

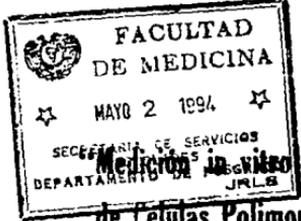
11220 N=1

DE 25.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES: "DR. BERNARDO SEPULVEDA" CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



Medición in vitro de la Quimiocinesis y Quimiotaxis de Celulas Polimorfonucleares de Donadores sanos después de la Aplicación de Extracto Bacteriano

T E S I S :

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN : ALERGIA E INMUNOLOGIA CLINICA

P R E S E N T A : DRA. NELLY CISNEROS GONZALEZ



I.M.S.S.

MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1994.

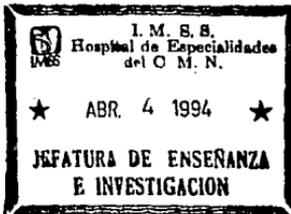


UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



wah

DR. NIELS WACHER RODARTE
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS

[Handwritten signature]

DR. SALVADOR MARTINEZ CAIRAL-CUETO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN
INMUNOLOGIA CLINICA Y ALERGIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**"MEDICION *in vitro* DE LA QUIMOCINESIS Y QUIMOTAXIS DE CELULAS
POLIMORFONUCLEARES DE DONADORES SANOS DESPUES DE LA
APLICACION DE EXTRACTO BACTERIANO**

AUTOR: DRA. NELLY CISNEROS GONZALEZ

**ASESOR: DR. SALVADOR MARTINEZ CAIRO-CUETO
COASESOR: DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO**

CURSO DE ESPECIALIZACION DE INMUNOLOGIA CLINICA Y ALERGIA

MEXICO, 1984.

ANTECEDENTES:

El reclutamiento de las células inflamatorias en los focos infecciosos requiere de la quimiotaxis ; la quimiotaxis se ha definido como el movimiento dirigido de los leucocitos hacia factores llamados quimiotácticos, y que esta inducida por los diferentes gradientes de estos factores.

La quimiotaxis depende del movimiento de los leucocitos y consta de tres fases:

- a) un mecanismo sensorial por el cual la célula detecta la presencia de un estimulante y la dirección del gradiente (significa que es capaz de detectar diferentes concentraciones de moléculas quimioatrayentes del medio ambiente),
- b) un mecanismo traductor por el que la información direccional se transforma dentro del mensaje celular, en esta fase ante el estímulo de factores quimioatrayentes se produce una polarización de las células y distribución de los receptores en la superficie de estas, y c) un mecanismo efector que mediante la transformación mecánica y de motilidad produce polarización y movimiento celular, la velocidad de las células esta determinada por la temperatura y adhesividad de las mismas a las superficies de los tejidos.

Ya se ha mencionado que la quimiotaxis implica un movimiento con dirección y orientación, pero en ocasiones las células pueden moverse al azar siendo llamado este movimiento quimocinesis. La quimocinesis puede ser determinada por sustancias del medio ambiente, es positiva cuando el movimiento al azar se incrementa o negativa si disminuye.

El movimiento celular es dosis-dependiente y puede inhibirse cuando el quimioatrayente se encuentra altas concentraciones (1)

La llegada de las células inflamatorias a los focos infecciosos o traumas requiere de una generación de mediadores químicos (factores quimiotácticos) de microbios u originados del propio huésped, que atraigan leucocitos de una manera vectorial. Esta respuesta migratoria involucra una secuencia compleja de vías efectoras celulares por la ocupación de receptores para factores quimiotácticos en la superficie de las células fagocíticas. El desarrollo de la polaridad de la célula, alteraciones de la adhesividad de la membrana y otras propiedades biofísicas como activación de las proteínas del citoesqueleto y secreción de componentes granulares, contribuyen a la respuesta de movimiento o quimiotaxis de la misma.

La quimiotaxis ha sido demostrada *in vitro* para neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos; una variedad de factores quimiotácticos de las células ha sido caracterizados, como los fragmentos séricos derivados del complemento: C5 C5a des arg C3a, metabolitos del ácido araquidónico, leucotrienos B₄ (LTB₄), factor activador de plaquetas y linfoquinas, estos componentes representan los más importantes quimioatrayentes que regulan la movilización de los neutrófilos o monocitos durante la respuesta a bacterias y hongos.

Alteraciones en los mecanismos humorales o celulares pueden conducir a que las funciones de los leucocitos sean insuficientes, esto puede incluir a desórdenes intrínsecos de funciones efectoras celulares requerido para el movimiento normal, desórdenes caracterizados por inhibidores humorales de la locomoción de los leucocitos, y desórdenes en la formación o inactivación de factores quimiotácticos (2-6).

Los agentes etiológicos de las infecciones elaboran factores quimiotácticos durante la respuesta inflamatoria y la migración de neutrófilos hacia los tejidos.

Los factores quimiotácticos producidos por las bacterias son los llamados péptidos del grupo N-formyl, estos péptidos son los responsables de la iniciación de la secuencia de la síntesis de proteínas en estas células, estos péptidos son potentes quimiotácticos para los neutrófilos (7-11)

Una deficiencia en inhibidores de factores quimiotácticos o la excesiva producción de estos factores pueden causar defectos en la quimiotaxis.

Existen estudios *in vitro* que indican que cuando los neutrófilos se exponen a altas concentraciones de quimioatrayentes pierden la habilidad de responder a subsiguientes exposiciones de factores quimiotácticos, en ciertos pacientes con infecciones bacterianas un defecto de la quimiotaxis puede ser secundaria a desactivación por la circulación de quimioatrayentes que son producidos excesivamente por la reacción inflamatoria o por productos quimiotácticos de microorganismos. La quimiotaxis anormal de neutrófilos reportada en pacientes con enfermedad severa periodontal puede representar la desactivación de leucocitos en la circulación por productos bacterianos contenida en la flora de la boca.(11).

Defectos en el movimiento de los neutrófilos puede resultar en una pobre respuesta inflamatoria y puede existir un incremento en la susceptibilidad a las infecciones (9). Los signos y síntomas de infección en pacientes con quimiotaxis y fagocitosis anormal son frecuentemente retardados porque estos fagocitos arriban tardíamente. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son las

infecciones más frecuentes así como también las infecciones por *Haemophilus influenzae*.

Algunos autores fundamentan que una amplia concentración de bacterias autólogas inducen quimiotaxis de células mononucleares de asmáticos no atópicos no teniendo efecto en los mononucleares de sujetos sanos (12).

Las terapéuticas con extractos bacterianos se han establecido en la mayoría de los casos sin estudios controlados o fundamentados empíricamente, reportando ciertos autores una disminución en la frecuencia de las infecciones (13,14). Los extractos bacterianos utilizados pueden ser polivalentes conteniendo bacterias gram positivas y gram negativas o bien pueden ser monovalentes compuestas de un solo tipo de bacteria como puede ser el *Staphylococcus aureus* . (15-18).

Existen evidencias recientes de que los extractos bacterianos pueden actuar incrementando la resistencia no específica, así como una probable acción inmunomoduladora y reguladora en la respuesta quimiotáctica y fagocítica (19) determinado por estudios realizados en modelos murinos y en células humanas (20,21).

JUSTIFICACION:

Teniendo como antecedentes que el grupo de péptidos N-formyl producido por bacterias pueden ser importantes quimiotácticos a bajas concentraciones , se plantea el siguiente problema.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Puede el extracto de *Staphylococcus aureus in vitro* modificar la quimiocinesis e inducir quimiotaxis de células polimorfonucleares, procedentes de sangre periférica de donadores sanos?

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si el extracto de *Staphylococcus aureus in vitro* puede modificar la quimiocinesis e inducir quimiotaxis de las células polimorfonucleares de sangre periférica de donadores sanos.

OBJETIVO ESPECIFICO:

Medir y comparar la quimiotaxis y la quimiocinesis *in vitro* de células polimorfonucleares obtenidas de sangre periférica de donadores sanos incubadas con extracto completo de *Staphylococcus aureus*.

HIPOTESIS:

El extracto de *Staphylococcus aureus* modifica *in vitro* la quimiocinesis e induce quimiotaxis de las células polimorfonucleares de donadores sanos.

VARIABLES DEPENDIENTES:

Quimiotaxis y quimiocinesis

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Células Polimorfonucleares incubados con extracto de *Staphylococcus aureus*

TIPO DE ESTUDIO. Experimental.

TIPO DE VARIABLES: Cuantitativas continuas.

CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA:

Se estudiaron células polimorfonucleares de treinta donadores sanos

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron células polimorfonucleares (pmn) de donadores sanos de edades entre 18 y 40 años de edad . que acudieron al Banco de Sangre del Hospital Infantil de México "Federico Gomez".

La toma de la muestra de sangre fue realiza por el por personal de enfermería de este servicio .

CRITERIOS DE INCLUSION:

Se incluyeron en el estudio:

Varones de 18 a 40 años de edad.

Diagnosticados como sanos por el personal médico del banco de sangre del Hospital Infantil de México.

CRITERIOS DE NO INCLUSION:

Varones que fueran rechazados por el personal médico del banco de sangre del Hospital Infantil de México.

METODOS:

Los Polimorfonucleares (pmn) se obtuvieron de 5 mililitros de sangre venosa periférica de 30 donadores sanos que acudieron al banco central de sangre del Hospital Infantil de México "Féderico Gómez " las muestras fueron procesadas en el en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biología Celular del Hospital Infantil de México "Féderico Gomez".

La sangre fue obtenida en jeringas desechables estériles , utilizándose como anticoagulante 10 U de heparina por cada mililitro de sangre. La separación de las celulas se realizó siguiendo el método de Boyum (22)modificado.

PROCEDIMIENTO:

La sangre fue obtenida y colocada en tubos de plástico de 15 mililitros , fue diluida y mezclada en solución salina isotónica a volúmenes iguales (1:1), posteriormente se le agregó 2 ml de Ficoll-Hypaque en el fondo del tubo de una densidad de 1.077 (el cual permite la separación por gradiente de densidad y centrifugación de los mononucleares formando un capa en el sobrenadante de los PMN y eritrocitos) por diferencia de densidades la columna sanguínea quedó superpuesta a la capa de Ficoll-Hypaque.; posteriormente se centrifugó 1500 rpm a 37°C durante 25 minutos. Se separan las capas de mononucleares y pmn con eritrocitos y se le agregó solución lítica para lizar a los eritrocitos y quedaran solamente los pmn , se mezcló hasta que obtuvo un color rojo quemado, centrifugando nuevamente a 1500 rpm a 37°C durante 10 minutos, posteriormente se desecho el sobrenadante y se resuspendió el botón

(de pmn) , se agregó en una proporción de 1:1 de solución lítica y se hizo un lavado con solución salina, se centrifugó posteriormente a 1500 rpm 5 minutos a 37°C, tiró el sobrenadante y el botón de pmn se resuspendió en un mililitro de solución de Hank (SSBH) y finalmente se realizó el recuento del número total de pmn obtenidos, con control de la viabilidad.

RECuento DE PMN: El recuento del número de células se realizó en microscopio óptico a inversión, se colocaron las células en un alícuota a dilución 1:4 con solución de Turk (80 µl de colorante y 20 µl de células en suspensión), se utilizó la cámara de Neubauer colocando 20 µl de la suspensión con colorante . Se obtuvo el número de células por cuadrantes y se calculó el número de células/mililitro utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células/ml} = \text{No. de células por cuadrante} \times 5 \times 10^4$$

se ajustaron la células a 2 millones de pmn /ml.

El recuento celular realizado posterior a la separación de la sangre demostró que el 95% de las células obtenidas eran pmn . Así mismo la viabilidad demostró que el 95% de las células se encontraban viables.

VIABILIDAD :

Se corroboró la viabilidad de los pmn con la técnica de colorante de azul de tripano (basada en que las células vivas no se tiñen a diferencia de las muertas que se tiñen de un color azul), se obtuvo una viabilidad no menor del 95%.

METODO DE PREPARACION DEL EXTRACTO CRUDO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Se consiguió la cepa de *Staphylococcus aureus* COWAN 1, se sembró en un medio sólido de agar Sal de Manitol se incubó durante 24 horas en una estufa a 37°C, al siguiente día se tomó una asada y se cultivó en caldo de soya tripticasa incubándose en baño maría a 37°C durante 22 horas, Posteriormente se realizaron tres lavados con solución salina centrifugando a 5,000 rpm durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 8 ml solución de Hank centrifugándose nuevamente a 5,000 rpm durante 15 minutos, una vez mas el botón es lavado y se resuspendió en en 5 ml de SSBH.

Para conocer la concentración de bacterias por mililitro se procedió a determinar turbidez por el Nefelometro de Mc Farland realizando la lectura en el espectrofotómetro, para esto se correlacionó la escala de Mc Farland de densidad bacteriana por ml con densidades ópticas en el espectrofotómetro realizando la lectura a 540 nm de longitud de onda, dando una lectura de 1.242 que es equivalente a 21×10^8 bacterias. Se ajustaron las bacterias a 1000 millones de bacterias por mililitro posteriormente la bacteria muerta por esterilización se obtuvo en una autoclave a 120°C durante 15 minutos

Se realizó la viabilidad sembrando la suspensión de bacterias muertas en agar Sal de Manitol y se realizó determinación de proteínas por el método de Lowry encontrándose una concentración de 53 microgramos/ml.

Se utilizó C5a como quimioatrayente para compararlo con el extracto bacteriano (control positivo) , Este quimioatrayente fue obtenido de suero AB activado . El principio consiste en la activación del sistema del complemento por la vía alterna al incubar el suero con sustancias como endotoxinas, agentes particulados , diversos microorganismos teniendo como resultado la generación de C5a que tiene una importante acción quimioatrayente (23).

El suero AB se obtuvo del Banco de sangre del Hospital Infantil de México, y se separó en alícuotas que se mantuvieron a -70° C hasta su uso.

Como activador del suero se empleó zimosan el cual fue suspendido mediante agitación en vortex, a una concentración de 10 mg/ml .

PREPARACION DE ZIMOSAN: a 200 mg de zimosan se le agregaron 20 ml de solución salina al 0.85% posteriormente se incubó en baño maría a 37°C durante 30 minutos, después se dejó enfriar a temperatura ambiente , se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos y se lavó una vez con solución salina. Posteriormente se obtuvieron alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos , se tiró el sobrenadante y se agregó 20 % de suero AB (200 µl), a continuación se agregó 700 µl de SSBH, se incubó nuevamente a 37°C de CO2 de 25 a 30 minutos, se centrifugó a 3000 rpm durante diez minutos y el sobrenadante, sirvió como quimioatrayente , desechándose el sedimento.

Se utilizó como control de quimioquinesis una solución inerte, la solución de Hank.

El ensayo quimiotactico lo realizamos siguiendo la metodología de Fulk, Goodwin y Leonard (42), empleando una microcamara de Boyden de 48 pozos y filtros de nitrocelulosa de 120 μm de espesor con poros de 3 μm de diámetro los cuales fueron humedecidos en solución balanceada de Gey-Hepes-Albumina antes de su uso.

El quimioatrayente (C5a) y el extracto bacteriano se colocaron en los pozos inferiores, utilizando como testigo (migración al azar o quimioinnesis) solución de SSBH en un volúmen de 30 μl por pozo. Los pmn se colocaron en los pozos superiores en volúmenes de 50 μl de la suspensión celular de $2 \times 10^6/\text{ml}$. La camara una vez con lo mencionado se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante una hora, a cabo de este tiempo se retiró la membrana de quimiotaxis siendo fijada con etanol-agua 1:1 hasta que se realizó la tinción de la misma.

PROCEDIMIENTO DE TINCION DE LA MEMBRANA

Se colocó la membrana 10 minutos en agua destilada hirviendo, posteriormente se tiñó con hematoxilina durante 8 minutos, nuevamente se le agregó agua destilada hirviendo durante 10 minutos, posterior ha esto se le agregó ácido clorhídrico al 0.5% Se colocó la membrana 10 minutos en agua destilada hirviendo, durante 30 segundos se tiñó con cromatropo , siguiendo la colocación en agua hirviendo durante 10 minutos , se le agregó alcohol durante 3 minutos, posteriormente propanol durante 3 minutos .y propanol-xilol 1:1 tambien 3 minutos, después en un caja de Petri estéril con xilol se dejó reposar antes de realizar la lectura.

Después a esto se fijó a un portaobjeto con resina histológica y se dejó secar. La interpretación se realizó según el método de Zigmon y Hirsch (41) utilizando para tal efecto un microscopio de luz convencional, midiendo por observación con el objetivo de 40X la distancia migrada en micras (desde donde se encuentra la mayor densidad de células hasta el plano donde se observen cuando menos cinco células), que se traduce por el recorrido del tornillo micrométrico graduado.

Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado, cada alícuota de las sustancias utilizadas (extracto bacteriano, HHBS y C5a), fue cubierta con papel aluminio para evitar conocer su contenido el cual fué revelado posteriormente, después de la lectura de las membranas (al terminar el proyecto), las lecturas de las membranas también fue realizada por una experta (Química Ma de Lourdes Ortiz) del Laboratorio de Inmunoquímica y Biología Celular del Hospital Infantil de México.

RESULTADOS :

(Ver tabla I y Gráfica I)

Se estudiaron las células pmn de 30 donadores sanos, de edades entre 18 y 40 años de edad. Fueron recopilados en el banco central de sangre del Hospital Infantil de México.

En la tabla I se pueden observar los datos de quimiotaxis y quimioquinesis de las células pmn de los 30 donadores sanos estudiados.

MEDICION DE MIGRACION AL AZAR Y QUIMOTAXIS.

Los recuentos diferenciales realizados después del proceso de separación de las células, demostró que el 95% o más de las células obtenidas fueron pmn. Así mismo la viabilidad controlada con azul de tripano mostró que el 95% o más de los pmn excluían el colorante indicación de que probablemente todas las células obtenidas se encontraban viables. El rendimiento del método empleado, en cuanto al porcentaje de pmn obtenidos a partir del número inicial presente en la sangre extraída, fue del 75% o más.

Si observamos nuevamente la tabla 1, la quimiocinesis tuvo un promedio de $54.6\mu\text{m} \pm 8.8\mu\text{m}$.

La respuesta quimiotáctica a C5a de los pmn fue en promedio de $89\mu\text{m} \pm 12.5$ post incubación de una hora a 37°C y la respuesta quimiotáctica con el extracto bacteriano de *Staphylococcus aureus* de estos niños fue de $103\mu\text{m} \pm 20.1\mu\text{m}$, también post incubación de las células una hora. ($p < 0.001$).

Al comparar por separado los grupos de células en las que utilizó quimiotrayente y la quimiocinesis se obtuvo que el grupo de células incubadas con C5a comparadas con el grupo de células incubadas con solución de Hanks existió diferencia estadística significativa encontrándose una $p < 0.001$

Comparando el grupo de células incubadas con extracto bacteriano de *Staphylococcus aureus* y el grupo de células incubadas con solución de Hanks se encontró también diferencia estadística significativa ($p < 0.001$).

Así mismo se encontró diferencia significativa al comparar el grupo de células incubadas con C5a y el grupo de células incubadas con extracto bacteriano de *Staphylococcus aureus* ($p=0.0002$).

CONCLUSIONES

El extracto completo de *Staphylococcus aureus* Cowan I estimula in vitro la quimiotaxis de las células polimorfonucleares de donadores sanos y es comparable con quimioatrayentes ya conocidos como C5a.

DISCUSION

Sabemos que en la literatura (principalmente europea y japonesa se han propuesto diferentes mecanismos que expliquen el incremento de la quimiotaxis de los PMN ocasionado por extractos microbianos como : hongos, endotoxinas bacterianas, componentes activos de micobacterias y agentes bacterianos poli y monovalente como es Ubinimex un dipeptido activo de *Streptococcus* , al parecer con estos ultimos se ha encontrado inducción de IFN, IL1 así como incremento de la resistencia no específica (actividad de macrófagos y células NK , que explicaría el efecto inmunomodulador del extracto bacteriano .

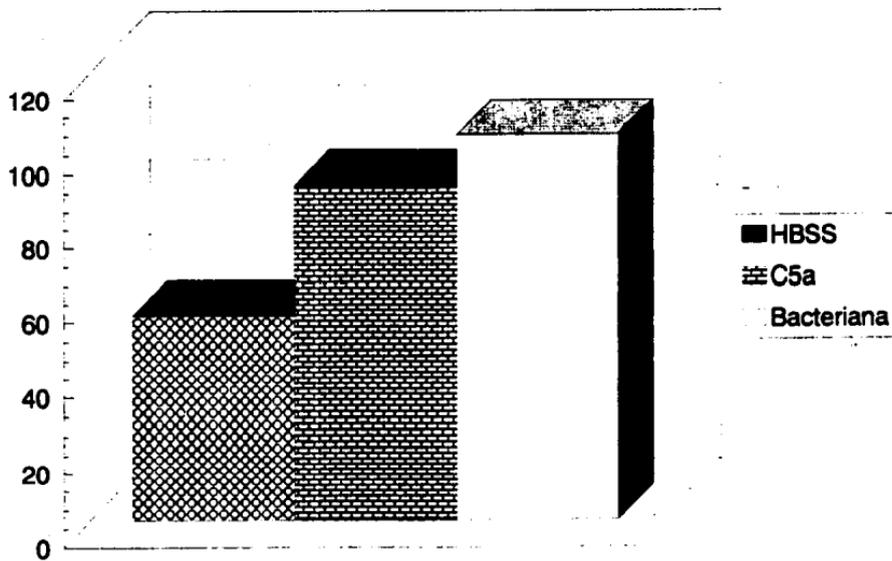
Opinamos que es necesario continuar realizando estudios controlados, donde tanto in vitro como in vivo se confirme o se rechace el efecto sobre la quimiotaxis de las células de primera línea y el estímulo en la producción de citocinas , que se ha propuesto con el uso de extractos bacterianos mono o polivalentes, para a su vez demostrar su beneficio clínico, purificar, estandarizar y reglamentar su uso en el paciente.

TABLA I
EFFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS
SOBRE LA QUIMOTAXIS DE PMN DE DONADORES SANOS

NUMERO	HANK	C5	BACTERIANA
1	50	90	140
2	65	80	100
3	70	80	105
4	65	100	150
5	50	80	110
6	80	90	100
7	66	85	110
8	45	100	150
9	75	120	130
10	58	90	90
11	60	130	110
12	40	80	90
13	60	95	100
14	50	90	95
15	55	90	100
16	54	94	110
17	60	100	90
18	45	85	80
19	60	100	100
20	50	80	85
21	51	85	85
22	45	90	92
23	60	95	100
24	50	80	80
25	55	80	140
26	58	78	90
27	45	85	90
28	45	78	80
29	50	68	70
30	40	95	100
media	54.63±8.85	89.7±12.5	103±20.15

QUIMIOTAXIS Y QUIMIOCINESIS DE DONADORES SANOS

CON LA APLICACION DE EXTRACTO BACTERIANO



HBSS: Solución Hank's

BIBLIOGRAFIA:

1. Wilkinon P C, Haston W S. Chemotaxis: An Overview. *Methods in enzymology* 1988;162:3-17.
2. Turner S R, Campbell J A, Lynn W S. Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis toward oxidized lipid components of cell membranes. *J exp medicine* 1975;141:1437-1441.
3. Senda N, Tamura H, Shibata N, Yoshitake J, Kondo K, Tanaka K. The mechanism of the movement of leucocyte *Exp Cell Res* 1975;91:393-407.
4. Macnab R M, Koshland E. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc Nat Acad Sci* 1972;69:2509-2512.
5. Zigmond S H. Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. *J cell biology* 1978;77:269-287.
6. Malech H L, Gallin J I. Neutrophils in human diseases. *N england J med* 1987;317:687-694.
7. Snyderman R, Smith C D, Verghese M W. Model for leukocyte regulation by chemoattractant receptors: roles of a guanine nucleotide regulatory protein and polyphosphoinositide metabolism. *J Leukocyte Biology* 1986;40:785-800.
8. Marasco W A, Ward P A. Chemotactic factors of bacterial origin. *Methods Ezymology* 1988;162:198-215.

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

9. Williams L T, Snynerman R, Pike M C, Lefkowitz R J. Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc natl acad sci immunology* 1977;74:1204-1062.
10. Schiffmann E, Corcoran B A, Wahl S M. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc nat acad sci* 1975;72:1059-1062.
11. Gallin J I. Abnormal phagocyte chemotaxis: pathophysiology, clinical manifestations and management of patients. *Rev infectious diseases* 1981;3:1196-1220.
12. Howard T H, Winkelstein J A, Tsan M F, Zinkham W H. Observations on the motile behavior of individual neutrophil from a patients with recurrentes bacterial infections . *Blood* 1978;52:1212-1218.
13. Vascotto M, Fossi E, Viancin E, Guerrini L. Efficacy of a polyvalente bacterial vaccine administered by aerosol in the treatment of children with respiratory infections. *Minerva-Pediatr* 1985;37:409-14.
14. Fontana V S, Salinitro A S, Wolte H I, Moreno F. Bacterial vaccine and infectious asthma . *JAMA* 1985;208:1378-1383.

15. Michel F B, Hinterland L D, Pinel A M, Guendon R, Guerrero A, Preault M. Les stimulations immunitaires dans la pre'vention de l' infection respiratoire bact'erienne. *Nouv presse med* 1975;4:333-336.
16. Bessler W G, Kleine B, Martinez Alonso C, Bresert L, Strecker M, Wiesmüller K H. Biological activity of bacterial surface components:bacterial extracts and defined bacterial cell wall components as immunomodulators. *Lung* 1990;suppl1:707-715.
17. Aleksandrowicz, Janaszekw, Fiejka M, Matusiewicz R, Sizielska D. Various immunochemical properties of nonspecific bacterial vaccines. *Med-Dosw Mikrobiol* 1990;42:95-9.
18. Harada H, Kasahara T, Ogota K, Shiori-Nakano K, Kawa T. Effect of staphylococcus aureus COWAN I bacteria on mitogenic response of human B cell subjects. *Immunol* 1982;47:557-67.
19. Kato K, Shiroita K, Dorasawa S, Mizukoshi N, Yamamoto K, Azuma I et al. Staphylococcal enterotoxin a induce interferon (IFN)-production in spleen cell from BCG immunized mice:the IFN production on dependent on leukotriene C4 but not dependent on interleukin 2. *Immunobiol* 1990;181:40-50.
20. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocyte from human blood. *Scand J Clin Lab Med* 1980;95:429-439.

21. Leukocyte Chemotaxis: Microfilter method of evaluation. In: Investigation of phagocytes in disease: SD Douglas, PG Quie, eds. New York: Churchill Livingstone, 1981; pp15-19.
22. Fulk W, Goodwin RH, Leonard EI: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J. Immunol Methods 1980;33:239-247.
23. Zigmond SH, Hoesli JG: Leucocyte locomotion and chemotaxis. J Exp Med 1973;137-410