y flexuosas y presenta acumulos de moco seco⁴.

Etiología

Los virus son la causa de más del 90 % de las infecciones de vías respiratorias altas, la causa bacteriana más importante son los *Streptococcus* beta-hemolíticos del grupo A. Otros microorganismos que se asocian generalmente con infecciones amigdalares y periamigdalares son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*^{4,7}.

4.1. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las infecciones de las vías respiratorias constituyen del 25-30 % del total una causa importante en la consulta médica diaria. La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) cataloga como portadores de infecciones recurrentes a aquellos pacientes que presentan por lo menos tres episodios infecciosos en un año³⁹. Los principales factores predisponentes para las infecciones recurrentes de las vías respiratorias son el humo del cigarro, la contaminación, los gases de compuestos químicos, la disminución de temperatura en forma brusca y trastornos fisiológicos que incluyen la desnutrición, alergias e inmunodeficiencias de anticuerpos²³.

Los *Streptococcus* beta-hemolíticos del grupo A, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y algunos virus se asocian generalmente con infecciones amigdalares y periamigdalares⁵⁶; los estreptococos son la causa más importante de la faringitis. La mayor parte de las infecciones por estreptococos no confieren inmunidad protectora, lo cual aunado a la frecuente incapacidad de los antibióticos para su erradicación constituyen una gran problemática en el tratamiento de estas infecciones^{7,59}.

En la faringitis recurrente el problema principal ha sido la erradicación del microorganismo causal, *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A. Las posibles causas de este fenómeno son cuatro: La primera es la persistencia del m.o. debido a que la población bacteriana en los tejidos es tan grande que el tratamiento no logra matar a todos los m.o. y los que sobreviven son los que colonizan de nuevo al paciente. En segundo lugar están los cambios del estreptococo inducidos por gradientes de penicilina para adquirir la "forma L" que es completamente resistente a la penicilina. El tercer factor a considerar es la reinfección de los pacientes y por último la presencia de organismos que producen penicilinasas como *S. aureus* que inactivan el antibiótico⁵⁶. Se ha propuesto la combinación de penicilina más clavulanato de potasio para su erradicación o el uso de oxaciclina, tratamientos que han demostrado ser eficaces^{51,56}. Pero estos tratamientos no evitan el fenómeno de persistencia ni las posibles reinfecciones con ambos microorganismos. Un tratamiento alternativo puede ser la inmunización a través de la aplicación de vacunas bacterianas que prevengan las infecciones y/o eliminen a los m.o. infectantes.

Por otro lado se ha observado una asociación bacteriana entre el *Streptococcus* beta-hemolítico y el *Staphylococcus aureus* productor de betalactamasa⁶. Aunque el *S. aureus* se cataloga como flora normal o no patógena en el tracto respiratorio superior^{51,59}, consideramos que desempeña un papel muy importante en la patogenia de las infecciones recurrentes de las vías respiratorias, debido a que presenta resistencia a los agentes antibacterianos, lo cual se encuentra mediado por enzimas como la betalactamasa, evitando con ello su erradicación y la de otros microorganismos asociados en la infección, también se ha observado que la proteína A del *S. aureus* tiene un efecto antiopsonizante y por lo tanto impide un buen desempeño de la respuesta inmunológica durante la infección^{7,23}.

La principal estrategia para el tratamiento de las infecciones bacterianas ha sido el uso de antibióticos, pero su uso indiscriminado y el mal seguimiento de los tratamientos ha provocado el desarrollo de cepas bacterianas resistentes^{59,62}. Una alternativa a ésta problemática puede ser la prevención inmunológica. Las bacterias expresan una gran cantidad de estructuras que presentan actividad antigénica, es decir que desencadenan una respuesta inmunológica específica, pero ésta respuesta no siempre resulta eficaz, debido a que en ocasiones, durante la infección, el microorganismo se reproduce más rápido que dicha respuesta^{59,42}.

Con base a lo anterior se piensa que el tratamiento más adecuado de las infecciones recurrentes de las vías respiratorias es la administración de vacunas bacterianas, el uso de estas vacunas provoca un aumento en los niveles de inmunoglobulinas A, G y M.^{31,24,58}, así como una mayor protección en contra de las lesiones que provocan los microorganismos¹⁶.

El presente trabajo es un estudio de tipo prospectivo, longitudinal para analizar los cambios en la respuesta inmunológica de pacientes con faringitis recurrente durante la aplicación de una vacuna inactivada de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan 1. El uso del *Streptococcus* beta-hemolítico del grupo A como inmunógeno no es recomendable por su relación con enfermedades autoinmunes como es el caso de la fiebre reumática⁵⁰.

4.2. HIPÓTESIS

Si la aplicación de una vacuna bacteriana de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I logra estimular el sistema inmunológico de pacientes con faringitis recurrente, entonces se observará un aumento en los niveles séricos de anticuerpos de los isotipos IgA y de las subclases IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ anti-*S. aureus* conforme transcurre el tratamiento.

4.3. OBJETIVOS

GENERAL:

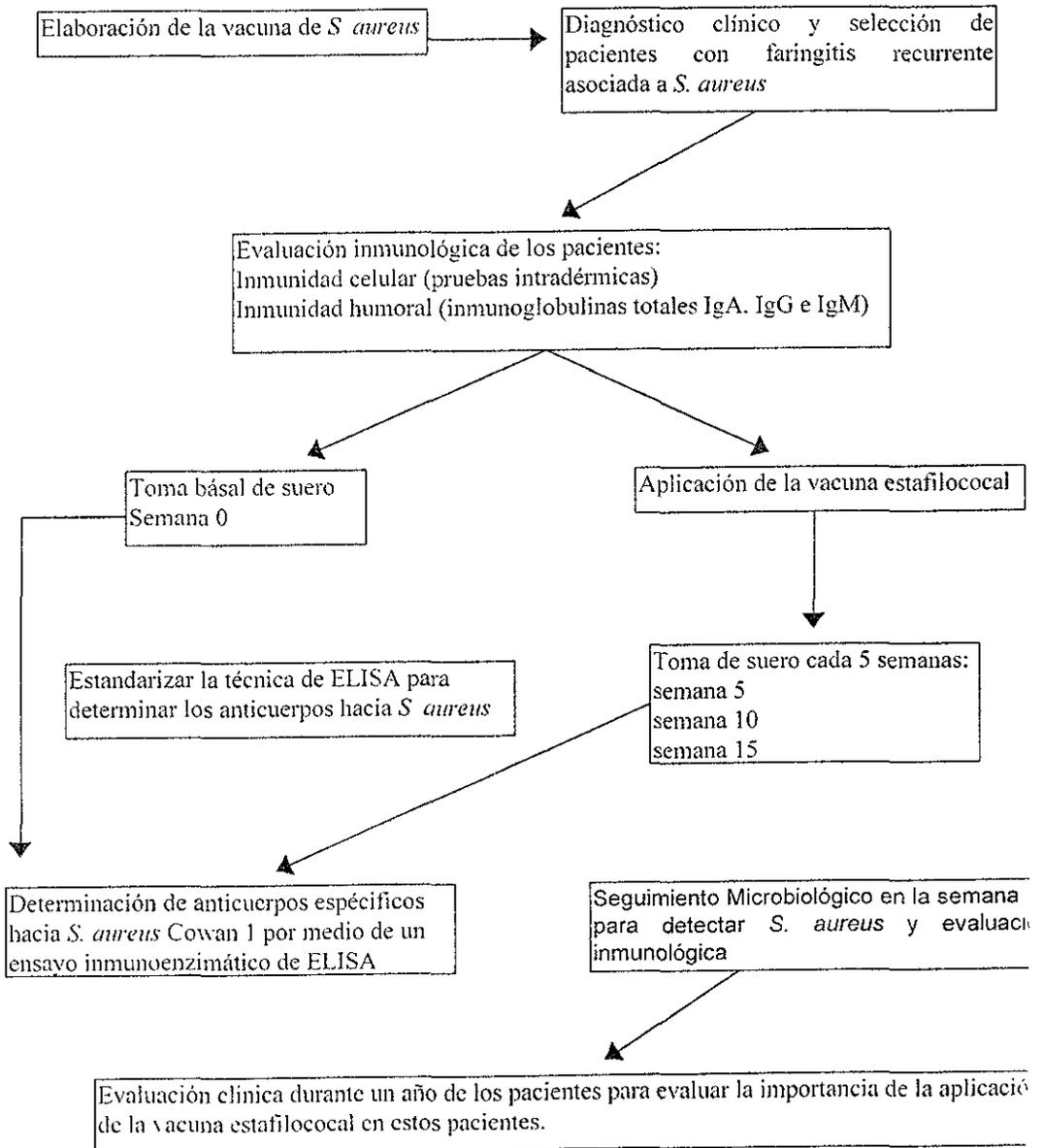
Por medio de la administración subcutánea de la vacuna bacteriana de *Staphylococcus aureus* Cowan I inducir una respuesta inmunológica protectora específica en pacientes con infecciones recurrentes de las vías respiratorias

PARTICULARES:

1. Elaboración de una vacuna bacteriana de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I.
2. Aplicación de dicha vacuna a pacientes con faringitis recurrente asociada con el *S. aureus*.
3. Realizar una valoración microbiológica e inmunológica de los pacientes con faringitis recurrente durante el tratamiento con la vacuna bacteriana.
4. Estandarizar las condiciones para el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático indirecto de doble anticuerpo.
5. Mediante un ensayo de ELISA indirecto de doble anticuerpo cuantificar los cambios en los niveles de anticuerpos hacia antígenos del *Staphylococcus aureus* Cowan I provocados por la aplicación de la vacuna a pacientes con faringitis recurrente y comparar dicho reconocimiento con el de un grupo testigo de sujetos sanos a los que no se les aplicó la vacuna.

4.4. MATERIAL Y MÉTODOS

DIAGRAMA DE TRABAJO EXPERIMENTAL



ELABORACIÓN DE LA VACUNA:

La cepa de *S. aureus* Cowan 1 (ATCC 12598) donada por el departamento de biología celular del CINVESTAV-I.P.N., se cultivó en caldo de soya tripticaseína a 37 °C durante 24 horas para promover su crecimiento, el crecimiento se confirmó por la turbidez presente en el tubo. Para verificar que la bacteria estaba pura se realizaron pruebas de control, las cuales consisten en sembrar un inoculo en agar sangre, en agar de sal y manitol y realizar una tinción de Gram para cada cultivo

La bacteria proveniente del caldo se cultivó en 60 placas de agar nutritivo, recubierto con papel celofán estéril, con el propósito de que la bacteria no se mezcle directamente con el medio de cultivo, a 37 °C durante 24 horas⁴³ Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron pruebas de control (mencionadas anteriormente) para verificar que no existiera ningún otro microorganismo contaminante

Posteriormente se realiza la cosecha de la bacteria de la siguiente manera: con pinzas estériles se toma el papel celofán en donde está la bacteria y se introduce en solución salina fisiológica (SSF) estéril tratando de remover toda la biomasa. Una vez suspendida la bacteria, se realizan tres lavados con SSF estéril para eliminar cualquier contaminante del medio de cultivo que podría sensibilizar al paciente⁴³.

La biomasa se recupera por centrifugación a 3000 r.p.m.(Centrifuga IEC modelo HN-SNII, diámetro del rotor 7cm) durante 10 -15 minutos. El paquete obtenido se envasa y se resuspende en 50 mL de solución de Evans. Posteriormente se inactiva por calor, en autoclave a 121 °C durante 1 minuto, y se congela a -70 °C para su almacenamiento. Al finalizar se repiten las pruebas de control y se realiza una inoculación en agar nutritivo para verificar la esterilidad. Finalmente se cuantifica el número de bacterias por medio de la cámara de Neubauer de la siguiente forma⁴³.

Procedimiento.

1. Se hizo una dilución del concentrado bacteriano, en la cual se pueda contar fácilmente a las bacterias.
2. Se colocó por capilaridad una gota de la dilución a contar dentro de la cámara de Neubauer. Se observó al microscopio con el objetivo de 40x y contabilizar las bacterias que están dentro de la cuadrícula central.
3. El número de bacterias se multiplica por el factor de corrección que está dado por el volumen del concentrado contenido en la cuadrícula central (0.1 mm^3 ó $0.1 \times 10^{-3} \text{ mL}$) y la dilución realizada del concentrado:

- $\text{Concentración} = (\text{Número de bacterias}) \times (\text{dilución} / 0.1 \times 10^{-3} \text{ mL})$

Después se realizaron las diluciones necesarias para ajustar a una concentración de 1200 millones de bacterias por mililitro. La vacuna obtenida se almacena a 4°C hasta el momento de su utilización⁵⁸.

CRITERIOS PARA EL REGISTRO DE PACIENTES

INCLUSIÓN:

- Pacientes entre 15 - 50 años de edad de sexo masculino o femenino.
- Pacientes que sean diagnosticados clínicamente con faringitis o faringoamigdalitis repetitivas o crónicas.
- Pacientes que por exudado faríngeo resulten positivos en los cultivos y pruebas bioquímicas a *S.aureus*.
- Pacientes que cumplan con el esquema de vacunación.

EXCLUSIÓN:

- Pacientes con faringitis de otra etiología o que presenten otro tipo de enfermedades infecciosas.
- Pacientes con tratamiento que altere la respuesta inmunitaria tales como el uso de corticoides o con inmunoterapia.
- Pacientes con enfermedades del sistema inmunológico.

ELIMINACIÓN:

- Pacientes que no cumplan con el esquema de vacunación.

CRITERIOS PARA EL REGISTRO DEL GRUPO TESTIGO NEGATIVO

INCLUSIÓN:

- Individuos entre 15 - 50 años de edad de sexo masculino o femenino.
- Individuos clínicamente sanos.

EXCLUSIÓN:

- Individuos que presentan más de un episodio infeccioso al año de vías respiratorias.
- Individuos con cualquier otra enfermedad

GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPO UNO.

Pacientes con faringitis recurrente asociada a *S. aureus* que reciban vacuna bacteriana.

GRUPO DOS:

Individuos clínicamente sanos

Cada grupo estuvo formado por 13 personas.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

Se realizó a través de la historia clínica y por una exploración física de las amígdalas para observar la existencia de inflamación e irritación. La historia clínica se basó en el cuestionario contenido en la hojas de registro de los pacientes que se anexa a continuación.



HISTORIA CLÍNICA

Nombre: _____
Edad: _____ Fecha: _____
Domicilio: _____
Teléfono: _____ Ocupación: _____

PADECIMIENTO ACTUAL:

Comienzo _____
Causa aparente _____
Con/estación _____
Sin/estación _____
Bebidas alcohólicas _____
Frecuencia _____
Cigarros _____
Frecuencia _____

Cambios atmosféricos:

frío _____
humedad _____
humo _____
calor _____
otros _____

Antecedentes personales:

Alérgicos _____
Médicos _____
Quirúrgicos _____

Antecedentes familiares:

Alérgicos _____
Generales _____
Observaciones _____

PRUEBAS DE LABORATORIO:

Exudado faríngeo:

Agar nutritivo _____
 Gram _____
 Agar sangre _____
 Sales manitol _____
 Coagulasa _____
 Catalasa _____
 Antibiograma _____

DIAGNOSTICO _____
 TRATAMIENTO _____
 INICIO _____
 TERMINACIÓN _____

SEGUIMIENTO:

INMUNIDAD CELULAR:

ANTÍGENO	DOSIS	CANTIDAD	INDURACIÓN Antes del Tratamiento.	INDURACIÓN Después del tratamiento.
PPD	5 UT	0.25 mL		
TT	7 UI	0.10 mL		
VARIDASA	25 UI	0.10 mL		
CANDIDINA	1:100 w/v	0.10 mL		
Vacuna Bacteriana.	1200 x 10 ⁶ bac/mL	0.10 mL		

INMUNIDAD HUMORAL:

Inmunoglobulina	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
IgA total		
IgG total		
IgM total		

Inmunoglobulina	Semana 0	Semana 5	Semana 10	Semana 15
IgA anti- <i>S.aureus</i>				
IgG ₁ anti- <i>S.aureus</i>				
IgG ₂ anti- <i>S.aureus</i>				
IgG ₃ anti- <i>S.aureus</i>				
IgG ₄ anti- <i>S.aureus</i>				

MICROBIOLOGÍA:

	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
<i>S. aureus</i>		

Los pacientes se seleccionaron a través del servicio de consulta externa del Hospital Juárez de México, previo consentimiento por escrito por parte de los pacientes y evaluado por un comité de ética de dicho Hospital. Cuando un paciente presentaba un cuadro de faringoamigdalitis recurrente o crónica se canalizaban al Laboratorio de Alergia, Inmunología y Micología Médica del Hospital, en donde se les realizó el seguimiento descrito a continuación:

Inicialmente a los pacientes con diagnóstico clínico de faringitis o faringoamigdalitis crónica se les practicó un exudado faríngeo para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus*. Las pruebas realizadas a cada paciente estuvieron sólo enfocadas a la identificación de *S. aureus*, en caso de ser negativo el diagnóstico, los pacientes se canalizaban al servicio de otorrinolaringología para que se les realizaran los estudios complementarios para determinar el origen de su enfermedad y se les diera el tratamiento adecuado, estos pacientes no entraron al estudio y quedaron fuera de nuestra responsabilidad. Por otro lado, los pacientes que resultaron positivos al *S. aureus* para ser incluidos en el estudio debieron presentar el siguiente perfil durante su diagnóstico⁴⁰:

Cuadro 2 Identificación de *S.aureus* en los pacientes en estudio.

PRUEBA	RESULTADO
Cultivo en agar sangre	Colonias grandes circulares, cremosas con producción de hemólisis
Tinción de Gram a partir del agar sangre	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Cultivo en agar de sal y manitol (S.M)	Colonias grandes circulares, cremosas que cambian el color del medio de rojo a amarillo (mínimo 10 U.F.C.)
Tinción de Gram a partir de agar S.M.	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Catalasa	Positiva
Coagulasa	Positiva

U.F.C.; unidades formadoras de colonias.

Los pacientes seleccionados para el estudio cumplieron con los requisitos indicados en los criterios de inclusión. Para comparar los resultados de los pacientes se incluyó un grupo testigo negativo, constituido por individuos clínicamente sanos que no presentaron más de un episodio de faringoamigdalitis o faringitis en el último año

A los pacientes seleccionados para el estudio se les aplicaron diversas pruebas antes de iniciar la administración de la vacuna bacteriana, estas pruebas tenían por objeto evaluar el estado inmunológico de los pacientes antes y después del tratamiento, por lo que al final del tratamiento se les repitieron las mismas pruebas que fueron las siguientes.

PRUEBAS DE LABORATORIO:

EXUDADO FARÍNGEO:

Se les solicitó a los pacientes que para la toma de muestra debían presentarse en ayunas, sin aseo bucal y tener por lo menos 15 días sin tratamiento con antibióticos. Para realizar el exudado faríngeo se utilizan hisopos estériles humedecidos con caldo de soya tripticaseína estéril y la muestra se procesó de la siguiente manera. se instruyó al paciente para que respire profundo y la lengua se hizo descender suavemente con un abatelenguas. El hisopo se deslizó entre los pilares tonsilares y por detrás de la úvula, cuidando de no tocar las paredes laterales de la cavidad bucal⁴⁰.

La muestra obtenida se sembró en agar nutritivo, agar sangre y agar de sal y manitol, y se incubaron durante 48 horas a 37 °C, una vez crecidos los microorganismos se procedió a identificar la presencia de *S. aureus* observando la morfología colonial en las diferentes placas de agar y la morfología microscópica característica a través de la tinción de Gram, además se aplicaron las pruebas de catalasa y coagulasa para el diagnóstico confirmativo⁴⁰.

TINCIÓN DE GRAM⁴⁰:

1. Se preparó el frotis, colocando una asada de la bacteria sobre una gota de agua estéril en un portaobjetos.
2. Se fijó al calor suavemente.
3. Se cubrió la preparación con la solución de cristal violeta por 1 minuto.
4. Se lavó el frotis con agua.
5. Se cubrió el frotis con lugol durante 1 minuto.
6. Se lavó con agua
7. Se Decoló con alcohol - acetona por unos segundos
8. Se lavó rápidamente.
9. Se agregó la safranina durante 1 minuto y lavar.
10. Se dejó secar el frotis.
11. Se agregó una gota de aceite de inmersión.
12. Se observó al microscopio con el objetivo de 100x.

CATALASA^{40,44}:

1. Con un palillo de madera estéril se tomó el centro de una colonia proveniente de un cultivo fresco y puro, colocandola sobre un portaobjetos limpio.
2. Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre el microorganismo.
3. Se observó si hay o no la presencia de un burbujeo.

Nota: la colonia no debe provenir de agar sangre.

COAGULASA:

Se realizó utilizando un equipo comercial (STAPHase III[®]), el cual consiste en una macrocúpula que contiene plasma de conejo liofilizado con EDTA. El contenido de la macrocúpula se rehidrata con agua destilada estéril y se inocula. Los organismos productores de la enzima coagulasa se aglutinan.

Procedimiento:

- 1 -Se rehidrató la macrocúpula con 70 microlitros de agua destilada estéril, mantenerlo así durante un minuto antes de ser inoculada.
- 2.-Se inoculó la macrocúpula, con un aplicador de madera estéril, adicionando 5 colonias de microorganismo de una placa de un cultivo puro.
- 3.-Se mezclar el inóculo con el contenido de la macrocúpula.
- 4.-Se leyeron los resultados de la aglutinación después de 1 minuto (algunas reacciones pueden ser instantáneas)

Reacción positiva: Aglutinación de la bacteria en 1 minuto máximo

Reacción negativa: La bacteria se disuelve en el plasma para formar una suspensión lechosa uniforme.

Control positivo. *Staphylococcus aureus* Cowan 1

Control negativo: *S. epidermidis*.

TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA:

A los pacientes por medio de una punción venosa en el brazo se les tomaron 10 mL de sangre, la muestra se incubó a 37 °C por 15 minutos, se centrifugó a 2500 r.p.m. por 10 minutos. El suero obtenido se almacenó a - 70 °C hasta su análisis. La extracción de sangre se realizó en todos los pacientes bajo el siguiente esquema: una toma antes del tratamiento y, posteriormente cada que se terminó de aplicar un frasco de vacuna, lo cual ocurría cada 5 semanas. Para el grupo control se realizaron dos tomas con intervalo de 10 semanas

PRUEBAS INTRADÉRMICAS.

Para evaluar la inmunidad celular *in vivo*, se utilizaron los siguientes antígenos donados por el laboratorio de inmunología y micología de Hospital Juárez de México S.S.: PPD (Dializado de proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* y *M.bovis*), TT (Toxoide tetánico), VAR (Varidasa, enzima estreptococal), CAN (Candidina) y VB (Vacuna bacteriana de *S.aureus*).

La lectura se realizó a las 48 horas posteriores a la aplicación, el parámetro a medir fue el diámetro de la induración, el cual para ser positivo debe ser mayor a 5 mm⁵⁹. La aplicación se realizó en la parte externa del brazo con una jeringa de insulina graduada, introduciendo la aguja con una inclinación de 45 ° aproximadamente, el líquido se inyecta lentamente y se debe observar la aparición de una pequeña pápula, la cual indica que la aplicación intradérmica fue correcta. La aplicación de los antígenos fue primero en el brazo derecho y después en el brazo izquierdo quedando de la siguiente forma:

Brazo derecho:

PPD (Dializado de proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* y *M.bovis*)
TT (Toxoide tetánico)
VAR (Varidasa, enzima estreptococal)

Brazo izquierdo:

CAN (Candidina)
VB (Vacuna bacteriana de *S.aureus*)

Entre cada inoculación debe existir una distancia mínima de 5 cm para evitar que las induraciones se encimen y no se logre con ello una adecuada lectura. El sitio de aplicación debe marcarse con un plumón indeleble para no tener confusiones durante la lectura.

INMUNOGLOBULINAS TOTALES:

Se determinaron a través de un método automatizado, por medio de nefelometría en el aparato QM300 de Sanofi-Diagnostic-Pasteur. El método se basa en una reacción antígeno-anticuerpo que forma un complejo insoluble con capacidad de dispersar la luz, el grado de dispersión se convierte en una señal digital que matemáticamente se relaciona a la concentración del anticuerpo contenido en la muestra. El QM300 cuenta con un sistema computacional que le permite procesar la muestra desde las diluciones hasta la comparación de los datos con curvas de calibración para determinar la concentración del anticuerpo en la muestra.

APLICACIÓN DE LA VACUNA

El esquema que se siguió fue la aplicación de dosis crecientes cada tercer día durante 15 semanas. La vía de aplicación fue subcutánea, las recomendaciones generales para la aplicación de la vacuna fueron las siguientes:

1. Mantener la vacuna en refrigeración y no congelarse.
2. Aplicarse tres veces por semana: lunes, miércoles y viernes, en la cara externa de ambos brazos en forma alterna.
3. Utilizar jeringa graduada de insulina.
4. La primera administración se realizó en el consultorio.
5. Las dosis fueron crecientes comenzando con 0.1 mL y aumentando en cada inyección 0.1 mL hasta llegar a 1.0 mL.
6. El paciente asistió al consultorio cada vez que se termine un frasco de vacuna de 10 mL.

A cada paciente se le administraron 3 frascos de 10 mL a las siguientes concentraciones:

- Frasco 1: 120 millones de bacterias por mL
- Frasco 2: 240 millones de bacterias por mL
- Frasco 3: 360 millones de bacterias por mL.

Cuadro 3. Esquema de vacunación:

SEMANA	DÍA	VOLUMEN (mL)
PRIMERA	Lunes	0.1
PRIMERA	Miércoles	0.2
PRIMERA	Viernes	0.3
SEGUNDA	Lunes	0.4
SEGUNDA	Miércoles	0.5
SEGUNDA	Viernes	0.6
TERCERA	Lunes	0.7
TERCERA	Miércoles	0.8
TERCERA	Viernes	0.9
CUARTA	Lunes	1.0
CUARTA	Miércoles	1.0
CUARTA	Viernes	1.0
QUINTA	Lunes	1.0
QUINTA	Miércoles	1.0
QUINTA	Viernes	Asistir al consultorio

Nota. Para cada frasco se siguió el mismo esquema.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):

Los anticuerpos en contra de *S. aureus* Cowan 1 se determinaron a través de una prueba de ELISA, en la cual la bacteria completa se fijó a los pozos de la microplaca. La técnica de ELISA se estandarizó de acuerdo a los siguientes resultados:

La concentración del antígeno se estableció por una curva a dosis crecientes iniciando con una concentración de 10 millones de bacterias por mililitro (b/mL) hasta 80 millones por mililitro, utilizando un suero que previamente se identificó positivo a anticuerpos anti-*S.aureus*. Eligiéndose la concentración de 20 millones, debido a que presentaba la mejor densidad óptica (D.O), el monoclonal utilizado para la estandarización fue el que detecta a IgG₁ (figura 2).

Las concentraciones de los anticuerpos fueron 1/2000 tanto para el anticuerpo monoclonal como para el anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa, los tiempos de incubación fueron de 1 hora y 30 minutos a 37 °C respectivamente¹⁷. El antígeno (*S.aureus* Cowan 1) se suspendió en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6^{30,35,54,61}. El bloqueo de los sitios libres, así como el sustrato utilizado fueron los referidos en la bibliografía^{15,30,54,61}. El sustrato utilizado fue H₂O₂ y el cromógeno fue o-fenilendiamina (OPD), dejándose incubar a 37 °C en la oscuridad^{15,35,61}. Para el sistema se utilizaron cuatro blancos, el primero sin antígeno, el segundo sin suero, otro sin anticuerpo monoclonal y por último otro sin anticuerpo conjugado, el valor promedio de los blancos se restó a cada D O obtenida de los problemas, eliminando de esta forma la inespecificidad del sistema, para considerar un resultado positivo éste tenía que ser mayor a dos veces la desviación estándar del valor promedio de los blancos, además en el caso de las curvas de comportamiento lineal o no logarítmico debían ser iguales o mayores que la ordenada al origen de la curva patrón⁵⁴.

Determinación de la concentración de antígeno

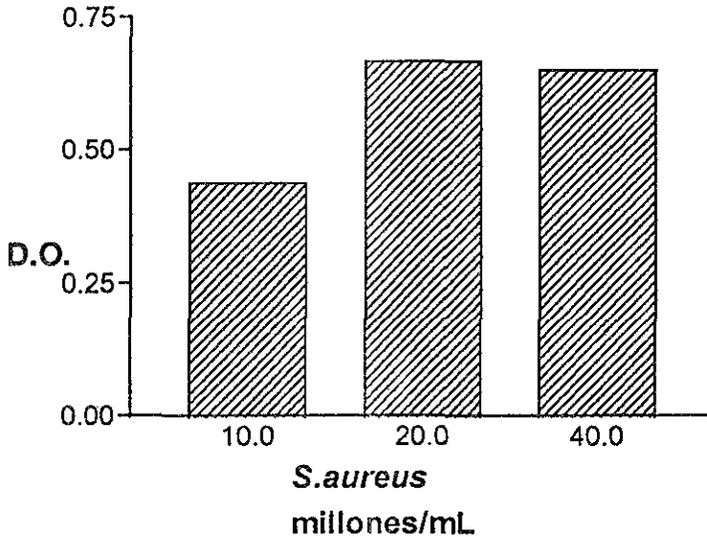


Figura 2. Determinación de la concentración de antígeno (bacteria). Se puede observar la mejor D.O. a la concentración de 20 millones de bacterias

Cuadro 4. Condiciones estandarizadas para la técnica de ELISA.

Reactivo	Concentración	Cantidad por pozo	Incubación
Antígeno	20 millones de b/mL	150 microlitros	2 horas a 37 °C
Bloqueo (BSA)	2.2 %	300 microlitros	toda la noche a 4 °C
Suero	1/50	100 microlitros	2 horas a 37 °C
Anticuerpo Monoclonal	1/2000	100 microlitros	1 hora a 37 °C
Anticuerpo conjugado	1/2000	100 microlitros	30 minutos a 37 °C
Sustrato (OPD-H ₂ O ₂)	0.5 mg/mL-0.025%	150 microlitros	10-15 minutos a 37 °C

BSA albúmina sérica bovina; OPD orto-fenilendiamina, H₂O₂ peróxido de hidrógeno.

Procedimiento:

1. El antígeno (*S.aureus* Cowan 1) se suspendió en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M, pH 9.6 a una concentración de 20 millones de bacterias por mililitro.
2. De la suspensión anterior se colocaron 150 mL en cada pozo de una placa de microtitulación (placas de poliestireno marca Dynatech Laboratories, Inc.).
3. Se incubó la placa con el antígeno durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Al término de la incubación la suspensión de antígeno se desechó y los pozos se lavaron con amortiguador de lavado (PBS con 0.05% de Tween 20) una vez por 3 minutos y tres veces con PBS, durante 3 minutos cada lavado, en agitación a 180 r.p.m.
5. Los sitios libres de los pozos se bloquearon con albúmina sérica bovina al 2%.
6. Se agregaron 300 microlitros en cada pozo
7. Se incubó toda la noche a 4 °C.
8. Los pozos se lavaron de la misma forma que el paso 4.
9. Se agregaron 100 mL de una dilución 1:50 de los diferentes sueros.
10. Se incubó a 37 °C durante 2 horas
11. Los pozos se lavaron de la forma ya descrita en el paso 4.
12. Según sea el caso se agregaron 100 mL de cada anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales anti-inmunoglobulinas humanas que se utilizaron fueron anti-IgA (Clona GA-112); anti-IgG1 (Clona 8c/6-39); anti-IgG2 (Clona HP-6014); anti-IgG3 (Clona HP-6050); anti-IgG4 (Clona HP-6025) de la marca Sigma Chemicals Co, St Louis Missouri.
13. Se agregó un anticuerpo de cabra anti- IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Fab specific, Sigma, Chemicals. Co, St Louis Missouri) y se dejó incubar por 30 minutos a 37 °C.
14. Por último se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 20 y 3 lavados con PBS, de 3 minutos cada lavado.
15. Se agregó el sustrato y cromógeno (o-fenilendiamina 0.5 mg/mL, en buffer de citratos 0.1M pH 5.5 y 0.003% de H₂O₂).
16. La placa se incubó a 37 °C en la oscuridad durante 10-15 minutos.
17. La reacción se detuvo adicionando 50 mL de ácido sulfúrico 2N.
18. La placa se leyó a 450 nm.

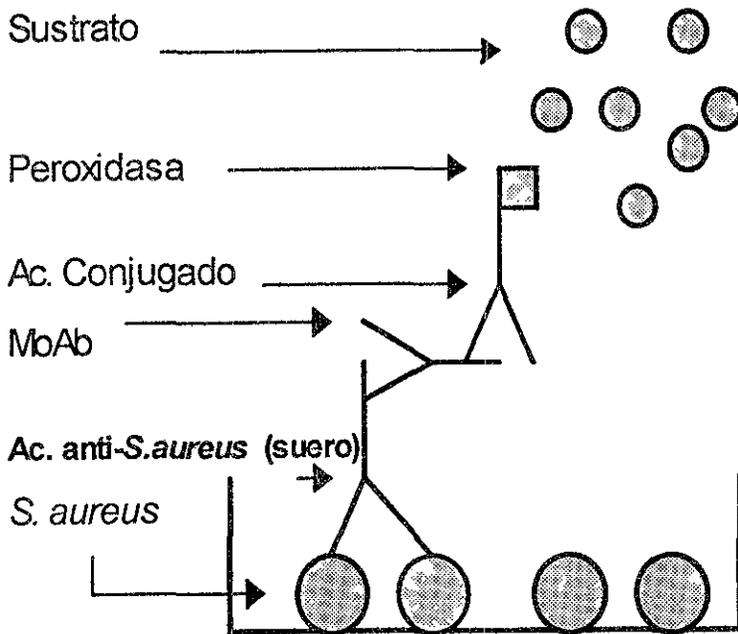


Figura 3. Representación esquemática de la técnica ELISA-STAPH

Una vez estandarizada la técnica de ELISA (que se denominó ELISA-STAPH) se determinaron los valores de D.O. para cada inmunoglobulina en los sueros de los pacientes. Se utilizó un suero con anticuerpos anti-*S.aureus* como control positivo; este suero se trabajó conjuntamente en cada ELISA-STAPH realizada, para obtener lecturas comparables, eliminando de esta forma la variabilidad de una prueba a otra. Para poder expresar los resultados en miligramos por decilitro de inmunoglobulina es necesario tener un preparado de anticuerpos anti-*S.aureus* de concentración conocida, como no se tenía disponible se determinaron indirectamente como a continuación se describe.

Primero, se determinó la concentración de inmunoglobulinas totales en el suero control positivo por medio de nefelometría (nefelómetro QM-300), con un valor de 226 mg/dL para IgA y 2358 mg/dL para IgG. Una vez conocida la concentración de IgA e IgG totales se realizaron diluciones dobles del suero control positivo, que se fijaron directamente a los pozos de una microplaca, bloqueándose los sitios libres con BSA, después se agregaron los anticuerpos (monoclonal y conjugado) y demás reactivos en las mismas condiciones que en la ELISA-STAPH anteriormente descrita. Se determinaron los valores de D.O. tanto para IgA como para IgG totales y se graficaron contra la concentración en mg/mL.

Anticuerpos IgA.

Para IgA se obtuvo una curva de tipo lineal (Cuadro 5, figura 4) al graficar las concentraciones con las D.O.

Cuadro 5. Curva patrón de IgA, Concentración (mg/mL) vs D.O.

Dilución	Concentración mg/mL	D.O.
1:2000	0.00113	0.775
1:4000	0.000565	0.478
1:8000	0.000282	0.406
1:16000	0.000141	0.323
m= 446.6	b= 0.259	r= 0.9927

mg/mL miligramos por mililitro; D.O. densidad óptica; m pendiente; b ordenada al origen; r coeficiente de linealidad.

Curva patrón de IgA

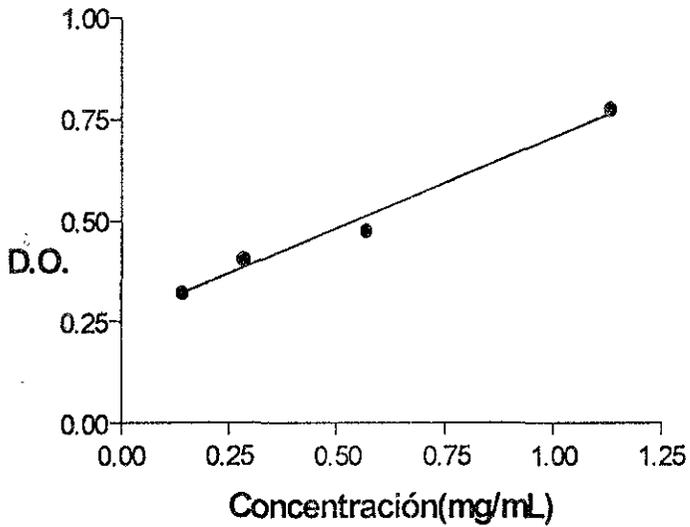


Figura 4. Gráfica de inmunoglobulina A total del suero control positivo a diferentes diluciones vs D.O. determinada por técnica de ELISA.

Una vez obtenida la curva patrón para IgA total, a una dilución del suero control positivo preincubada en pozos con bacteria fija, se le midió la D.O. y se interpoló en la curva patrón. La concentración obtenida de esta forma representa a las IgA totales menos las IgA que reaccionaron con el *S.aureus*. La diferencia entre esta concentración y la concentración del suero control positivo sin incubación con *S.aureus* es igual a la concentración de IgA anti-*S.aureus*. Los cálculos fueron los siguientes:

Ecuación de la curva para IgA totales:

Los datos obtenidos tienen un comportamiento lineal, debido a ello se sustituyen en la ecuación 1, para obtener la ecuación 2:

$$y = m x + b \dots\dots\dots \text{ecuación 1}$$

$$D.O. = 446.6 C_{IgA} + 0.259 \dots\dots\dots \text{ecuación 2}$$

Donde:

- D.O es la densidad óptica
- C_{IgA} es la concentración de IgA totales

La dilución utilizada que se pre-incubo con *S. aureus* fue 1:2000 ó 0.001113 mg/mL (C_{IgAt}), tuvo una D.O. de 0.752 después de la incubación con *S.aureus*, que de acuerdo a la ecuación 2 corresponde a 0.001103 mg/mL($C_{IgAp.i}$). La diferencia entre ambas concentraciones es igual a la concentración de IgA anti-*S. aureus* ($C_{IgA \text{ anti } S. aureus}$):

$$C_{IgAt} - C_{IgAp.i} = C_{IgA \text{ anti } S. aureus} \dots\dots\dots \text{ecuación 3}$$

sustituyendo:

$$0.00113 \text{ mg/mL} - 0.001103 \text{ mg/mL} = 0.000027 \text{ mg/mL}$$

multiplicando por la dilución:

$$0.000027 \text{ mg/mL} \times 2000 = 0.054 \text{ mg/mL}$$

La concentración de IgA anti-*S.aureus* fue igual a = 0.054 mg/mL

Con la concentración antes determinada se procedió a realizar una serie de diluciones dobles del suero control positivo y se procesó cada dilución en la técnica de ELISA-STPH usada para detectar los anticuerpos anti-*S.aureus*. Con ello se estableció una curva patrón para determinar los miligramos de IgA anti-*S.aureus* en cada paciente al interpolar los valores de D.O. dentro de la curva. La curva patrón para IgA anti-*S.aureus* tuvo un comportamiento logarítmico, para linealizar la curva se calculó el logaritmo de la concentración de cada dilución (cuadro 6 y figura 5)

Cuadro 6. Curva patrón para IgA anti-*S. aureus* determinada por ELISA-STAPH.

Dilución	Concentración(mg/mL)	Logaritmo de C	D.O.
1:10	0.005400	-2.267	0.930
1:25	0.002160	-2.665	0.858
1:50	0.001080	-2.966	0.709
1:100	0.000540	-3.267	0.621
1:200	0.000270	-3.568	0.492
1:400	0.000135	-3.869	0.363
1:800	0.0000682	-4.170	0.232

mg/mL miligramos por mililitro, C concentración, D O. densidad óptica

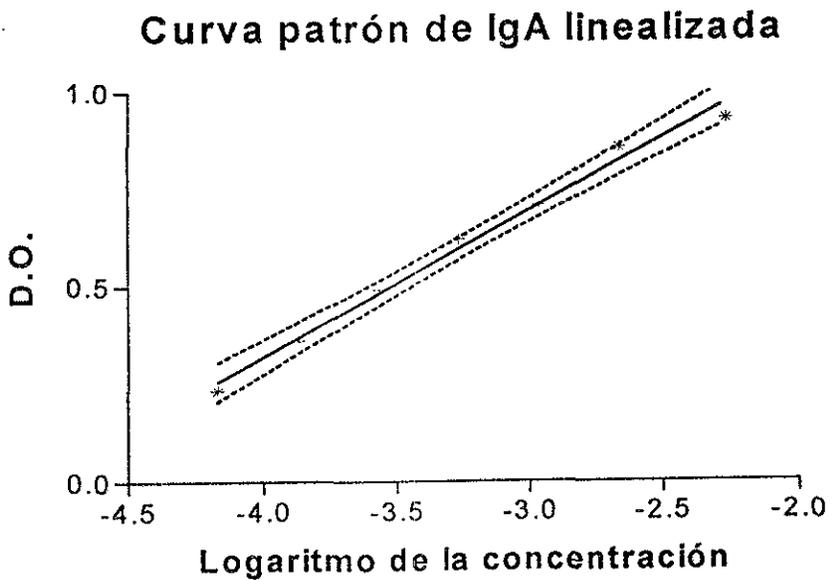
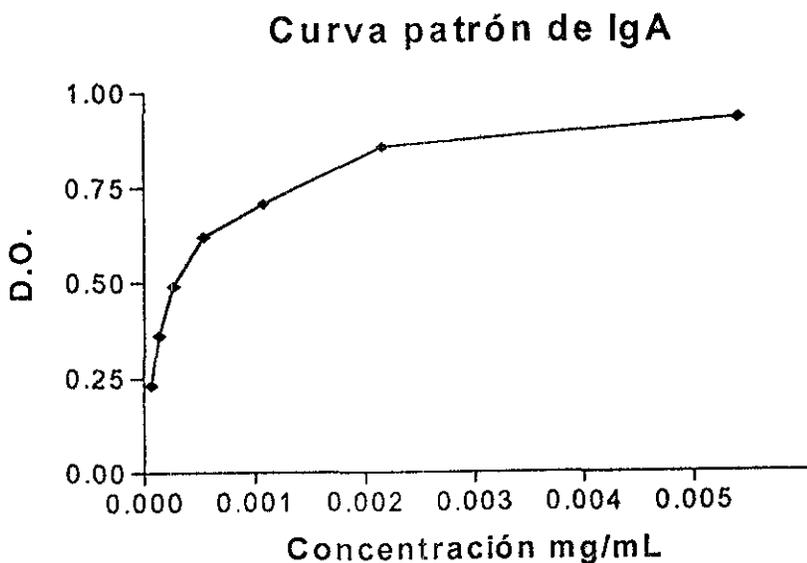


Figura 5. La gráfica de arriba representa la curva patrón para IgA anti-*S.aureus* (concentración vs absorbancia determinada en ELISA-STAPH) y la gráfica de abajo está linealizada.

Ecuación lineal de la curva patrón de IgA anti-*S. aureus*:

Los valores de la regresión lineal fueron.

- $m = 0.377$
- $b = 1.82$
- $r = 0.99$

Quedando la ecuación final.

$$\text{D.O.} = 0.377 \log C_{\text{IgA anti-}S. \text{ aureus}} + 1.82 \quad \text{ecuación 4.}$$

Con la ecuación anterior se calcularon los valores de IgA anti-*S. aureus* para cada paciente se hicieron determinaciones dobles de cada muestra y los valores de D.O. se promediaron.

Para evitar la variación que existe de una prueba a otra de ELISA se utilizó una dilución del suero positivo como patrón de comparación, la cual se incluyó en todas las pruebas de ELISA-STAPH realizadas. Para comparar los valores de D.O. de las pruebas de ELISA-STAPH el valor de D.O. del suero positivo se usó para adaptar los valores de la ecuación 4 para cada prueba realizada, teniendo en cuenta que la pendiente es constante, que la concentración de este suero es conocida y por lo tanto sólo cambia el valor de la ordenada al origen. Con esta última adaptación se calcularon los valores de IgA anti-*S. aureus* en mg/mL para cada paciente e individuo.

Anticuerpos IgG

Para el caso de las subclases de IgG se siguió un procedimiento similar para determinar los miligramos de anticuerpos anti- *S. aureus* que se describe a continuación.

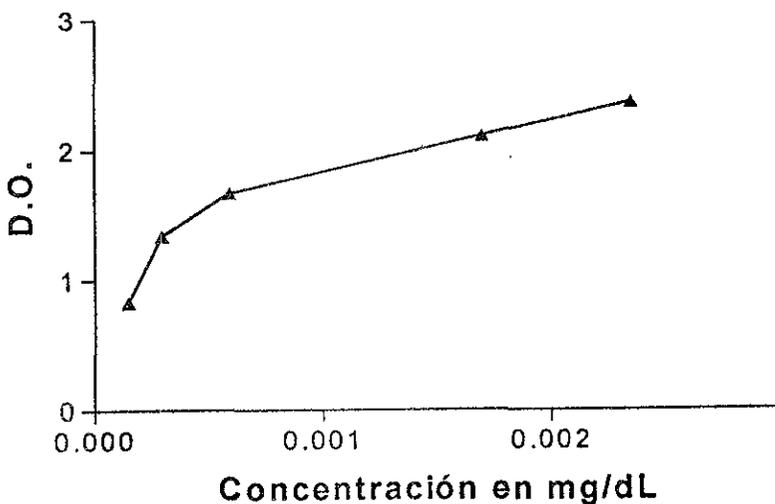
Primero, al igual que para IgA se determinó la concentración total de IgG en el suero usado como control positivo, a través de la técnica de nefelometría automatizada QM300, que tuvo un valor de 2358 mg/dL. De la misma forma descrita para IgA se realizó un sistema de ELISA para obtener una curva patrón para IgG totales en donde se graficó la concentración (mg/mL) de IgG totales contra la D.O. Para este sistema de ELISA se realizó una mezcla de los anticuerpos monoclonales que identifican a las diferentes subclases de IgG, quedando a una concentración final de 1:2000 para cada anticuerpo monoclonal. En el siguiente cuadro se ilustran los valores obtenidos.

Cuadro 7. Curva patrón para IgG totales

Dilución	Concentración de IgG totales (mg/ mL)	Logaritmo de la concentración	D.O.
1:10000	0.002358	-2.627	2.369
1:20000	0.001179	-2.928	2.111
1:40000	0.000589	-3.229	1.672
1:80000	0.000294	-3.530	1.340
1:160000	0.000147	-3.831	0.831
Regresión lineal	$r = 0.99$	$m = 1.27$	$b = 5.79$

La curva obtenida fue de tipo logarítmica, para linealizarla se calculó el logaritmo de la concentración, la gráfica resultante se ilustra en la figura 6. La regresión lineal de la curva se ilustra en la cuadro 7.

Curva patrón de IgG totales



Curva patrón de IgG totales lineal

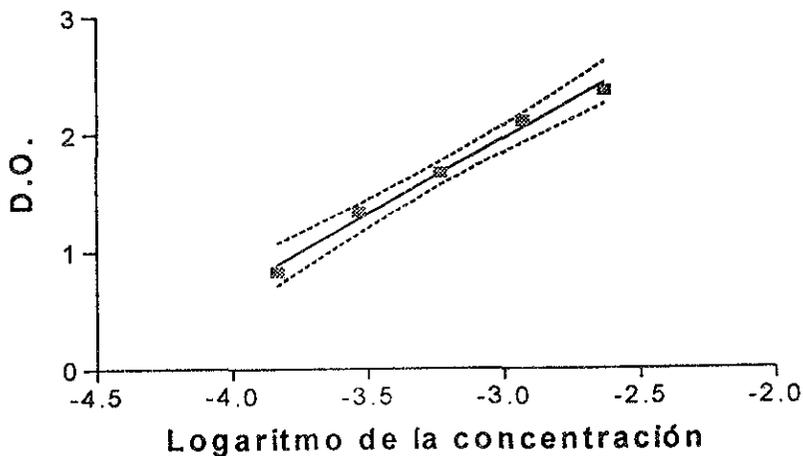


Figura 6. Gráficas para la curva patrón de IgG totales, la gráfica de abajo es la que se utilizó para el cálculo de los miligramos de IgG total anti-*S aureus*.

Bajo el mismo procedimiento que para IgA se determinó, con ayuda de la curva anterior, la concentración de IgG totales anti-*S. aureus*, resultando un valor de 0.28 mg/ml. Por otro lado, dentro del sistema de la ELISA-STAPH se compararon los valores de D.O. para las diferentes subclases de IgG en condiciones iguales, los valores que se obtuvieron son los siguientes:

Cuadro 8. D.O. de las diferentes subclases de IgG anti-*S. aureus*.

Subclase	D.O.
G 1	0.728
G 2	0.472
G 3	0.286
G 4	0.000

Para IgG₄ en el suero positivo no existe reconocimiento hacia el *S. aureus*, de tal forma las IgG totales anti-*S. aureus* son iguales a la suma de las subclases 1,2 y 3, considerando la relación de D.O. se calculó la concentración para cada una de las subclases, excepto para G₄, de la siguiente forma:

$$IgG_{\text{anti-}S. aureus} = IgG_1 + IgG_2 + IgG_3 \dots \dots \dots \text{ecuación 5}$$

considerando las relaciones entre D.O. tenemos

$$IgG_1 / IgG_2 = 0.728 / 0.472 = 1.542$$

despejando IgG₁ :

$$IgG_1 = 1.542 IgG_2 \dots \dots \dots \text{ecuación 6}$$

para la relación de IgG₃ con IgG₂ :

$$IgG_3 / IgG_2 = 0.286 / 0.472 = 0.605$$

despejando IgG_3 :

$$IgG_3 = 0.605 IgG_2 \dots\dots\dots \text{ecuación 7}$$

sustituyendo las ecuaciones 6 y 7 en la ecuación 5.

$$IgG_{\text{anti-S aureus}} = 1.542 IgG_2 + IgG_2 + 0.605 IgG_2 \dots\dots \text{ecuación 8}$$

despejando IgG_2 :

$$IgG_2 = IgG_{\text{anti-S aureus}} / 3.147$$

sustituyendo el valor de $IgG_{\text{anti-S aureus}}$

$$IgG_2 = (0.28 \text{ mg/mL}) / 3.147 = 0.0889$$

sustituyendo el valor de IgG_2 en la ecuación 6 y 7

$$IgG_1 = 1.542 (0.0889 \text{ mg/mL}) = 0.137 \text{ mg/mL}$$

$$IgG_3 = 0.605 (0.0889 \text{ mg/mL}) = 0.0538 \text{ mg/mL}$$

Cuadro 9. Concentración de las subclase de IgG anti-*S. aureus*.

Subclase de IgG anti- <i>S. aureus</i>	Concentración (mg/mL)
G1	0.1370
G2	0.0889
G3	0.0538
G4	0.0000

Una vez que se determinó la concentración para cada subclase de IgG anti-*S.aureus* se realizaron las curvas patrón para cada una de la misma forma descrita que para IgA anti-*S. aureus*.

Anticuerpos IgG₁

Para IgG₁ los valores de D O obtenidos se muestran en el cuadro 10, la curva siguió una tendencia logarítmica y se linealiza al graficar el logaritmo de la concentración con la D.O. (figura 7).

Cuadro 10. Curva patrón para IgG₁ anti-*S. aureus*

Dilución	Concentración mg/mL	Logaritmo de la concentración	D.O.
1:10	0.013700	-1.863	1.089
1:25	0.005480	-2.261	0.924
1:50	0.002740	-2.562	0.786
1:100	0.001370	-2.863	0.666
1:200	0.000685	-3.164	0.597
1:400	0.000342	-3.465	0.470
1:800	0.000171	-3.767	0.441
Regresión lineal	$r = 0.99$	$m = 0.349$	$b = 1.707$

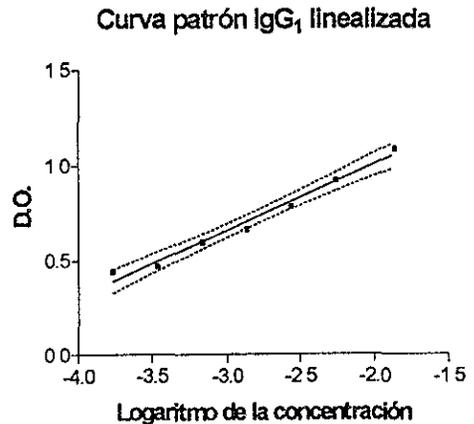
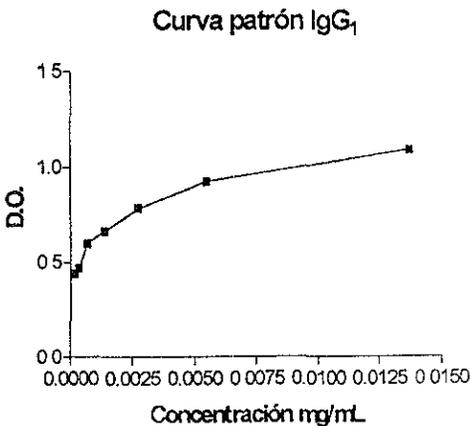


Figura 7. Gráficas de la curva patrón de IgG₁ anti-*S.aureus*, la gráfica de la izquierda muestra un comportamiento de tipo logarítmico que se linealiza al graficar el logaritmo de la concentración (gráfica derecha).

Con ayuda de la curva patrón se obtuvo la ecuación que se utilizó para calcular los miligramos de IgG₁ anti-*S.aureus* a partir de los valores de D.O., los valores se calcularon bajo el mismo proceso que para IgA anti-*S. aureus*

Anticuerpos IgG₂

Para IgG₂ los valores de D O se incluyen en el cuadro 11, a diferencia que para IgG₁ la curva patrón resultó de tipo lineal (fig. 8)

Cuadro 11. Curva patrón para IgG₂ anti-*S.aureus*

Dilución	Concentración (mg/mL)		D.O.
1:10	0 008890		0.7750
1:25	0 003550		0.6020
1:50	0 001778		0.5380
1:100	0 000889		0.5290
Regresión lineal.	r = 0.99	m = 31.75	b = 0.49

Con la curva patrón se calcularon los miligramos de IgG₂ anti-*S. aureus* a partir de las D.O.

Curva patrón IgG₂

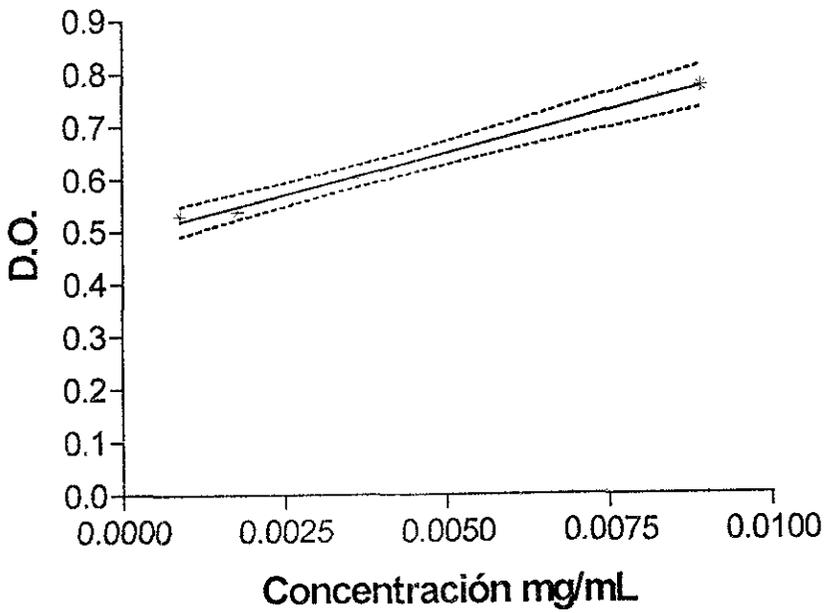


Figura 8. Gráfica de la curva patrón de IgG₂ anti-*S.aureus*.

Anticuerpos IgG₃

La curva patrón para IgG₃ fue de tipo lineal (figura 9), los valores se muestran en el cuadro 12. A partir de la curva patrón se calcularon los miligramos de IgG₃ para los grupos control y de pacientes.

Cuadro 12.- Curva patrón IgG₃ anti-*S.aureus*

Dilución	Concentración mg/mL	D.O.	
1:10	0.005380	0.3020	
1:25	0.002150	0.1690	
1:50	0.001070	0.1270	
1:100	0.000538	0.1140	
1:200	0.000269	0.0930	
Regresión lineal.	$r=0.998$	$m=40.055$	$b=0.085$

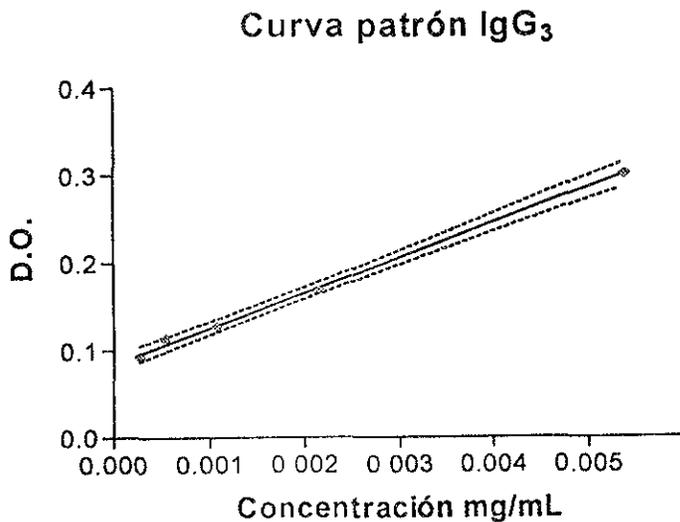


Figura 9. Gráfica de la curva patrón de IgG₃ anti-*S. aureus*

Procesamiento de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron las pruebas de t-student para comparar los datos de la inmunoglobulinas. Las pruebas se aplicaron para datos pareados para poder analizar el efecto del tratamiento aplicado.

Los cálculos estadísticos se realizaron en el programa computacional GraphPad Prism.

Para medir objetivamente el aumento de los niveles séricos de anticuerpos se calculó el incremento relativo que es igual a la diferencia entre la última muestra (semana 15) y la muestra basal (semana 0):

$$\text{Incremento relativo} = \text{Semana 15} / \text{Semana 0}$$

Para aquellos casos en donde los valores de anticuerpos de todas las muestras fue igual a cero, se asignó el valor de 1 al incremento ya que este valor representa que no hay cambios, y para los casos donde la muestra basal fue igual a cero pero la muestra de la semana 15 registraba un valor positivo de anticuerpos, el incremento considerado fue el valor numérico de la muestra 15.

4.5. RESULTADOS

ELABORACIÓN DE LA VACUNA BACTERIANA

Una vez que se confirmó la esterilidad y pureza de la suspensión (cuadros 13 y 14) se contabilizó la cantidad de bacterias por mililitro, resultando ser de 18 571 millones de bacterias por mililitro (concentrado de bacteria). A partir de este concentrado se prepararon las diluciones de 1200 millones de bacterias por mililitro en viales de 50 mL. A cada frasco se les adicionó 3.23 mL del concentrado más 46.77 mL de solución diluyente.

Cuadro 13. Pruebas de control de proceso de la vacuna bacteriana de *S. aureus*.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Agar de sal y manitol	Colonias cremosas, grandes, circulares con pigmentación amarilla que viran el indicador del medio
Catalasa	Positiva
Coagulasa	Positiva

Cuadro 14. Pruebas de esterilidad y pureza de la vacuna de *S. aureus*.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	Cocos Gram (+) agrupados en racimos
Agar de sal y manitol	No hay crecimiento
Agar nutritivo	No hay crecimiento

EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

El número de pacientes seleccionados para el exudado faríngeo fue de 39, de los cuales sólo 16 resultaron positivos a *S.aureus* (41.02 %): en tanto que 23 pacientes no tenían *S. aureus* (cuadro 15), estos últimos no se incluyeron en el estudio y se canalizaron al servicio de otorrinolaringología.

Cuadro 15. Identificación de *S. aureus* en pacientes con faringitis o faringoamigdalitis crónica o recurrente.

Clave del paciente	Edad (años)	Sexo	<i>S. aureus</i>
1. P1	42	M	+
2. P2	17	F	+
3. P3	42	F	+
4. P4	22	F	+
5. P5	24	M	+
6. P6	48	M	+
7. P7	36	M	-
8. P8	24	M	-
9. P9	21	F	-
10. P10	21	F	+
11. P11	21	F	+
12. P12	15	M	+
13. P13	30	F	-
14. P14	41	F	+
15. P15	31	F	-
16. P16	17	F	+
17. P17	39	F	-
18. P18	20	F	-
19. P19	28	M	+
20. P20	22	F	-
21. P21	37	M	-
22. P22	66	F	+
23. P23	42	F	-
24. P24	32	F	-
25. P25	24	F	-
26. P26	24	F	-
27. P27	18	M	+
28. P28	46	M	+
29. P29	19	F	-
30. P30	25	F	-
31. P31	48	F	-
32. P32	31	M	-
33. P33	41	F	-
34. P34	22	F	-
35. P35	18	F	-
36. P36	29	M	-
37. P37	20	M	-
38. P38	20	M	+
39. P39	33	F	-

F= femenino; M= masculino

SELECCIÓN DE PACIENTES

Finalmente se seleccionaron 13 pacientes de los 16 positivos a *S. aureus*. La conformación de este grupo fue la siguiente: 7 hombres (53.84%) y 6 mujeres (46.16%). Los pacientes seleccionados fueron: P1, P2, P4, P5, P6, P10, P11, P12, P14, P16, P19, P27 y P28.

En el grupo testigo negativo la proporción de hombres y mujeres fue la misma que en el grupo de pacientes. Se encontró que la cantidad de individuos positivos a *S. aureus* fue de 3 (23.07%), menos de la mitad que en el grupo de pacientes (cuadro 16)

Cuadro 16. Grupo de pacientes testigo negativos

clave	Edad (años)	Sexo	<i>S.aureus</i>
C1	36	M	-
C2	33	M	+
C3	28	M	-
C4	26	F	-
C5	25	M	-
C6	41	F	-
C7	36	M	-
C8	36	M	-
C9	24	F	-
C10	24	F	-
C11	25	F	+
C12	24	M	+
C13	36	F	-

F= femenino; M= masculino

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Al inicio del tratamiento el 100% de los pacientes fue positivo al *S.aureus*, al finalizar el tratamiento 7 de 13 pacientes (53.84%) no se les detectó *S.aureus* al practicarles el exudado faríngeo.

Cuadro 17. Identificación de *S. aureus* antes y después de la aplicación de la vacuna.

Paciente	A.T (Semana 0)	D.T. (Semana 15)
P1	---	-
P2	-	+
P4	+	-
P5	---	+
P6	---	-
P10	-	+
P11	+	-
P12	---	+
P14	---	-
P16	---	+
P19	+	+
P27	-	-
P28	---	-
TOTAL	13 (100 %)	6 (53.84 %)

A.T. Antes del tratamiento; D.T. Después del tratamiento

INMUNIDAD CELULAR

Los pacientes se sometieron a pruebas intradérmicas para evaluar su inmunidad celular hacia diferentes antígenos (dentro de los cuales estaba incluida la vacuna de *S. aureus* Cowan 1), antes y después del tratamiento, no se observaron diferencias significativas en las respuestas celulares hacia los antígenos aplicados al comparar los datos por una prueba de t-student pareada (cuadro 18).

Cuadro 18 Pruebas intradérmicas.

Paciente	PPD (mm ²)		TT (mm ²)		VAR (mm ²)		CAN (mm ²)		VB (mm ²)	
	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT	AT	DT
P1	144	320	306	500	0	550	240	400	42	90
P2	90	0	575	1680	710	2090	156	675	72	0
P4	42	99	195	132	252	864	696	285	0	48
P5	64	130	285	440	1184	960	132	140	56	64
P6	110	0	156	300	25	360	330	260	12	72
P10	110	72	450	143	0	0	81	0	25	0
P11	88	0	660	240	216	400	108	120	72	0
P12	0	0	342	500	0	42	400	224	0	0
P14	0	25	NA	NA	110	4550	195	195	36	100
P16	156	144	280	160	0	0	0	0	0	81
P19	156	NA	56	NA	342	NA	72	NA	0	NA
P27	0	0	1960	225	255	169	169	550	0	0
P28	0	0	391	180	270	675	169	400	36	36
Promedio	73.85	65.83	471.3	409.1	412.6	888.3	211.4	270.8	27.00	40.92
DS	60.84	97.06	498.5	443.8	556.1	1291	180.4	206.6	27.62	39.83
t-student	p > 0.05		p > 0.05		p > 0.05		p > 0.05		p > 0.05	
Diferencia.	NS		NS		NS		NS		NS	

AT= antes del tratamiento; DT= después del tratamiento, DS= desviación estándar; PPD= dializado de proteína purificada; TT= toxoide tetánico, VAR= vaudasa. CAN= candidina; VB= vacuna bacteriana de *S. aureus*; NA= no aplicada.

INMUNOGLOBULINAS TOTALES

Las inmunoglobulinas que se midieron fueron IgA, IgG e IgM totales. Los niveles de inmunoglobulinas totales en el grupo testigo no cambian con el tiempo, mientras que en el grupo de pacientes existe un aumento significativo en IgG ($p < 0.01$), pero no en IgM e IgA. Este aumento en los niveles de IgG está provocado por la aplicación de la vacuna bacteriana, ya que en el grupo testigo negativo, el cual no recibe ningún tratamiento inmunológico, no presenta cambios en los niveles de IgG. Los resultados obtenidos se ilustran en los cuadros 19, 20 y la figura 10.

Para IgA los individuos C7 y C8 del grupo testigo presentaron valores superiores, para IgM C3 y C4 tienen valores aumentados, mientras que C8 tiene un valor ligeramente menor del rango de normalidad, pero es tan pequeña la diferencia que puede considerarse un valor normal. Para IgG todos los valores individuales están dentro del rango de normalidad. Las posibles causas de los aumentos no puede ser la presencia de una infección, ni de una inmunización por que los individuos seleccionados no refirieron ninguna de las dos situaciones, por lo tanto la explicación más adecuada es la variación genética individual, esto se confirma por que al cabo de 15 semanas, tiempo suficiente para observar cambios inmunológicos provocados por una infección activa o inmunización, los valores séricos de IgM e IgA para todos los casos mencionados se mantienen constantes. Para el grupo de pacientes los niveles promedios de inmunoglobulinas totales IgA, IgG e IgM séricos antes del tratamiento (semana 0) están dentro de la normalidad, dentro de los valores individuales sólo para IgM hay un paciente (P16) con valor aumentado, pero este aumento obedece a la misma causa que los encontrados en el grupo testigo.

Cuadro 19. Inmunoglobulinas totales del grupo testigo negativo.

Individuo	IgA mg/dL		IgG mg/dL		IgM mg/dL	
	Semana 0.	Semana 15	Semana 0.	Semana 15	Semana 0.	Semana 15
C1	205	244	1029	1164	98.8	155
C2	176	169	1290	1125	140	125
C3	302	283	1569	1509	304	313
C4	198	224	437	1191	236	233
C5	295	292	1534	1514	147	141
C6	255	259	1625	1523	133	130
C7	496	475	1259	1296	122	114
C8	452	469	1122	1163	30.8	36.8
C9	223	201	1445	1521	145	150
C10	201	213	1373	1348	113	107
C11	180	199	1468	1669	264	270
C12	189	214	1565	1777	62.8	73.5
C13	274	283	1243	1252	219	205
Promedio	265.1	271.20	1381.40	1388.60	155.03	157.90
D.S.	102.3	96.49	182.16	210.95	79.34	77.99
Diferencia	p>0.05 (ns)		p>0.05 (ns)		p>0.05 (ns)	

D.S. desviación estándar; ns. no significativa.

Valores normales para cada inmunoglobulina en mg/dL ^{38,51,55,59} IgA = 87 - 350; IgM = 47 - 211; IgG= 608-1716

Cuadro 20. Inmunoglobulinas totales de los pacientes

Individuo	IgA mg/dL		IgG mg/dL		IgM mg/dL	
	A.T.	D.T.	A.T.	D.T.	A.T.	D.T.
P1	289	304	1166	1321	133	129
P2	204	207	1222	1219	153	141
P4	280	316	1284	1385	192	223
P5	210	204	1424	1456	216	214
P6	314	327	998	1003	72	75
P10	266	265	1055	1168	177	171
P11	148	210	891	1313	91.8	130
P12	122	178	969	1346	59.3	76.7
P14	153	159	1477	1591	146	157
P16	313	446	1201	1638	232	286
P19	226	230	1272	1424	77.3	86.7
P27	107	83.1	1256	1169	78.2	61.7
P28	221	227	1769	1961	89.5	85.1
Promedio	219.50	242.80	1230.0	1384.0	132.10	141.20
D.S.	70.94	90.82	235.8	245.4	58.82	67.92
Diferencia	p>0.05 (ns)		p= 0.0056 (s)		p>0.05 (ns)	

D.S. desviación estándar; s. significativa

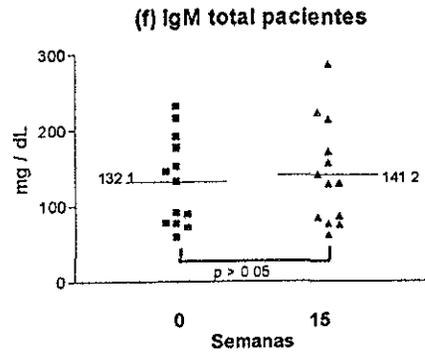
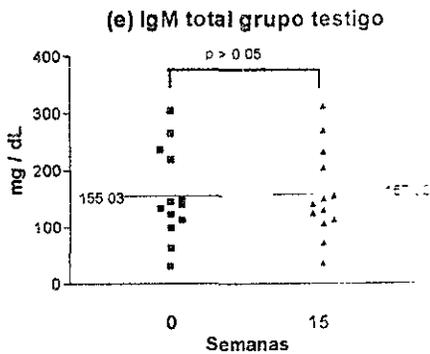
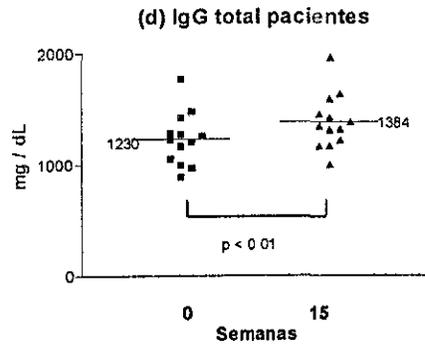
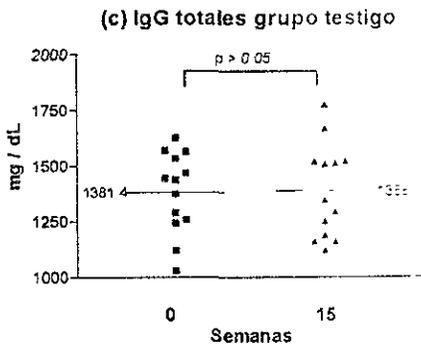
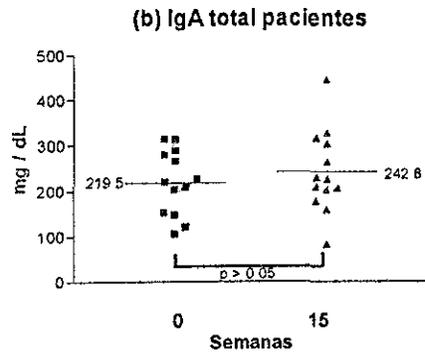
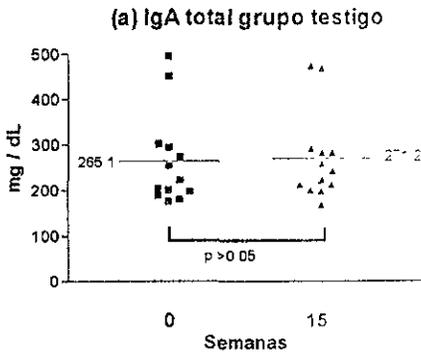


Figura 10. Valores de inmunoglobulinas totales (a) y (b) IgA sérica total en los grupos testigo y de pacientes; (c) y (d) IgG sérica total en los grupos testigo y de pacientes; (e) y (f) IgM sérica total en los grupos testigo y de pacientes respectivamente

DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-S.AUREUS COWAN I.

Anticuerpos IgA

Los valores en miligramos por decilitro para IgA de los testigos y pacientes se muestran en la cuadros 21 y 22 respectivamente. En el grupo testigo negativo existen 3 individuos (23 %) que no reconocieron con IgA a los antígenos de *S aureus* a pesar de presentar niveles normales de IgA total; y 10 que lo reconocieron (77%), los valores de anticuerpos IgA anti-*S aureus* no varían con el tiempo. La figura 11 y 12 ilustran el comportamiento de ambos grupos

Cuadro 21. Valores de IgA anti-*S aureus* del grupo testigo negativo.

Individuo	Semana 0 (miligramos por decilitro)	Semana 15 (miligramos por decilitro)	Incremento relativo semana 15 / semana 0
C1	0.00000	0 00000	1.000
C2	4.70200	5 58200	1.186
C3	0.38400	0.20500	0.533
C4	10 81000	5 61600	0.519
C5	0 00000	0 00000	1.000
C6	3.04400	5 12300	1.682
C7	0.00000	0.00000	1.000
C8	19.9100	18 0000	0.904
C9	9.28000	11.7100	1.261
C10	0.74440	0 63100	0.847
C11	0.64660	0 73530	1.137
C12	1 10160	1 05540	0.958
C13	0.63480	0 63100	0.994
Promedio	3.942	3.791	1.001
Desviación estándar	5 99	5 52	0.298
t- student	p > 0 05 (no significativa)		

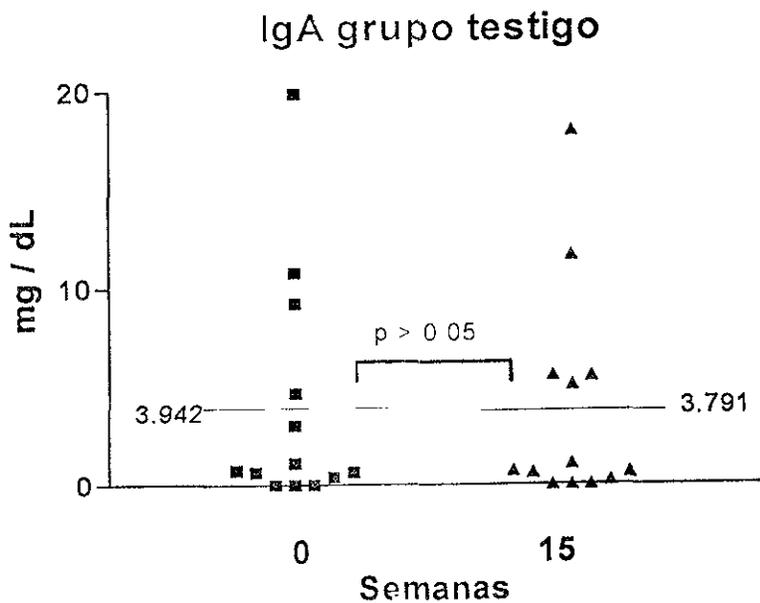


Figura 11. Niveles de anticuerpos IgA anti-*S. aureus* en el grupo testigo, no se observan diferencias significativas entre la muestra basal y la muestra de la semana 15 ($p > 0.05$ no significativo).

Para el grupo de pacientes el 100% reconoció con IgA al *S. aureus*. Cuando se analizó este reconocimiento por una prueba de t-student pareada, no se encontraron cambios en los niveles de anticuerpos IgA anti-*S. aureus*, sólo se detectó un incremento promedio de aproximadamente 2 veces, esto quizá se deba a que sólo 4 pacientes presentaron cambios en sus niveles de anticuerpos IgA anti- *S. aureus*, en tanto que los demás pacientes no.

Cuadro 22. Valores de IgA anti-*S.aureus* para los pacientes.

Paciente	Semana 0(mg/dL)	Semana 5(mg/dL)	Semana 10(mg/dL)	Semana 15(mg/dL)	Incremento relativo semana 15 / semana 0
P1	0.4120	1.14990	0.77230	2.1740	5.276
P2	1.1150	2.20000	6.27100	3.8890	3.487
P4	2.8810	3.33700	2.64400	4.8490	1.683
P5	0.0037	0.00650	0.00410	0.0042	1.135
P6	0.1923	0.29520	0.14690	0.2383	1.239
P10	0.9569	1.08820	0.35260	0.9746	1.018
P11	0.4702	0.50300	0.67490	0.7220	1.535
P12	1.1499	0.99880	1.30770	0.8518	0.740
P14	0.0744	0.24870	0.43430	0.3082	4.142
P16	0.0379	0.06540	0.05150	0.0430	1.134
P19	0.6580	0.62700	0.40800	0.7580	1.151
P27	0.0002	0.00020	0.00018	0.0003	1.500
P28	0.4790	1.25280	1.24520	1.1289	2.356
Promedio	0.648	0.905	1.101	1.226	2.030
DS	0.785	0.965	1.717	1.528	1.401
t-student	p > 0.05 no hay diferencias entre los valores de cada toma				

DS desviación estándar.

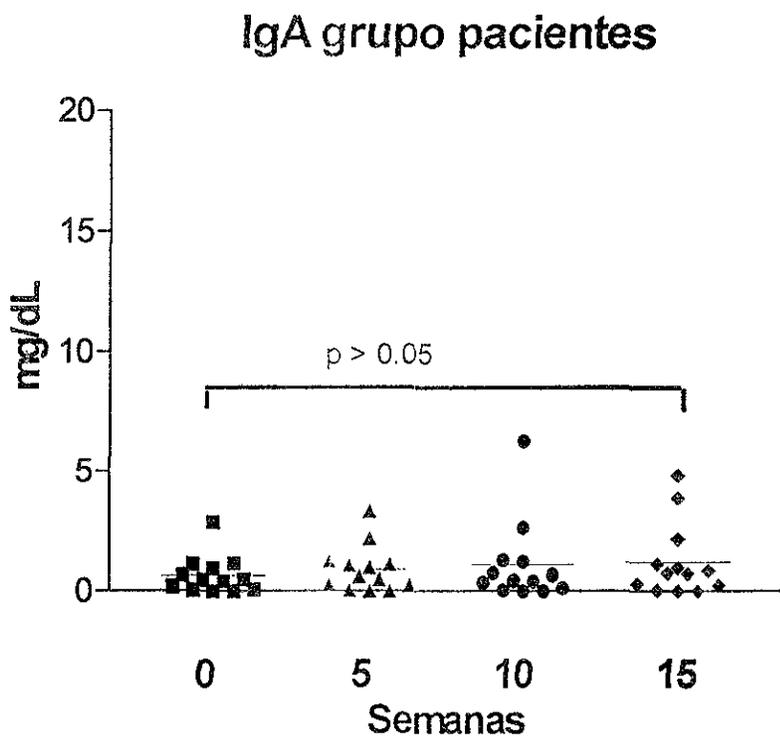


Figura 12. Comparación de los niveles de anticuerpos IgA anti-*S aureus* del grupo de pacientes durante el tratamiento. No se observan cambios significativos ($p > 0.05$) entre las diferentes muestras comparadas.

Anticuerpos IgG

Los anticuerpos IgG anti-*S. aureus* que se midieron, fueron las 4 subclases séricas (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄), a continuación se ilustran los valores obtenidos de cada una en los diferentes individuos de ambos grupos de estudio.

Anticuerpos IgG₁

Cuadro 23. Valores de IgG₁ anti-*S. aureus* en el grupo testigo.

Individuo	Semana 0 (mg/dL)	Semana 15 (mg/dL)	Incremento relativo semana 15 / semana 0
C1	3 2340	2.4190	0.747
C2	0 6257	0 2500	0.399
C3	13.9020	17 5130	1.259
C4	5.7810	2.1630	0.374
C5	96.0810	101.9500	1.061
C6	60 5400	40 4800	0.668
C7	1.9720	2.8530	1.446
C8	5 8570	3.6180	0.617
C9	0 0000	0 0000	1.000
C10	74 7700	154 5000	2.066
C11	33 2100	31 0900	0.936
C12	12 6700	3.2340	0.255
C13	9 3570	8 0930	0.864
Promedio	24 46	28 32	0.899
DS	32 06	47.30	0.493
t-student	p > 0 05 (diferencia no significativa)		

DS= desviación estándar

IgG₁ grupo testigo

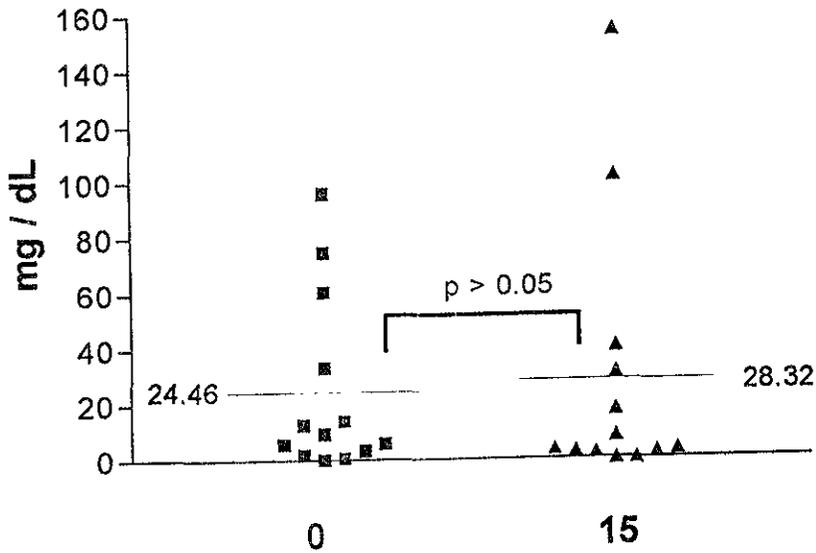


Figura 13. Niveles de anticuerpos IgG₁ anti-*S. aureus* en el grupo testigo, no hay cambios significativos entre las dos grupos de muestras ($p > 0.05$ no significativo)

Los niveles de IgG₁ anti-*S.aureus* de las diferentes muestras de los pacientes se compararon estadísticamente para determinar si existían diferencias significativas y posteriormente se determinó a partir de que muestra se presentó la diferencia (cuadro 24)

Cuadro 24. Valores de IgG₁ anti-*S.aureus* en el grupo de pacientes.

Paciente	Semana 0 (mg/dL)	Semana 5 (mg/dL)	Semana 10 (mg/dL)	Semana 15 (mg/dL)	Incremento relativo semana 15 /semana 0
P1	4.41090	6 01440	12 26460	38.91230	8.821
P2	9.29600	11 78000	75 26000	84.20000	9.057
P4	0 57050	5.48360	1 52400	7.42800	13.020
P5	0.92350	1 04680	1.16340	1.28440	1.390
P6	9.11400	12 02400	44.99000	65.10000	7.142
P10	3.89100	6 17500	6 86200	23.56700	6.056
P11	0.23700	0 16600	0 30480	1.35400	5.713
P12	0.36600	0 77700	0 60900	0.42110	1.150
P14	0.62570	0 89940	1.56550	1.49490	2.389
P16	0.60540	4 61900	5 89600	3.09000	5.104
P19	2.34100	11 55000	28.53000	52.36000	22.366
P27	3.25600	3 81400	6 51000	4.83700	1.485
P28	1.71700	4 90200	10 74800	9.93000	5.783
Promedio	2.87338	5 32650	15 09440	22.61374	6.882
DS	3.134	4 230	22 242	28.406	5.800
t-student	p < 0.01 (diferencia significativa a partir de la semana 5)				

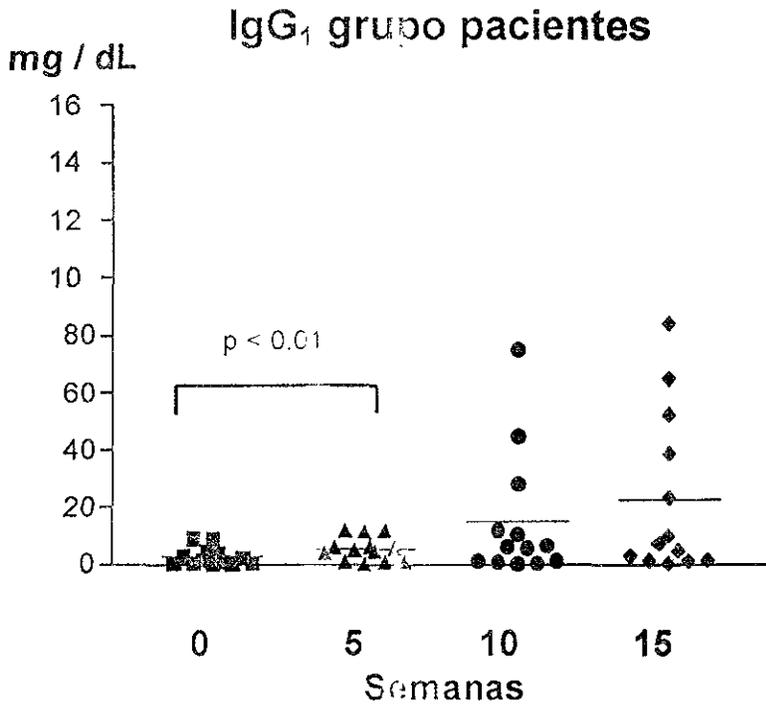


Figura 14.- Comparación de la concentración de IgG₁ -anti-*S aureus* en el grupo de pacientes. Se presentan cambios significativos durante el tratamiento entre la muestra basal y la muestra de la semana 5 ($p < 0.01$).

Anticuerpos IgG₂

Los anticuerpos IgG₂ anti- *S. aureus* del grupo testigo no sufren alteraciones durante el tiempo de estudio (cuadro 25), mientras que en los niveles de estos anticuerpos en los pacientes tratados con vacuna existe un aumento significativo ($p < 0.01$) a partir de la semana 10, el incremento al final del tratamiento fue de aproximadamente 13 veces (cuadro 26)

Cuadro 25. Valores de IgG₂ anti-*S. aureus* en el grupo testigo

Individuo	Semana 0 (mg/dL)	Semana 15 (mg/dL)	Incremento relativo semana 15 / semana 0
C1	0.0000	0.0000	1.000
C2	36.7600	20.3800	0.554
C3	4.6310	0.0630	0.013
C4	0.0000	0.0000	1.000
C5	0.0000	0.0000	1.000
C6	0.0000	0.0000	1.000
C7	0.0000	0.0000	1.000
C8	0.0000	0.0000	1.000
C9	21.3290	32.6210	1.529
C10	10.1490	3.8430	0.378
C11	0.0000	0.0000	1.000
C12	0.0000	0.2205	0.220
C13	6.4910	0.0000	0.000
Promedio	6.1046	4.3944	0.745
DS	11.136	10.178	0.466
t-student	$p > 0.05$ (diferencia no significativa)		

IgG₂ grupo testigo

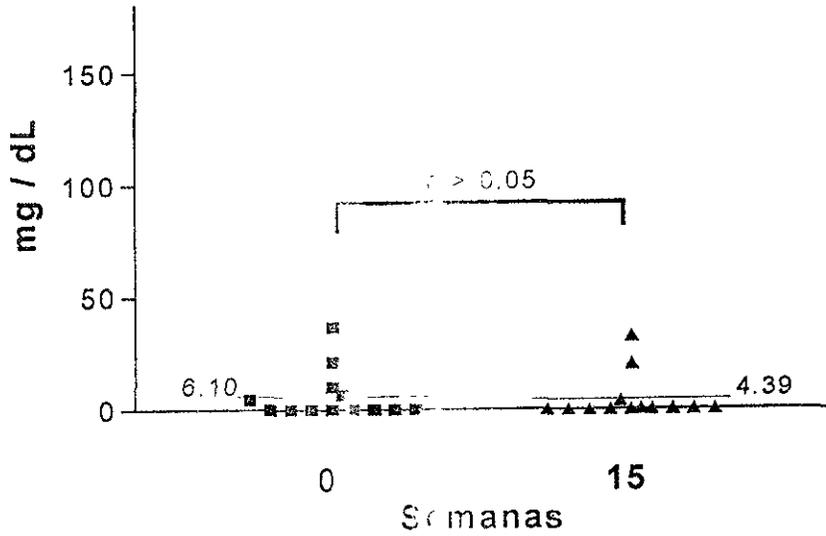


Figura 15. En el grupo testigo negativo no hay cambios en los niveles de IgG₂ anti - *S. aureus* (p > 0.05 no significativo)

Cuadro 26 - Valores de IgG₂ anti-*S aureus* en el grupo de pacientes.

Paciente	Semana 0 (mg/dL)	Semana 5 (mg/dL)	Semana 10 (mg/dL)	Semana 15 (mg/dL)	Incremento relativo semana 15 /semana 0
P1	0.0000	14 1750	33 080	31.030	31.030
P2	0 0000	25 0470	54 190	40 012	40.012
P4	0.0000	6 4580	6.143	4.883	4.883
P5	0.0000	0.0000	0 000	0.000	1.000
P6	0.0000	0 0000	0.000	34.814	34.814
P10	52.2990	68.0520	72 621	78.922	1.509
P11	17.8600	18 4900	25 740	23.219	1.300
P12	0 0000	14 9650	17 800	27 410	27.410
P14	60.0800	45 2740	108.916	87.920	1.463
P16	0.0000	0 0000	0.000	0.000	1.000
P19	1.1020	6 1370	12 602	20.663	18.750
P27	5.3560	8 9790	27 410	45.053	8.411
P28	15.4370	50 0940	51 197	37.177	2.408
Promedio	11.702	19 820	31.515	33.161	13.380
DS	20.719	21 673	32 664	26.757	14.880
t-student	p < 0 01 (Diferencia significativa a partir de la semana 10)				

Anticuerpos IgG₃

A partir de la curva patrón se calcularon los miligramos de IgG₃ anti-*S.aureus* para los grupos testigo negativo y de pacientes, no se observaron cambios significativos en ambos grupos, aunque los pacientes P16 y P 19 tienen incrementos finales de aproximadamente 16 y 3 veces en comparación con los niveles basales (Cuadro 27 y 28).

Cuadro 27. Miligramos de IgG₃ anti-*S. aureus* en el grupo testigo negativo.

Individuo	Semana 0 (mg/dL)	Semana 15 (mg/dL)	Incremento relativo semana 15 / semana 0
C1	0 0000	0.0000	1.000
C2	8 7390	5 4930	0.628
C3	0 0000	0 0000	1.000
C4	0 0000	0.0000	1.000
C5	0 0000	0.0000	1 000
C6	0 0000	0.7490	0.749
C7	1.1120	2.1220	1 908
C8	0 0000	0.0000	1.000
C9	1 9970	0.0000	0 000
C10	2.3720	0.0000	0.000
C11	0 0000	0.0000	1.000
C12	0 0000	0 0000	1 000
C13	0 0000	0.0000	1.000
Promedio	1 0938	0.6433	0.868
DS	2 4430	1.5770	0 483
t-student	p > 0 05 (diferencia no significativa)		

Cuadro 28. Miligramos de IgG₃ anti-*S aureus* en el grupo de pacientes.

Paciente	Semana 0 (mg/dL)	Semana 5 (mg/dL)	Semana 10 (mg/dL)	Semana 15 (mg/dL)	Incremento relativo semana 15 / semana 0
P1	0.0000	0 0000	0.0000	0.0000	1.000
P2	0.0000	0 0000	2 7460	0 1240	0.124
P4	0 0000	0 0000	0 0000	0.0000	1.000
P5	0.0000	0 0000	0 0000	0.0000	1.000
P6	10 6100	6 9910	0 0000	0 0000	0.000
P10	0.0000	0 0000	0 0000	0.0000	1 000
P11	0.0000	0 0000	3.9950	0.0000	1.000
P12	0.0000	0.0000	0 0000	0 0000	1.000
P14	15 8550	10 8610	10 8610	15.6050	0.984
P16	0.0000	18 6010	11 9850	16.1040	16.104
P19	5.7420	7 7400	8.6140	20 5990	3.587
P27	122.5900	148 5600	141 0700	162 1720	1.322
P28	0.0000	0.0000	0 0000	0.9980	0.998
Promedio	11.907	14 827	13.790	16.584	2 239
DS	33.642	40.604	38.500	44 396	4.249
t-student	p > 0.05 (no hay diferencia significativa entre las 4 muestras)				

IgG₃ grupo testigo

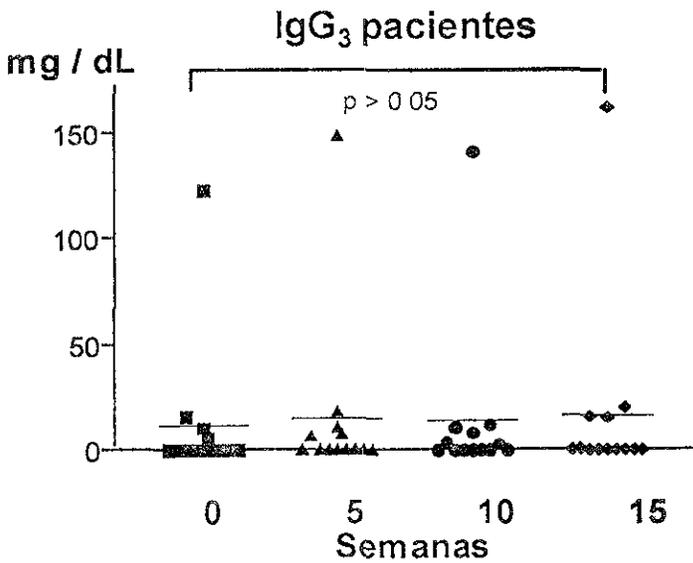
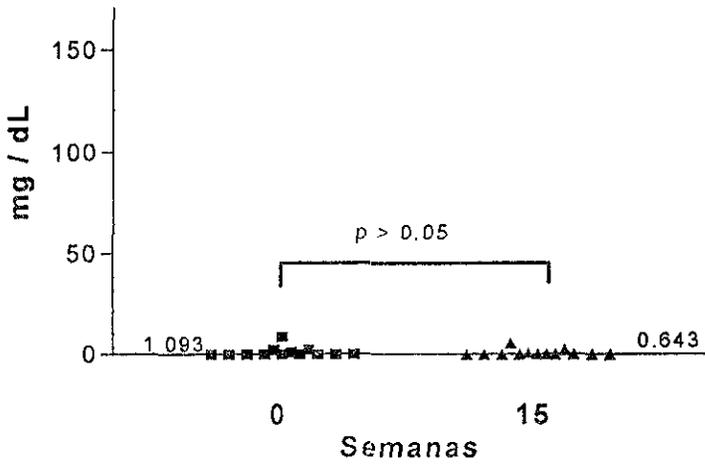


Figura 17. Comparación gráfica de los valores de IgG₃ anti- *S. aureus* entre el grupo testigo negativo y el grupo de pacientes, en ambos grupos no hay diferencias significativas en las diferentes muestras ($p > 0.05$ no significativo).

Anticuerpos IgG₄

Para el caso de IgG₄ anti-*S. aureus*, el suero control positivo utilizado no presentó reconocimiento para *S. aureus*, debido a esto los valores de IgG₄ anti-*S. aureus* tanto para el grupo testigo como para el grupo de pacientes se reportan sólo en densidad óptica (Figura 18).

En todos los pacientes del grupo testigo (100%), el valor de D.O. para IgG₄ fue cero (dato no ilustrado). Para el grupo de pacientes sólo el 23.07% presentó reconocimiento de IgG₄ hacia *S. aureus* (cuadro 29), el 76.93% restante fue negativo

Cuadro 29. Valores de D.O. de IgG₄ anti-*S. aureus* en los pacientes

Paciente	Semana 0 (D.O.)	Semana 5 (D.O.)	Semana 10 (D.O.)	Semana 15 (D.O.)	Incremento relativo semana 15/ semana 0
P1	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P2	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P4	0.214	0.245	0.177	0.239	1.116
P5	0.221	0.260	0.254	0.209	0.945
P6	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P10	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P11	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P12	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P14	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P16	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P19	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P27	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
P28	0.655	0.574	0.581	0.546	0.833
Promedio	0.0668	0.083	0.0778	0.0764	0.991
DS	0.186	0.175	0.171	0.164	0.060
t-student	p > 0.05 (no hay diferencia significativa entre las muestras)				

Análisis individual de los pacientes al final del tratamiento

Terminada la inmunización los pacientes fueron evaluados clínicamente durante un año para determinar los efectos que tuvo la inmunización. Ocho pacientes (P1, P6, P11, P12, P14, P16, P27 Y P28) no refirieron ningún episodio de faringitis infecciosa. 3 pacientes (P4, P5 y P10) presentaron de 2 a 3 episodios con duración de 3 - 5 días cada episodio.

Cuadro 30. Resultados finales del grupo de pacientes

Paciente	Incremento de anticuerpos anti- <i>S. aureus</i>					<i>S. aureus</i>	TIEMPO DE PADECER LA ENFERMEDAD (AÑOS)	FUMADOR	Episodios en un año
	IgA	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄				
P1	5.276	8.821	31.030	1.000	1.000	-	2	No	0
P2	3.487	9.057	40.012	0.124	1.000	+	10	No	*
P4	1.683	13.020	4.883	1.000	1.116	-	10	No	3
P5	1.135	1.390	1.000	1.000	0.945	+	10	No	3
P6	1.239	7.142	34.814	0.000	1.000	-	1	Si	0
P10	1.018	6.056	1.509	1.000	1.000	+	5	No	2
P11	1.535	5.713	1.300	1.000	1.000	-	6	No	0
P12	0.740	1.150	27.410	1.000	1.000	+	7	No	0
P14	4.142	2.389	1.463	0.984	1.000	-	3	No	0
P16	1.134	5.104	1.000	16.164	1.000	+	3	No	0
P19	1.151	22.366	18.750	3.587	1.000	+	1	Si	*
P27	1.500	1.485	8.411	1.322	1.000	-	3	No	0
P28	2.356	5.783	2.408	0.998	0.833	-	3	No	0

* Pacientes con los cuales se perdió el contacto después de terminado el tratamiento.

4.6. DISCUSIÓN

Anteriormente el control de las enfermedades bacterianas estaba orientado hacia la terapéutica, pero la aparición de cepas antibiótico resistentes y la falta de antibióticos que sean eficaces y no tóxicos han comenzado a inclinar la balanza hacia el desarrollo de vacunas⁵⁵ Para las infecciones provocadas por *S. aureus* el uso indiscriminado de los antibióticos ha provocado la aparición de cepas multi-resistentes que son muy difíciles de erradicar, el tratamiento quimioterapéutico debe ser muy intenso puesto que la resistencia al medicamento puede aparecer con gran rapidez¹⁹.

Un tratamiento alternativo puede ser la inmunización a través de la aplicación de vacunas bacterianas que prevengan las infecciones y a su vez eliminen a los microorganismos. Aunque existen algunas limitantes como es el caso del uso del *Streptococco* β -hemolítico del grupo A, que es el agente causal de la faringitis recurrente, el utilizar la bacteria completa como inmunógeno no es recomendable por su relación con enfermedades autoinmunes como la fiebre reumática⁵⁰. En este estudio se analizaron los efectos inmunológicos de una vacuna bacteriana de *S. aureus* cepa Cowan 1 aplicada a pacientes con faringitis recurrente asociada a *S. aureus*.

Las vacunas para prevenir las infecciones causadas por *S. aureus* se han utilizado primordialmente en animales, en las vacas la mastitis es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas por lo que se han desarrollado diversas vacunas. Estas vacunas están hechas a base de bacteria completa muerta por calor, por polisacáridos capsulares unidos a proteínas o una combinación de *S. aureus* microencapsulado con adyuvantes^{3,8,63}. La vacuna utilizada en el presente estudio contiene a la bacteria completa muerta por calor a 121 °C por 1 minuto, la cepa utilizada fue *S. aureus* Cowan 1 (ATCC 12598), caracterizada por producir altas cantidades de proteína A¹⁴. La inactivación se realizó en el menor tiempo posible para evitar la alteración de los antígenos; las condiciones de inactivación utilizadas fueron suficientes para matar a la bacteria (cuadro 14). Una vez confirmada la esterilidad de la vacuna se aplicó a pacientes con faringitis recurrente con presencia de *S. aureus* en faringe para evaluar su efecto biológico.

En el presente estudio se encontró que la frecuencia de *S.aureus* en los pacientes con faringitis recurrente fue de 41 %, en tanto que en los individuos sanos sólo el 23 % es portador de *S. aureus*, esto es lo esperado por que el *S. aureus* es considerado un microorganismo oportunista de las vías respiratorias, que coloniza fácilmente cuando existe de por medio otra infección viral o bacteriana³⁸ y en los pacientes con faringitis recurrente está de por medio la infección causada por *Streptococcus* β -hemolítico y las infecciones virales^{7,62}. La proporción de hombres y mujeres en el grupo de pacientes con faringitis fue 50:50 es decir no existe relación con el sexo. El porcentaje de portadores sanos que se encontró (23%), coincide con el reportado en la literatura que es de 25%^{25,57}. En estos pacientes a pesar de estar colonizados por el *S. aureus* no se presentan infecciones frecuentes de las vías respiratorias, lo cual no es de extrañar ya que el *S. aureus* está reportado como un microorganismo que puede residir en nariz y garganta sin causar daño en algunos individuos con una apropiada respuesta inmunológica hacia esta bacteria²⁶.

Los efectos inmunológicos que se observaron después del tratamiento con la vacuna no reflejan cambios en la respuesta celular tipo IV (hipersensibilidad retardada), la cual fue evaluada por las pruebas intradérmicas; este fue un resultado esperado por que la respuesta celular de tipo IV está dirigida principalmente en contra de microorganismos intracelulares como los virus y las micobacterias^{59,51}. En general la mayoría de los pacientes responde adecuadamente a los antígenos inoculados, y sólo 3 de 13 pacientes (P10, P12 y P16) tienen una baja respuesta celular. Esto posiblemente se puede deber a que estos pacientes no hayan tenido previo contacto con el antígeno, lo cual es evidente sobre todo en P16 y P12 en donde la anergia es constante antes y después del tratamiento (cuadro 18)

Para el paciente P10 se observa una baja respuesta después del tratamiento, en este caso la anergia encontrada representa una disminución de la respuesta que no concuerda con la explicación para los casos anteriores, de tal forma que la causa puede ser explicada por diversos factores como el estrés, cambios hormonales, uso de medicamentos o procesos que comprometan el sistema inmunológico⁵⁹, creemos que la causa fue provocada por ambos o por alguno de los dos primeros factores ya que durante el estudio el paciente no refirió ninguna enfermedad ni uso de medicamentos.

En relación a la respuesta humoral se ha asociado la presencia de infecciones recurrentes de las vías respiratorias con inmunodeficiencias selectivas de anticuerpos, principalmente de la clase IgA e IgG^{32,54,59} Para el diagnóstico de estas inmunodeficiencias es necesario determinar los niveles séricos de IgA que deben ser menores a 5 mg/dL, para IgG los niveles séricos pueden ser normales, por ello es necesario determinar la concentración de cada subclase⁵⁹. En este estudio a los pacientes y a los individuos del grupo testigo se les determinaron los niveles séricos de inmunoglobulinas totales de las clases IgA, IgM e IgG para identificar la existencia de una deficiencia selectiva de anticuerpos. Al comparar los valores séricos de IgA, IgM e IgG de todos los individuos y de los pacientes con los valores normales reportados^{38,51,55,59}, no se encontraron inmunodeficiencias en ningún caso, sin embargo para IgG no se determinaron las concentraciones de cada subclase por ello no descartamos la posible existencia de una inmunodeficiencia de alguna de las subclases.

Por otro lado no existieron cambios significativos en los niveles séricos de inmunoglobulinas totales IgA, IgM e IgG en el grupo testigo durante el tiempo de estudio (cuadro 19), mientras que en el grupo de pacientes se presentó un aumento significativo en los niveles séricos de IgG totales. $p < 0.01$ (cuadro 20) En condiciones normales como ocurre con el grupo testigo no hay cambios significativos en los niveles de inmunoglobulinas, a menos que exista un proceso evidente de estimulación o inhibición del sistema inmunológico⁵⁹, y puesto que el grupo de pacientes, durante el tiempo de tratamiento, no estuvo sometido a ningún otro estímulo del sistema inmunológico que la aplicación de la vacuna estafilococal, dicho aumento en los niveles séricos de IgG fue provocado por la aplicación de la vacuna estafilococal. En contraste los niveles de IgA e IgM al igual que en el grupo testigo no sufrieron cambios durante el tiempo del tratamiento (cuadro 20) El hecho de que los valores de IgM no aumentaran es lógico porque el intervalo de muestreo de 15 semanas no permite observar cambios de una respuesta humoral primaria, debido a que esto ocurre dentro de las primeras semanas (7 a 25 días) posteriores a la primera inmunización y donde el anticuerpo predominante es la IgM^{12,51}

El incremento selectivo de anticuerpos IgG concuerda con lo referido en la bibliografía acerca de que la principal clase de anticuerpos que opsonizan al *S. aureus* son IgG³⁸. Además se pone de manifiesto que la respuesta obtenida al final del tratamiento (semana 15) es de tipo secundaria, porque como está reportado los anticuerpos de la clase IgG son los que predominan en una respuesta secundaria^{12,51}

Para los anticuerpos específicos hacia el *S. aureus* Cowan 1 se determinaron los niveles séricos de IgA, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ específicos para *S. aureus* Cowan 1. En el grupo testigo el 77% de los individuos reconoció al *S. aureus* Cowan 1 con IgA sérica, lo cual indica que han tenido previo contacto con la bacteria, en contraste el 23 % restante no lo reconoce. En el grupo de pacientes todos reconocieron al *S. aureus* Cowan 1 con IgA y no se encontraron cambios significativos ($p > 0.05$) en sus niveles séricos promedio, existe un incremento promedio de 2 veces al final del tratamiento (cuadro 22), posiblemente la vacuna estafilococal pueda causar un incremento mayor de IgA sérica a dosis más grandes que las utilizadas o a mayores tiempos de exposición.

Para determinar la importancia que tiene los anticuerpos de la clase IgA en suero en la respuesta inmunológica hacia el *S. aureus* comparamos los niveles de IgA anti- *S. aureus* Cowan 1 de los individuos del grupo testigo con los pacientes (dato no ilustrado), y encontramos que no hay diferencia significativa, es decir que la recidiva de la faringitis no está relacionada con los niveles séricos de IgA. Esto sugiere que la IgA de importancia en la respuesta hacia *S. aureus* en la infección respiratoria es la que se produce localmente en la mucosa⁴².

Como se mencionó anteriormente los anticuerpos de la clase IgG fueron los que aumentaron con la aplicación de la vacuna, además de ser los de mayor importancia en la respuesta humoral hacia *S. aureus*⁸. Para evaluar la importancia que tienen las diferentes subclases de IgG se han realizado diversos estudios en donde se han determinado cuales son las subclases de IgG que se producen en contra de los polisacáridos capsulares, y lo que se ha reportado es que las subclases 1 y 2 son las que se producen, siendo mayor la cantidad de IgG₂ y que además tienen mayor duración^{3,63}. En nuestro estudio evaluamos la importancia de las diferentes subclases de

IgG hacia los antígenos de superficie del *S. aureus* Cowan 1 a través de la comparación en sus niveles séricos. Encontramos que los anticuerpos IgG₁ e IgG₂ tuvieron un aumento de aproximadamente 7 y 13 veces respectivamente al final del tratamiento en los pacientes (cuadros 24 y 26), mientras que para IgG₃ e IgG₄ no hay cambios con el tratamiento (cuadros 28 y 29). La IgG₂ aumenta aproximadamente el doble que la IgG₁, estos resultados son acordes a los reportados para los polisacáridos capsulares de *S. aureus*. En cuanto a valores absolutos, son también los anticuerpos IgG₂ los que se encuentran en mayor cantidad tanto anterior como posterior al tratamiento. Para IgG₁ el aumento significativo de anticuerpos comienza en la semana 5 (cuadro 24), para IgG₂ el aumento significativo se observó a partir de la semana 10 (cuadro 26).

Estos resultados muestran primero que la IgG₂ es la clase más importante en el reconocimiento hacia *S. aureus*, y que su cinética de producción estimulada por la bacteria fue menos rápida que la de IgG₁. Lo anterior se confirma por que comparando los niveles de IgG₁ e IgG₂ anti- *S. aureus* Cowan 1 observamos que la IgG₂ se encuentra en mayor concentración (cuadros 24 y 26).

Por otro lado se observó que los pacientes reconocieron al *S. aureus* con IgG₁ en todos los casos. En cambio, para IgG₂ al inicio del tratamiento sólo 6 pacientes (46%) lo reconocen y al final del tratamiento son 11 los pacientes (85%) que lo reconocen con esta subclase, es decir que hubo un aumento del 40 % en el número de pacientes que reconocieron con IgG₂ a *S. aureus*.

Para determinar si hay relación entre las recidivas de la faringitis y los niveles séricos de las diferentes subclases de IgG anti- *S. aureus* Cowan 1, se comparó mediante una prueba t-student los niveles de cada subclase entre los pacientes y el grupo testigo en la semana cero (dato no ilustrado), y se encontró que sólo para IgG₁ anti- *S. aureus* Cowan 1 existió una diferencia significativa ($p < 0.05$), mientras que para IgG₂, IgG₃ e IgG₄ no se encontró entre ambos grupos ($p > 0.05$). Los pacientes tuvieron niveles más bajos de IgG₁ que los testigos antes del tratamiento (semana 0), en contraste en la semana 15 no existieron diferencias en los niveles séricos de IgG₁ entre ambos grupos, tomando en cuenta que después del tratamiento los pacientes tienen una marcada disminución en las recidivas de faringitis (cuadro 30), los resultados indican que las

recidivas de faringitis están estrictamente relacionadas con los niveles séricos de IgG₁ anti- *S. aureus* Cowan 1.

Para tener un panorama más completo acerca de los factores que predisponen a la faringitis recurrente comparamos conjuntamente todos los resultados para cada paciente (cuadro 30). Lo primero a señalar es que el número de pacientes (77%) que presentan un aumento de anticuerpos IgG₁ en contra de *S. aureus* Cowan 1 es el más alto, seguido de IgG₂ (62%) y posteriormente IgA e IgG₃. Por otro lado en todos los pacientes disminuyó el número de episodios de infección faríngea en un año posterior al tratamiento, siendo 8 los pacientes que no presentaron ningún episodio, tres pacientes presentaron de 2-3 episodios con una duración máxima de 5 días. Es importante resaltar que antes del tratamiento con la vacuna estafilococal todos los pacientes presentaron más de 3 episodios al año y cada episodio con duración de 10 a 15 días. Por lo tanto el aumento de anticuerpos, sobre todo de las subclases IgG₁ e IgG₂, inducido por la aplicación de la vacuna estafilococal fue capaz de reducir la frecuencia y por lo tanto las recidivas de la faringitis en los pacientes.

Otros factores a considerar es que a pesar de no presentar episodios de faringitis infecciosa el 47% de los pacientes continuaron siendo portadores de *S. aureus* en faringe. Esto se debió a que la presencia de *S. aureus* en la faringe está condicionada a varios factores como se observa en el cuadro 30, como son el hábito de fumar y la cronicidad de la faringitis.

Por lo descrito anteriormente pensamos que una buena opción para el tratamiento y prevención de la faringitis recurrente es el uso de la vacuna a base de *S. aureus* Cowan 1, y para garantizar la erradicación de la bacteria se recomienda administrar conjuntamente con la vacuna una terapia con un antibiótico al cual sea sensible la cepa de *S. aureus* de cada paciente.

Por otro lado, los resultados muestran que el aumento de anticuerpos se genera a partir de la semana 10 para IgG₂ y 15 para IgG₁, sin presentar cambios en la semana 5 para ninguno de los dos anticuerpos, esto coincide con la mejoría clínica observada, la cual se presentó entre esas semanas. Por lo anterior consideramos que el tratamiento debe comenzar con la dosis contenida en el frasco número 2 (240×10^6 bacterias / mL) sin riesgo de comenzar con una mayor dosis porque el uso de la vacuna durante el tratamiento no presentó problemas de hipersensibilidad u otra reacción adversa en ninguno de los pacientes. La única reacción secundaria que se observó fue una sensibilización al dolor en el sitio de aplicación

En resumen, se concluye que la faringitis recurrente asociada al *S. aureus* está relacionada con los bajos niveles séricos de anticuerpos IgG₁ anti-*S. aureus*; lo cual favorece las infecciones recurrentes, en cambio cuando se estimuló la producción de estos anticuerpos con la vacuna las recidivas disminuyeron marcadamente. Por otro lado los anticuerpos a nivel sistémico que más participan en el reconocimiento hacia *S. aureus* son las subclases IgG₁ e IgG₂. Los anticuerpos IgG₂ fueron los que más rápido y en mayor cantidad se produjeron, posiblemente inducidos por la presencia de polisacáridos capsulares en la bacteria.

4.7- CONCLUSIONES

- La producción de la vacuna fue sencilla y eficaz por que fue pura, estable en las condiciones de almacenamiento (4 °C), no se observaron efectos secundarios, produce un estado de inmunidad que disminuye la frecuencia de faringitis infecciosa, por lo tanto cumple con las tres características básicas de una vacuna: segura, efectiva y estable ^{42,59 67}.
- A través de las evaluaciones inmunológicas y microbiológicas durante el tratamiento se determinó que los cambios en los niveles de anticuerpos IgG indujeron una disminución del *S. aureus* en faringe en 53.84% de los pacientes.
- La técnica inmunoenzimática de ELISA propuesta y estandarizada en este estudio fue efectiva para detectar los anticuerpos anti-*S. aureus* a partir de muestras de sueros humanos. La técnica es específica porque permite diferenciar los sueros con anticuerpos anti-*S. aureus* de los sueros que carecen de estos anticuerpos. Además tiene una sensibilidad que permite detectar pequeñas cantidades de inmunoglobulinas séricas. A través del procedimiento planteado se elimina la variabilidad de la técnica y permite ser aplicada a cualquier antígeno utilizado para detectar anticuerpos humanos. Por lo tanto las ventajas de este procedimiento inmunoenzimático es que es específica, sensible, reproducible y aplicable a una gran variedad de ensayos para la detección de anticuerpos humanos.
- Mediante la técnica de ELISA, denominada ELISA-STAPH se observaron diferencias significativas en el reconocimiento humoral de los anticuerpos IgG₁, hacia *S. aureus* entre individuos normales y pacientes con faringitis recurrente asociada a *S. aureus*.
- Se logró inducir una respuesta humoral específica contra *S. aureus*, debido a que se detectaron aumentos significativos en los niveles de IgG₁ e IgG₂ anti-*S. aureus* Cowan 1. Se demostró que cuando existe un aumento en los niveles de estas subclases los episodios de faringitis así como su duración disminuyeron notablemente en los pacientes que recibieron la vacuna.

5. APÉNDICE

Los medios de cultivo se elaboraron de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes : DIBCO S.A. de C.V. y BIOXOM de México S.A

Reactivos:

Solución de Cristal violeta:

crystal violeta	2.0 g
alcohol etílico	20.0 mL
oxalato de amonio	0.8 g
agua destilada	100.0 mL

Lugol:

yoduro de potasio	2.0 g
yodo	1.0 g
agua destilada	100 mL

Decolorante para Gram:

etanol al 95%	50 mL
acetona	50 mL

Safranina:

safranina	0.5 g
agua destilada	100 mL

Solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6:

NaHCO ₃	5.6 g
Na ₂ CO ₃	3.5 g
agua bidestilada	1000 mL

Solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS), 0.01 M pH 7.4 :

KH ₂ PO ₄	0.544 g
K ₂ HPO ₄	1.040 g
NaCl	8.76 g
agua bidestilada	1000 mL

PBS con 0.05 % de Tween 20:

Tween 20	50 µL
PBS	100 mL

Solución de bloqueo:

Albúmina sérica bovina (Sigma)	2.0 g
PBS	100 mL

Solución amortiguadora de citratos 0.1 M pH 5.5:
citrate de sodio trisódico 2.9 g
ácido cítrico 0.41 g
agua bidestilada 100 mL

H₂SO₄ 2 Normal:
ácido sulfúrico puro 100 mL
agua destilada 800 mL

Solución de Evans: (pH = 7.0 +/- 0.2)
Na₂HPO₄ · 12 H₂O 1.72 g
KH₂PO₄ 0.363 g
NaCl 5.00 g
Fenol 4.00 g
Agua inyectable 1000 mL

REFERENCIAS

1. Aarestrup, F.; Scott, N. and Sordillo, L. (1994). Ability of *S. aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. *Infection and Immunity* 62: 5679-5682
2. Alcamo, E. (1991). *Fundamentals of microbiology*. Third edition, The Benjamin Cummings Publishing Company, USA. pp 12-27.
3. Amerena, B.; Baselga, R. and Albizu, I. (1994). Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine staphylococcal vaccine. *Vaccine* 12: 243-249.
4. Augusti, V. (1978). *Medicina interna de Domarus*. Ed. MARIN. México. pp 12.
5. Bannerman, T.; Hancock, G.; Tenover, F. and Miller, M. (1995). Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 551-555.
6. Brook, I. (1981). Role of anaerobic bacteria in upper respiratory tract infections. *Ann. Oto. Rhinol. Laryngol, supp.* 154, pt 2: 11-13.
7. Brook, I. (1989). Treatment of patients with recurrent acute tonsillitis due to group A beta-hemolytic streptococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 24: 227- 233.
8. Brock, J.; Steel, E.; and Reiter. (1975). The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *S. aureus*. *Research in Veterinary Science* 19: 152-158.
9. Brock, T. y Smith, W. (1987). *Microbiología*. 4ª edición, Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México. pp: 675,782

10. Buchanan, R. and Gibbans, N. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. 8ª edición, Ed. The Williams and Wilkins Company. U.S.A. pp: 483-489.
11. Bryan, H.; Bryan, A. and Bryan, G. (1976). Bacteriología principios y prácticas. Ed. CECSA. México. pp: 261-267.
12. Calderon, J. (1984). Los Sistemas moleculares de defensa y los procesos vitales. Ed. Continental. México. pp: 21-25.
13. Cheung, A.; Bayer, A.; Peters, J. and Ward, J. (1987). Analisis by gel electrophoresis, western blot, and peptide mapping of protein A heterogeneity in *S.aureus* strains. Infection and Immunity 55:843-847.
14. Cheung, A. and Fischetti. V. (1988). Variation in the expression of cell wall proteins of *Staphylococcus aureus* grown on solid and liquid media. Infection and Immunity 56: 1061-1065.
15. Ciborowski, P.; Flock, J. and Wadström, T. (1992). Immunological response to a *S. aureus* fibronectin-binding protein. J. Med. Microbiol. 37: 376-381.
16. Ciprian, A.; Cruz, T. and De la Garza, M. (1994). *Mycoplasma hyopneumoniae* interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. Archives of Medical Research 24: 235-239.
17. Cisneros, N.; Martínez, S. and Santos, J. (1995) Efecto in vitro del extracto bacteriano de *S. aureus* en la quimioquinesis y quimiotaxis de células PMN. Revista Alergia 42 : 9-13.
18. Clark, R. William. (1991). The experimental foundations of modern immunology. 4ª edición, Editorial John Wiley and Sons. Canada. pp: 61-92.
19. Davis, B.; Dulbecco, R.; Eisen, H. y Ginsberg, H. (1983). Tratado de microbiología. 2ª edición, Salvat Editores. México. pp: 752-762.
20. Delaat, A. (1985). Microbiología. 2ª edición. Ed. Interamericana. México. pp: 117-122.

21. Delgado Beltrán, A. (1987). Estudio de *Streptococcus* beta-hemolítico del grupo A (identificación no serológica) y *S. aureus* coagulasa positiva a partir de exudado faríngeos obtenidos de la población de la zona metropolitana norte que acude al Hospital 1° de Octubre del I.S.S.S.T.E. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan U.N.A.M. pp: 5,8-10.
22. Dossett, J.; Kronvall, G.; Williams, R. and Quie, P. (1969). Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. *Journal of Immunology* 103: 1405-1410.
23. Enciclopedia "La Salud". (1984). Volumen 3. Ed. UTHEA. México. pp 241-251.
24. Fattom, A.; Schneerson, R.; Szu, S.; Vann, W.; Shiloach, J.; Karakawa, W. and Robbins, J. (1990). Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugates to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infection and Immunity* 58: 2367-2374.
25. Fattom, A.; Schneerson, R.; Watson, D.; Karakawa, W.; Fitzgerald, D.; Pastan, I.; Li, X.; Shiloach, J.; Bryla, D. and Robbins, J. (1993). Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A. *Infection and Immunity* 61: 1023-1032.
26. Ferrante, A.; Martin, A.; Bates, E.; Goh, D.; Harvey, P.; Parson, D.; Rathjen, D.; Russ, G. and Dayer, J. (1993). Killing of *S. aureus* by tumor necrosis factor- α -activated neutrophils. *Journal of Immunology* 151: 4821-4828.
27. Ferrante, A.; Martin, A.; Bates, E.; Kowanko, I.; Harvey, P.; Parson, D.; Rathjen, D.; Russ, G. and Dayer, J. (1994). Interaction of *S. aureus* with human neutrophils and the down-regulation of tnfr receptors. *Journal of Immunology* 152: 3999-4004.
28. Foster, T. (1991). Potential for vaccination against infections caused by *S. aureus*. *Vaccine* 9: 221-227.

29. Freeman, A. (1983). Tratado de microbiología de Burrows. 21ª edición, Nueva Editorial Interamericana, México. pp 429-442.
30. Goers, J. (1991) Immunochemicals techniques laboratory manual. Academic Press, New York, U.S.A. pp 126-135, 147-162.
31. Gorodezky, C.; Escobar, A.; Pateiro, R. y Montes, J. (1979). La vacuna bacteriana oral y el nivel de inmunoglobulinas del suero. Rev. Med. Hosp. Gral. 42: 544-547.
32. Greenberg, D.; Bayer, A.; Cheung, A. and Ward, J. (1989). Protective efficacy of protein A - specific antibody against bacteremic infection due to *S. aureus* in an infant rat model. Infection and Immunity 57: 1113-1118.
33. Homonylo, M.; Krajewska, D.; Rydén, C. and Hook, M. (1993). Identification of a *S. aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. Infection and Immunity 61: 2479 - 2484.
34. Karakawa, W.; Sutton, A.; Schneerson, R.; Karpas, A. and Vann, W. (1988). Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulate *S. aureus* by human pmn leukocytes. Infection and Immunity 56: 1090-1095.
35. Kemmeny, D.; Urbanek, R.; Richards, D. and Greenall, C. (1987). Development of a semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human IgG subclass antibodies. Journal of Immunological Methods 96: 47-56.
36. King, B. and Wilkinson, B. (1981). Binding of human immunoglobulin G to protein A in encapsulated *S. aureus*. Infection and Immunity 33: 666-672.
37. Kingsbury, D. (1991) Manual de microbiología médica. Ed. Gerald E. Wagner, México. pp 130-132.
38. Klein, J. (1989). Immunology. Blackwell Scientific Publications, U.S.A. pp: 410-411
39. Kolb, H. (1990). Immunostimulation. Med. Welt. 41: 176-182.

40. Koneman, E. (1989). Diagnóstico microbiológico. Ed. Panamericana. México. pp 25, 292-296.
41. Koning, F. ; Chantal, R. (1992). Staphylococcal enterotoxin-mediated human T-T cell interactions. *The Journal of Immunology*. 149: 317-322.
42. Kumate, J. (1983). Inmunidad-Imunización-Vacunas. 3ª edición, Ed. Francisco Mendez Cervantes. México. pp: 23-49.
43. Lynch, M.; Stanley, S.; Leslie, M.; Spare, P. e Inwood, M. (1992) Métodos de laboratorio. Nueva Interamericana, 2ª edición. México. pp 1004.
44. Mac Faddin, J. (1993). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 1ª edición. Ed. Médica Panamericana. México. pp: 39, 50, 208.
45. Marr, J.; Lyon, J.; Roberson, J.; Lopher, M.; Davis, W. and Bohach, G. (1993). Characterization of novel type c staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infection and Immunity* 61: 4255-4262.
46. Peterson, P.; Wilkison, B. Kim, Y.; Schmeling, D. and Quie, P. (1978). Influence of encapsulation on staphylococcal opsonization and phagocytosis by human pmn leukocytes. *Infection and Immunity* 12: 943-949.
47. Pressler, T.; Mansa, B.; Pedersen, S.; Espersen, F.; Hoiby, N. and Koch, C. (1994). Methodologic problems in establishing normal values for IgG subclass concentration in a pediatric populations: comparison of radial immunodiffusion and ELISA Methods. *Allergy* 49: 772-777.
48. Remo, B.; (1993). Antibióticos. Ed. Médica Panamericana. 5ª edición. Argentina. pp: 18-19.
49. Robbins, J. and Schneerson, R. (1990). Polysaccharide-protein conjugates: A new generation of vaccines. *The Journal of Infections Diseases* 161: 821-832.

50. Robinson, J. and Kehoe, M. (1992). Group A streptococcal M proteins: Virulence factors and protective antigens. *Immunology Today* 13: 362-366.
51. Roitt, J. (1991). *Essential immunology*. 7ª edición, Ed. Blackwell scientific publications. pp 1-15 y 225-238.
52. Romagnani, S.; Giudizi, M.; Prete, G.; Maggi, E.; Biagiotti, R.; Almergogna, F. and Ricci, M. (1982). Demonstration on protein A of two distinct immunoglobulin-binding sites and their role in the mitogenic activity of *S. aureus* Cowan 1 on human B cells. *The Journal of Immunology* 129: 596-602.
53. Russell, R. and White, A. (1969). The *in vitro* release of leukocyte histamine by staphylococcal antigens. *The Journal of Immunology* 102: 437 - 441.
54. Ruths, S.; Driedijk, P.; Weening, R. and Out, T. (1991). ELISA procedures for the measurement of IgG subclass antibodies to bacterial antigens. *Journal of Immunological Methods* 140: 67-78.
55. Siber, G.; Schur, P.; Ainsber, A.; Weitzman, S. and Schiffman, G. (1980). Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *The New England Journal of Medicine* 303: 178-182.
56. Simon, H. and Sakai, W. (1963). Staphylococcal antagonism to penicillin-G therapy of hemolytic streptococcal pharyngeal infection. *Pediatrics* 31: 463-469.
57. Soell, M. ; Diab, M. ; Haan, G.; Beretz, A.; Herbelin, C.; Poutrel, B. and Klein, J. (1995). Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *S. aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infection and Immunity* 63: 1380-1386.
58. Stanley, A. and Mortimer, E. (1994). *Vaccines*. 2ª edición. Ed. Saunders. U.S.A. pp: 867-884.
59. Stites, D. y Terr, A. (1993). *Inmunología básica y clínica*. 7ª edición, Ed. El Manual Moderno. México. pp 867-884.

60. Tenover, F.; Arbeit, R.; Archer, G.; Biddle, J.; Byrne, S.; Goering, R.; Hancock, G.; Hébert, A.; Hill, B.; Hollis, R.; Jarvis, W.; Kreiswirth, B.; Eisner, W.; Maslow, J.; McDougal, L.; Miller, M.; Mulligan, M. and Pfaller, M. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *S. aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 407-415.
61. Ternynck, Th. and Avrameas, S. (1989). Técnicas inmunoenzimáticas. Ed. Iberoamérica. México. pp: 31-51
62. Walter, W. (1984). Introducción a la microbiología. Ed. Continental. México. pp 313-315.
63. Watson, D. (1988). Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. research of veterinary Science 45: 16-21.
64. Wolfgang, K. y Willet, H. (1986) Microbiología de Zinsser. 18ª edición, Ed. Panamericana. Argentina. pp: 519-537.
65. Xu, Sh.; Arbeit, R. and Lee, J. (1992). Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *S. aureus* by human PMN leukocytes. *Infection and Immunity* 60: 1358-1362.
66. Yoshihara, R.; Shiozawa, S.; Fujita, T. and Chihara, K. (1993). Gamma interferon is produced by human natural killer cells but not cells during *S. aureus* stimulation. *Infection and Immunity* 61: 3117-3122.
67. Youmans, G. ; Phterson, P. ; Sommers, H. and McGraw. H. (1982). Manual de infectología. 2ª edición, Ed. Interamericana. México. pp 200-205.