

11262
24/5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
E INVESTIGACION

PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION CLINICA
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GOMEZ"
DIVISION DE INVESTIGACION

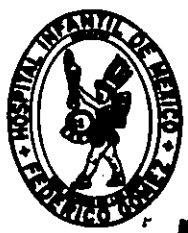
DEPURACION RECTICULOENDOTELIAL DE Klebsiella pneumoniae EN UN MODELO ANIMAL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE :
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
PRESENTA EL DR.
JAVIER MANCILLA RAMIREZ

Director de Tesis:
JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO

México, D. F.

1988



FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

| Contenido | Página |
|--------------------|--------|
| INTRODUCCION | 1 |
| ANTECEDENTES | 4 |
| OBJETIVOS | 14 |
| HIPOTESIS | 14 |
| MATERIAL Y METODOS | 15 |
| RESULTADOS | 29 |
| DISCUSION | 40 |
| REFERENCIAS | 51 |
| ANEXOS | 65 |
| CUADROS | 66 |
| FIGURAS | 73 |

infección grave y no controlada los recién nacidos pueden cursar con neutropenia absoluta y alto riesgo de muerte (17).

El sistema reticuloendotelial, también llamado sistema fagocítico mononuclear (37), desempeña un importante papel en la depuración de bacterias en pacientes bacteriémicos (14). Esta función se hace evidente en pacientes y animales asplénicos anatómica o funcionalmente, los cuales presentan mayor susceptibilidad a las infecciones por bacterias encapsuladas, principalmente Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae (34,49,98).

En cuanto a la evidencia experimental, se ha demostrado que la depuración de neumococos por macrófagos alveolares pulmonares de ratas recién nacidas es deficiente (26) y que la depuración reticuloendotelial de neumococos en el hígado y el bazo de cobayos adultos requiere de la presencia de anticuerpos anticapsulares específicos y complemento (9). El grado de bacteriemia por Klebsiella pneumoniae en ratas también se reduce notablemente al administrar anticuerpos anticapsulares específicos (28).

El fenómeno de opsonización de partículas fagocitables facilita el proceso de reconocimiento de las mismas por células fagocíticas. Sin embargo, el recién nacido presenta deficiencias parciales de varios factores del complemento (11,48) y dificultad en la activación del sistema de complemento (1,75); así como una cantidad insuficiente de anticuerpos (41,69,81), lo cual dificulta el mecanismo de fagocitosis (38).

Los macrófagos fijos alveolares del huésped neonato parecen tener una capacidad fagocítica disminuida (112) y la capacidad bactericida de las células del sistema mononuclear fagocítico en general puede ser normal (99), siempre y cuando hayan sido estimuladas previamente (6), por ejemplo con productos bacterianos como las endotoxinas de bacterias gram-negativas o lipopolisacáridos (58,72,90,96).

Estas anotaciones orientan a pensar que la función de depuración retículoendotelial de Klebsiella pneumoniae en el huésped recién nacido sea deficiente y pueda contribuir a la mayor susceptibilidad del neonato a infecciones graves por esta bacteria.

La finalidad del presente trabajo es lograr un mejor entendimiento del funcionamiento del sistema retículoendotelial en huéspedes neonatos con sepsis por esta bacteria encapsulada que evade la fagocitosis ante la falta de opsoninas específicas (29,30). Con tal propósito, hemos desarrollado un modelo animal de sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae en ratas Wistar recién nacidas, el cual empleamos para investigar la función de depuración bacteriana y contrastar dicha función con la de animales adultos infectados con la misma bacteria.

tisulares fijos).

Cuando se produce bacteriemia, la depuración de bacterias por el sistema mononuclear fagocítico (SMF) desempeña un importante papel en el control de procesos sépticos (14). Esta función de limpieza es llevada a cabo principalmente por los macrófagos fijos localizados en los sinusoides sanguíneos de hígado, bazo y médula ósea y por los macrófagos alveolares pulmonares (5). Esta actividad fagocítica de depuración se lleva a cabo en un 85% a 90% por los macrófagos de hígado y bazo (91).

La ausencia anatómica o funcional del bazo aumenta notablemente la susceptibilidad a las infecciones por bacterias encapsuladas, lo cual hace evidente la importancia de este órgano en el proceso de depuración bacteriana (98). Una manera de subsanar esta deficiencia es administrar al huésped asplénico anticuerpos anticapsulares específicos, lo cual favorece significativamente la depuración de estas bacterias por el hígado y suple más o menos eficientemente la ausencia del bazo, limitando las infecciones graves por tales agentes. Esto puede observarse particularmente con Streptococcus pneumoniae (9) y con Klebsiella pneumoniae (28).

La función de depuración bacteriana que desempeñan los macrófagos alveolares pulmonares parece tener importancia en etapas tempranas o incipientes de la bacteriemia por neumococos (45). Sin embargo, esta actividad de depuración se hace poco eficiente después, cuando ya se ha establecido el proceso de septicemia por esta bacteria (7).

Cuando la bacteriemia es prolongada, repetitiva o de gran magnitud, la depuración hepática y la esplénica adquieren gran importancia para controlar la septicemia. Estos hallazgos han sido observados en animales infectados experimentalmente con neumococos (10) y es probable que suceda igual con otras bacterias encapsuladas.

La importancia de las células fagocíticas en la eliminación de materia o partículas extrañas de la sangre fue expuesta por Metchnikoff a fines del siglo XIX. En los años siguientes, se propuso la existencia de factores humorales en el suero inmune que actuarían sobre las bacterias para facilitar su reconocimiento y fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Wright y Douglas, en 1903, denominan a tales factores como opsoninas (del griego *opsonein*: preparar comida para...), contribuyendo así a cerrar la brecha entre las teorías humoral y celular de la respuesta inmunológica (91).

Los anticuerpos de las clases IgM e IgG y el factor C3b del complemento son las principales opsoninas que actúan sobre las bacterias y otras partículas extrañas al huésped para favorecer su fagocitosis y eventual destrucción en las células fagocíticas. Los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y los monocitos y macrófagos tienen en sus membranas celulares receptores de superficie para C3b y para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas IgG y en menor proporción para IgM (21,46).

Aunque los PMNs son fagocitos más activos que los monocitos circulantes, su capacidad bactericida en estudios *in vitro* es

similar (100), lo cual se ha demostrado al retarlos con E. coli (21,57,76) o Staphylococcus aureus (76,107) opsonizados con una fuente adecuada de complemento.

Al comparar la actividad funcional in vitro de PMNs y monocitos de recién nacidos con la de fagocitos de adultos, se ha observado que en presencia de suero normal los PMNs de neonatos tienen similar capacidad fagocítica y bactericida que los de adultos (23,24,31,38,65,84). Sin embargo, tal capacidad se ve disminuida en los neonatos sometidos a tensión ("stress") por circunstancias clínicas tan variadas como sepsis, insuficiencia respiratoria e hiperbilirrubinemia (3,38,39,64,66,70,95,111). En cuanto a los monocitos, se ha reportado en los recién nacidos actividades de fagocitosis y capacidad bactericida similares a las de monocitos de adultos (57,76,100,108). En ambos tipos de células fagocíticas se han encontrado deficiencias en su movimiento dirigido o quimiotaxis (54,56,57,67,82,102,107).

La inmunidad humoral en el neonato es deficiente, pues si bien puede producir todas las clases de inmunoglobulinas al nacimiento, no es capaz de producir cantidades medibles de anticuerpos específicos (81). Tomando en consideración que la transferencia de IgG de la madre al producto se efectúa principalmente durante el último trimestre del embarazo, la cantidad de IgG en el recién nacido será menor cuanto menor sea su edad gestacional (38,15). A pesar de que el recién nacido de término puede tener mayores niveles de IgG, superiores en 5% a 10% de los de la madre, la especificidad de tales anticuerpos

depende de la experiencia inmunológica de la madre (68).

Los anticuerpos contra bacterias gram-negativas como Salmonella y Escherichia coli son primariamente de la clase IgM y aunque hay algunos de clase IgG, generalmente corresponden a la subclase IgG-2, los cuales son transferidos de la madre al feto en menor proporción (68). Estas observaciones concuerdan con el hallazgo de anticuerpos específicos contra Klebsiella pneumoniae en 50% de las muestras de suero de 50 madres mexicanas estudiadas en nuestro laboratorio, en tanto que solamente en un 5% de los recién nacidos se detectaron tales anticuerpos (40).

La actividad y los componentes del complemento en el recién nacido alcanzan apenas un 50% a 75% de los valores normales del adulto (1,48), encontrándose valores más bajos cuanto menor es la edad gestacional (75). La activación de C3 por Escherichia coli K-1 y por Klebsiella pneumoniae es deficiente en el neonato (110). Esta observación parece estar más relacionada con una deficiente activación de la vía alterna en los recién nacidos (1,61), ya que al adicionar IgG al suero de neonatos en los ensayos in vitro, con la finalidad de favorecer la activación de la vía clásica del complemento (44), se logra una eficiente opsonización de diferentes bacterias encapsuladas (61).

La principal causa de septicemia neonatal en el Hospital Infantil de México es Klebsiella pneumoniae y en segundo lugar se encuentra Escherichia coli (63). Un patrón similar ha sido observado en la unidad de terapia intensiva neonatal del Centro Médico Nacional en la ciudad de México (105,106). Estas dos

por la vía clásica y lograr así, además de un efecto bacteriolítico directo, una opsonización adecuada para que la bacteria en cuestión sea reconocida, fagocitada y destruida por las células fagocíticas del huésped.

Estudios en ratas (30) y en ratones (29) han demostrado que las cepas de Klebsiella pneumoniae que producen mayor cantidad de polisacárido capsular son más virulentas. El grado de bacteriemia y la mortalidad se reduce notablemente al administrar a los animales con infección experimental anticuerpos específicos contra los polisacáridos capsulares de las cepas de Klebsiella pneumoniae inoculadas (28,30,60). Este mismo efecto se obtiene en el caso de anticuerpos anticapsulares específicos administrados a cobayos con sepsis por neumococos (10).

Los experimentos que han utilizado animales no inmunes, deficientes de complemento y específicamente de C4 han mostrado que es necesaria la integridad de la vía alterna del complemento para que se lleve a cabo una adecuada depuración de neumococos en el bazo (7) y que, cuando se encuentran presentes anticuerpos anticapsulares específicos y se cuenta con una vía alterna del complemento intacta, la depuración de neumococos virulentos, provistos de una cápsula abundante, se lleva a cabo preferentemente en el hígado (8,10). Estas observaciones ayudan a comprender la susceptibilidad del huésped no inmune a este tipo de bacterias encapsuladas, como sería el caso del recién nacido, la exagerada susceptibilidad del huésped esplénico no inmune y la eficacia protectora de los anticuerpos anticapsulares en estas situaciones clínicas (50).

A diferencia de los estudios in vitro , que no muestran alteración en la capacidad de fagocitosis y muerte bacteriana de los monocitos de recién nacidos; en modelos de sepsis neonatal experimental, utilizando fetos de rata y ratas recién nacidas, se ha demostrado que la depuración de varias cepas de Escherichia coli y de Salmonella es menor que en las ratas adultas (85). La opsonización de estas bacterias con suero de rata adulta mejora la depuración bacteriana en las ratas recién nacidas (86). Los niveles de depuración bacteriana aumentan con la edad, lo cual se asocia con mayor eficacia en la depuración hepática, demostrado por mayor depuración de bacterias radiomarcadas (51,87).

En diversos estudios experimentales se ha demostrado que los macrófagos alveolares pulmonares de animales recién nacidos retados con bacterias encapsuladas, como Escherichia coli y Staphylococcus aureus, muestran una actividad fagocítica y una capacidad bactericida disminuidas (112), lo cual parece estar relacionado con deficiencias en las actividades de lisozima, del ciclo de Krebs y de la vía hexosa-monofosfato en estas células (74). Estas funciones tienden a recuperarse a partir de la primera semana de edad (112).

La capacidad de depuración bacteriana pulmonar se ha observado disminuida en animales recién nacidos infectados experimentalmente con Staphylococcus aureus (93), con estreptococos del grupo B (94), o con Streptococcus pneumoniae (26). Aunque la cantidad de macrófagos alveolares por gramo de tejido pulmonar es menor en los animales recién nacidos que en

los adultos, la depuración pulmonar de bacterias continúa siendo deficiente en las primeras semanas de edad, aún a pesar del incremento en el número de células fagocíticas residentes en los pulmones (26,74,93,94,112).

La depuración hepática y la esplénica de coloide se han reportado disminuidas en las ratas recién nacidas, al compararlas con las observadas en ratas adultas (80). En las primeras semanas de edad se encuentra en este modelo animal una mejoría gradual de la depuración hepática de coloide, pero no de la depuración en el bazo. De estos resultados se ha sugerido una hipoesplenia fisiológica en las ratas recién nacidas, que explicaría en parte su mayor susceptibilidad a las infecciones por bacterias encapsuladas (80).

El trasplante de macrófagos peritoneales de animales adultos a ratas recién nacidas con sepsis experimental por estreptococos del grupo B mejora la sobrevida a la infección (92), lo cual sugiere que la deficiente función de los macrófagos del huésped neonato contribuya a la mayor susceptibilidad a estas bacterias.

La mayor sobrevida de neonatos poco aptos, prematuros y de bajo peso, se ha logrado en base a sistemas refinados de asistencia que resultan en periodos prolongados de hospitalización. El riesgo de infección en estos pacientes comprometidos se incrementa al ser colonizados por microorganismos hospitalarios que, como en el caso de Klebsiella pneumoniae, con frecuencia se manifiestan como patógenos

oportunistas y presentan factores de mayor virulencia y resistencia múltiple a los antimicrobianos habitualmente empleados en las unidades de terapia neonatal (2,13,43,102,106).

Se hace necesario, por tanto, buscar alternativas para el manejo de estas infecciones, con base en un mejor conocimiento de los mecanismos de defensa del neonato.

La finalidad del presente trabajo es, precisamente, lograr un mejor conocimiento acerca del funcionamiento del SMF durante la septicemia por Klebsiella pneumoniae en el animal recién nacido, huésped que se caracteriza por sus deficientes mecanismos de opsonización y por su limitada respuesta de leucocitos PMNs ante la infección bacteriana (16,17).

Propongo que la depuración reticuloendotelial de Klebsiella pneumoniae está disminuida en el animal recién nacido, lo cual condiciona bacteriemia persistente y de mayor magnitud que en el animal adulto. Estas circunstancias probablemente contribuyen a la mayor susceptibilidad del recién nacido ante las infecciones por Klebsiella pneumoniae.

El conocimiento que genere este trabajo puede ser de gran utilidad para intentar modificaciones experimentales de las condiciones de depuración bacteriana en el SMF del neonato.

OBJETIVOS :

1. Establecer un modelo animal de sepsis neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae en ratas Wistar.
2. Determinar la capacidad de depuración bacteriana en el bazo, hígado y pulmones de ratas Wistar recién nacidas y adultas con sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae.
3. Conocer la relación entre el comportamiento de la bacteriemia por Klebsiella pneumoniae y su depuración por órganos específicos del sistema reticuloendotelial en ratas adultas y recién nacidas.

HIPOTESIS :

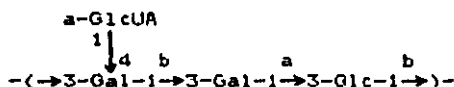
La susceptibilidad a las infecciones graves por Klebsiella pneumoniae es mayor en las ratas Wistar recién nacidas que en las adultas, por lo que la bacteriemia será de mayor duración y magnitud en las ratas recién nacidas, debido a una depuración reticuloendotelial de bacterias menos efectiva.

MATERIAL Y METODOS:

BACTERIA:

Utilizamos una cepa de Klebsiella pneumoniae obtenida de hemocultivos de varios recién nacidos hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos neonatales del Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social durante una epidemia de sepsis neonatal. Esta bacteria fue identificada y serotipificada en el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y nos fue proporcionada gentilmente por la Dra. Ethel García de Ortigoza.

El serotipo capsular correspondió al K-8, el cual es un polisacárido que contiene en su estructura D-glucosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico en proporciones molares 1:2:1, que forman una serie de unidades repetitivas del tetrasacárido con la siguiente disposición (101):



1). Con la finalidad de conocer el comportamiento de crecimiento de esta bacteria, procedimos a establecer la fase de crecimiento logarítmico mediante una cinética de crecimiento bacteriano de la siguiente manera:

1.a). Se tomó una muestra de la cepa transportada en agar bacteriológico* y se sembró en una placa de agar eosina azul de metileno* (EAM) con técnica de estriación. Se incubó durante 18

horas a 37 C y se separó una de las colonias para hacer pruebas bioquímicas y ratificar la identidad de Klebsiella pneumoniae.

1.b). Una vez corroborada la cepa, se sembró una muestra de la bacteria en medio de cultivo líquido: caldo soya-tripticasa* (CST) y se incubó durante la noche a 37 C. De este cultivo se tomaron muestras de 0.5 ml que se inocularon simultáneamente en 25 tubos diferentes con 5 ml de CST y se incubaron a 37 C en agitación suave y constante.

* (Bioxón de México).

1.c). Ajustando a un valor basal de cero se hicieron mediciones de la turbidez del medio de cultivo cada hora durante 24 horas por densidad óptica en un espectrofotómetro (Beckman, Modelo 26) a 540 nm de longitud de onda de luz visible. Todas las mediciones se hicieron por triplicado lavando previamente la bacteria dos veces con solución balanceada de fosfatos (PBS) a pH 7.2 y centrifugando a 7,500 rpm por 5 minutos para resuspender finalmente en 5 ml de PBS y hacer las lecturas de absorbancia, evitando de esta manera la interferencia propia de los ingredientes del CST.

1.d). El número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de cultivo en cada una de las fases de la cinética de crecimiento bacteriano se estimó de acuerdo al sistema de nefelometría de McFarland (anexo No. 1), para lo cual se midió la densidad óptica de los 10 tubos del nefelómetro en el mismo espectrofotómetro y con los mismos parámetros ya mencionados.

1.e). Con la finalidad de verificar la confiabilidad de las

lecturas de absorbancia del nefelómetro de McFarland en cuanto a la estimación del número de UFC en los cultivos de Klebsiella pneumoniae, se hicieron siembras en agar EAM de muestras de 0.1 ml de varias diluciones del medio de cultivo líquido a diferentes intervalos de crecimiento bacteriano y se incubaron a 37 C por 18 horas para determinar el número exacto de UFC en placa.

1.f). Las lecturas de absorbancia del cultivo de Klebsiella pneumoniae a diferentes intervalos de tiempo se graficó en polígono de frecuencias para evidenciar las fases de latencia, logarítmica y estacionaria en la cinética de crecimiento bacteriano. A su vez, las lecturas de absorbancia de los 10 tubos del nefelómetro de McFarland se graficaron con el mismo sistema, de tal manera que pudimos determinar la cantidad de UFC que correspondían a determinadas lecturas y correlacionarlo con las lecturas encontradas en diferentes fases de la cinética.

DOSIS LETAL MEDIA *

2). Con la finalidad de establecer las dosis de bacterias necesarias para producir septicemia en las ratas adultas y en las recién nacidas y que permitieran una sobrevida suficiente para después evaluar el comportamiento de la depuración reticulo-endotelial, procedimos a establecer una dosis letal media (DL-50) en los dos grupos de edad.

2.a). Se tomaron 0.5 ml de un cultivo de Klebsiella pneumoniae K-8 en CST incubado a 37 C durante una noche y se sembraron en 5 ml de CST nuevo, el cual se incubó a 37 C durante

el tiempo suficiente para lograr una fase de crecimiento logarítmico.

2.b). El número de UFC en la fase logarítmica del cultivo se estimó según la densidad óptica medida por espectrofometría después de lavar dos veces con PBS y se ajustó a una concentración de 1×10^9 UFC/ml comparando las lecturas de absorbancia con las de la curva del nefelómetro de McFarland. En todos los casos se sembraron muestras de las diluciones empleadas para verificar la cantidad de UFC estimada por densidad óptica.

2.c). Para probar la dosis letal de la bacteria se utilizaron 36 ratas Wistar adultas, de 10 a 12 semanas de edad, de ambos sexos, con peso corporal de 200 a 230 g. Se inocularon por vía intraperitoneal (ip) seis diferentes diluciones en PBS de la bacteria, desde 1×10^5 UFC hasta 2×10^9 UFC, a grupos de seis animales por cada dilución en volúmenes de inyección de 1 ml.

2.d). Se observó la mortalidad en cada uno de los seis grupos de animales durante 10 días después del enfrentamiento con la bacteria y se determinó la DL-50 según el esquema propuesto por Reed y Muench (88), mediante la siguiente fórmula:

$$2.d.1). \quad DL-50 = (DPM) (\text{Log}10 Fd) + (\text{Log}10 dil > 50\%).$$

$$DPM = \frac{50 - (\% \text{ mortalidad} < 50\%)}{(\% \text{ mortalidad} > 50\%) - (\% \text{ mortalidad} < 50\%)}$$

DPM: Distancia proporcional de mortalidad;

Fd: Factor de dilución.

dil > 50% : Fd con mortalidad próxima al 50%.

3.a). Los niveles séricos de anticuerpos IgG e IgM específicos contra el polisacárido capsular K-8 de Klebsiella pneumoniae en las ratas adultas y en las madres de las ratas RN que se utilizaron para este estudio se determinaron por técnica de ELISA, empleando un conjugado de peroxidasa con el anti-anticuerpo de rata en microplaca. Fueron descartados del estudio los animales que tuvieron niveles de anticuerpos superiores a los niveles de corte de absorbancia de 0.183 para IgG y 0.079 para IgM, previamente establecidos en 100 ratas adultas sanas sin antecedentes de contacto con Klebsiella pneumoniae.

3.b). **RATAS ADULTAS** : Un grupo de 50 ratas Wistar adultas de 10 a 12 semanas de edad, de ambos sexos, sin apareamiento previo, con peso corporal de 216 g \pm 30 g, se inoculó por vía ip con una DL-50 de Klebsiella pneumoniae (5.6×10^8 UFC) preparada en 0.5 ml de PBS a pH 7.2.

3.c). Antes del inóculo (tiempo cero), se tomaron muestras de 300 μ l de sangre a todos los animales por punción del seno retro-orbitario con tubo capilar en condiciones de esterilidad para realizar cuentas totales de leucocitos (CTL) y hemocultivos en medio líquido de caldo cerebro-corazón* (CCC). Los medios de cultivo se incubaron a 37 C y sólo se consideraron negativos cuando no presentaron turbidez después de 72 horas de observación.

* (Bioxón de México).

3.d). A diferentes intervalos de tiempo post-infección (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas), se sacrificaron por

dislocamiento cervical grupos de 3 animales, a los cuales se les extrajo por punción cardiaca la mayor cantidad posible de sangre, con la finalidad de limitar al mínimo el volumen residual de sangre en los tejidos y en particular en hígado, bazo y pulmones. Los animales que murieron entre los intervalos fueron excluidos del estudio.

3.e). En condiciones de esterilidad se disecaron y extrajeron los pulmones, el hígado y el bazo. Se lavaron en PBS estéril y se pesaron por separado en una balanza analítica (Sauter, Modelo 404). Cada uno de los órganos se colocó en tubos de cristal de 50 ml de capacidad y se homogeneizó en 10 ml de agua bidestilada estéril mediante un pistón de teflón conectado a un rotor provisto de control manual de la velocidad de rotación (HIM, Modelo 1). Se hicieron cuatro diluciones subsecuentes de 1 ml de cada suspensión en 9 ml de agua bidestilada estéril, homogeneizando en cada paso mediante un agitador vórtex (Super-mixer, Modelo 1290). Finalmente, se hicieron siembras masivas de 10 ul y 100 ul de cada una de las muestras en placas de agar EAM, las cuales se incubaron a 37 C durante 18 horas.

3.f). De la sangre obtenida por punción cardiaca en condiciones de asepsia, se diluyó 1 ml en 9 ml de agua bidestilada estéril y se hicieron tres diluciones subsecuentes en agua bidestilada hasta 1:10,000, homogeneizando en cada paso con el agitador vórtex. De igual manera, se sembraron en agar EAM muestras de 10 ul y 100 ul de cada una de las diluciones y se incubaron las placas a 37 C por 18 horas. Otra muestra de 0.1 ml

de sangre se sembró en tubos con 1 ml de CCC y se incubó a 37 C, observándose diariamente por tres días para determinar cualitativamente por turbidez en el medio de cultivo el número de hemocultivos positivos.

3.g). RATAS RECIEN NACIDAS : De un total de 150 ratas Wistar RN, menores de 48 horas de edad y con peso corporal de $8.1 \text{ g} \pm 1.3 \text{ g}$, se asignaron al azar dos grupos de 75 ratas cada uno. Al primer grupo se inoculó por vía ip una DL-50 de Klebsiella pneumoniae (1.1×10^7 UFC), preparada en un volumen de 150 ul de PBS a pH 7.2; en tanto que al segundo grupo se inoculó por vía sc en la base de la cola una DL-50 de la bacteria (1.3×10^7 UFC) en un volumen de inyección de 10 ul. Los animales se marcaron en el dorso con tintura de cristal violeta según el tipo de inóculo aplicado y se asignaron en grupos de 10 ratas RN a 15 ratas-madres en puerperio inmediato. Las ratas RN que murieron entre los intervalos fueron excluidas del ensayo.

3.h). Los animales se sacrificaron por dislocamiento cervical en grupos de seis ratas a diferentes intervalos de tiempo post-infección (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas) y se hizo punción cardíaca en condiciones de asepsia para sembrar muestras de 0.1 ml de sangre en tubos con 1 ml de CCC, los cuales se incubaron a 37 C y se observaron diariamente por tres días.

Los medios que presentaron turbidez se sembraron en placas de agar EAM y se incubaron a su vez a 37 C durante 18 horas, con la finalidad de identificar por morfología de las colonias y por

tinción de Gram la presencia de Klebsiella pneumoniae. En los casos en que persistía la duda se hicieron pruebas bioquímicas a las bacterias aisladas, antes de considerar los hemocultivos como positivos a Klebsiella pneumoniae.

3.i). Una muestra de 0.1 ml de sangre de cada rata se diluyó en 9.9 ml de agua bidestilada estéril, se homogeneizó por agitación en vórtex y se sembraron muestras de 10 ul y 100 ul en placas de agar EAM que se incubaron a 37 C por 18 horas. El número de UFC en placa se reportó según el índice de UFC/ml de sangre para determinar cuantitativamente la bacteriemia en estos animales.

3.j). Los pulmones, el hígado y el bazo de estos animales fueron disecados y extraídos en condiciones de esterilidad. Se lavaron en PBS estéril y se pesaron por separado en la balanza analítica. Se colocó cada órgano en un tubo de cristal con capacidad de 20 ml y se homogeneizó en 5 ml de agua bidestilada estéril con un pistón de teflón conectado a un rotor. Se diluyeron 0.5 ml de cada suspensión en 4.5 ml de agua bidestilada estéril y se homogeneizaron con un agitador vórtex. De igual manera, se hicieron dos diluciones subsecuentes de 1 ml en 9 ml de agua bidestilada estéril y se sembraron en placas de agar EAM muestras de 10 ul y 100 ul de cada dilución y se incubaron a 37 C por 18 horas.

CUENTAS DE LEUCOCITOS CIRCULANTES :

4). En todas las ratas infectadas con Klebsiella pneumoniae

se hicieron cuentas totales (CTL) y diferenciales de leucocitos en sangre periférica en diferentes intervalos de tiempo después del reto con la bacteria (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas).

4.a). Se utilizaron pipetas de Thoma para glóbulos blancos, con solución de Turk (ácido acético al 3%) para diluir la muestra y lisis eritrocitos. Las lecturas de las CTL se hicieron en cámaras de Neubauer con el microscopio óptico a 10x y 40x.

4.b). Para las cuentas diferenciales de leucocitos, se hicieron frotis de sangre teñidos con colorante de Wright y se contaron 100 a 200 células en el microscopio óptico a 100x. El porcentaje de PMNs y el de monocitos se multiplicó por la CTL de cada muestra.

4.c). A cada subtotal se restó el valor basal del tiempo cero para conocer las variaciones en las CTL y en las cuentas de PMNs y monocitos circulantes a diferentes intervalos de tiempo postinfección, tanto en las ratas adultas como en las RN.

INTERPRETACION :

5.a). El comportamiento de la bacteriemia por Klebsiella pneumoniae se investigó en dos aspectos:

5.a-1). Cualitativo, en cuanto a los resultados de los hemocultivos en CCC, reportándose solamente como número de hemocultivos positivos o negativos en los diferentes intervalos de tiempo post-infección en ambos grupos de edad.

5.a.2). Cuantitativo, de acuerdo al número de UFC cultivadas en las placas de agar EAM. Este número se multiplicó por el factor de dilución de las muestras sembradas para determinar la cantidad de UFC por ml de sangre en cada animal. Se reportó el promedio de UFC/ml de sangre en los animales correspondientes a cada intervalo post-infección en ambos grupos de edad.

5.b). La depuración de Klebsiella pneumoniae en los órganos del SRE que investigamos se interpretó cuantitativamente, para lo cual multiplicamos el número de UFC cultivadas en las placas de agar EAM por el factor de dilución de las muestras sembradas y este total lo dividimos entre el peso del órgano correspondiente, de tal manera que determinamos un índice de UFC/gramo de peso de hígado, bazo y pulmones, respectivamente. Se reportó el promedio de UFC/g para cada órgano en los animales correspondientes a cada intervalo post-infección en ambos grupos de edad.

5.c). En los diferentes intervalos de tiempo post-infección que se estudiaron, se determinó en ambos grupos de edad la asociación entre la magnitud de la bacteriemia medida como UFC/ml de sangre y la cantidad de UFC/g encontrada en cada uno de los tres órganos cultivados, con la finalidad de conocer la relación entre la capacidad de depuración bacteriana de cada uno de ellos y la presencia de bacterias circulantes en sangre.

5.d). Las vías de inóculo de la bacteria en las ratas RN se compararon en cuanto al comportamiento de la bacteriemia de manera cualitativa, según el número de hemocultivos positivos en

CCC en los diferentes intervalos de tiempo post-infección. Este ensayo fue motivado por el hallazgo de que las DL-50 por vía ip o sc en las ratas RN fueron estrechamente similares (1.12×10^7 UFC por vía ip y 1.36×10^7 UFC por vía sc).

5.e). Las CTL en sangre periférica a diferentes intervalos post-infección se reportaron de acuerdo a la variación positiva o negativa de un valor basal, tomado de las CTL de cada uno de los animales adultos antes de ser infectados y de un grupo testigo de 20 animales no infectados en el caso de las ratas RN.

ANALISIS ESTADISTICO :

6). Con la finalidad de definir diferencias entre los patrones de depuración reticuloendotelial de Klebsiella pneumoniae en ambos grupos de edad y su relación con el comportamiento de la bacteriemia a diferentes intervalos de tiempo post-infección, planteamos las siguientes hipótesis estadísticas de nulidad (H_0) y alternativas (H_1 , H_2 , etc) para los diferentes aspectos analizados:

6-a). H_0 : La bacteriemia por Klebsiella pneumoniae, después del inóculo experimental de una DL-50 en ratas Wistar es cuantitativamente igual en las ratas adultas que en las ratas RN.

H_1 : La bacteriemia por Klebsiella pneumoniae, después del inóculo de una DL-50 en ratas Wistar es mayor en las ratas adultas que en las ratas recién nacidas.

H_2 : La bacteriemia por Klebsiella pneumoniae, después del

inculo de una DL-50, es menor en las ratas adultas que en las ratas recién nacidas.

Para probar esta H.0 utilizamos una prueba no paramétrica para dos muestras no relacionadas, ya que los valores de X estaban representados por un índice (UFC/ml) y se contrastaban muestras independientes. Aplicamos la prueba U de Mann-Whitney con un valor de significancia alfa 0.05 (97).

6.b). H.0: La depuración hepática, esplénica y pulmonar de Klebsiella pneumoniae a diferentes intervalos de tiempo post-infección en ratas Wistar inoculadas con una DL-50 es igual en las ratas adultas que en las ratas RN.

H.1: La depuración hepática, esplénica y pulmonar de Klebsiella pneumoniae a diferentes intervalos post-infección en ratas Wistar inoculadas con una DL-50 es mayor en las ratas adultas que en las ratas RN.

H.2: La depuración hepática, esplénica y pulmonar de Klebsiella pneumoniae a diferentes intervalos post-infección en ratas Wistar inoculadas con una DL-50 es menor en las ratas adultas que en las ratas RN.

Con la finalidad de probar estas hipótesis estadísticas, utilizamos la prueba de varianza por rangos de Kruskal-Wallis (97) para definir diferencias globales entre los dos grupos de edad y aplicamos la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras no relacionadas (97), para contrastar la depuración bacteriana en cada uno de los órganos entre ambos grupos.

6.c). Para establecer la relación entre la bacteriemia y la depuración bacteriana encontrada en cada uno de los órganos estudiados, realizamos coeficientes de correlación mediante la prueba de rangos de Spearman (97) en los dos grupos de edad y mostramos los datos mediante gráficas de regresión lineal (32).

6.d). De manera adicional, hicimos un contraste entre las cantidades de UFC/g encontradas en hígado, bazo y pulmones en cada uno de los grupos de edad por separado; ésto con la finalidad de conocer la importancia de cada órgano en la depuración de Klebsiella pneumoniae a los diferentes intervalos de tiempo post-infección investigados.

Se aplicaron pruebas de varianza por rangos de Friedman (97) a los datos de UFC/g en los tres órganos del BRE cultivados en el grupo de las ratas adultas y también para el grupo de ratas RN y se definieron diferencias específicas entre los tres órganos en cada uno de los grupos de edad mediante la prueba U de Mann-Whitney, con un valor alfa 0.05 (97).

RESULTADOS :

BACTERIA :

1.a). La cinética de crecimiento bacteriano de Klebsiella pneumoniae serotipo capsular K-8 se muestra en la figura No. 1. Como puede apreciarse, la primera fase, también llamada fase de latencia o fase "lag", fue sólo de una hora, tal como se esperaba después de haber realizado el cultivo nocturno previo. Luego, puede observarse que la bacteria entra en una fase de crecimiento logarítmico sostenido en las siguientes tres horas y finalmente, a partir de las cuatro horas de cultivo entra en una fase estacionaria. En esta curva podemos ver que la fase de mayor crecimiento se encuentra entre las dos y tres horas de cultivo, por lo que siempre utilizamos la bacteria a las dos y media horas del cultivo en CST realizado a partir del cultivo nocturno previo, para asegurar la fase logarítmica en nuestros ensayos.

1.b). El nefelómetro de McFarland (83) consta de 10 tubos de cristal que contienen diferentes proporciones de H_2SO_4 al 1% y $BaCl_2$ al 1%, preparados como se muestra en el anexo No. 1, lo cual produce diferentes grados de densidad óptica por interferencia de la luz, en forma similar a la producida por suspensiones de bacterias en concentraciones que van de 300 a 3,000 millones de UFC. Al hacer las lecturas de absorbancia de los tubos del nefelómetro de McFarland en el espectrofotómetro, obtuvimos la curva que se presenta en la figura No. 2. Para ajustar las concentraciones deseadas de nuestros cultivos líquidos de Klebsiella pneumoniae utilizamos esta gráfica con gran confiabilidad, ya que al verificar por siembras en placas de

agar EAM la cantidad de UFC estimadas por este método, encontramos una variación de apenas ± 1 UFC de los factores de dilución probados ($\times 10^{-7}$, $\times 10^{-8}$ y $\times 10^{-9}$).

DOSIS LETAL MEDIA :

2). La dilución basal (1×10^{10}) correspondió a 1×10^{10} UFC de Klebsiella pneumoniae, de tal manera que las diluciones empleadas para los inóculos se representan como $\times 10^{-1}$, $\times 10^{-2}$, $\times 10^{-3}$ UFC, etc. y corresponden en realidad a concentraciones de $\times 10^9$, $\times 10^8$, $\times 10^7$ UFC y así, sucesivamente.

El resultado final de la fórmula presentada en el índice 2-d.1. del apartado de "Material y Métodos" da un valor expresado en logaritmo de base 10; por lo tanto, se obtuvo el antilogaritmo del resultado y se multiplicó por la concentración basal de UFC (1×10^{10}), para conocer la DL-50 exacta en cada uno de los grupos de edad de los animales retados.

2-a). El ensayo para determinar la DL-50 de Klebsiella pneumoniae K-8 por vía ip en ratas Wistar adultas se esquematiza a continuación:

| INOCULO ip UFC | # RATAS | MORTALIDAD | SOBREVIDA ACUMULADA | MORTALIDAD ACUMULADA | (%) DE MORTALIDAD |
|--------------------|---------|------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| 2×10^{-1} | 6 | 6 | 0 | 14 | 100. |
| 1×10^{-1} | 6 | 6 | 0 | 8 | 100. * |
| 1×10^{-2} | 6 | 2 | 4 | 2 | 33.3 * |
| 1×10^{-3} | 6 | 0 | 10 | 0 | 0. |
| 1×10^{-4} | 6 | 0 | 16 | 0 | 0. |
| 1×10^{-5} | 6 | 0 | 22 | 0 | 0. |

* El porcentaje de mortalidad se obtiene del producto de :
Mortalidad acumulada / Mortalidad acumulada + Sobrevida acumulada.

Aplicando la fórmula 2.d.1. (88):

$$* DPM = (50 - 33.3) / (100 - 33.3) = 0.25 ;$$

$$\text{Log}_{10} \text{ del Fd } (x10^{-1}) = -1 ;$$

$$(DPM) (\text{Log}_{10} \text{ Fd}) = (0.25) (-1) = -0.25 ;$$

$$\text{Log}_{10} \text{ dil } > 50\% (1x10^{-1}) = -1 ;$$

$$(-0.25) + (-1) = -1.25 ; \text{ antiLog}_{10} -1.25 = 5.6x10^{-2} ;$$

$$DL-50 = (5.6x10^{-2}) (1x10^{10}) = 5.6x10^8.$$

Por lo tanto, DL-50 = 5.6x10⁸ UFC. (Ratas adultas, vía ip).

2.b). Ensayo para determinar la DL-50 por vía ip en ratas RN:

| INOCULO ip UFC | # RATAS | MORTALIDAD | SOBREVIDA ACUMULADA | MORTALIDAD ACUMULADA | (%) DE MORTALIDAD |
|--------------------|---------|------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| 2x10 ⁻¹ | 10 | 10 | 0 | 27 | 100. |
| 2x10 ⁻² | 9 | 9 | 0 | 17 | 100. |
| 2x10 ⁻³ | 6 | 4 | 2 | 8 | 80. * |
| 2x10 ⁻⁴ | 8 | 4 | 6 | 4 | 40. * |
| 2x10 ⁻⁵ | 10 | 0 | 16 | 0 | 0. |
| 2x10 ⁻⁶ | 10 | 0 | 26 | 0 | 0. |

$$* DPM = (50 - 40) / (80 - 40) = 0.25 ;$$

$$\text{Log}_{10} \text{ del Fd } (x10^{-1}) = -1 ;$$

$$(DPM) (\text{Log}_{10} \text{ Fd}) = (0.25) (-1) = -0.25 ;$$

$$\text{Log}_{10} \text{ dil } > 50\% (2x10^{-3}) = -2.699 ;$$

$$(-0.25) + (-2.699) = -2.949 ; \text{ antiLog}_{10} -2.949 = 1.12x10^{-3} ;$$

$$DL-50 = (1.12x10^{-3}) (1x10^{10}) = 1.12x10^7.$$

Por lo tanto, DL-50 = 1.12x10⁷ UFC. (Ratas RN, vía ip).

2.c). Ensayo para definir la DL-50 por vfa sc en ratas RN:

| INOCULO sc UFC | # RATAS | MORTALIDAD | SOBREVIDA ACUMULADA | MORTALIDAD ACUMULADA | (%) DE MORTALIDAD |
|----------------------|---------|------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| 4.3×10^{-2} | 10 | 10 | 0 | 20 | 100. |
| 4.3×10^{-3} | 10 | 10 | 0 | 10 | 100. * |
| 4.3×10^{-4} | 10 | 0 | 10 | 0 | 0. * |
| 4.3×10^{-5} | 10 | 0 | 20 | 0 | 0. |
| 4.3×10^{-6} | 10 | 0 | 30 | 0 | 0. |

$$* DPM = (50 - 0) / (100 - 0) = 0.5 ;$$

$$\text{Log}_{10} \text{ del Fd } (\times 10^{-1}) = -1 ;$$

$$(DPM) (\text{Log}_{10} \text{ Fd}) = (0.5) (-1) = -0.5 ;$$

$$\text{Log}_{10} \text{ dil } > 50\% (4.3 \times 10^{-3}) = -2.366 ;$$

$$(-0.5) + (-2.366) = -2.866 ; \text{ antiLog}_{10} -2.866 = 1.36 \times 10^{-3} ;$$

$$DL-50 = (1.36 \times 10^{-3}) (1 \times 10^{10}) = 1.36 \times 10^7.$$

Por lo tanto, $DL-50 = 1.36 \times 10^7$. (Ratas RN, vfa sc).

DEPURACION BACTERIANA :

BACTERIEMIA :

3.a). La bacteriemia en las ratas RN, medida cualitativamente por el número de hemocultivos positivos a Klebsiella pneumoniae en CCC, después de ser retadas por vfa ip o por vfa sc se muestra en el cuadro No.1, donde se puede apreciar que en los diferentes intervalos de tiempo muestreados existe una gran semejanza en cuanto al comportamiento de la bacteriemia, independientemente de la vfa de inóculo empleada, lo cual se confirma al encontrar una correlación positiva por una r de Spearman = 0.7917, significativa para un valor de p = 0.0084.

3.b). En la figura No. 3-A se muestra gráficamente que todas las ratas adultas y las ratas RN tuvieron hemocultivos positivos a Klebsiella pneumoniae a partir de las 6 horas post-infección y que aunque en ambos grupos empezaron a aparecer hemocultivos negativos a partir de las 72 horas, en el grupo de ratas RN hubo hemocultivos positivos hasta las 144 horas inclusive, en tanto que en las ratas adultas todos los hemocultivos fueron negativos a partir de las 120 horas.

En la figura No. 3-B se puede apreciar el comportamiento cuantitativo de la bacteriemia en ambos grupos, representando en una escala logarítmica de base 10 los promedios del número de UFC de Klebsiella pneumoniae por ml de sangre en los diferentes intervalos post-infección. Como puede observarse, la mayor cantidad de bacterias en sangre se presentó en ambos grupos a las 12 horas del enfrentamiento. La bacteriemia en todo momento fue de menor magnitud en el grupo de ratas adultas, que a las 96 horas post-infección sólo presentó un hemocultivo positivo con menos de 100 UFC/ml de sangre; en tanto que en las ratas RN siempre hubo una cantidad significativa de bacterias en sangre.

Al contrastar el grado de bacteriemia encontrado en ambos grupos, observamos que fue significativamente mayor en el grupo de ratas RN con un valor de U de Mann-Whitney = 11, que corresponde a una $p = 0.0081$. Los valores promedio de UFC/ml se presentan en el cuadro No. 2.

DEPURACION RETICULOENDOTELIAL :

RATAS ADULTAS :

4.a). La figura No. 4 muestra una ilustración mediante barras de la cantidad de bacterias cultivadas de los órganos del SRE que investigamos a diferentes intervalos post-infección. Se representa el logaritmo base 10 de las UFC de Klebsiella pneumoniae por gramo de peso del hígado, bazo y pulmones. Se puede apreciar que en las primeras 24 horas el bazo contenía mayor cantidad de bacterias/gramo, en tanto que a las 48 horas y 72 horas hubo más bacterias por gramo de tejido en el hígado. Es notable que la magnitud de depuración bacteriana por los pulmones fue siempre menor.

Al contrastar los índices de UFC/q entre estos tres órganos del SRE, considerando globalmente todos los intervalos post-infección investigados, se demostró una diferencia significativa mediante un análisis de varianza por rangos de Friedman con un valor de 6.333, para una $p = 0.0421$.

Ahora bien, al contrastar los índices de UFC/g entre órganos específicos hubo poca diferencia estadística entre hígado y bazo, demostrada mediante un valor $U = 20$ (U de Mann-Whitney), que corresponde a una $p = 0.31$, no significativa. Aunque la cantidad de UFC/g tanto en el bazo como en el hígado fue mayor que en los pulmones en los intervalos de las 3 horas a las 24 horas, las diferencias globales no fueron estadísticamente significativas. Los valores promedio de UFC/g para cada órgano y sus respectivos valores de U de Mann-Whitney se presentan en el cuadro No. 3.

RATAS RECIEN NACIDAS :

4.b). La cantidad de bacterias aisladas de cada uno de los órganos del SRE investigados en el modelo de sepsis neonatal después de una DL-50 de Klebsiella pneumoniae se muestra en la gráfica de barras de la figura No. 5. Puede observarse que desde las 3 horas post-infección hubo mayor cantidad de UFC/g en el hígado y a las 12 horas se alcanzó el mayor número de bacterias tanto en el hígado como en el bazo, en tanto que la depuración pulmonar siempre fue menor.

Al hacer un contraste de la depuración bacteriana apreciada en estos tres órganos del SRE, encontramos que hubo una diferencia significativa demostrada mediante la prueba de rangos de Friedman, con un valor de 11.556, para una $p = 0.0031$.

Al identificar los puntos de esta diferencia, utilizando para ello la prueba U de Mann-Whitney, encontramos que la cantidad de UFC/g fue mayor en el hígado que en el bazo ($U = 17$; $p = 0.034$) y que en los pulmones ($U = 1$; $p = 0.0004$). En cambio, a pesar de que la cantidad de UFC/g fue mayor en el bazo que en los pulmones, la diferencia estadística no fue significativa ($U = 23.5$; $p = 0.122$). Al observar por separado los intervalos, de las 6 horas a las 144 horas post-infección hubo mayor depuración hepática. De igual manera, la depuración esplénica fue mayor a la observada en los pulmones entre las 3 horas y las 48 horas después del reto con la bacteria. En el cuadro No. 4 se muestran los promedios de los valores de UFC/g en los diferentes intervalos de tiempo post-infección.

PATRONES DE DEPURACION BACTERIANA :

4.c). Es gráficamente visible la diferencia entre los patrones de depuración bacteriana de las ratas adultas y ratas recién nacidas (figuras No. 4 y No. 5). Al contrastar los valores de UFC/g encontrados en las ratas de ambos grupos de edad mediante la prueba de varianza por rangos de Kruskal-Wallis, observamos un valor de 17.762, con el cual la diferencia estadística fue significativa para un valor de $p = 0.003$.

Ahora bien, al considerar por separado cada uno de los órganos que cultivamos (cuadros No. 3 y No. 4), observamos mayor cantidad de UFC/g a partir de las 6 horas post-infección y durante más tiempo en el hígado de las ratas RN que en el hígado de las ratas adultas; esta diferencia fue significativa, con una U de Mann-Whitney = 7 y un valor de $p < 0.01$.

A pesar de que los cultivos para Klebsiella pneumoniae fueron positivos por más tiempo en el bazo y los pulmones de las ratas RN que en los de las ratas adultas, la cantidad de UFC/g no fue muy superior en el grupo de ratas RN y las diferencias en la depuración bacteriana esplénica y pulmonar entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas.

RELACION ENTRE BACTERIEMIA Y DEPURACION RETICULOENDOTELIAL :

4.d). En la figura No. 6 se muestran las gráficas de regresión lineal resultantes de los cálculos de correlación, señalados en escala logarítmica de base 10, entre los valores de

UFC/g obtenidos de hígado, bazo o pulmones (abscisas) y los valores de UFC/ml de sangre (ordenadas) encontrados en cada una de las ratas de ambos grupos, adultas y recién nacidas, en los diferentes intervalos post-infección.

La depuración hepática de Klebsiella pneumoniae en las ratas adultas mostró una correlación positiva con la bacteriemia, estadísticamente significativa por una r de Spearman = 0.7143, que corresponde a un valor de $p = 0.036$. En cambio, en las ratas recién nacidas no se encontró correlación significativa entre estos valores (r de Spearman = -0.2375 ; $p = 0.276$).

La depuración esplénica tuvo una correlación positiva con la bacteriemia en ambos grupos de edad. Dicha correlación fue estadísticamente significativa en las ratas adultas con un coeficiente r de Spearman = 0.7857, para una $p = 0.0089$. En las ratas RN esta correlación positiva fue muy notable, con una r de Spearman = 0.8273, para un valor significativo de $p = 0.004$.

La correlación entre depuración pulmonar y bacteriemia fue positiva en ambos grupos de edad, pero sólo fue significativa en las ratas adultas, en las que se observó un coeficiente r de Spearman = 0.8303, que corresponde a una $p = 0.0087$; en tanto que en las ratas RN el coeficiente de correlación de Spearman fue de 0.0375, con un valor no significativo de $p = 0.463$.

CUENTAS DE LEUCOCITOS CIRCULANTES :

5). Las cuentas de leucocitos totales circulantes ($\times \text{mm}^3$) antes de infectar con Klebsiella pneumoniae a las 30 ratas

adultas fueron ($X \pm D.E.$) : $9,680 \pm 4,794$ y en las 20 ratas recién nacidas tomadas como tiempo cero correspondieron a : $2,930 \pm 1,164$.

5.a). Los cambios en las cuentas totales de leucocitos observados a los diferentes intervalos de tiempo post-infección se muestran en el cuadro No. 5. Donde se aprecia que entre las 3 horas y 6 horas post-infección se manifiesta discreta leucopenia, seguida de un pico de leucocitosis a las 12 horas y de un pico de leucopenia entre las 48 horas y 72 horas después del reto con Klebsiella pneumoniae, para después regresar a los niveles basales, persistiendo discreta tendencia a la leucocitosis.

Los cambios observados en las CTL de las ratas RN infectadas fueron más discretos, aunque notablemente diferentes de los observados en las ratas adultas. Hubo un aumento de leucocitos circulantes a las 3 horas del reto con la bacteria, seguido por una fase prolongada de leucopenia entre las 6 horas y 96 horas, otro pico de leucocitosis a las 120 horas y tendencia a la recuperación de los valores basales hacia las 144 horas :

5.b). Los cambios en las cuentas de leucocitos PMNs circulantes también fueron diferentes en los dos grupos de edad. Las ratas adultas presentaron un aumento progresivo de los PMNs que hizo pico a las 12 horas, tras lo cual disminuyeron en forma significativa entre las 48 horas y las 72 horas, mostrando después una tendencia a la recuperación de los valores basales.

En cambio, como se muestra en el cuadro No. 6, las ratas RN

presentaron disminución de los PMNs circulantes desde las 3 horas hasta las 96 horas post-infección y fue hasta las 120 horas que tuvieron un incremento de las cuentas basales de los PMNs en sangre periférica.

5.c). Las cuentas de monocitos circulantes se modificaron durante la sepsis por Klebsiella pneumoniae de la manera que se muestra en el cuadro No. 7. Llama la atención el aumento observado a las 12 horas post-infección en las ratas adultas y que los cambios siguientes son muy parecidos a los encontrados en las CTL.

En las ratas RN, a pesar de que las cuentas de PMNs y las CTL fueron menores a los niveles basales hasta las 96 horas post-infección, las cuentas de monocitos circulantes siempre fueron superiores al valor basal, con excepción de una discreta disminución a las 72 horas, durante el momento de mayor leucopenia.

DISCUSION :

El periodo neonatal representa una etapa crucial de transición para muchos sistemas y funciones. El sistema inmunológico del feto reúne características particulares que son resultado de requerimientos fisiológicos contradictorios; pues, por una parte, la adquisición temprana de una competencia inmunológica completa sería peligrosa para el delicado equilibrio entre el "injerto fetal" y la madre como hospedero; pero, por otra parte, la inmunocompetencia temprana sería muy valiosa para evitar o limitar la eventual transmisión por vía transplacentaria de microorganismos patógenos (68,69).

El resultado de estos requerimientos contradictorios es un complicado compromiso inmunológico, producto de la maduración incompleta de varias subpoblaciones celulares y de la supresión activa de otras funciones y células que se encuentran ya completamente desarrolladas en el feto.

La gran susceptibilidad del neonato a las infecciones es resultado, al menos en parte, de la persistencia de la inmunosupresión o de la maduración incompleta de los mecanismos de defensa que, hasta unas horas antes, correspondían a lo que fue un "injerto fetal".

Considero que la deficiente capacidad de depuración bacteriana del SMF de las ratas recién nacidas que estudiamos, constituye uno de los factores que contribuyen a la mayor susceptibilidad que presentan los huéspedes neonatos a las

infecciones graves y en especial a la septicemia por Klebsiella pneumoniae.

El primer hallazgo interesante en nuestros resultados es la similitud observada en el comportamiento de la bacteriemia por Klebsiella pneumoniae en las ratas recién nacidas al ser inoculadas con una DL-50 de la bacteria por vía ip o por vía sc en la base de la cola (cuadro No. 1).

Este dato resulta muy importante en cuanto al manejo del modelo animal de sepsis neonatal, ya que nos ha permitido contar con un modelo de infección experimental muy confiable cuando utilizamos la vía subcutánea en la base de la cola de animales recién nacidos. La confiabilidad de este método ha sido reportada también por Fisher y cols (36) para su modelo de sepsis neonatal experimental por estreptococos del grupo B en ratas.

Debido a las dificultades técnicas que plantea la vía de acceso ip en los animales neonatos, ya que que su pared abdominal es muy delgada y con frecuencia se pierden cantidades considerables del inóculo, se hace necesario utilizar números grandes de animales para limitar el efecto de variabilidad y obtener resultados confiables. Las ventajas del inóculo sc en la base de la cola que hemos observado sobre la vía ip en animales recién nacidos son:

- a). El volumen de la inyección no se pierde.
- b). El procedimiento es menos traumático.
- c). Los resultados son reproducibles con números pequeños de animales neonatos.

Estas observaciones pudimos confirmarlas también en ratones RN y hámster RN (datos no mostrados en este trabajo), además de lo ya mencionado en las ratas RN. Otras observaciones interesantes que no mostramos en estos resultados fueron la presencia de bacteriemia a partir de los 30 minutos post-infección con una DL-50 de Klebsiella pneumoniae en ratas Wistar RN inoculadas por vía ip o por vía sc. Además, observamos presencia de la bacteria en una tercera parte de los cultivos del cerebro de las ratas RN inoculadas por cualquiera de estas dos vías a las 48 horas de infectarlas con una DL-50 de Klebsiella pneumoniae K-8.

Cuando intentamos el inóculo de la bacteria por vía sc en la base de la cola de ratas Wistar adultas, solamente logramos inducir la formación local de un absceso y la bacteriemia se presentó en pocos animales y de manera inconstante, aún a pesar de que administramos dosis de la bacteria hasta 100 veces mayor que una DL-50 establecida previamente por inóculo ip.

Nuestros resultados nos permiten suponer que la vía de inóculo sc en las ratas RN es útil y confiable para producir sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae, pero no es aplicable a las ratas adultas.

Una vez que consideramos establecido nuestro modelo animal de sepsis experimental, procedimos a investigar el comportamiento de la bacteriemia, la depuración bacteriana y la respuesta de leucocitos circulantes en ratas adultas y contrastamos tales

hallazgos con los que observamos en las ratas RN, no con el afán de comparar dos grupos tan heterogéneos, si no con la finalidad de definir diferencias en el comportamiento de los fenómenos biológicos estudiados.

Así, pudimos observar que las dosis de Klebsiella pneumoniae por gramo de peso corporal requeridas para alcanzar una DL-50 fueron proporcionalmente mayores en las ratas adultas (2.9×10^6 UFC/g) que en las RN (1.25×10^6 UFC/g); lo cual, en principio, nos indica mayor susceptibilidad de las ratas RN a esta bacteria.

La magnitud de la bacteriemia fue significativamente mayor en las ratas RN y la negativización de los hemocultivos fue más temprana en las ratas adultas (figura No. 3 y cuadro No. 2), lo cual indica una función de depuración bacteriana deficiente en las ratas RN. Estas observaciones son semejantes a las reportadas por Reade y cols (85-87) en ratas RN infectadas con Escherichia coli o con Salmonella.

Al estudiar la depuración de Klebsiella pneumoniae en órganos específicos del SRE, observamos en las ratas adultas (cuadro No. 3) un patrón de depuración predominante en el bazo y en el hígado, lo cual es compatible con la actividad fagocítica de depuración esperada en estos dos órganos (91); en tanto que en las ratas RN fue predominante la depuración bacteriana en el hígado (cuadro No. 4). Es notable que en ambos grupos de edad la depuración pulmonar fue mínima.

Estos resultados sugieren en el animal adulto un comportamiento de depuración de Klebsiella pneumoniae similar al

observado por Hosea y cols (45) y Brown y cols (7) en cobayos adultos no inmunes infectados con Streptococcus pneumoniae, con una participación de la depuración esplénica más importante en relación a la hepática cuando los animales fueron infectados con cepas más virulentas (8).

El patrón de depuración hepática predominante que observamos en las ratas RN infectadas con Klebsiella pneumoniae nos hace pensar en la semejanza de nuestros resultados con los hallazgos de estos autores en animales esplenectomizados e infectados con neumococos, situación que incrementa la virulencia de las cepas que utilizaron en sus ensayos (8). De tal manera que también en nuestro modelo de sepsis neonatal experimental podemos sugerir que las ratas RN se comportan con una hipoesplenia fisiológica, tal como fue sugerido por Ozsoylu y cols (20) en sus estudios de depuración reticuloendotelial en ratas RN.

La menor capacidad de depuración pulmonar de Klebsiella pneumoniae que observamos en las ratas adultas parece tener un comportamiento similar a la deficiente depuración pulmonar de neumococos en cobayos adultos cuando se encuentra ya establecido un proceso de septicemia (7,45).

La deficiente capacidad de depuración pulmonar de Klebsiella pneumoniae que encontramos en las ratas RN de nuestro estudio constituye una contribución adicional a la información disponible acerca de esta actividad en ensayos experimentales con animales RN. Diversos estudios han demostrado que diferentes especies de mamíferos (conejos, ratas, ratones) cursan durante la etapa

neonatal con una función deficiente de depuración pulmonar durante infecciones experimentales por Staphylococcus aureus (93,112), Escherichia coli (112), estreptococos del grupo B (94) o Streptococcus pneumoniae (26).

Como puede apreciarse en la figura No- 6, la depuración de Klebsiella pneumoniae en el hígado, el bazo y los pulmones de las ratas adultas se correlacionó en forma positiva y significativa con el grado de bacteriemia; en cambio, en las ratas RN esta correlación positiva sólo se presentó en el caso del bazo y además fue estadísticamente muy significativa.

El hecho de que las ratas RN tengan mayor cantidad de bacterias en el hígado sin correlación directa con la magnitud de la bacteriemia por Klebsiella pneumoniae, nos sugiere la posibilidad de una capacidad deficiente de eliminación de las bacterias en este órgano. En cambio, la correlación positiva del grado de bacteriemia con la cantidad de UFC/g encontrada en el bazo de las ratas RN a diferentes intervalos post-infección sugiere mejor capacidad de este órgano para eliminar las bacterias que retiene o que depura de la sangre, aunque siempre en menor grado que lo observado en las ratas adultas.

Una explicación probable a estos fenómenos es la falta de anticuerpos específicos en los animales RN, situación que limita la capacidad bactericida de sus fagocitos y en especial de los macrófagos hepáticos (9). Cabe también la posibilidad de una opsonización inadecuada por C3b, tomando en cuenta la deficiencia de la activación de la vía alterna en los huéspedes RN (1,61) y

la dificultad para activar la vfa clásica, precisamente por la falta de anticuerpos anticapsulares específicos (40,44,61,68).

Además, es importante considerar que el polisacárido capsular le confiere a Klebsiella pneumoniae propiedades antifagocíticas directas (77) o por bloqueo del depósito de factores del complemento sobre su superficie, lo cual impide su opsonización por la vía alterna e inhibe la capacidad de bacteriolisis del complemento (52).

Otras posibilidades incluyen una pobre expresión de receptores para C3b en las membranas celulares de las células de Kupffer del huésped RN, tal como ha sido observado en animales con quemaduras (27,59), los cuales, por cierto, son también más susceptibles a las bacterias encapsuladas y particularmente a Klebsiella pneumoniae (29).

La deficiencia global en la función de depuración bacteriana de las ratas RN también puede estar relacionada con la menor capacidad de respuesta de sus macrófagos a estímulos de activación (73,89), como son las endotoxinas de las bacterias gram-negativas (58,59); o estar condicionada, simplemente, por la falta de estimulación previa de sus macrófagos (72).

Los cambios que observamos en las cuentas leucocitarias de las ratas infectadas con Klebsiella pneumoniae (cuadro No. 5) muestran que las ratas adultas presentaron una respuesta inicial de leucopenia en las primeras 6 horas post-infección; seguida de un pico de leucocitosis a las 12 horas, con aumento de la

cantidad de PMNs y monocitos (cuadros No. 6 y No. 7), que coincidió con el momento de mayor bacteriemia (figura No. 3). Tales cambios se pueden interpretar como una respuesta inicial de marginación leucocitaria, seguida de una fase de liberación de leucocitos de las reservas medulares hacia la circulación, tal como ha sido descrito en la respuesta a procesos infecciosos agudos (4,12,62).

Las ratas RN presentaron una respuesta temprana de leucocitosis (cuadro No. 5) a las 3 horas de ser infectadas con Klebsiella pneumoniae; sin embargo, incluso hasta las 96 horas post-infección, manifestaron cuentas de leucocitos y de PMNs menores a las basales del tiempo cero (cuadros No. 5 y No. 6) y no se apreció leucocitosis en los periodos de máxima bacteriemia.

Este tipo de cambios pueden ser interpretados como una respuesta rápida y fugaz de liberación de reservas medulares de leucocitos con agotamiento de reservas y/o un aumento sostenido en el compartimiento de leucocitos marginados. Estas observaciones son compatibles con las descripciones recientes y ya clásicas de Christensen y cols (16-20,35) en diferentes modelos animales de sepsis neonatal.

La información generada por este estudio puede ser de utilidad para entender uno de los mecanismos por los cuales el neonato es más susceptible a las bacterias encapsuladas y en particular a Klebsiella pneumoniae. Aunque nuestras observaciones experimentales no son directamente aplicables al ser humano, si pueden sugerir que algo semejante sea lo que sucede en la

respuesta natural del SMF del neonato a este tipo de procesos infecciosos bacterianos, tal como sucede con la respuesta leucocitaria (16-20,62).

Finalmente, nuestros resultados nos permiten concluir que:

a). Establecimos un modelo de sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae en ratas Wistar, tanto adultas como en recién nacidas.

b). La bacteriemia por Klebsiella pneumoniae, después del inóculo de una DL-50, es menor en las ratas Wistar adultas que en las ratas recién nacidas.

c). La depuración hepática, esplénica y pulmonar de Klebsiella pneumoniae en las ratas Wistar adultas es diferente a la observada en las ratas recién nacidas; con discreto predominio de la depuración esplénica en las ratas adultas y un claro predominio de la depuración hepática en las ratas recién nacidas.

d). La depuración esplénica de Klebsiella pneumoniae se correlaciona en forma positiva con el grado de bacteriemia en ratas Wistar inoculadas con una DL-50, tanto en las ratas adultas como en las recién nacidas.

e). La mayor depuración hepática de Klebsiella pneumoniae en las ratas Wistar recién nacidas y la falta de correlación con el grado de bacteriemia puede indicar una deficiente capacidad de este órgano para eliminar las bacterias que depura.

f). La respuesta de leucocitos circulantes en las ratas Wistar recién nacidas con sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae tiende a manifestarse como leucopenia y neutropenia prolongadas y no presenta la fase de leucocitosis observada en las ratas adultas durante el periodo de máxima bacteriemia.

Ahora bien, tal vez una de las aplicaciones más importantes de nuestro modelo de sepsis neonatal experimental es que puede ser utilizado para probar diversas medidas de orden profiláctico y terapéutico, tendientes a corregir las alteraciones que hemos observado en la depuración bacteriana por el SRE de las ratas RN, con la finalidad expresa de su eventual aplicación en humanos.

Entre las medidas que recientemente se han estado probando con éxito, se encuentra la administración de preparaciones de inmunoglobulina para uso intravenoso con anticuerpos específicos contra las bacterias causales de sepsis neonatal, pero que además contienen actividad opsonizante comprobada (60). La transfusión de granulocitos sigue siendo una medida terapéutica coadyuvante de gran utilidad en el tratamiento de los cuadros de septicemia que se manifiestan con neutropenia absoluta (17) y en el caso de sepsis por Klebsiella pneumoniae puede ser también de gran valor, tal como lo sugieren los cambios leucocitarios que hemos observado en nuestro modelo experimental.

Otras posibilidades que parecen prometedoras son la farmacomodulación y la inmunestimulación de las funciones fagocítica y bactericida, tanto en PMNs como en fagocitos

mononucleares. Este es un reto que plantea toda una línea de investigación y que nos hemos propuesto afrontar, con el objetivo de lograr un abordaje profiláctico y terapéutico basado en el mejoramiento, en primer término, de los mecanismos de defensa inespecíficos del neonato contra las infecciones bacterianas agudas y particularmente de la función de depuración del SMF, tomando como prototipo nuestro modelo de sepsis neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae en ratas Wistar (Propuesta para trabajo de tesis de Doctorado en Ciencia Médicas: Mancilla-Ramírez, Javier; 1988).

REFERENCIAS :

1. Adamkin D, Stitzel A, Urmson J, Farnett ML, Post E, Spitzer R. (1978): Activity of the alternative pathway of complement in the newborn infant. J Pediatr 93:604-8.
2. Adler JL, Shulman JA, Terry PM, Feldman DB, Skaliy P. (1970): Nosocomial colonization with kanamycin-resistant Klebsiella pneumoniae, types 2 and 11 in a premature nursery. J Pediatr 77:376-85.
3. Anderson DC, Pickering LK, Feigin RD. (1974): Leukocyte function in normal and infected neonates. J Pediatr 89:420-5.
4. Athens JM, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM. (1961): Leukokinetic studies IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. J Clin Invest 40:989-95.
5. Benacerraf B, Biozzi G, Halpern BN, Stiffel C. (1957): Physiology of phagocytosis of particles by R.E.S. En: Halpern BN, Benacerraf B, Delafresnaye JF, eds: Physiopathology of the reticulo-endothelial system. Oxford, Blackwell Scientific Publications pp:52-79.
6. Blanden RV. (1968): Modification of macrophage function. J Reticuloendothel Soc 5:179.
7. Brown EJ, Hosea SW, Frank MM. (1981): The role of the spleen in experimental pneumococcal bacteremia. J Clin Invest 67:975-82.

8. Brown EJ, Hosea SW, Frank MM. (1981): The role of complement in the localization of pneumococci in the splanchnic reticuloendothelial system during experimental bacteremia. J Immunol 126:2230-5.
9. Brown EJ, Hosea SW, Hammer CH, Burch CG, Frank MM. (1982): A quantitative analysis of the interactions of anti-pneumococcal antibody and complement in experimental pneumococcal bacteremia. J Clin Invest 69:85-98.
10. Brown EJ, Hosea SW, Frank MM. (1983): The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. Rev Infect Dis 5(Suppl 4):797-805.
11. Cairo MS, Worcester C, Rucker R, Bennetts GA, Amile R, Perkin R, Anas N, Hicks D. (1987): Role of circulating complement and polymorphonuclear leukocyte transfusion in treatment and outcome in critically ill neonates with sepsis. J Pediatr 110:935-41.
12. Cartwright GE, Athens JW, Wintrobe MM. (1964): The kinetics of granulopoiesis in normal man. Blood 24:780-803.
13. Casewell MM, Phillips I. (1981): Aspects of the plasmid-mediated antibiotics resistance and epidemiology of Klebsiella species. Am J Med 70:459-62.
14. Cates KL. (1983): Host factors in bacteremia. Am J Med 75(Suppl):19-25.
15. Cates KL, Goetz C, Rosenberg N, Pantschenko A, Rowe JC, Ballow M. (1988): Longitudinal development of specific and

- functional antibody in very low birth weight premature infants. *Pediatr Res* 23:14-22.
16. Christensen RD, Shigeoka AO, Hill HR, Rothstein G. (1980): Circulating and storage neutrophil changes in experimental type II group B streptococcal sepsis. *Pediatr Res* 14:806-8.
17. Christensen RD, Rothstein G. (1980): Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. *J Pediatr* 96:316-8.
18. Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. (1981): The leukocyte left shift in clinical and experimental neonatal sepsis. *J Pediatr* 98:101-5.
19. Christensen RD, Macfarlane JL, Taylor NL, Hill HR, Rothstein G. (1982): Blood and marrow neutrophils during experimental group B streptococcal infection: quantification of the stem cell, proliferative, storage and circulating pools. *Pediatr Res* 16:549-53.
20. Christensen RD, Hill HR, Rothstein G. (1983): Granulocytic stem cell (CFUc) proliferation in experimental group B streptococcal sepsis. *Pediatr Res* 17:278-80.
21. Cline NJ, Lehrer RI. (1968): Phagocytosis by human monocytes. *Blood* 32:423.
22. Cline NJ, Moore MAS. (1972): Embryonic origin of the mouse macrophage. *Blood* 39:842-9.
23. Cocchi P, Marianelli L. (1967): Phagocytosis and intracellular killing of Pseudomonas aeruginosa in premature

infants. *Helv Paediatr Acta* 22:110.

24. Coen R, Grush O, Kauder E. (1969): Studies of bactericidal activity and metabolism of the leukocyte in full-term neonates. *J Pediatr* 75:400.

25. Cohn ZA, Benson B. (1965): The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry and biochemistry. *J Exp Med* 121:153.

26. Coonrod JD, Jarrells MC, Bridges RB. (1987): Impaired pulmonary clearance of pneumococci in neonatal rats. *Pediatr Res* 22:736-42.

27. Cuddy BG, Loegering DJ, Blumenstock FA. (1984): Depression of in vivo clearance function of hepatic macrophage complement receptors following thermal injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 176:443-51.

28. Cryz BJ Jr, Furer E, Germanier R. (1984): Protection against fatal Klebsiella pneumoniae burn wound sepsis by passive transfer of anticapsular polysaccharide. *Infect Immun* 43:139-42.

29. Cryz BJ Jr, Furer E, Germanier R. (1984): Experimental Klebsiella pneumoniae burn wound sepsis: Role of capsular polysaccharide. *Infect Immun* 43:440-1.

30. Domenico P, Johanson WG Jr, Strauss DC. (1982): Lobar pneumoniae in rats produced by clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. *Infect Immun* 37:327-35.

31. Dosset JH, Williams RC, Quie PG. (1969): Studies on interaction of bacteria, serum factors and polymorphonuclear leukocytes in mothers and newborns. *Pediatrics* 44:49.
32. Downie NM, Heath RW. (1973): Contraste de hipótesis: Diferencia de medias. En: *Métodos estadísticos aplicados*. México, Haria. pp:182-203.
33. Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson-Weller A. (1982): Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J Immunol* 128:1278-83.
34. Ellis EF, Smith RT. (1966): The role of the spleen in immunity. With special reference to the post-splenectomy problem in infants. *Pediatrics* 37:111-9.
35. Erdman SH, Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. (1982): Supply and release of storage neutrophils. A developmental study. *Biol Neonate* 41:132-7.
36. Fisher GW, Lowell GH, Crumrine MH, Bass JW. (1978): Demonstration of opsonic activity and *in vivo* protection against group B streptococci type III by Streptococcus pneumoniae type 14 antisera. *J Exp Med* 148:776-86.
37. Fishman M. (1972): Introduction. En: Laskin AI, Lechevalier H, eds: *Macrophages and cellular immunity*. London, CRC. pp:1-2.
38. Forman ML, Stiehm ER. (1969): Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low-birth-weight infants. *N Engl J Med*

39. Frazier JP, Cleary TG, Pickering LK, Kohl S, Ross PJ. (1982): Leukocyte function in healthy neonates following vaginal and cesarean section deliveries. *J Pediatr* 101:269-72.
40. Garcia MIP, Santos JI. (1987): Determinación de anticuerpos de las clases IgA e IgG contra el polisacárido capsular de Klebsiella pneumoniae K-8 en muestras de suero de cordón umbilical, suero de madres en puerperio y calostro materno, por el método de ELISA. Tesis de Licenciatura en Farmacobiología. Laboratorio de Inmunología del Hospital Infantil de México, Universidad Nacional Autónoma de México.
41. Hayward AR, Lawton AR. (1977): Induction of plasma cell differentiation of human fetal lymphocytes: Evidence for functional immaturity of T and B cells. *J Immunol* 119:1213-7.
42. Heidelberger M, Nimnich W. (1976): Immunochemical relationships between bacteria belonging to two separate families: Pneumococci and Klebsiella. *Immunochemistry* 13:67-80.
43. Hill HR, Hunt CE, Matsen JM. (1974): Nosocomial colonization with Klebsiella, type 26, in a neonatal intensive-care unit associated with an outbreak of sepsis, meningitis, and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 85:415-9.
44. Herwitz MA, Silverstein SC. (1980): Influence of the Escherichia coli capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J Clin Invest* 65:82-94.

45. Brown EJ, Hammer CH, Frank MM. (1980): The role of complement activation in a model of adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 66:375-82.
46. Huber H, Fudenberg HH. (1968): Receptor sites of human monocytes for IgG. *Int Arch Allergy* 32:181.
47. Jann K, Jann B. (1977). In: Sutherland J, ed: *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. London y New York, Academic Press. pp:247-287.
48. Johnston RB Jr, Altenburger KM, Atkinson AW Jr, Curry RH. (1979): Complement in the newborn infant. *Pediatrics* 64(Suppl):781-6.
49. Johnston RB Jr. (1984): Recurrent bacterial infections in children. *N Engl J Med* 310:1237-43.
50. Joiner KA, Brown EJ, Frank MM. (1984): Complement and bacteria: Chemistry and biology in host defense. *Ann Rev Immunol* 2:461-91.
51. Karthigasu K, Reade PC, Jenkin CR. (1965): The functional development of the reticuloendothelial system III. *Immunology* 9:67-73.
52. Kasper DL. (1986): Bacterial capsule -Old dogmas and new tricks. *J Infect Dis* 153:407-15.
53. Kauffmann F. (1949): *Acta Pathol Microbiol Scand* 26:381-406.
54. Klein RB, Fisher TJ, Gard SE, Biberstein M, Rich KC, Stiehm

- ER. (1977): Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants, and young children. Pediatrics 60:467-72.
55. Klein JO, Marcy SM. (1983): Bacterial sepsis and meningitis. En: Remington JS, Klein JO, eds: Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 2a ed. Philadelphia, W.B.Saunders. pp:679-735.
56. Kowanko IC, Ferrante A, Maxwell GM. (1987): Effects of neutrophil migration inhibitory factors on neonatal neutrophils. Pediatr Res 21:377-80.
57. Kretschmer RR, Stewardson PB, Papierniak CK, Gotoff SP. (1976): Chemotactic and bactericidal capacities of human newborn monocytes. J Immunol 117:1303-7.
58. Lasfargues A, Ledur A, Charon D, Szabo L, Chaby R. (1987): Induction by lipopolysaccharide of intracellular and extracellular interleukin 1 production: Analysis with synthetic models. J Immunol 139:429-36.
59. Loegering DJ, Blumenstock FA. (1985): Depressing hepatic macrophage complement receptor function causes increased susceptibility to endotoxemia and infection. Infect Immun 47:659-64.
60. Mancilla J, Castellanos MC, Santos JI. (1987): Opsonic activity and protective efficacy of an intravenous immunoglobulin against Klebsiella pneumoniae. Resumen No. 544: 27th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. New York, American Society for Microbiology.

61. **Marodi L, Leijh PCJ, Braat A, Daha MR, van Furth R. (1985):** Opsonic activity of cord blood sera against various species of microorganism. *Pediatr Res* 19:433-6.
62. **Marsh JC, Boggs DR, Cartwright GE, Wintrobe MM. (1967):** Neutrophil kinetics in acute infection. *J Clin Invest* 46:1943-53.
63. **Martinez AJ, Santos JI. (1988):** Sepsis neonatal. Experiencia 1980-1985 del Hospital Infantil de México. *Bol Med Hosp Infant Mex (En prensa)*.
64. **Matoth Y. (1952):** Phagocytic and ameboid activities of the leukocytes in the newborn infant. *Pediatrics* 9:749.
65. **McCracken GH Jr, Eichenwald HF. (1971):** Leukocyte function and the development of opsonic and complement activity in the neonate. *Am J Dis Child* 121:120.
66. **Miller ME. (1969):** Phagocytosis in the newborn infant: Humoral and cellular factors. *J Pediatr* 74:255.
67. **Miller ME. (1971):** Chemotactic function in the human neonate: Humoral and cellular aspects. *Pediatr Res* 5:487.
68. **Miller ME. (1978):** The immune response in the neonate. *En: Host defenses in the human neonate.* New York, Grune & Stratton. pp:43-58.
69. **Miller ME, Stiehm ER. (1983):** Immunology and resistance to infection. *En: Remington JS, Klein JO, eds: Infectious diseases of the fetus and the newborn infant; 2a ed.* Philadelphia, W.B.Saunders. pp:27-68.

70. Mills EA, Thompson T, Bjorkstein B, Filipovich D, Guie PG. (1979): The chemiluminescence response and bactericidal activity of neutrophils from newborns and their mothers. *Pediatrics* 63:429.
71. Montgomerie JZ, Ota JK. (1980): Klebsiella bacteremia. *Arch Intern Med* 140:525-7.
72. Morland B, Midtredt T. (1984): Phagocytosis, peritoneal influx, and enzyme activities in peritoneal macrophages from germfree, conventional, and ex-germfree mice. *Infect Immun* 44:750-2.
73. Murczynska W, Andrzejewski J, Bogunowicz A. (1970): Role of macrophages in the development of immunologic maturity in rat. *Nature* 227:721.
74. Nerurkar LB, Zeligs BJ, Bellanti JA. (1977): Maturation of the rabbit alveolar macrophage during animal development. II. Biochemical and enzymatic studies. *Pediatr Res* 11:1202-7.
75. Notarangelo LD, Chirico G, Chiara A, Colombo A, Rondini G, Plebani A, Martini A, Ugazio AG. (1984): Activity of classical and alternative pathways of complement in preterm and small for gestational age infants. *Pediatr Res* 18:281-5.
76. Orłowski JP, Sieger L, Anthony BF. (1976): Bactericidal capacity of monocytes of newborn infants. *J Pediatr* 89:797-801.
77. Orskov I. (1956): "Immunological paralysis" induced in rabbits by a heavily capsulated Klebsiella strain. *Acta Pathol*

Microbiol Scand 38:375-84.

78. Orskov I, Fife-Asbury MA. (1977): New Klebsiella capsular antigen, K-82, and the deletion of five of those previously assigned. Intern J Syst Bacteriol 27:386-7.
79. Orskov I, Orskov F. (1984): Serotyping of Klebsiella. En: Methods in microbiology. London, Academic Press. 14:143-64.
80. Ozsoyle S, Hosain F, McIntyre PA. (1977): Functional development of phagocytic activity of the spleen. J Pediatr 90:560-2.
81. Pabst HF, Kreth HW. (1980): Ontogeny of the immune response as a basis of childhood disease. J Pediatr 97:319-34.
82. Pahwa SO, Pahwa R, Grimes E, Smithwick E. (1977): Cellular and humoral components of monocyte and neutrophil chemotaxis in cord blood. Pediatr Res 11:677-80.
83. Paik G. (1970). McFarland's nephelometer. En: Branson D, ed: Methods in clinical bacteriology. Illinois, 1980. American Society for Microbiology. pp:106,219.
84. Park SM, Holmes B, Good RA. (1970): Metabolic activities in leukocytes of newborn infants. J Pediatr 76:237.
85. Reade PC, Jenkin CR. (1965): The functional development of the reticuloendothelial system I. Immunology 9:53-60.
86. Reade PC, Casley-Smith JR. (1965): The functional development of the reticuloendothelial system II. Immunology 9:61-66.

87. Reade PC, Turner KJ, Jenkin CR. (1965): The functional development of the reticuloendothelial system IV. Immunology 9:175-84.
88. Reed LJ, Muench H. (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg 27:493-7.
89. Rosenthal AS. (1980): Regulation of the immune response. Role of the macrophage. N Engl J Med 303:1153-6.
90. Rowley D. (1955): Stimulation of natural immunity to Escherichia coli infections. Lancet 1:232.
91. Saba TN. (1970): Physiology and pathophysiology of the reticuloendothelial system. Arch Intern Med 126:1031-52.
92. Schult KE. (1981): Macrophages and resistance of newborn rats to infection. J Reticuloendothel Soc 30:341-6.
93. Sherman M, Goldstein E, Lippert W, Wennberg R. (1977): Neonatal lung defense mechanisms: a study of the alveolar macrophage system in neonatal rabbits. Am Rev Respir Dis 116:433-40.
94. Sherman M, Goldstein E, Lippert W, Wennberg R. (1982): Group B streptococcal lung infection in neonatal rabbits. Pediatr Res 16:209-12.
95. Shigeoka AO, Santos JI, Hill HR. (1979): Functional analysis of neutrophil granulocytes from healthy, infected, and stressed newborns. J Pediatr 95:454-60.

96. Shilo M. (1959): Nonspecific resistance to infection. Ann Rev Microbiol 13:225.
97. Siegel S. (1972): El caso de dos muestras independientes. En: Estadística no paramétrica, 2a ed. México, Trillas. pp:120-187.
98. Solberg CO. (1980): Infections in the immunocompromised host. Scand J Infect Dis 24(Suppl):36-43.
99. Spear CP, Johnston RB Jr. (1984): Phagocyte function. En: Ogra PL, ed: Neonatal infections, nutritional and immunologic interactions. Orlando, Grune & Stratton. pp:21-36.
100. Steigbigel RT, Lambert LH, Remington JS. (1974): Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. J Clin Invest 53:131.
101. Sutherland IW. (1970): Structure of Klebsiella aerogenes type 8 polysaccharide. Biochemistry 9:2180-5.
102. Bvenningsen NW, Békassy AN, Christensen P, Kamme C. (1984): Nosocomial Klebsiella pneumoniae infection: clinical and hygienic measures in a neonatal intensive care unit. Scand J Infect Dis 16:29-35.
103. Tone-Oka T, Nakayama M, Uehara H, Matsumoto S. (1979): Characteristics of impaired chemotactic function in cord blood leukocytes. Pediatr Res 13:148-51.
104. van Furth R, Cohn ZA. (1968): Origins and kinetics of mononuclear phagocytes. J Exp Med 128:425.

105. Vargas A, Jasso L, Gálvez MA. (1980): Frecuencia y etiología de las bacteriemias. Rev Mex Pediatr 47:163-6.
106. Vargas A, Escobedo E, Mercado A. (1985): Epidemiología de las bacteriemias en una unidad de cuidado intensivo neonatal. Bol Med Hosp Infant Mex 42:306-9.
107. Weston WL, Carson BS, Barkin RM, Slater GE. (1976): Monocyte-macrophage function in the newborn. Clin Res 24:182A.
108. Weston WL, Carson BS, Barkin RM, Slater GE. (1977): Monocyte-macrophage function in the newborn. Am J Dis Child 131:1241.
109. Winkelstein JA, Bocchini JA, Schiffman G. (1976): The role of capsular polysaccharide in the activation of the alternative complement pathway by the pneumococcus. J Immunol 116:367-70.
110. Winkelstein JA, Kurlandsky LE, Swift AJ. (1979): Defective activation of the third component of complement in the sera of newborn infants. Pediatr Res 13:1093-6.
111. Wright MC, Ank BJ, Herbert J, Stiehm ER. (1975): Decreased bactericidal activity of leukocytes of stressed newborn infants. Pediatrics 56:579-84.
112. Zeligs BJ, Nerurkar LS, Bellanti JA. (1977): Maturation of the rabbit alveolar macrophage during animal development. III. Phagocytic and bactericidal functions. Pediatr Res 11:1208-11.

NEPELOMETRO DE McFARLAND *

| TUBO No. | BaCl ₂ al 1% (ml) | H ₂ SO ₄ al 1% (ml) | UFC/ml (x10 ⁸) |
|----------|------------------------------|---|----------------------------|
| 1 | 0.1 | 9.9 | 3 |
| 2 | 0.2 | 9.8 | 6 |
| 3 | 0.3 | 9.7 | 9 |
| 4 | 0.4 | 9.6 | 12 |
| 5 | 0.5 | 9.5 | 15 |
| 6 | 0.6 | 9.4 | 18 |
| 7 | 0.7 | 9.3 | 21 |
| 8 | 0.8 | 9.2 | 24 |
| 9 | 0.9 | 9.1 | 27 |
| 10 | 1.0 | 9.0 | 30 |

* Referencia (83).

ANEXO No. 1.

BACTERIEMIA POR Klebsiella pneumoniae EN RATAS RECIENTE NACIDAS,
 SEGUN LA VIA DE INOCULO: INTRAPERITONEAL (ip) O SUBCUTANEA (sc).

| POST-INFECCION (HORAS) | HEMOCULTIVOS POSITIVOS | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | ip (1.1×10^7 UFC) | sc (1.3×10^7 UFC) |
| 0 | 0/10 | 0/10 |
| 3 | 5/9 | 4/6 |
| 6 | 5/5 | 6/6 |
| 12 | 5/5 | 6/6 |
| 24 | 4/4 | 5/5 |
| 48 | 5/5 | 6/6 |
| 72 | 1/3 | 4/6 |
| 96 | N.D. | 3/6 |
| 120 | 5/7 | 2/6 |
| 144 | 3/7 | 3/6 |

N.D.: No determinado. r de Spearman = 0.7917 ; p = 0.0084.

CUADRO No. 1.

MAGNITUD DE LA BACTERIEMIA POR *Klebsiella pneumoniae* EN RATAS
ADULTAS Y RATAS RECIEN NACIDAS, DESPUES DEL INOCULO DE UNA DL-50.

| POST-INFECCION (HORAS) | BACTERIEMIA: X ± ES UFC/ml (CULTIVOS POSITIVOS) | | | |
|---------------------------|---|------------|------------------------|-------------|
| | RATAS ADULTAS | | RATAS RECIEN NACIDAS * | |
| 0 | 0. | (0) | 0. | (0) |
| 3 | 1,213. ± | 1,164. (2) | 10,692. ± | 10,364. (4) |
| 6 | ~100. ± | 0. (3) | 4,750. ± | 4,650. (6) |
| 12 | 1,003. ± | 903. (3) | 131,267. ± | 76,577. (6) |
| 24 | ~100. ± | 0. (3) | 3,280. ± | 3,180. (6) |
| 48 | ~100. ± | 0. (3) | 1,943. ± | 1,442. (6) |
| 72 | ~100. ± | 0. (2) | ~100. ± | 0. (4) |
| 96 | < 100. ± | 0. (1) | 623. ± | 523. (3) |
| 120 | 0. | (0) | ~100. ± | 0. (2) |
| 144 | 0. | (0) | 6,900. ± | 6,800. (3) |

* U (Mann-Whitney) = 11 ; p = 0.0081.

C U A D R O No. 2.

DEPURACION BACTERIANA HEPATICA, ESPLENICA Y PULMONAR EN RATAS
ADULTAS INOCULADAS CON UNA DL-50 DE Klebsiella pneumoniae.

| POST-INFECCION (HORAS) | UFC/GRAMO $\times 10^{-4}$ (X \pm ES) | | |
|---------------------------|---|-------------------|-----------------|
| | HIGADO | BAZO | PULMONES |
| 0 | 0. | 0. | 0. |
| 3 | 124.8 \pm 38.5 | 446.1 \pm 132.1 | 77.9 \pm 71.1 |
| 6 | 71.4 \pm 17.3 | 333.3 \pm 53.0 | 2.7 \pm 1.9 |
| 12 | 28.8 \pm 5.5 | 625.0 \pm 134.0 | 17.8 \pm 9.9 |
| 24 | 19.7 \pm 4.9 | 36.9 \pm 13.3 | 0.24 \pm 0.2 |
| 48 | 11.8 \pm 3.5 | 1.7 \pm 0.9 | 7.9 \pm 7.8 |
| 72 | 2.2 \pm 1.2 | 0.8 \pm 0.5 | 0. |
| 96 | 0. | 0. | 0. |
| 120 | 0. | 0.3 \pm 0. | 0. |
| 144 | 0. | 0. | 0. |

H vs. B: U = 20 (p = 0.31);

Friedman = 6.333 (p = 0.0091).

H vs. P: U = 15 (p = 0.13);

B vs. P: U = 13 (p = 0.082).

C U A D R O No. 3.

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

DEPURACION BACTERIANA HEPATICA, ESPLENICA Y PULMONAR EN RATAS
RECIEN NACIDAS INOCULADAS CON UNA DL-50 DE Klebsiella pneumoniae.

| POST-INFECCION (HORAS) | UFC/GRAMO $\times 10^{-4}$ ($\bar{X} \pm ES$) | | |
|---------------------------|---|-------------------|-----------------|
| | HIGADO | BAZO | PULMONES |
| 0 | 0. | 0. | 0. |
| 3 | 25.3 \pm 11.0 | 88.0 \pm 80.6 | 0. |
| 6 | 398.6 \pm 340.9 | 46.2 \pm 37.3 | 2.0 \pm 1.6 |
| 12 | 1,510.7 \pm 659.4 | 716.5 \pm 295.9 | 14.9 \pm 7.7 |
| 24 | 464.7 \pm 370.1 | 165.8 \pm 131.6 | 11.6 \pm 6.8 |
| 48 | 348.5 \pm 317.3 | 12.9 \pm 12.9 | 0.6 \pm 0.3 |
| 72 | 631.0 \pm 624.7 | 23.9 \pm 21.5 | 27.8 \pm 26.5 |
| 96 | 30.9 \pm 20.8 | 0.9 \pm 0.5 | 0.14 \pm 0.14 |
| 120 | 531.0 \pm 353.2 | 0.3 \pm 0.3 | 0.56 \pm 0.56 |
| 144 | 29.3 \pm 25.4 | 0. | 3.7 \pm 1.8 |

H vs. B: $U = 17$ ($p = 0.034$); Friedman = 11.55 ($p = 0.0031$).
H vs. P: $U = 1$ ($p = 0.0004$);
B vs. P: $U = 23.5$ ($p = 0.122$).

C U A D R O No. 4.

Ratas adultas (cuadro 3) vs. ratas recién nacidas (cuadro 4):
Kruskal-Wallis = 17.762 ; $p = 0.0033$.

MODIFICACIONES EN LAS CUENTAS LEUCOCITARIAS DE RATAS

WISTAR CON SEPSIS POR Klebsiella pneumoniae.

| POST-INFECCION (HORAS) | CAMBIOS DEL VALOR BASAL DE CTL (x mm ³) | |
|---------------------------|---|----------------------|
| | RATAS ADULTAS | RATAS RECIEN NACIDAS |
| 3 | - 2,467. | + 1,553. |
| 6 | - 3,900. | - 830. |
| 12 | + 10,317. | - 497. |
| 24 | - 2,983. | - 180. |
| 48 | - 9,050. | - 863. |
| 72 | - 7,500. | - 1,390. |
| 96 | + 2,067. | - 797. |
| 120 | + 1,333. | + 1,337. |
| 144 | + 5,667. | + 190. |

CUADRO No. 5.

MODIFICACIONES EN LAS CUENTAS DE PMNs DE RATAS
WIBTAR CON BEPSIS POR Klebsiella pneumoniae.

| POST-INFECCION (HORAS) | CAMBIOS DEL VALOR BASAL DE PMNs (x mm) ³ | |
|---------------------------|--|----------------------|
| | RATAS ADULTAS | RATAS RECIEN NACIDAS |
| 3 | + 33. | - 292. |
| 6 | + 258. | - 391. |
| 12 | + 8,895. | - 66. |
| 24 | + 204. | - 279. |
| 48 | - 1,685. | - 622. |
| 72 | - 1,388. | - 758. |
| 96 | - 52. | - 391. |
| 120 | - 767. | + 357. |
| 144 | + 841. | + 310. |

CUADRO No- 6.

**CAMBIOS EN LAS CUENTAS TOTALES DE MONOCITOS CIRCULANTES
EN RATAS MISTAR CON SEPSIS POR Klebsiella pneumoniae.**

| POST-INFECCION (HORAS) | CAMBIOS DEL VALOR BASAL DE MONOCITOS (x mm ³) | |
|---------------------------|---|----------------------|
| | RATAS ADULTAS | RATAS RECIEN NACIDAS |
| 3 | + 35. | + 319. |
| 6 | - 257. | + 81. |
| 12 | + 671. | + 51. |
| 24 | - 397. | + 154. |
| 48 | - 692. | + 9. |
| 72 | - 466. | - 15. |
| 96 | + 421. | + 233. |
| 120 | + 135. | + 614. |
| 144 | + 617. | + 179. |

CUADRO No. 7.

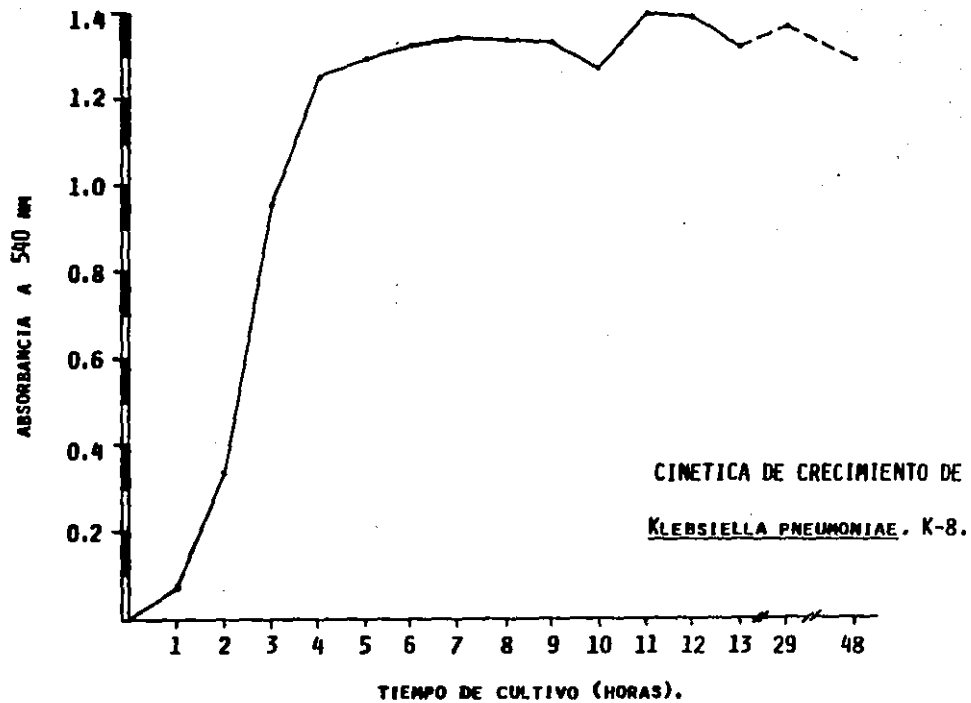


FIGURA No. 1.

NEFELOMETRIA DE McFARLAND, PARA
Klebsiella pneumoniae, SEROTIPO K-8

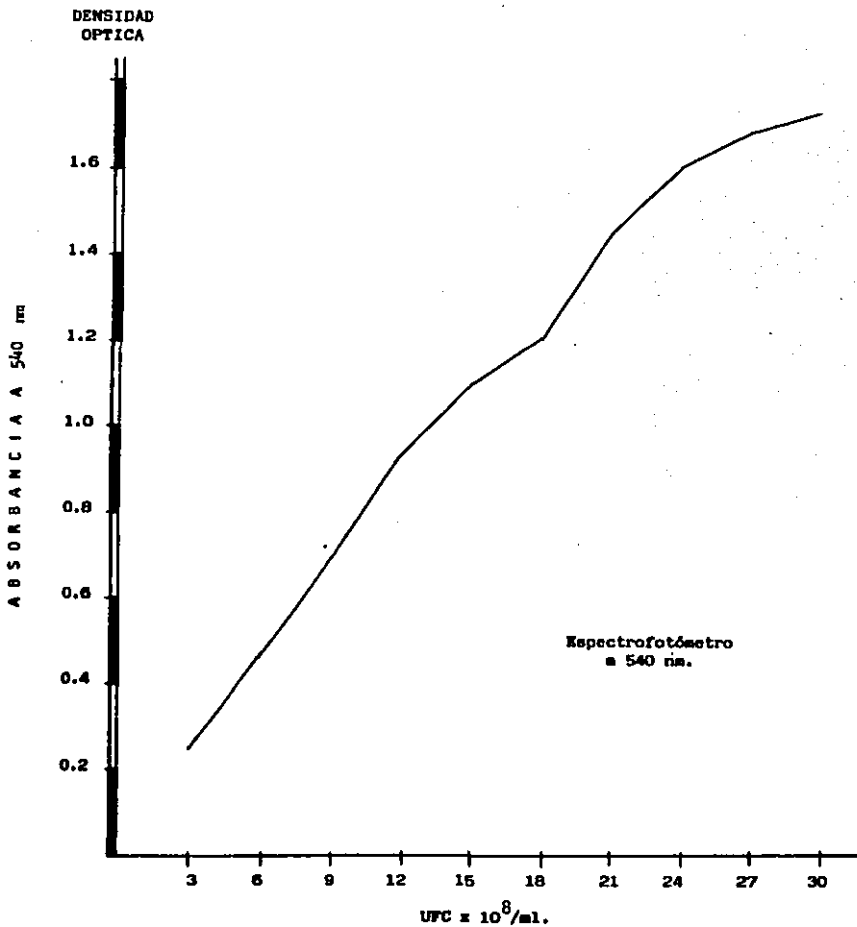


FIGURA No. 2.

BACTERIEMIA EN RATAS WISTAR CON SEPSIS POR KLEBSIELLA PNEUMONIAE.

A). ADULTAS

B). RECIEN NACIDAS

HEMOCULTIVOS

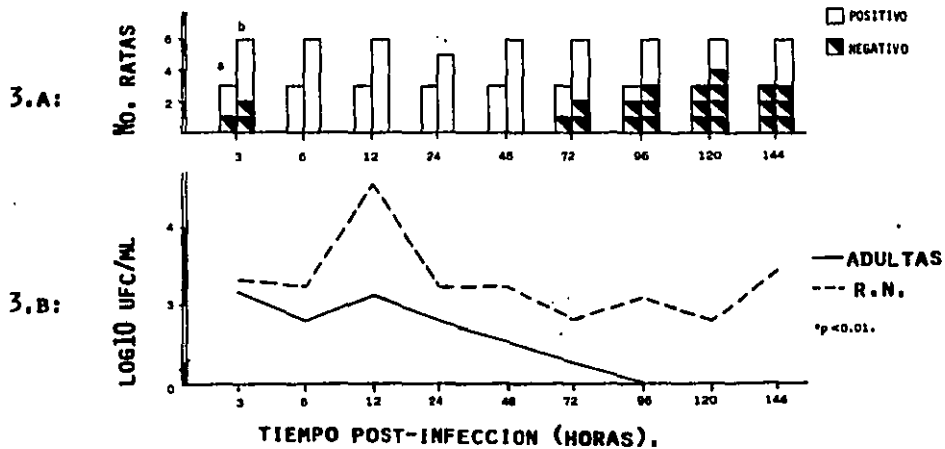


FIGURA No. 3.

DEPURACION DE Klebsiella pneumoniae
EN RATAS WISTAR ADULTAS

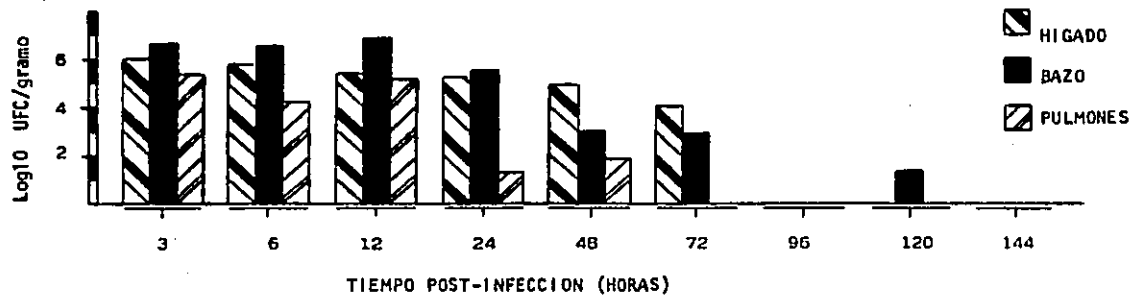


FIGURA No. 4.

DEPURACION DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE
EN RATAS WISTAR RECIENTE NACIDAS.

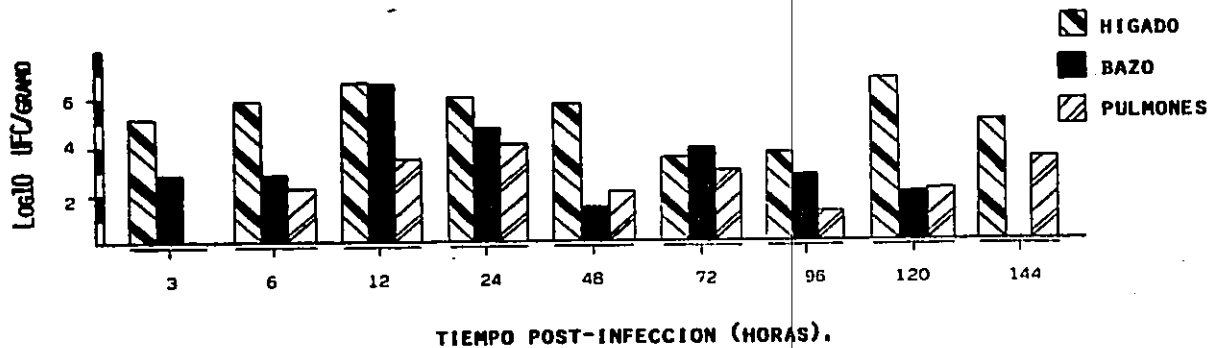


FIGURA No. 5.

FIGURA No. 6.

