



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

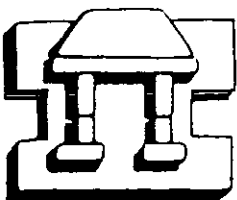
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

29/66!

"PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE PRP (POLIRRIBOSILRIBITOLFOSFATO) DE Haemophilus influenzae TIPO B EN UN MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO"

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: B I O L O G O P R E S E N T A N : ELIA ALVAREZ GOMORA AZENETH BARRERA VARGAS

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ERIC MONROY PEREZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*A Dios:*

*Por regalarme la oportunidad de vivir.*

*A mis padres y hermana:*

*Sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo; quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayuda a conseguirlo fue su apoyo.*

*Con cariño y admiración.*

*A mis asesores:*

*Por su paciencia y conocimientos invaluableles que me condujeron a terminar esta tesis.*

*Azeneth B. U.*

*A mis padres y hermano:*

*Porque me enseñaron a luchar por mis sueños a pesar de las adversidades del destino. Sin ustedes esto no sería posible.*

*Gracias por creer en mí.*

*A Rubén:*

*Por todo tu cariño y apoyo incondicional. Y por darme la fortaleza cuando más lo necesitaba. Gracias.*

*A mis asesores:*

*Por su paciencia y conocimientos invaluableles que me condujeron a terminar esta tesis.*

*Elia A. G.*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL.....	15
METODOLOGÍA.....	16
* SELECCIÓN DE CEPA.....	17
* ABASTO.....	17
* MEDIO DE CULTIVO.....	18
* OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

## RESUMEN

En México *Haemophilus influenzae* tipo b es uno de los agentes que provoca con mayor frecuencia enfermedades infecciosas agudas del aparato respiratorio, provocando gran morbilidad y mortalidad dentro de la población infantil. El principal factor de virulencia de *Haemophilus influenzae* tipo b es la cápsula formada por el polisacárido polirribosilribitolfosfato (PRP). El PRP producido por la bacteria y conjugado con diversos elementos ha sido utilizado para prevenir el proceso infeccioso, por lo que es importante producir masivamente el polisacárido, ampliando con ello la producción del PRP y de esta manera tener mayores posibilidades de erradicar las enfermedades causadas por este microorganismo. Debido a la gran variedad de medios de cultivo empleados para la producción de PRP de *Haemophilus influenzae* tipo b, es necesario encontrar el medio adecuado para promover la máxima productividad del polisacárido, además de un diseño aplicado al medio con el fin de seleccionar el número mínimo de requerimientos nutricionales que promuevan la respuesta deseada y con ello llevar la producción del polisacárido a un nivel industrial en el país y satisfacer las demandas de las vacunas para erradicar y prevenir las enfermedades de *Haemophilus influenzae* tipo b.

En el presente trabajo se evaluó la producción de PRP en 5 cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b, se seleccionó la mejor cepa productora del antígeno y se determinó su máxima producción en un medio de cultivo líquido optimizado, bajo condiciones de cultivo controladas como: T°, pH y aireación.

Se analizaron las características morfo-coloniales (tamaño, color, forma, bordes, elevación, superficie y mucosidad) de las 5 cepas incubadas en placas de agar BHI a 37 C°/ 24hrs, encontrando dos tipos coloniales: "S" (cepa II y 80) y "R" ( cepas I, III, y IV). Posteriormente se seleccionó a la cepa de mayor producción de polisacárido con 15 µg/ml de PRP (cepa I) y se determinaron las condiciones generales del medio de cultivo: estableciendo concentraciones mínimas de 20 mg/l para NAD y 10 mg/l para Hemina. Utilizando el método de presencia y ausencia, se determinó la influencia de casaminoácidos, glucosa y extracto de levadura, componentes principales en el medio INH, sobre la producción del polisacárido determinando que la falta de cualquiera de ellos afectó notablemente la producción. Utilizando el método Box-Wilson (modificado) se estableció la optimización de los nutrientes casaminoácidos, glucosa y extracto de levadura del medio INH, obteniendo después de tres series el medio optimizado con las siguientes concentraciones: 2.5g/l de casaminoácidos, 8.43g/l de extracto de levadura y glucosa, 1.8g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 12.4 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8.1 g/l de NaCl, 20 mg/l de NAD y 10 mg/l de Hemina. Obteniendo concentraciones de PRP de 41.26 µg/ml de PRP en la cepa seleccionada. El siguiente paso fue modificar los parámetros ambientales como: pH, aireación y temperatura, manejados bajo el método de Box-Wilson obteniendo los siguientes parámetros: 7.8 de pH, Temperatura de 36-36.5 C°, aireación (superficie/Volumen) del 80% y r.p.m. de 160. Para dichos parámetros se midió su efecto en el medio de cultivo optimizado teniendo un incremento de 41 µg/ml de PRP a 45 µg/ml de PRP.

Con estos resultados concluimos que el medio INH posee todos los componentes principales de crecimiento, elementales y energéticos para el crecimiento del *Haemophilus influenzae* tipo b, obteniendo un mejoramiento de un 60% de producción de PRP al optimizar los nutrientes del medio de cultivo y sus parámetros ambientales (de 15 µg/ml de PRP en el medio sin optimizar a 45 µg/ml de PRP en el medio optimizado).

## INTRODUCCIÓN

La peligrosidad de algunos organismos patógenos para el hombre, entre ellos ciertas bacterias asociadas a enfermedades respiratorias, han evolucionado considerablemente durante los últimos años; en algunos casos se han llegado a erradicar completamente y en otros se ha controlado su incidencia. Así mismo, se han ampliado los conocimientos científicos y las capacidades tecnológicas para combatir muchas enfermedades, y poder contar así con mejores recursos de diagnóstico y tratamiento. No obstante, conforme avanzan la ciencia y la tecnología, también aumenta la necesidad de conocer más a fondo las características de aquellos microorganismos que siguen provocando padecimientos de gran importancia para el hombre; y así poder controlarlos definitivamente.

Una de las bacterias que continua afectando enormemente la salud humana es sin duda *Haemophilus influenzae*, que llega a producir gran morbilidad y mortalidad dentro de la población principalmente infantil (23).

La clasificación taxonómica de *Haemophilus influenzae* según Bryan (1976), es la siguiente:

1. Grupo: Hemoglobínófilos.
2. Familia: Pasteurellaceae
3. Género: *Haemophilus*
4. Especie: *influenzae*
5. Descubridor: Pfeiffer en 1882.

Sus principales características morfológicas son: Forma de bastones muy pequeños, su agrupamiento celular es generalmente aislado, en pares o esporádicamente en cadenas cortas y a veces forma largos filamentos, miden de 0.2  $\mu\text{m}$  a 0.3  $\mu\text{m}$  de grosor y 0.5  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$  de largo, se tiñe bien con la fucsina fenicada y con el azul de metileno alcalino, son bacterias Gram -

negativas, inmóviles, no esporuladas, y algunas cepas poseen una cápsula de polisacáridos (4). Es precisamente de acuerdo con las características de estas cápsulas, que *Haemophilus influenzae* se clasifica en diferentes grupos que van de la a, a la f, considerando al tipo b como el más peligroso, ya que su cápsula está constituida por el polisacárido polirribosilribitolfosfato (PRP) (figura 1), el cual ha sido considerado como un elemento importante en la patogenicidad de la bacteria, ya que incrementa la virulencia de este organismo debido a que favorece la sobrevivencia del mismo en las mucosas y en otros sitios (11).

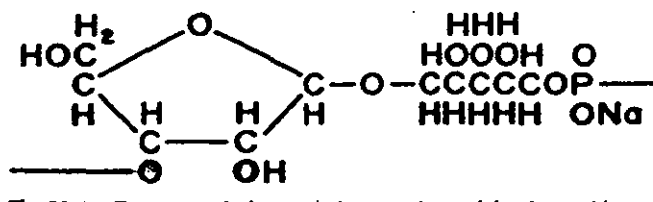


Fig. 1. Estructura de las unidades repetitivas del polisacárido capsular tipo b ( Crisel y cols., 1975)

Ahora bien, desde el punto de vista fisiológico, las condiciones de *Haemophilus influenzae* tipo b incluyen entre otras, una temperatura óptima, que es de 36 a 37°C, es un organismo aerobio estricto; aproximadamente del 40 al 50% de las cepas produce indol, reduce los nitratos a nitritos, y algunas cepas atacan los carbohidratos, pero no fermentan el manitol ni la lactosa. Este organismo al formar parte de la flora autóctona de las superficies mucosas de las vías respiratorias superiores en el hombre, actúa como hospedero natural favoreciendo la existencia de portadores que a menudo provocan la diseminación bacteriana en las comunidades más susceptibles.

Estas características hacen de *Haemophilus influenzae* tipo b un organismo altamente patógeno, siendo su principal factor de virulencia la capacidad de evitar las defensas del huésped, que al poseer cápsulas formadas por polisacáridos evitan su fagocitosis por las células macrofágicas del huésped. La prueba de que el polisacárido capsular es el principal mecanismo de virulencia de *Haemophilus influenzae* tipo b, fue establecida al demostrarse

que vacunas preparadas con el antígeno capsular protegían contra la enfermedad (1).

De esta forma, *Haemophilus influenzae* tipo b ha surgido como causa importante de enfermedades clínicas, aumentando su relevancia como problema de salud pública causando algunas enfermedades tales como meningitis (inflamación de las cubiertas de la columna espinal y del cerebro), infecciones de la sangre, pulmonía, epiglotitis e infecciones de otras partes del cuerpo. Las enfermedades provocadas por *Haemophilus influenzae* tipo b son más comunes en niños de tres meses a tres años de edad, y poco usual en niños de cinco años de edad. Se puede transmitir a través de contacto con moco o gotitas de la nariz y de la garganta de una persona infectada: los síntomas pueden incluir fiebre, vomito y cuello o espalda rígidos. Otros síntomas dependen de la parte del cuerpo afectada, estos aparecen generalmente en menos de 10 días después de la exposición, comúnmente en el plazo de 2 a 4 días; el período contagioso varía y, a menos que esté tratado, puede persistir mientras el organismo está presente en la nariz y la garganta, incluso después que hayan desaparecido los síntomas. Una persona no puede transmitir la enfermedad después de tomar los antibióticos por 1 a 2 días, pero los niños que han tenido alguna de estas enfermedades pueden contraerla otra vez (25).

También existen otras enfermedades menos comunes, pero incluso más graves, ocasionadas por *Haemophilus influenzae* tipo b, que son la epiglotitis y la laringitis obstructiva. El comienzo de la enfermedad es súbito y el curso fulminante, terminando frecuentemente con la muerte dentro de las primeras 24 horas, la infección comienza en la faringe y se extiende a la epiglotis, que se vuelve de color rojo cereza y muy edematosa, y a continuación se desarrolla obstrucción laringea (22).

La etiología de la bronquitis aguda suele ser una infección viral (rinovirus, influenza, adenovirus) por lo que en principio el tratamiento antibiótico no aporta un beneficio claro. Sin embargo, en pacientes con enfermedades crónicas debilitantes se debe administrar tratamiento antibiótico debido a la frecuente sobre infección bacteriana. Los gérmenes que se han aislado con mayor frecuencia son *Mycoplasma pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae* tipo b. En las exacerbaciones agudas de la bronquitis crónica, uno de los



gérmenes que debe cubrirse es *Haemophilus influenzae* tipo b, causante de más del 70% de estos cuadros (8).

De manera general, las principales enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b, sus manifestaciones clínicas y las muestras requeridas para su cultivo, se pueden resumir en la siguiente tabla:

**ENFERMEDADES INFECCIOSAS ASOCIADAS CON *Haemophilus influenzae* tipo b.**

ENFERMEDAD	MUESTRA PARA CULTIVO	MANIFESTACIONES CLÍNICAS
MENINGITIS	LIQUIDO CEFALORAQUIDEO, SANGRE	dolor de cabeza, rigidez cervical, convulsiones, fiebre, más frecuente en niños de un mes a dos años.
LARINGOTRAQUEÍTIS	EXUDADO FARINGEO, SECRECIONES LARINGEAS	puntos inflamados y enrojecidos, edematosos y con exudado amarillo, dolor de garganta con tos.
EPIGLOTITIS	SANGRE, SECRECIONES LARINGEAS	dolor de garganta de inicio y evolución súbitos; disfagia y obstrucción de vías aéreas superiores. Puede requerirse traquetomía.
NEUMONÍA	ESPUTO, ASPIRADO TRANSTRAQUEAL, LAVADO BRONQUIAL	tos, producción de esputo y dolor pleural.

Fuente: Publicación Técnica del INDRE No. 19, 1998

En México, *Haemophilus influenzae* tipo b reviste especial trascendencia ya que es uno de los agentes más frecuentes de las enfermedades infecciosas agudas del aparato respiratorio, que en conjunto provocan una elevada morbilidad que afecta principalmente a la población infantil, son causa de daños severos y algunas pueden conducir a la muerte o provocar secuelas invalidantes que conducen a pérdidas de la fuerza de trabajo con los impactos consecuentes en la economía familiar y nacional (11).

En este caso, es necesario implementar medidas de defensa contra este tipo de enfermedades, y aunque actualmente existen ya una buena cantidad de tratamientos contra *Haemophilus influenzae* tipo b, es necesario continuar con las investigaciones obteniendo medios para combatir en su totalidad a esta bacteria, y así mantener una mayor protección a la salud de la población infantil. Actualmente, los tratamientos más comunes son: la ampicilina y el cloranfenicol, que desgraciadamente no han sido lo suficientemente eficaces para controlar a *Haemophilus influenzae* tipo b y hasta ahora, la ampicilina ha sido el fármaco de elección (22).

Otros tratamientos que hasta la fecha han arrojado algunos resultados satisfactorios, son las cefalosporinas (antimicrobianos) de tercera generación como moxalatran, cefotaxima y ceftriaxona, que constituyen en la actualidad el tratamiento de elección de la meningitis bacteriana por *Haemophilus influenzae* tipo b. Otros antibióticos, como la cefuroxima, también pueden ser útiles, pero su perfil de eficacia y seguridad es inferior al de cefotaxima y ceftriaxona; así mismo, en pacientes alérgicos a los  $\beta$ -lactámicos puede emplearse cloramfenicol y aztreonam, siendo la cepa de *Haemophilus influenzae* tipo b sensible a ambos antibióticos (20).

Una vez probada la eficacia limitada de los tratamientos antes mencionados, en diversos países se procedió a la búsqueda de un método preventivo para evitar y controlar la incidencia de *Haemophilus influenzae* tipo b. De esta manera, en 1970 se comenzó a desarrollar una vacuna, que inicialmente evaluó el uso del polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b para su producción; debido al alto porcentaje de las infecciones invasoras provocadas por este organismo. Esta vacuna estaba constituida por el

polisacárido polirribosil ribitol fosfato (PRP); asociado directamente con el carácter patógeno del *Haemophilus influenzae* tipo b (10).

En un principio las vacunas probadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b estaban hechas a base de su propia cápsula de polisacáridos (16). Sin embargo, este tipo de vacunas tuvo poco éxito, y aunque fue recomendada por la Academia Americana de Pediatría en 1985; tres años después la vacuna de polisacáridos fue reemplazada por las vacunas conjugadas (21).

En 1990 se aprobaron para su uso algunas vacunas conjugadas diferentes, entre las que destaca la vacuna conjugada con la proteína del meningococo (PRP-OMP). Años más tarde se aprobaron las vacunas de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado con toxoide diftérico (PRP/D) y tetánico (PRP/T) (8). Cabe señalar que esta es la vacuna que se ha implementado en el Programa de vacunación quintuple que se desarrolla en México, planteando como nueva meta la erradicación de *Haemophilus influenzae* tipo b.

De esta manera, el PRP producido por la bacteria y conjugado con los diversos elementos mencionados, ha sido utilizado para combatirla; por ello es que resulta de trascendental importancia encontrar una metodología que produzca masivamente este polisacárido, haciéndose necesario conocer las características básicas de los medios de cultivo en que se desarrolla esta bacteria para producirla a nivel industrial, con ello ampliar la producción del PRP y tener mayores posibilidades de erradicar las enfermedades asociadas a la bacteria.

Las principales características de cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b, son: al ser un parásito estricto, requiere dos factores para su desarrollo, denominados X (hemina) y V (nicotinamida adenina dinucleótido ó NAD). Ambos se encuentran en la sangre fresca total. El factor X es termoestable y reemplazable por la hemoglobina o hematina, a la cual parece ser idéntico. El factor V, termolábil, se extrae de levaduras, algunas otras células vegetales y de muchas bacterias. Hay otros factores nutricionales que estimulan el crecimiento de *Haemophilus influenzae* tipo b, tales como el ácido pantoténico, tiamina, uracilo, purina y cisteína (4). También requiere de una

temperatura de entre 36 y 37° C, aireación constante y un pH de aproximadamente 7.0.

Por esta razón, los medios en que generalmente se cultiva el *Haemophilus influenzae* tipo b deben de tener los factores de requerimiento del organismo, estos medios son comúnmente el agar sangre y el agar chocolate; ya que *Haemophilus influenzae* tipo b crece lentamente en caldo de sangre o en agar sangre que contenga sangre de conejo, caballo o cobaya. La sangre fresca humana y la de carnero inhiben el crecimiento, pero pueden usarse para la preparación de agar chocolate, en el que *Haemophilus influenzae* tipo b crece abundantemente. El agar chocolate se prepara agregando sangre a un agar base a 80°C y manteniendo la temperatura a 50°C durante aproximadamente 15 min. o hasta que el medio se torna de color marrón. El calor moderado libera los factores X y V de los hematíes y destruye los inhibidores del factor V sin inactivar al propio factor; en ambos tipos de cultivo, a las 24 hrs se forman colonias transparentes a manera de gotitas; y en otros medios de cultivo, como el Agar-sangre-patata-glicerina, forma colonias arqueadas que parecen gotas de mercurio. Así mismo, en todos los cultivos se ha comprobado que la adición de glucosa y fuentes de nitrógeno fomenta el crecimiento a las colonias (3).

Sin embargo, *Haemophilus influenzae* tipo b no solamente es cultivado en medios sólidos, también se han implementado cultivos de este microorganismo en medios líquidos, que promueven una mayor productividad y crecimiento. En este tipo de medios, bajo determinadas condiciones de aireación y temperatura, se incrementa la obtención del polisacárido capsular (PRP) al ser sintetizado *in vitro* durante el desarrollo de las bacterias, y en un medio amortiguador es obtenido tempranamente en la fase estacionaria a una temperatura de 37°C (18).

De esta manera, la elección de los medios de cultivo líquidos y las condiciones de crecimiento descritos en diferentes investigaciones son variables para que *Haemophilus influenzae* tipo b, pueda ser cultivado en medios con sangre fresca o hemolizada, o en medios con extracto globular que contengan los factores X y V. Su crecimiento puede estimularse por aireación, a un pH de 7.0 y una temperatura de 36-37°C (4). En el aislamiento primario, algunas

Debido a la gran variedad de medios de cultivo empleados para la producción de PRP en *Haemophilus influenzae* tipo b, es necesario encontrar un medio adecuado que promueva la máxima producción del polisacárido, además de un diseño aplicado al medio de cultivo con el fin de seleccionar el número mínimo de requerimientos nutricionales favoreciendo la producción o respuesta de la variable de seguimiento.

La importancia de obtener un medio de cultivo apto para mejorar la productividad de un metabolito deseado ha generado algunas innovaciones sobresalientes como el método Box-Wilson, el cual proporciona una base estadística para la toma de decisiones en la optimización de medios de cultivo (9). Por ello, este método presenta una buena opción para tratar de mejorar la producción de PRP, donde su correcta aplicación permite mejorar tanto las condiciones ambientales del cultivo, como las concentraciones de los nutrientes requeridas por el organismo, favoreciendo la productividad del antígeno capsular.

Dentro de la aplicación del método, el medio de cultivo original puede ser optimizado, esto es, modificando los porcentajes de algunos componentes, obtener un medio de cultivo que proporcione mayor rendimiento en la producción del factor deseado, en este caso PRP de *Haemophilus influenzae* tipo b; haciendo uso de combinaciones entre los cambios en los porcentajes de los ingredientes del medio de cultivo y los costos de los mismos, es factible en muchos casos optimizar un medio de cultivo de tal manera que no solamente sea más productivo, sino que de menor o igual costo que el original.

## ANTECEDENTES

Las investigaciones realizadas para tratar de conseguir una vacuna efectiva contra *Haemophilus influenzae* tipo b, a través de la optimización de medios para la producción del polirribosilribitolfosfato (PRP), se han llevado a cabo en todo el mundo desde la década de los treinta, aunque en un inicio con resultados poco alentadores. Los primeros estudios sobre el tipo y la cantidad específica de la producción del polisacárido capsular (PRP) fueron realizados en 1931 por Margaret Pittman, quien observó las cepas de aislamientos de meningitis, y otras enfermedades relacionadas con *Haemophilus Influenzae* tipo b; Pittman en 1931 clasificó a *Haemophilus influenzae* de acuerdo a sus antígenos capsulares en seis grupos o serotipos, denominándolos con las letras a, b, c, d, e y f, siendo el serotipo b de mayor trascendencia por su patogenicidad en la población infantil. La cápsula que posee *Haemophilus influenzae* tipo b juega un papel importante en la patogenicidad, y en la producción de inmunidad, pero no fue sino hasta la segunda mitad de la década de los setenta, en que algunos investigadores se dedicaron a estudiar la producción del PRP en diferentes medios de cultivo. De esta manera; se observó que la encapsulación de las células en un medio sólido era determinado por iridiscencia, siendo la mayoría del antígeno surgido de colonias jóvenes; también encontró durante su estudio, quince diferentes formas de colonias, habiendo dos tipos principales, las lisas y las rugosas; donde las primeras se distinguieron por su superficie lisa, por ser largas, opacas e iridiscentes, en estas cada bacteria estaba encapsulada individualmente, produciendo una sustancia soluble específica al lavar y filtrar las colonias; por su parte las colonias rugosas fueron más pequeñas y menos opacas, sin la producción de la sustancia soluble. En este experimento las colonias lisas fueron más virulentas para los animales de laboratorio que las colonias rugosas (17).

Para mediados de los setenta, Rae M. estudia la composición química del PRP encontrando que el antígeno capsular tipo específico de *Haemophilus influenzae* tipo b además de tener una unidad estructural compuesta de D-ribosa y fosfato, como se creía hasta entonces, también tenía ribitol; los resultados analíticos de su trabajo mostraron proporciones equimolares de ribosa, ribitol y fosfato (20). A partir de estos resultados, los estudios

posteriores sobre PRP pudieron determinar mayor importancia en la inmunogenicidad de este polisacárido capsular.

Por otra parte, Porter (1972) encontró que la capsulación y la morfología bacteriana pueden deteriorarse por sí mismos después de obtener una cierta densidad bacteriana en la superficie del medio sólido, mientras que el deterioro en un medio líquido fue más gradual, y no se reporta que en este medio el antígeno fuera degradado por la desintegración bacteriana. Dingle y Fothergill encontraron que la adición de glucosa, la neutralización de la acidez y la aireación maximizan el crecimiento bacteriano en un medio líquido (18).

Con base en estos trabajos, los investigadores Porter, Pitt y Smith (1976) estudian la síntesis y liberación de PRP en dos cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b; en este estudio se registró la liberación del polisacárido durante su crecimiento *in vitro*, llegándose a establecer la cantidad y composición del polisacárido sintetizado, concluyendo que en caldo es más gradual la liberación de PRP, y si al mismo tiempo se incluye una buena aireación y se regula el pH a 7.0 y la temperatura alrededor de los 37°C, esto permite una mayor respuesta del organismo, no solo en biomasa, sino también en la producción del polisacárido (18).

Con estos trabajos iniciales se comenzaron a producir las primeras vacunas con el polisacárido, basadas en la producción del mismo bajo las condiciones de cultivo establecidas en estas experimentaciones; de esta manera, en 1985 la Federal Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, autorizó la vacuna del polisacárido capsular *Haemophilus influenzae* tipo b la cual no es inmunogénica en menores de 18 meses de edad. Desde entonces se comenzaron a evaluar las vacunas conjugadas con proteínas, que incluyen el polisacárido capsular PRP asociado covalentemente al toxoide tetánico (T), a proteínas de la membrana externa del meningococo (OMP) o bien, oligosacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b asociado a CRM, que es una molécula atóxica diftérica. En 1987 se autorizó la primera vacuna conjugada la cual resultó ser inmunogénica en niños menores de 18 meses y en 1991 se dejó de recomendar la vacuna de polisacárido solo y se hizo obligatorio en los Estados Unidos la administración en infantes de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (11).

Las técnicas utilizadas para la producción del polisacárido capsular continuaron entonces evolucionando, y para los primeros años de la década de los noventa, se encuentra en el catálogo de técnicas de Massachusetts la precipitación del polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b en sobrenadantes de cultivo mediante la utilización del detergente catiónico hexadecyltrimethylammonium comúnmente llamado cetavión, que actúa sobre el PRP mediante la atracción de cargas; obteniendo bajo ciertas condiciones de temperatura y pH el 80% del polisacárido capsular, precipitado en los sobrenadantes del cultivo.

Con esta nueva técnica y otras ya establecidas para la obtención de PRP y la fabricación de vacunas resultaron ser más efectivas en todo el mundo; así en Europa se comenzó a utilizar masivamente la vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b obtenida de los recientes medios de precipitación y producción de PRP.

Morante (1992) hizo un seguimiento en la Comunidad de Valencia España de enfermedades provocadas por *Haemophilus influenzae* tipo b, llegando a la conclusión de que la incidencia de estas infecciones llegó a ser del 75% en pacientes no vacunados, por lo que se justificó plenamente la vacunación universal contra este microorganismo. Así mismo en España, un trabajo similar en 1996 demostró de la misma manera que la incidencia de *Haemophilus influenzae* tipo b es mucho mayor sin la vacuna. Por ello es que la necesidad de contar con más y mejores vacunas contra *Haemophilus influenzae* tipo b ha aumentado a partir de mediados de los años noventa (15).

En España se llevaban a cabo las campañas de vacunación con las vacunas ya probadas, en otros países europeos como Finlandia, continuaban las pruebas de nuevas vacunas, basadas en la producción masiva del polisacárido PRP, tal es el caso de los investigadores S. Kurikka y colaboradores que en 1995 probaron los efectos inmunológicos de una dosis de PRP de *Haemophilus influenzae* tipo b en la vacunación a los infantes de ese país (12).



Al mismo tiempo en México el Instituto Nacional de Pediatría realizó estudios que demostraron la necesidad de erradicar a los portadores de *Haemophilus influenzae* tipo b a través de la vacunación; y al mismo tiempo de mejorar la eficacia de las vacunas mediante un mejor de obtención y producción del PRP (10).

Posteriormente en 1997, el Consejo Directivo de la Organización Panamericana de Salud (OPS) instó a los Estados Miembros a fortalecer la vigilancia en preparación y la introducción de nuevas vacunas, como la vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b y hepatitis B, y así determinar con exactitud la carga de morbilidad o el impacto de la vacuna y poder formular estrategias de vacunación apropiadas.

Echániz (1999) reportó en la revista *The Lancet* el uso de una vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), elaborada a partir de la producción masiva y el refinamiento del polisacárido capsular del mismo organismo que ocasiona meningitis y neumonía en infantes. Por un lado, se introdujo en el Reino Unido y por otro en Gambia, en altos casos con una alta efectividad. A partir de estos y otros reportes previos provenientes de Norteamérica, Nueva Zelanda, Europa y Chile, donde se probó su efectividad y el bajo rango de consecuencias adversas, la Organización Mundial para la Salud (OMS) y la iniciativa de Vacunación para niños, están considerando recomendar su uso en los programas de inmunización extensiva (6).

Para diciembre de 1999, 81% de todos los recién nacidos de las Américas - 75 % en América Latina y el Caribe- fueron vacunados contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) como parte del plan de vacunación regular, dijo la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2).

De esta forma, las campañas más extensivas de investigación referente a la producción de PRP para la elaboración de la vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b se han dado a partir de los noventa, pero actualmente aún falta mucho por hacer, principalmente en los países en desarrollo, en donde se hace necesario implementar medios que promuevan la productividad de la vacuna (PRP) de una manera industrializada y que sobre todo sea de bajo costo.

## JUSTIFICACIÓN

En nuestro país, la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b se ha comenzado a usar en la población derechohabiente del IMSS y se incluye ya en el Programa Extensivo de Inmunización por lo que se encuentra al alcance de un importante porcentaje de la población. Sin embargo, la búsqueda y reporte de los casos de enfermedad invasora por *Haemophilus influenzae* tipo b merece una atención especial ya que actualmente no existe una producción nacional del polisacárido capsular para satisfacer la demanda total de las vacunas para erradicar y prevenir las enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b, por lo que es necesario continuar con las investigaciones científicas que están dirigidas a producir PRP a un nivel industrial, que reduzca los costos y mejore la productividad a partir de materia prima, es decir, encontrar una metodología apropiada que contemple el medio de cultivo adecuado y la selección de la mejor cepa para favorecer la producción del polisacárido, obteniéndose así la materia prima para la producción de la vacuna en nuestro país.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Producción y cuantificación de PRP (Polirribosilribitolfosfato) de la cepa *Haemophilus influenzae* tipo b en un medio de cultivo líquido que mejore la producción del polisacárido.

### OBJETIVO PARTICULAR

- Evaluar la producción de PRP en cinco cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b
- Selección de la cepa que presente mayor producción del polisacárido capsular.
- Observar la producción de PRP con relación a la descripción de sus características morfológicas y microscópicas de la cepa seleccionada.
- Optimización de un medio de cultivo líquido que promueve la producción de PRP:
  - a) Determinar la concentración mínima requerida del factor X (Hemina) y V (NAD).
  - b) Efecto de la presencia y ausencia de nutrientes en el medio de cultivo líquido.
  - c) Determinar la concentración óptima de los nutrientes por el método "Box-Wilson".
- Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo (T°, pH, aireación y rpm) en la producción del polisacárido capsular.

## MATERIAL

- **Material Estéril para cultivo:**

1. Cajas Petri (con medio de cultivo solidificado BHI, complementando con NAD y Hemina).
2. Matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón y gorro de papel.
3. Micropipetas (sanitizadas) de 0-50  $\mu$ l, 0-100 $\mu$ l, 0-1000  $\mu$ l y puntas (estériles) para micropipeta.
4. Tubos de ensayo (para centrifuga) estériles para inóculo.
5. Tubos de ensayo con rosca.
6. Jeringas de 1 ml, 3 ml y 10 ml.
7. Hisopos.
8. Guantes.
9. Unidades de Ultrafiltración c/membrana de 0.45  $\mu$ m y 0.22  $\mu$ m

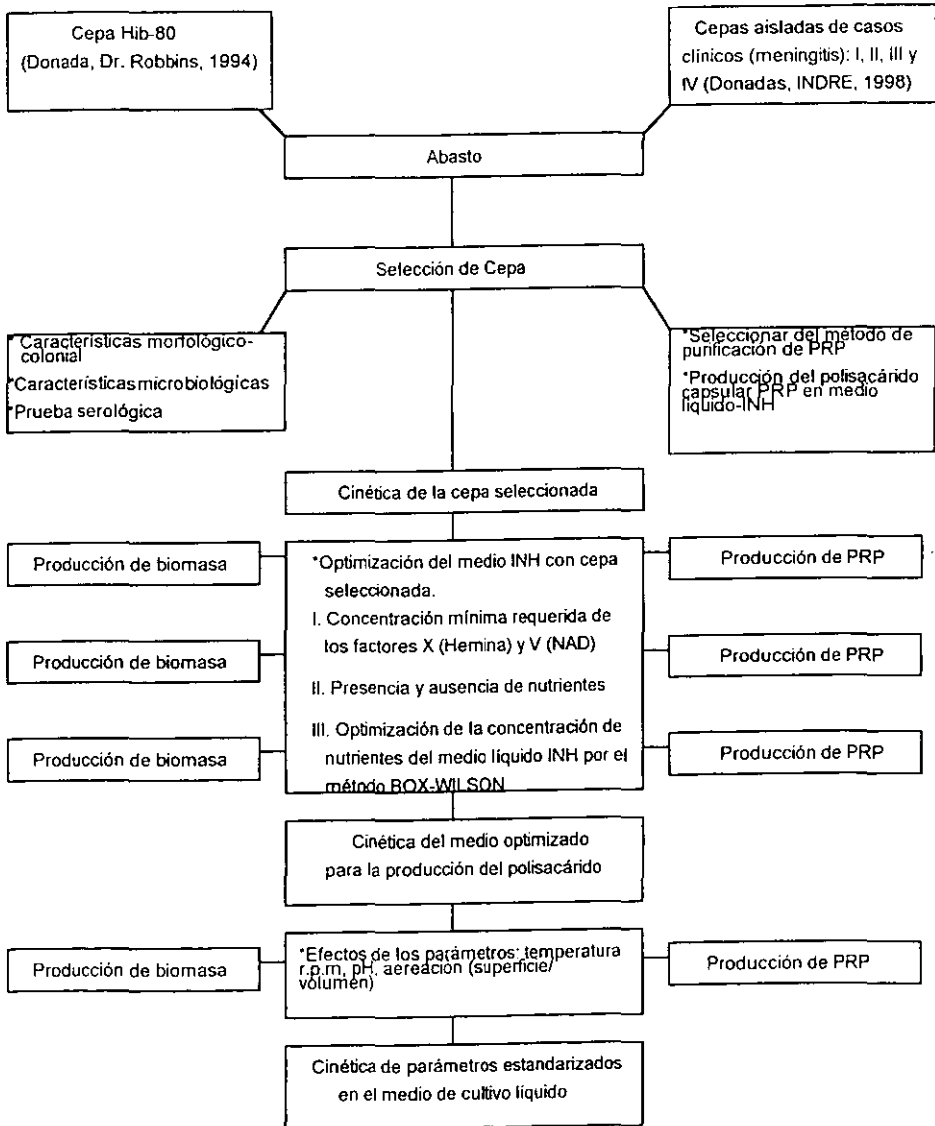
- \* **Material no estéril:**

1. Gradillas
2. Tubos Eppendorff.
3. Celdas para espectrofotómetro.

- \* **Equipo:**

1. Balanza analítica y granataria.
2. Shaker o incubadora con agitación.
3. Espectrofotómetro.
4. Vortex.
5. Centrifuga.
6. Centrifuga para tubos Eppendorff.
7. Bomba de vacío.
8. Rotator.

## METODOLOGÍA



## SELECCIÓN DE CEPA

Para el presente estudio se emplearon 5 cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b las cuales fueron llamadas cepa-80, biotipo I- 098, biotipo II- 119, biotipo III- 035 y biotipo IV- 118. La primera fue donada al INH (Instituto Nacional de Higiene) en 1994, por el Doc. Robbins (Lab. of Developmental and Molecular Immunity the National Institute of Child Health and Human Development), mientras que las otras cepas fueron donadas por el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos), en Noviembre de 1998, caracterizadas por proceder de aislamientos clínicos de niños enfermos de meningitis. En estas cepas se comprobó que sus diferentes características morfológicas están estrechamente relacionadas con la producción del polisacárido capsular.

## ABASTO

Así mismo, con el fin de obtener un abasto suficiente para asegurar la homogeneidad de los resultados que se obtengan en la Selección de Cepa (I, II, III, IV y 80), se realizó un abasto de cada cepa, para lo cual se realizó los siguientes pasos:

En primer lugar, se preparó 4 placas (cajas petrí), con medio BHI (Infusión Cerebro- Corazón) sólido (52 g/l de agar BHI complementado con NAD y Hemina), las cuales se dejaron en prueba de esterilidad a 37°C durante 24 hr; posteriormente se prepararon 100 ml de medio BHI líquido en un matraz Erlenmeyer (52 g/l de caldo BHI, complementado con NAD y Hemina); y una solución al 20% de leche Skim Milk, esterilizada por filtración, dejándose también en prueba de esterilidad a 37°C durante 24 hr.

Después de inocular las placas con *Haemophilus influenzae* tipo b se sembraron mediante la técnica de estría masiva, dejando una placa para ser inoculada mediante la técnica de estría cruzada, esto se dejó incubar a 37°C durante 24 hr.; pasado el tiempo se cosechó el crecimiento celular superficial

de las placas, mediante la adición de solución fisiológica y el raspado de la superficie del agar con ayuda de un hisópo para suspender la biomasa, y se recolectó la suspensión bacteriana. Posteriormente se realizó una inoculación del medio BHI líquido con 10 ml de la suspensión anterior, y se dejó incubando a 37°C durante 24 hr con agitación de 180 r.p.m.; se tomaron 80 ml del medio BHI cultivado y se adicionó 20 ml de la solución estéril de Skim Milk al 20%, todo esto en condiciones totalmente estériles.

Finalmente se llenaron ampolletas o viales estériles con 0.5 ml de la mezcla Skim Milk BHI, y se congelaron a -70°C en nitrógeno líquido para una mejor conservación.

Las bacterias fueron conservadas bajo estas condiciones para posteriormente ser cultivadas durante 24 hrs. en medio sólido BHI y así poder describir sus características morfo-coloniales y microbiológicas utilizando diversas pruebas.

De esta manera, una vez que se llevó a cabo la preparación del abasto, se describieron las características principales del organismo, procediendo a elegir el medio de cultivo más adecuado para la producción del polisacárido capsular, que de acuerdo con los objetivos del presente trabajo fue el siguiente:

## **MEDIO DE CULTIVO**

El medio de cultivo empleado, llamado INH fue obtenido a partir de diversos estudios. Este medio consistió de Ácidos casamínicos al 2% (Difco), Extracto de Levadura dializado al 0.25% -ultrafiltrado en unidad de filtración Nalgene 0.45µm- (Difco); Glucosa al 0.25% (Difco, Merck) y Cloruro de Sodio o Fosfato de sodio como buffer específico. El suplemento X (hemina), fue esterilizado por filtración el cual se utilizó a una concentración de 20 mg/l. El suplemento V, que es un III grado de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) de Sigma Chemical Co., fue esterilizado por filtración de uso a 40

mg/l. Por otro lado el buffer de fosfato (PBS) consistió de 8.1 g/l. de NaCl, 1.8 g/l. de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O y 12.4 g/l. de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por litro.

Componente/ concentración	Concentración requerida por Litro	Stock
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.8 g	0.036 /ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.4 g	0.248 g/ml
NaCl	8.1 g	0.162 g/ml
Casaminoácidos	20 g	0.2 g/ml
Glucosa	2.5 g	0.05 g/ml
Ext. Levadura	2.5 g	0.2 g/ ml
Hemina	20 mg	10 mg/ml
NAD	40 mg	10 mg/ml

Para el ensayo de cuantificación del PRP se seleccionó el método de precipitado por cetavión, siendo la mejor opción, debido a la rapidez de la prueba con relación al método más común para dicho fin, es decir por antisuero de conejo. El ensayo consistió en tomar una muestra de medio líquido (INH) inoculado y centrifugar a 3500 r.p.m. obteniendo el sobrenadante. Se tomó 1 ml de sobrenadante, al cual se le agregaron 50 µl de cetavión al 10%; enseguida se agitó en vortex durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 10,000 r.p.m., durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante; al precipitado resultante se le agregó 1 ml., de agua destilada, agitándose nuevamente en vortex por 5 minutos; se vuelve a centrifugar a 10,000 r.p.m., y se eliminó el sobrenadante, al precipitado se le agregó 1 ml de NaCl al 0.5 M y esto se agitó en rotator durante 30 minutos, con agitaciones intermitentes en vortex; finalmente se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 r.p.m., y se eliminó el precipitado.

Seleccionado el medio de cultivo y estandarizado el método de cuantificación, se prosiguió con la caracterización y selección de las cepas de acuerdo a la capacidad de producción de biomasa y PRP, utilizando como apoyo cinéticas de tal forma que se pudiera describir con mayor facilidad el comportamiento de producción de cada cepa.



Para los ensayos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada matraz 50 ml de medio INH, los cuales fueron inoculados con las cepas, ya previamente cultivadas por 24 h en placas de BHI (infusión cerebro-corazón); a una D.O. 490nm de 0.15-0.20 µg/ml. de inóculo para posteriormente tomar lecturas de 24, 48 y 72 hrs. Así mismo, se tomaron muestras para lecturas de PRP de 1-7, 24, 48 y 72 hrs (Todo esto en condiciones de esterilidad).

Seleccionada la mejor cepa productora de PRP se procedió a la optimización del medio, para lo cual se aplicaron diversos métodos:

## OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Siendo el factor X y V los componentes principales en el crecimiento del *Haemophilus influenzae* tipo b, se determinó la concentración mínima requerida para la producción de PRP. La concentración mínima de estos factores de acuerdo a diversas investigaciones se muestra en la siguiente tabla:

Medio de Cultivo	[NAD]	[Hemina]
I	10 mg/l	5 mg/l
II	40 mg/l	20 mg/l
III	5 mg/l	5 mg/l
IV	20 mg/l	10 mg/l

Posteriormente, se determinó la importancia de cada nutriente del medio INH, en especial: Casaminoácidos, glucosa y extracto de levadura; utilizando un método sencillo de presencia y ausencia de cada nutriente, y así determinar su efecto sobre biomasa y producción del polisacárido.

La presencia o ausencia de los nutrientes en el medio pudo ser medida bajo el siguiente esquema:

Medios / Componente	Bloque	Casaminoaci- dos	Ext. Levadura	Glucosa
I	*	*	*	*
II	*	*	*	-
III	*	-	*	*
IV	*	*	-	*
V	*	*	-	-
VI	*	-	*	-
VII	*	-	-	*
VIII	*	-	-	-

Bloque	[Requerida]	[en 50 ml]	[Stock]
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.8 g/l	0.09 g	0.036 g/ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.4 g/l	0.620 g	0.248 g/ml
NaCl	8.1 g/l	0.405 g	0.162 g/ml
Hemina	20 mg/l	1 mg	10 mg/ml
NAD	40 mg/l	2 mg	10 mg/ml

Nutrientes	[Requerida]	[En 50 ml]	[Stock]
Casaminoácidos	20 g/l	1 g	0.2 g/ml
Ext. Levadura	2.5 g/l	0.125 g	0.2 g/ml
Glucosa	2.5 g/l	0.125 g	0.05 g/ml

\* Presencia de Nutriente.

- Ausencia de Nutriente.

Siendo el objetivo principal del presente trabajo, el diseño de un medio de cultivo con el número mínimo de requerimientos nutricionales que promuevan la respuesta deseada (en este caso la producción de PRP en *Haemophilus influenzae* tipo b), se seleccionó el método que por su facilidad y rapidez permitió alcanzar este fin. Este método seleccionado fue el llamado Box-Wilson (modificado), el cual involucra, el diseño de experimentos factoriales (series), constituidos por una serie de medios de cultivo, donde se variaron las

concentraciones iniciales de los componentes seleccionados en la misma magnitud hacia arriba y hacia abajo de un valor medio (Concentración basal), arbitrariamente decidido, ejemplo:

Matraz/ Nutrientes	Casaminoácidos	Ext. Levadura	Glucosa
I	+	+	+
II	+	+	-
III	+	-	+
IV	+	-	-
V	Medio Basal	Medio Basal	Medio Basal
VI	-	+	+
VII	-	+	-
VIII	-	-	+
IX	-	-	-

- Para las siguientes series después de la inicial, se establecieron como la diferencia entre dos concentraciones basales definidas, por los resultados de la serie anterior.
- Para un medio de cultivo, con componentes seleccionados, con 2 concentraciones por componente (inferior y superior), cada serie estuvo constituida de 2n medios de cultivo.
- Para calcular el coeficiente de Box-Wilson, a los valores de la variable de seguimiento (Producción o liberación de PRP), producidos en cada tratamiento (Medio de cultivo) en una serie, se les asignó un signo (+) ó (-), en función de si la concentración del componente en consideración fue la inferior o la superior, respectivamente

El coeficiente se obtuvo dividiendo la suma de los valores positivos entre la suma de los valores negativos. Si el coeficiente es mayor a la unidad, esto indica que para la siguiente serie la concentración basal del componente en

cuestión será superior a la serie antecedente; en cambio si el valor del coeficiente es por debajo de la unidad indica que para la siguiente serie, la concentración basal del componente en cuestión será inferior con relación a la serie antecedente. Por ejemplo, en la primera serie de optimización del medio INH considerando el método de Box - Wilson, el coeficiente se observa de la siguiente manera:

### Optimización del Medio INH (Box - Wilson) 1ª Serie

Medio / nutrien- tes	Casami- noácidos	Ext. Levadu- ra	Glucosa	Casami- noácidos	Ext. Levadu- ra	Glucosa
	24 horas					
I	+	+	+	+	+	+
	7.0233			7.9100		
II	+	+	+	+	+	+
	6.3400			7.3666		
III	+	+	+	+	+	+
	10.1766			10.6166		
IV	+	+	+	+	+	+
	[30 g/l]	[1.25 g/l]	[1.25 g/l]	8.2057		
	11.2056					
V	[20 g/l]	[2.5 g/l]	[2.5 g/l]	12.5534		
	11.2056					
VI	-	+	-	-	+	+
	14.3517					
VII	-	+	-	-	+	+
	8.3290			9.9466		
VIII	-	-	+	-	-	+
	8.9066			10.1435		
IX	-	-	-	-	-	-
	7.1276			10.1966		

Por último, una vez que fue optimizado el medio, el trabajo de producción masiva del polisacárido capsular de las cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b, se basó en la determinación de los rangos de diversos parámetros

indispensables para promover una mayor productividad de PRP en cada organismo, tales como la temperatura, que es uno de los factores determinantes para la reproducción de las bacterias; así mismo la aireación juega un papel muy importante, ya que se ha demostrado que dependiendo de las variaciones en esta variante la productividad del polisacárido puede aumentar o disminuir, donde los mejores resultados se presentan al exponer a los cultivos a un porcentaje mayor al cincuenta por ciento de aireación y menor al noventa, lo cual está determinado por el mayor o menor número de revoluciones por minuto (r.p.m.), es decir, a mayor r.p.m. mayor oxigenación (este es un factor que también está incluido dentro del presente trabajo); otro factor de gran importancia es el pH bajo el cual se mantuvieron los cultivos, ya que bajo determinados rangos de pH las bacterias se pueden reproducir mejor y tener una mayor producción capsular.

Así, de acuerdo con todos los parámetros observados, *Haemophilus influenzae* tipo b puede presentar un notable aumento de la producción en biomasa (D.O.) y de la producción de PRP.

Cabe mencionar además, que para realizar el presente trabajo se utilizó el método de Box - Wilson para las condiciones de cultivo antes mencionadas, es decir, el porcentaje de aireación, el rango de pH y la temperatura.

En todas las determinaciones se realizaron cinéticas, para su mejor representación sobre el avance en optimización del medio y por tanto en la producción del polisacárido capsular.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### MORFOLOGIA DE LAS CEPAS.

Con el objeto de estudiar la liberación del antígeno capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b, durante el curso del presente trabajo se analizaron las características morfológicas y coloniales de las cinco cepas sometidas a experimentación, lo cual se llevó a cabo después de incubar a 24h / 37°C en placas de BHI complementado con NAD y Hemina.

Las principales características morfológicas estudiadas fueron el tamaño, el color, la forma, los bordes, la elevación, la superficie y la consistencia (mucosidad), así mismo se observó la presencia de cápsula y la pureza de los cultivos con el uso de pruebas de tinción de Gram y de Coagulación. Los resultados obtenidos al respecto se presentan en la siguiente tabla:

TABLA No. 1  
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CEPAS

CARACTERÍSTICAS/ CEPAS	BIOTIPO I HIB-098	BIOTIPO II HIB-119	BIOTIPO III HIB-035	BIOTIPO IV HIB-118	CEPA 80
Tamaño	3 mm	1 mm	1-1.5 mm	2 mm	0.5 mm
Color	Blanco - lechoso	Blanco - transparente	Blanco - lechoso	Blanco - lechoso	Blanco - transparente
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Bordes	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros
Elevación	Elevado - convexo	Elevado - convexo	Elevado - convexo	Elevado - convexo	Elevado - convexo
Superficie	Lisas	Lisas	Lisas	Lisas	Lisas
Aspecto	Húmedas	Húmedas	Húmedas	Húmedas	Húmedas
Transparencia	Translúcida	Muy translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida
Consistencia	Mucoide	Mucoide	Mucoide	Mucoide	Mucoide
Tinción de Gram	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)

Dentro de los resultados observamos 2 tipos de colonias en las 5 cepas: la cepa II y la cepa 80 presentaron las características morfológicas como: formación de colonias bacterianas pequeñas de 1mm de diámetro o menos, de color blanco transparente, circulares, translúcidas y de mediana mucosidad, así como la presencia de baja a mediana respuesta ante la prueba de coagulación (indicando la mínima presencia de cápsula en las cepas); mientras que las cepas I, III y IV presentaron algunas características diferentes, esto fue un tamaño de colonias mayor a 1 mm de diámetro de color blanco lechoso, granulares, opacas, de gran mucosidad y una alta respuesta ante la prueba de coagulación.

Nuestros resultados corroboran lo propuesto por Pittman (1931), quien mencionó la existencia de dos tipos coloniales para *Haemophilus influenzae* tipo b: colonias con características típicas, llamadas "S" ( cepas II y 80) y colonias con características atípicas, llamadas "R" ( cepas I, III y IV). Cabe mencionar que las cepas I, III y IV fueron aisladas de pacientes con meningitis. Varios autores, entre ellos Cohen y colaboradores (1922), Henry (1912), Taylor (1927), Grenkowitz (1929) y otros, mencionaron que las formas atípicas presentan un mayor carácter patogénico (relacionado a su tamaño capsular), siendo aislamientos de casos clínicos principalmente en meningitis, septicemia y artritis. Pittman (1976) igual menciona que el carácter patogénico de las cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b pueden ser relacionados con su morfología colonial y el tipo de aislamiento.

## MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCION DE POLISACARIDOS

Determinadas las características morfológicas se procedió a realizar una selección de las cepas de acuerdo con la liberación de PRP; para lo cual las experimentaciones se realizaron en un medio de cultivo líquido llamado "INH" cuyos componentes y concentraciones originales designados de cada nutriente fueron los siguientes:

1.8 g/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.09 g en 50 ml); 12.4 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.620g en 50 ml); 20 g/l de Casaminoácidos (1g en 50 ml); 2.5 g/l de glucosa y 2.5 g/l de extracto de levadura (0.125 g en 50 ml); 20 mg/l de Hemina (1mg en 50 ml) y 40 mg/l de NAD (2 mg en 50 ml).

*Haemophilus influenzae* tipo b al ser un organismo altamente estricto requiere de un medio de cultivo apropiado. Ello condujo a la utilización de varios factores de crecimiento, elementales y energéticos. Porter y colaboradores (1976) comprobaron que un medio al poseer componentes que proporcionan factores de crecimiento (Factor X y V), elementales (fosfatos y NaCl) y energéticos (glucosa, extracto de levadura y casaminoácidos) favorecen tanto el crecimiento como la liberación del antígeno en cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b.

Designadas las concentraciones originales en el medio de cultivo, se procedió a realizar una selección de las cepas de acuerdo con la liberación de PRP durante 24, 48 y 72 horas a 36°C; también durante la incubación se midió la producción de biomasa a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas; lo que arrojó los siguientes resultados:



**TABLA No. 2**  
**SELECCIÓN DE CEPA**

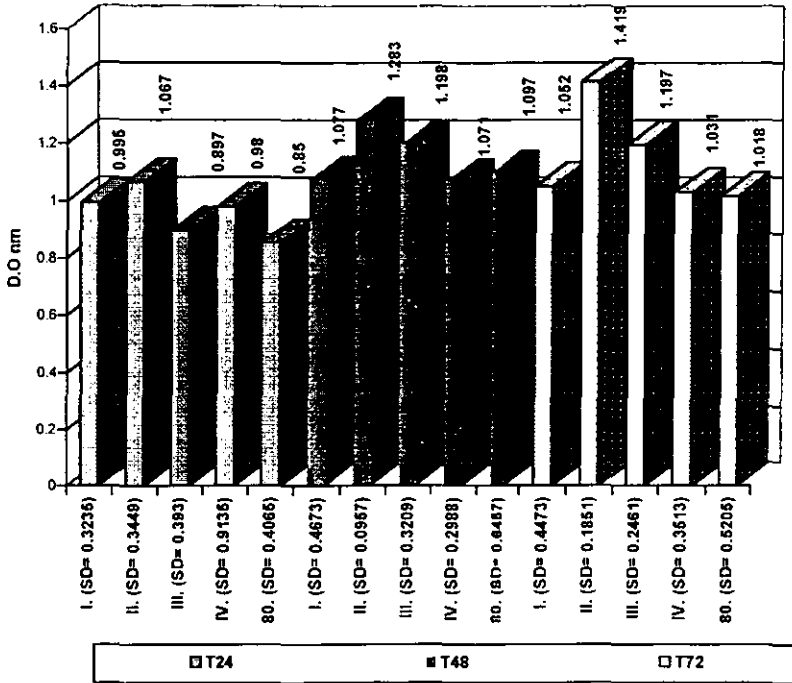
CEPAS / TIEMPOS	PRODUCCION DE BIOMASA ( D.O. 490 nm)				PRODUCCION DE PRP µg/ml (670nm)		
	D.O	D.O	D.O	D.O	PRP	PRP	PRP
	0.2147	0.7998	0.6241	0.6284	12.7477	24.3147	21.0960
I	0.1564	0.8172	1.3572	1.5201	15.386	11.0788	13.3093
	0.1747	1.3687	1.0500	1.0101	8.4348	12.4060	13.1491
X	0.1816	0.9952	1.0776	1.0528	10.9397	15.9331	16.0181
II	0.2006	0.6761	1.2120	1.2622	0.3455	0.8205	1.1815
	0.1260	1.1996	1.3925	1.5236	10.3549	10.0514	12.527
	0.2389	1.3274	1.2470	1.3727	0.6875	1.9246	2.0081
X	0.2224	1.3573	1.2888	1.195	10.7626	10.9321	14.807
III	0.1643	0.6770	0.9851	1.1081	8.8525	16.4368	16.2999
	0.1434	0.5545	1.5679	1.4755	10.0953	10.9660	13.5875
	0.1765	1.3514	1.0434	1.008	6.4043	13.2482	13.9201
X	0.1404	0.9976	1.1988	1.1972	7.784	13.55	14.6025
IV	0.1703	0.5703	0.7395	0.6376	7.7492	16.4882	10.4848
	0.1202	0.9747	1.8196	1.3132	10.1730	9.9834	13.4459
	0.1699	1.3973	1.1544	1.1428	10.3360	13.3050	13.7382
X	0.1701	0.9807	1.0741	1.0312	10.0860	13.2588	12.5563
80	0.1143	0.4918	0.4768	0.5237	0.4517	0.8151	0.6869
	0.1467	0.516	1.7657	1.5614	10.3795	0.8297	10.9688
	0.1865	1.2890	1.0496	0.9698	0.3570	0.8432	0.8592
X	0.1666	0.85441	1.0973	1.0183	10.3980	0.8299	10.6376
					4.7288	7.5612	7.1189

\*D.O=DENSIDAD OPTICA

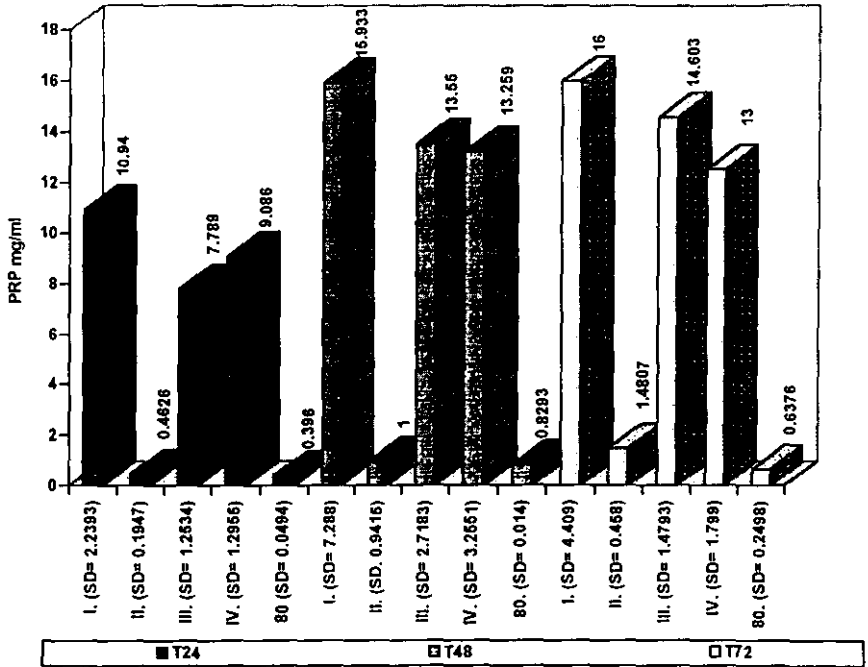
\*T= TIEMPO DE INCUBACION EN HRS

En la tabla 2 se aprecia perfectamente que la cepa 80 y la cepa II presentaron la más baja concentración de la liberación de PRP durante los tres periodos de tiempo, teniendo como máxima liberación 1 µg para la cepa 80 y 2 µg para la cepa II de PRP por ml de cultivo a las 72 horas. No obstante, para poder distinguir más ampliamente las diferencias de producción entre una cepa y otra, se utilizo la desviación estándar como método estadístico (gráfica 1-A).

**GRÁFICA No. 1**  
**SELECCIÓN DE CEPA.**  
**PRODUCCION DE BIOMASA ( D.O. 490 nm )**



GRÁFICA No. 1-A  
SELECCIÓN DE CEPAS  
PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g/ml}$



En la gráfica 1 se muestra la producción de biomasa (D.O.) de las cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b durante los 3 periodos de tiempo hasta la obtención en la fase estacionaria, la cual se presentó a las 72 hrs. Después de la fase estacionaria, finalmente todas las cepas detienen su crecimiento a una densidad óptica de 1nm, es importante mencionar que todos los cultivos iniciaron con un inoculo de D.O. 0.2 nm. Con lo anterior se estableció que la obtención de un buen crecimiento depende principalmente de la cantidad de inoculo.

En la gráfica 1-A muestra la producción de PRP en el cultivo, apreciándose una buena liberación en las cepas I, III y IV que corresponden de 7µg a 15µg / ml de PRP en el periodo de 24 a 48 hrs; mientras que las cepas II y 80 a pesar de tener un buen crecimiento celular ( gráfica 1) fue mínima la liberación de PRP, obteniendo la fase estacionaria con una liberación de 0.6µg a 1µg/ml.

La relación de las gráficas anteriores (gráfica 1 y 1-A) muestra que en la producción de biomasa de las cepas I, III y IV existen variaciones considerables en el T24 hrs en relación con el T48 hrs, pero las variaciones entre este último y T72 hrs son muy pequeñas, lo cual se refleja en la producción de PRP que difiere notablemente entre T24 y T48 hrs, pero no así entre T48 y T72 hrs, lo que sugiere que si hay diferencias significativas de producción de iniciado el cultivo hasta pasadas las 48 horas, y que estas diferencias ya no son tan significativas al llegar a las 72 horas.

Lo anterior es corroborado al analizar la desviación estándar de cada tiempo en la producción de PRP (gráfica 1-A), ya que existe una diferencia sumamente considerable en la cepa I de 2.23 ( T24 hrs) hasta 7.28 ( T48 hrs), lo que sugiere que en este periodo la producción, al menos en esta cepa es elevada; mientras que entre el T48 y el T72 solo existe una pequeña diferencia siendo en este caso para la misma cepa la diferencia de sólo 2.8 unidades siendo menor a las del caso anterior; esto confirma que no existe diferencias significativas en la producción de PRP una vez pasadas las 48 horas de incubación. Con relación al comportamiento estable durante el crecimiento y producción del antígeno capsular se seleccionaron las cepas I, III y IV.

Luego de haber seleccionado las mejores cepas productoras de PRP, se procedió con la experimentación y se realizó una cinética de las cepas I, III y IV, en donde se observó el crecimiento y la liberación de PRP en distintos intervalos de tiempo; tiempo de 0 a T7 horas, T24, T48 y T72 hrs todo a 36°C con agitaciones de 120-160 r.p.m. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

**TABLA No. 3**  
**CINÉTICA DE LAS CEPAS I, III Y IV**  
**PRODUCCION DE BIOMASA D.O. (490 nm)**

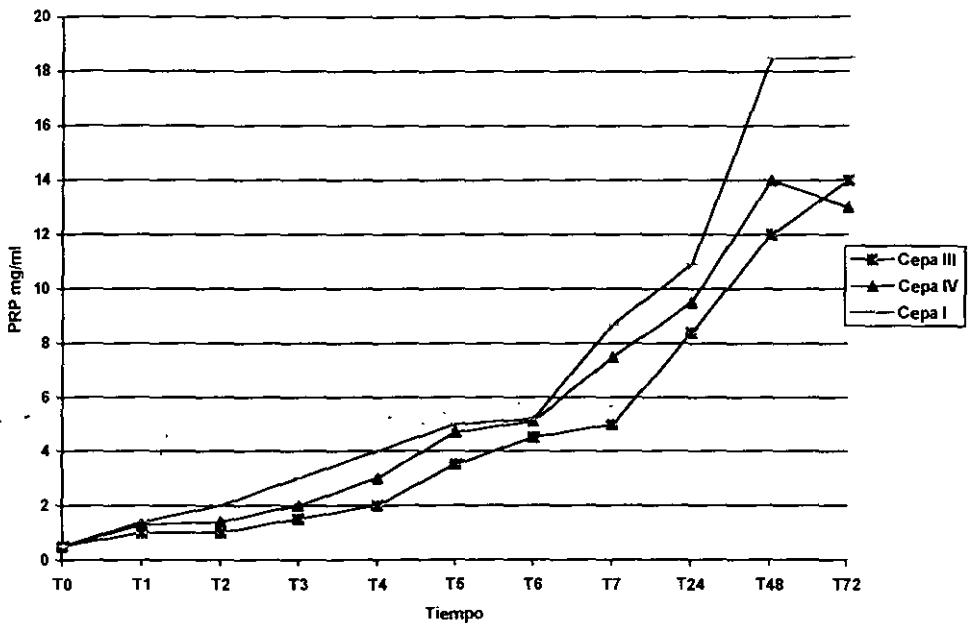
Cepas / tiempo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T24	T48	T72
I	0.2500	0.2650	0.3620	0.5810	0.7760	0.7157	0.7722	0.8041	1.4460	1.3811	1.3375
x	0.0210	0.2432	0.3204	0.4912	0.7382	0.7342	0.7502	0.7694	1.2032	1.2013	1.0194
SD	0.2255	0.2541	0.3362	0.5361	0.7571	0.7249	0.7612	0.7867	1.3246	1.2912	1.1784
SD		0.0154	0.0294	0.0634	0.0267	0.0130	0.0155	0.0245	0.1716	0.1278	0.2249
III	0.1643	0.2432	0.3692	0.3972	0.5694	0.7609	0.7943	0.8004	1.0290	1.2942	1.2906
x	0.1891	0.2284	0.3841	0.4486	0.6682	0.7146	0.8001	0.8341	1.1313	1.1381	1.2201
SD	0.1767	0.2358	0.3666	0.4229	0.6188	0.7377	0.7972	0.8172	1.0801	1.2161	1.2553
SD		0.0104	0.0105	0.0363	0.0698	0.0327	0.0041	0.0238	0.0723	0.1103	0.0498
IV	0.1703	0.2849	0.3142	0.4204	0.6391	0.7346	0.7702	0.7614	1.0042	1.1524	1.1424
x	0.1999	0.3001	0.3891	0.4614	0.6482	0.7981	0.8941	0.8416	1.1691	1.2142	1.2201
SD	0.1851	0.2925	0.3516	0.4409	0.6432	0.7663	0.8321	0.8015	1.0866	1.1833	1.1812
SD	0.0107	0.0734	0.0289	0.0064	0.0449	0.0876	0.0567	0.1166	0.0436	0.0549	

TABLA No 3-A  
CINÉTICA DE LAS CEPAS I, III Y IV  
PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ( 670nm )

Cepas Tiempo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T24	T48	T72
I	8.8350	1.2500	2.0300	3.4340	5.005	5.3660	6.851	8.4971	10.485	17.6900	17.9482
X.	0.8291	0.9983	1.7219	2.8324	4.0753	4.9901	6.4382	8.7214	11.0123	18.5301	18.3241
X.	0.8320	1.1241	1.8759	3.1332	4.5401	5.175	6.6446	8.5742	10.749	18.11	18.1361
SD		0.1769	0.2178	0.4253	0.5739	0.2658	0.2918	0.1586	0.3728	0.5940	0.2658
III	0.6671	0.7849	0.9482	1.6241	2.4372	3.1207	3.9214	4.6214	7.4982	10.4901	14.8201
X	0.6546	0.8691	0.9236	1.5692	2.3690	3.4381	4.0129	5.1419	8.5106	13.1492	13.0961
X	0.6608	0.827	0.9359	1.5966	2.4031	3.2794	3.9671	4.8816	8.0044	11.8196	13.9581
SD		0.0595	0.0173	0.0388	0.0482	0.2244	0.0647	0.3680	0.7158	1.8802	1.2190
IV	0.6942	0.7249	1.1404	2.4102	3.9041	4.2389	5.6651	7.8358	9.1624	13.3529	13.4381
X	0.8103	1.0396	1.5693	2.5346	4.1300	4.9682	5.9283	7.9741	10.1482	13.8324	13.2482
X	0.7522	0.8822	1.3548	2.4724	4.017	4.6035	5.7967	7.9049	13.5926	13.5926	13.3431
SD		0.2225	0.3032	0.0879	0.1597	0.5156	0.1861	0.0977	0.6970	0.3390	0.1342

En las tres cepas seleccionadas, durante el periodo de incubación (tabla 3) se apreció que existía un comportamiento semejante en la producción de biomasa, apareciendo una fase exponencial en los T6 a T24 hrs, seguida de la fase estacionaria entre los T48 y T72 hrs con una D.O. de 1.18 nm. La tabla 3-A muestra un comportamiento similar relacionado a la liberación del PRP en donde se aprecia una máxima producción en los tiempos de T48 y T72 hrs que van de 13 a 18  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de PRP. El efecto de la liberación de PRP en las tres cepas seleccionadas puede distinguirse en la gráfica que se presenta a continuación:

**GRÁFICA No. 2**  
**CINÉTICA CEPAS, I, III, IV**  
**PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g} / \text{ml}$**



Porter y colaboradores (1976) mencionaron que la liberación de PRP en el sobrenadante ocurre por una aparente degradación de la cápsula celular mientras transcurre el tiempo de incubación, de esta manera la liberación se presenta en la fase exponencial (6-7 horas) teniendo su máxima producción en la fase estacionaria (24- 48 horas).

En la gráfica 2, la fase estacionaria de liberación de PRP es muy parecido en las tres cepas, por lo que no se consideran diferencias significativas entre las

mismas; pero en cuanto a la liberación de PRP y de biomasa se advierte que la cepa número 1 es la que presenta una mayor productividad y una mayor estabilidad en el crecimiento. Para los estudios de liberación de PRP en distintas investigaciones se requiere de una cepa que presente una estabilidad durante el crecimiento desde la fase exponencial hasta una fase estacionaria, como lo demostró Porter y colaboradores (1976). Ellos observaron la producción y liberación del PRP en dos cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b conocidas como Rab y Eag. Dichas cepas se incubaron a 37°C durante 4-5 días, obteniendo producciones de PRP 65µg/ml a los dos días de incubación (fase estacionaria).

Elander R. (1990) resume que una cepa económicamente importante debe poseer distintas características como son: la capacidad de crecer vigorosamente una vez inoculado en un fermentador, que libere fácilmente el producto deseado (en este caso el polisacárido capsular), fácilmente recuperable y en poco tiempo, y que sea una cepa que se conserve durante largo tiempo. Considerando estas características y los distintos valores obtenidos durante el crecimiento y producción de las cepas se optó por la cepa 1.

Después de haber determinado y seleccionado la cepa más apta para una mayor producción de PRP, se procedió a determinar las condiciones generales del medio de cultivo bajo el cual se continuó la investigación. El primer paso para ello fue asignar diferentes concentraciones a los principales factores nutricionales para el organismo, es decir, variando la concentración de NAD y Hemina, que son factores imprescindibles para el crecimiento bacteriano, y la variación en el medio de cultivo puede modificar las condiciones generales de producción, tal y como se muestra en el siguiente cuadro y en la siguiente gráfica:



**TABLA No. 4**  
**CONCENTRACIÓN DE NAD Y HEMINA**

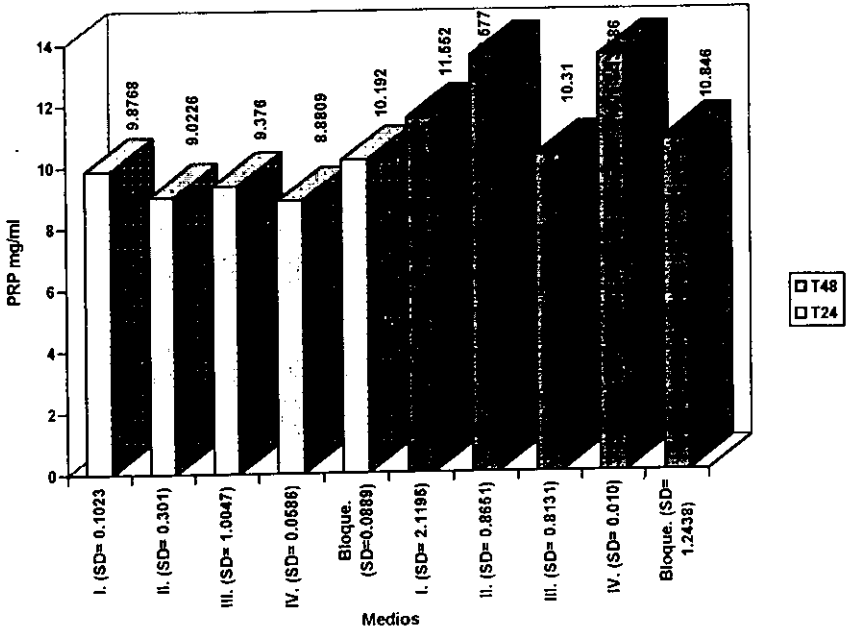
MEDIOS	PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)			PRODUCCION DE PRP µg/ml (670 nm)		CONCENTRACIONES	
	TO	T24	T48	T24	T48	[NAD]	[Hemina]
I	0.1592	1.0374	1.1864	7.4338	9.7229		
	0.1897	0.9414	1.0122	11.2255	13.0333	50 mg/l	30 mg/l
	0.1385	0.9989	1.1923	10.9700	11.90		
X	0.1624	0.9925	1.1135	9.8755	11.552		
	0.1515	0.9595	1.2791	9.8964	11.3298		
	0.1525	0.9270	1.2357	8.1255	13.8766	50 mg/l	10 mg/l
X	0.1376	0.9161	1.2212	9.0450	15.5250		
	0.1472	0.9342	1.2453	9.0225	13.5771		
	0.1478	0.9275	0.9406	8.6698	10.1939		
III	0.1498	0.9191	0.9320	9.1933	10.5466	20 mg/l	30 mg/l
	0.1322	0.9266	0.9396	10.2650	9.8900		
	0.1432	0.9244	0.9374	9.375	10.3101		
IV	0.1532	0.9029	1.1850	8.8827	11.8368		
	0.1926	1.0909	1.0740	8.8700	12.1300	20 mg/l	10 mg/l
	0.1389	1.1141	1.0968	8.8900	16.7900		
X	0.1615	1.0359	1.1189	8.8800	13.5856		
	0.1517	0.9984	1.1432	8.7563	10.1249		
	0.1678	1.2513	0.9831	10.9400	10.5765	40 mg/l	20 mg/l
Bloque	0.1606	0.0231	1.1302	10.8800	11.8350		
	0.1667	1.0909	1.0855	10.1921	10.8455		
				1.1556	2.0745		

**TABLA No. 4-A  
CONCENTRACIÓN DE NAD Y HEMINA**

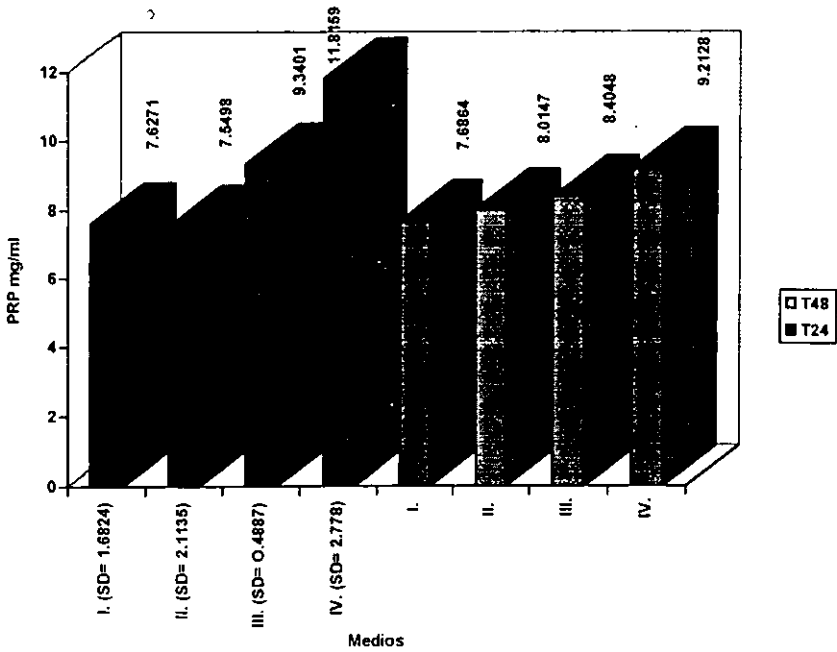
MEDIOS	PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)			PRODUCCION DE PRP µg/ml (670 nm)		CONCENTRACIONES	
	T0	T24	T48	T24	T48	[NAD]	[Hemina]
I	0.1722	1.1786	1.2107	8.8654	8.9516		
	0.1639	1.1596	1.0819	6.0487	5.7077	10 mg/l	5 mg/l
	0.1640	1.1700	1.1524	7.9673	8.4000		
II	0.1633	1.1894	1.1483	7.6271	7.6864		
	0.1711	1.2278	1.4552	8.0161	8.5392		
	0.1694	1.2262	1.4520	6.5450	8.3394	40 mg/l	20 mg/l
III	0.1766	1.2351	1.4697	7.9883	7.4355		
	0.1723	1.23	1.4589	7.5488	8.1047		
	0.1718	1.1031	1.4875	8.8840	7.6425		
IV	0.1754	1.1052	1.4974	9.7700	8.3829	5 mg/l	5 mg/l
	0.1722	1.1033	1.4884	9.3673	9.1891		
	0.1731	1.1038	1.4911	9.3401	8.4048		
X	0.1146	1.1538	1.2150	13.1986	8.8145		
	0.1301	1.1746	1.2058	12.1059	8.9490	20 mg/l	10 mg/l
	0.1199	1.1609	1.2130	9.1432	9.8751		
X	0.1215	1.1631	1.2116	11.8159	9.2128		
				2.1846	1.0584		

Las tablas 4 y 4-A muestran las diferencias en la producción de PRP y biomasa a partir de las variaciones en la concentración de NAD y Hemina utilizados en el medio de cultivo. Pudo observarse que de la concentración del medio original de 40 mg/l de NAD y 20 mg/l de Hemina no presentaron diferencias significativas entre las concentraciones mayores como la de 60 mg/l de NAD y 30mg/l de Hemina; ni entre las concentraciones menores como de 5 mg/l de NAD y 5mg/l de Hemina, por lo que se decidió continuar con la experimentación utilizando la mitad de la concentración original, es decir, 20 mg/l de NAD por 10 mg/l de Hemina.

**GRÁFICA No. 3**  
**CONCENTRACIÓN DE NAD Y HEMINA**  
**PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g/ml}$**



GRÁFICA No. 4  
CONCENTRACIÓN DE NAD y HEMINA  
PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g/ml}$



En las gráficas 3 y 4 no se observan diferencias significativas de producción de biomasa y de PRP entre las diferentes concentraciones; de esta manera la concentración de 20mg/l de NAD y 10mg/l de hemina fue elegida para continuar la optimización del medio, ya que presentó los mismos resultados que las otras concentraciones. Una vez determinada la concentración mínima del factor hemina y NAD se determinó la importancia de cada elemento integrante del medio de cultivo, utilizando un método simple de presencia y ausencia de nutrientes enfocada a tres ingredientes principales que fueron los casaminoácidos, el extracto de levadura y la glucosa; los cuales son de gran importancia para el desarrollo de las colonias bacterianas de *Haemophilus influenzae* tipo b y la consecuente producción de PRP por el hecho de que estos tres compuestos son los principales donadores de nitrógeno, carbono y glucosa, que son sin duda nutrientes vitales para el crecimiento de los microorganismos con las características generales del *Haemophilus influenzae* tipo b.

Con la utilización de este método se obtuvieron ocho medios distintos; el medio I conteniendo todos los ingredientes necesarios, el medio II sin glucosa, el medio III sin casaminoácidos, el medio IV sin extracto de levadura, el medio V sin extracto de levadura ni glucosa, el medio VI sin casaminoácidos ni glucosa, el medio VII sin casaminoácidos ni extracto de levadura, y el medio VIII sin ninguno de los tres ingredientes( tabla 1), lo cual arrojó los siguientes resultados:

**CUADRO No. 1**  
**PRESENCIA Y AUSENCIA DE NUTRIENTES**

Medio/ Componente	Bloque	Casamino- ácidos	Ext. Levadura	Glucosa
I	*	*	*	*
II	*	*	*	*
III	*	*	*	*
IV	*	*	*	*
V	*	*	*	*
VI	*	*	*	*
VII	*	*	*	*
VIII	*	*	*	*

Bloque	[Requerida]	[en 50 ml]	[Stock]	ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,H <sub>2</sub> O	1.8 g/l	0.09 g	0.036 g/ml	2.5 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12.4 g/l	0.620 g	0.0248 g/ml	2.5 ml
NaCl	8.1 g/l	0.405 g	0.162 g/ml	2.5 ml
Hemina	10 mg/l	0.5 mg	10 mg/ml	0.05 ml
NAD	20 mg/l	1 mg	10 mg/ml	0.1 ml

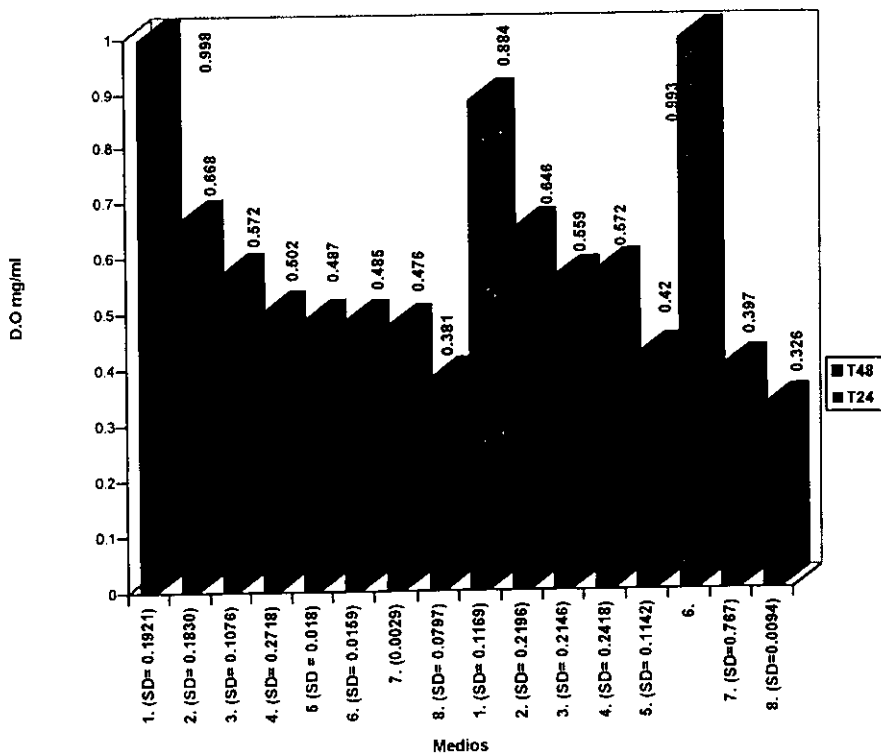
Nutrientes	[Requerida]	[en 50 ml]	[Stock]	ml
Casaminoácidos	20 g/l	1 g	0.2 g/ml	5 ml
Ext. Levadura	2.5 g/l	0.125 g	0.2 g/ml	0.625 ml
Glucosa	2.5 g/l	0.125 g	0.05 g/ml	2.5 ml

**TABLA No. 5**  
**PRESENCIA Y AUSENCIA DE NUTRIENTES**

TIEMPOS / MEDIOS	PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)			PRODUCCION DE PRP µg/ml (670 nm)	
	T0	T24	T48	T24	T48
1	0.1273	0.8630	0.8019	12.1956	14.5255
	0.1642	1.1348	0.9673	12.9482	12.3401
X	0.14575	0.9989	0.8846	12.5719	13.4328
2	0.1501	0.5393	0.4908	9.5549	9.4233
	0.1749	0.7982	0.8014	10.1491	11.1142
X	0.1625	0.6687	0.6461	9.852	10.2687
3	0.1352	0.4964	0.4075	8.0924	7.2994
	0.1702	0.6486	0.7111	9.7891	8.9553
X	0.1527	0.5725	0.5593	8.9407	8.1273
4	0.1242	0.3101	0.4013	8.9130	7.3060
	0.1692	0.6946	0.7433	8.4949	8.6286
X	0.1467	0.5024	0.5723	8.7039	7.9673
5	0.1369	0.4746	0.3396	3.9873	4.2133
	0.1741	0.5001	0.5012	5.0191	5.1142
X	0.1555	0.4873	0.4204	4.6032	4.6637
6	0.1271	0.4746	0.3393	5.0520	5.2928
	0.1801	0.4972	0.4478	4.3689	5.1248
X	0.1536	0.4859	0.3935	4.7104	5.2106
7	0.1360	0.4739	0.3748	3.5875	3.6853
	0.1792	0.4781	0.4201	5.1242	4.9683
X	0.1576	0.476	0.3974	4.3558	4.3268
8	0.1281	0.4330	0.3335	3.8219	4.0120
	0.1700	0.3202	0.3201	4.1281	4.0196
X	0.149	0.3816	0.3268	3.975	4.0158
				3.1650	3.3093

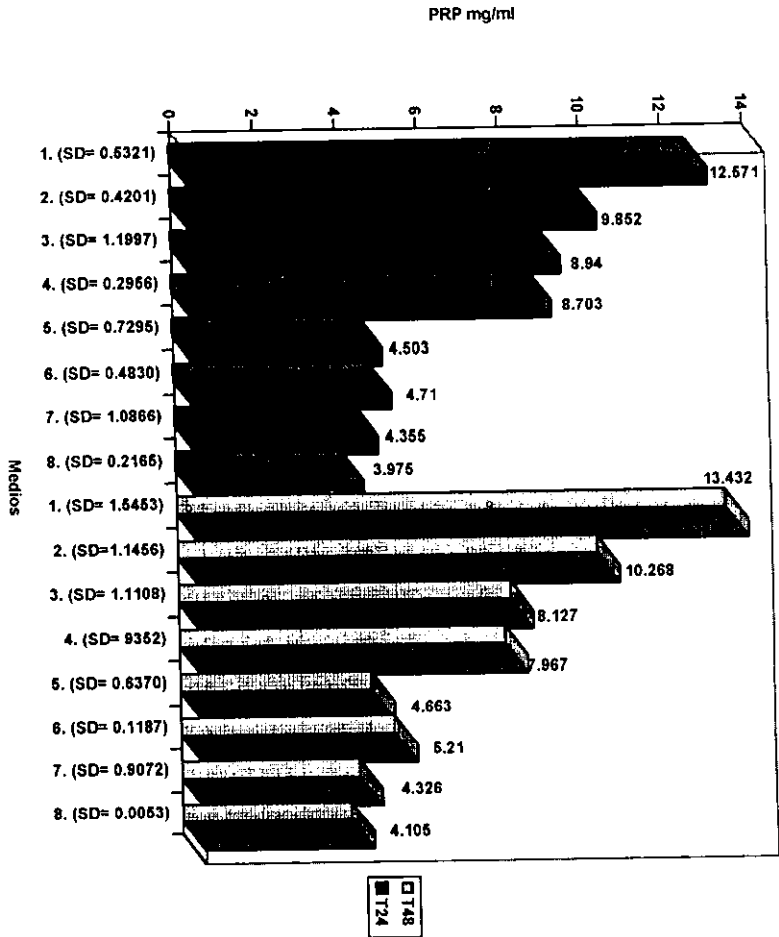
En la tabla 5 se observa que la ausencia de cualquiera de los tres ingredientes principales afectó sensiblemente la liberación de PRP y la producción de biomasa, ya que tres elementos juntos proporcionaron las fuentes principales para una mayor producción tanto de biomasa y por consiguiente de PRP, mientras que en el resto de los medios que carecen de uno o más de estos elementos la producción fue notablemente inferior al medio uno, esto puede apreciarse más claramente en las gráficas siguientes:

**GRÁFICA No. 5**  
**PRESENCIA Y AUSENCIA DE NUTRIENTES**  
**PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490nm)**





### GRÁFICA NO. 5 - A PRESENCIA Y AUSENCIA DE NUTRIENTES PRODUCCION DE PRP µg/ml



De esta manera, al haber determinado la importancia de cada uno de los componentes del medio de cultivo, se procedió a la realización de una cinética para el medio original; esto con el objeto de tener una base teórica de las características que tiene el medio sin optimizar sobre el desarrollo de biomasa y la producción de PRP y comparar entonces los cambios sobre la cepa al comenzar su optimización. El medio original, mostró los resultados siguientes:

**CUADRO No. 2**

**CINÉTICA 1. MEDIO SIN OPTIMIZAR**

Nutrientes	[Requerida]	[Requerida / 50 ml]	Stock
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.6 g/l	0.09 g	0.036 g/ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.4 g/l	0.620 g	0.248 g/ml
NaCl	8.1 g/l	0.405 g	0.162 g/ml
Casaminoácidos	20 g/l	1g	0.2 g/ml
Glucosa	2.5 g/l	0.125 g	0.05 g/ml
Ext. levadura	2.5 g/l	0.125 g	0.2 g/ml
Hemina	10 mg/l	0.5 mg	10 mg/ml
NAD	20 mg/l	1 mg	10 mg/ml

T° = 36 - 36.5°C  
 pH = 7.3  
 r.p.m. = 120 - 140  
 Volumen / superficie = 80% aire  
 Placas BHI: 24 horas

**TABLA No 6**  
**MEDIO SIN OPTIMIZAR**

Tiempo	Producción de Biomasa (D.O. 490 nm)	Des. Est.	PRP $\mu\text{g/ml}$ (670 nm)	Desv. Est.
T0	0.1792		0.4991	
	0.1651		0.3422	
	0.1696		0.6983	
T1	0.1727	0.0072	0.5065	0.1784
	0.2643		0.6983	
	0.1983		1.4312	
T2	0.1842		1.1322	
	0.2156	0.0427	1.0872	0.3685
	0.2983		1.9673	
T3	0.2844		2.4681	
	0.3001		2.4691	
	0.2942	0.0085	2.3054	0.2894
T4	0.3891		3.1481	
	0.3643		3.0938	
	0.3981		2.1416	
T5	0.3838	0.01750	2.7845	0.5660
	0.4567		4.1683	
	0.5932		3.4495	
T6	0.6900		5.1243	
	0.5798	0.1172	4.2474	0.8401
	0.6972		5.9672	
T7	0.6991		4.8342	
	0.7409		4.8696	
	0.7124	0.0247	5.2235	0.6441
T8	0.6872		5.8871	
	0.6996		5.4691	
	0.7841		6.3283	
T9	0.7236	0.0527	5.8948	0.4295
	0.8946		6.2301	
	0.7012		6.3642	
T10	0.8602		5.8943	
	0.8186	0.1031	6.1628	0.2420
	1.4792		8.3742	
T24	1.2001		7.9163	
	1.0341		7.3681	

x	2.279	0.2249	7.8862	0.5037
T48	1.3940		9.4373	
	3.809		8.4291	
	1.3438		7.3106	
x	1.5462	0.0465	8.3923	1.0836

*Haemophilus influenzae* tipo b al ser un parásito estricto requiere factores que favorezcan su crecimiento así, el medio utilizado por Porter y colaboradores (1976) (medio INH) muestra tener todos los componentes necesarios para la producción de la bacteria, siendo indispensables cada uno de los componentes.

Los datos de la tabla 6 fueron analizados posteriormente con los datos de un medio ya optimizado; mientras tanto se presentó el diseño del experimento para optimizar el medio en base a los tres componentes nutricionales seleccionados anteriormente; casaminoácidos, extracto de levadura y glucosa, para así generar la máxima respuesta de la variable de seguimiento, en este caso la producción de PRP. Para ello se utilizó el método de Box-Wilson. para determinar las concentraciones establecidas para cada una de las tres series realizadas.

La primera serie se compuso de nueve medios con diferentes concentraciones de cada uno de los tres ingredientes fundamentales; se tiene un medio basal con una concentración de 20g/l de casaminoácidos con una concentración superior de 30 g/l e inferior de 10g/l; 2.5 g/l de extracto de levadura y 2.5 g/l de glucosa, con concentraciones superiores de 3.75 g/l e inferiores de 1.25 g/l respectivamente.

El medio I tuvo una concentración superior en los tres ingredientes, el medio II tuvo una concentración inferior en glucosa, el medio III una concentración inferior en el extracto de levadura, el medio IV una concentración superior solo en los casaminoácidos, el medio V fue el basal, el medio VI una concentración inferior en casaminoácidos y superior en los otros dos ingredientes, el medio VII una concentración superior solo en el extracto de levadura, el medio VIII una concentración superior solo en la glucosa y el medio IX concentración inferior de todos los ingredientes. Todo ello se muestra en el siguiente cuadro:

**CUADRO No. 3**  
**OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH**  
**(BOX-WILSON)**  
**1ª SERIE**

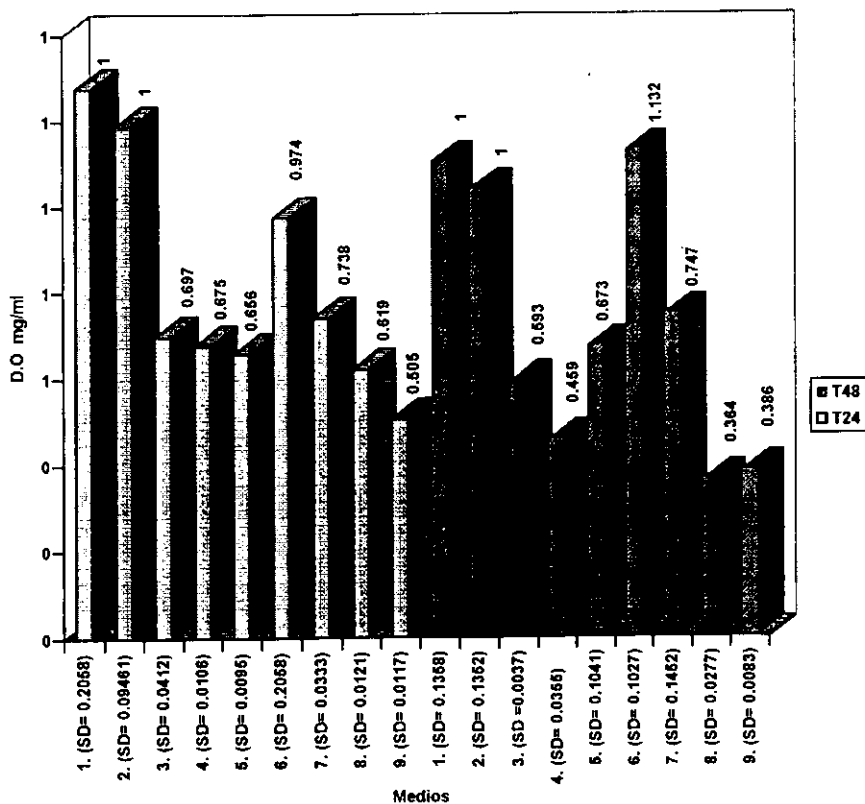
Medios / nutrientes	Casaminoácidos	Ext. Levadura	Glucosa
I	+	+	+
II	+	+	-
III	+	-	+
IV	[30gr/l]	[1.25gr/l]	[1.25gr/l]
Basal V	[20 g/l]	[2.5 g/l]	[2.5 g/l]
VI	[10gr/l]	[3.75gr/l]	[3.75gr/l]
VII	-	+	-
VIII	-	-	+
IX	-	-	-

Los resultados se muestran en la siguiente tabla y gráficas:

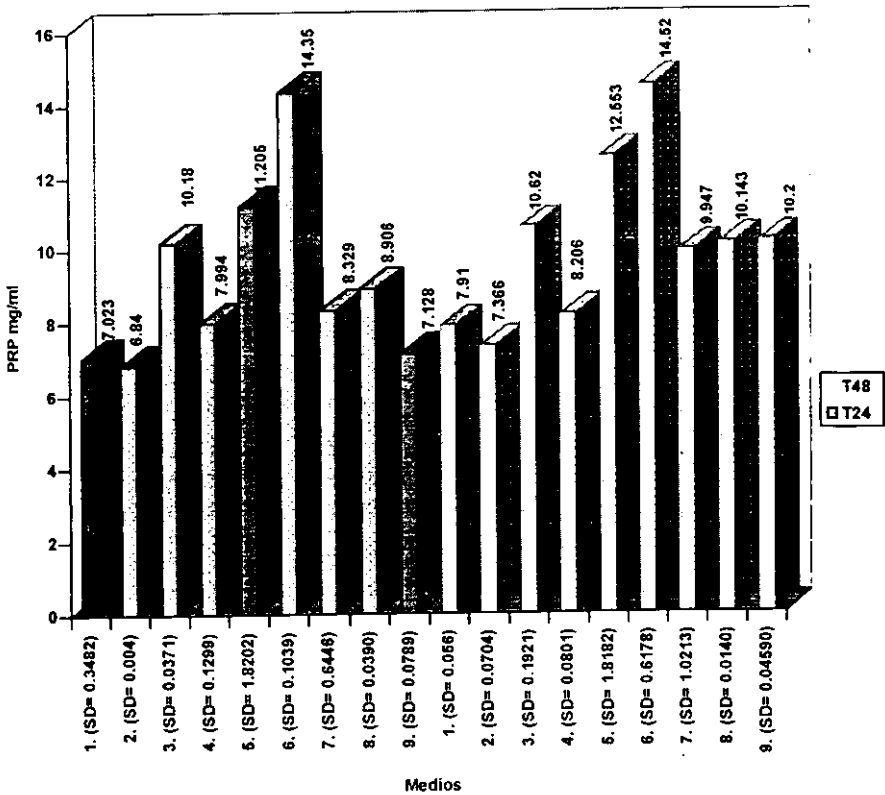
TABLA No. 7 OPTIMIZACION DEL MEDIO  
INH (BOX-WILSON). 1° SERIE

TIEMPOS / MEDIOS	PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)			PRODUCCION DE PRP $\mu\text{g/ml}$ (670 nm)	
	T0	T24	T48	T24	T48
	0.1624	1.1523	1.3218	6.8610	7.8539
	0.1892	1.1657	1.1955	7.0835	7.9477
	0.1585	1.5154	1.0503	7.3401	7.8538
X	0.1699	1.2778	1.892	7.0233	7.9100
	0.1609	1.0536	0.9656	6.8408	7.4043
	0.1580	1.0569	0.9658	6.8491	7.4183
	0.1691	1.2191	1.2000	6.8408	7.2899
X	0.1626	1.1074	1.0438	6.8400	7.3666
	0.1771	0.6591	0.5894	10.1551	10.6824
	0.1546	0.6910	0.5947	10.2221	10.7717
	0.1680	0.7410	0.5967	10.1607	10.4034
X	0.1665	0.697	0.5936	10.1766	10.6166
	0.1642	0.6631	0.4251	7.8479	8.1994
	0.1664	0.6823	0.4952	8.0627	8.1381
	0.1662	0.6808	0.4594	8.0820	8.2971
X	0.1656	0.6754	0.4599	7.9940	8.2057
	0.1609	0.6461	0.5836	12.0495	13.1041
	0.1585	0.6602	0.7875	9.1201	14.0554
	0.1689	0.6643	0.6489	12.4568	10.5402
X	0.1627	0.6568	0.6736	11.2056	12.5534
	0.1448	1.1628	1.1784	14.4739	14.2005
	0.1588	0.7549	1.2034	14.2842	15.2355
	0.1649	1.0072	1.0142	14.3053	14.1335
X	0.1561	0.9749	1.132	14.3517	14.5211
	0.1563	0.7035	0.6100	9.0559	10.8526
	0.1643	0.7429	0.8994	8.1269	8.8411
	0.1654	0.7699	0.7335	7.8172	10.3551
X	0.1586	0.7387	0.7476	8.3290	9.9466
	0.1528	0.6061	0.3407	8.9527	10.1328
	0.1876	0.6246	0.3586	8.8802	10.1440
	0.1668	0.6290	0.3951	8.8913	10.1607
X	0.1690	0.6199	0.3648	8.9066	10.1435
	0.1518	0.4954	0.3813	7.0835	10.2221
	0.1623	0.5016	0.3817	7.0891	10.2444
	0.1697	0.5182	0.3959	7.2230	10.1328
X	0.1646	0.5050	0.3863	7.1276	10.1966
				2.4239	2.2755

**GRÁFICA No. 6**  
**OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH 1er SERIE**  
**PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)**



GRÁFICA No. 6-A  
OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH 1er SERIE  
PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g/ml}$





Los resultados de la primera serie presentaron una mejor respuesta a las concentraciones bajas de los tres nutrientes principales, con relación a los medios con concentraciones superiores a las del medio basal. Dentro de los resultados de la primera serie pudo observarse que la mayor producción de PRP se alcanzó tanto a las 24 como a las 48 horas en el medio número VI que contenía una mayor concentración de extracto de levadura y de glucosa con relación a la concentración basal, y una menor concentración de casaminoácidos, también con respecto a la basal; lo que sugiere que esta relación en las concentraciones de cada nutriente fue la óptima para obtener mejores resultados de producción de PRP.

Sin embargo, resultó conveniente realizar una segunda serie experimental con diferentes concentraciones para corroborar la efectividad de aumentar el extracto de levadura y la glucosa y disminuir los casaminoácidos en el medio de cultivo, tomando ahora la concentración del medio VI como concentración basal para la segunda serie.

La segunda serie, también con nueve medios, tuvo una basal con 10g/l de casaminoácidos, con 15g/l como superior y 5g/l como inferior; 3.75g/l de extracto de levadura y glucosa con 1.87g/l como inferior y 5.625g/l como superior. En esta serie se siguió el mismo modelo de concentraciones en los diferentes medios que en la primer serie (cuadro 4):

**CUADRO No. 4**  
**OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH (BOX-WILSON)**  
**2ª SERIE**

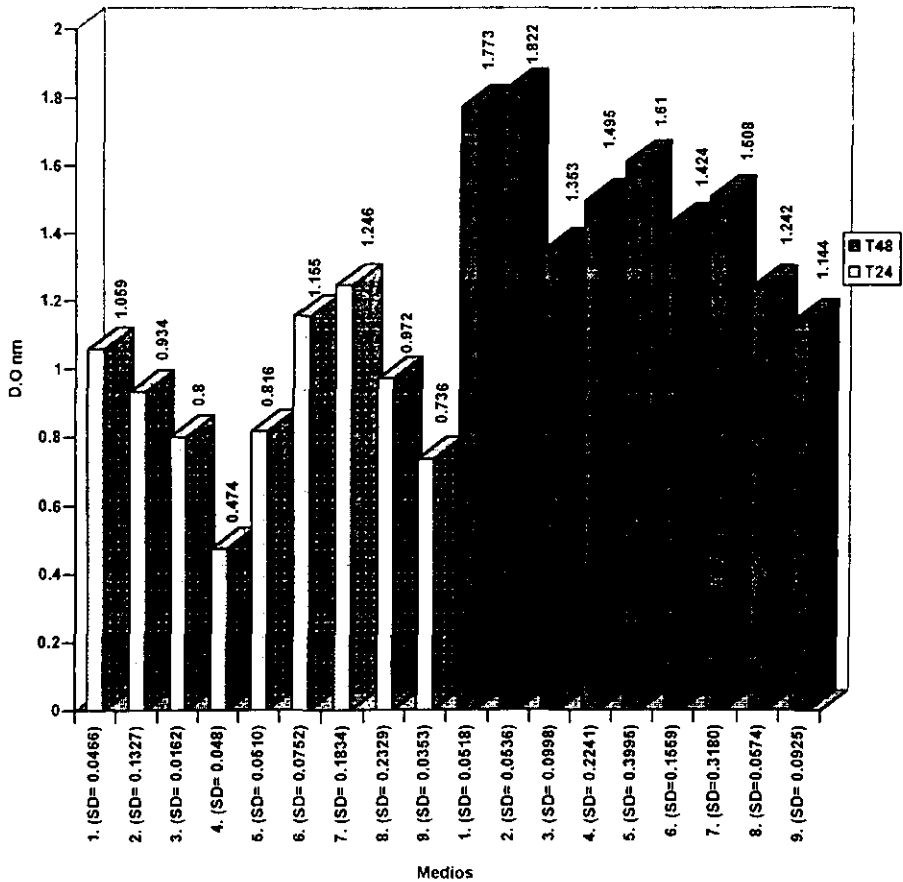
<b>Nutrientes / medios</b>	<b>Casaminoácidos</b>	<b>Ext. Levadura</b>	<b>Glucosa</b>
I	+	+	+
II	+	+	+
III	+	-	+
IV	[15 g/l]	[1.87 g/l]	[1.87 g/l]
Basal V	[10 g/l]	[3.75 g/l]	[3.75 g/l]
VI	[5 g/l]	[5.625 g/l]	[5.625 g/l]
VII	-	+	-
VIII	-	-	+
IX	-	-	-

**TABLA No. 8**  
**OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH**  
**(BOX-WILSON)**  
**2ª SERIE**

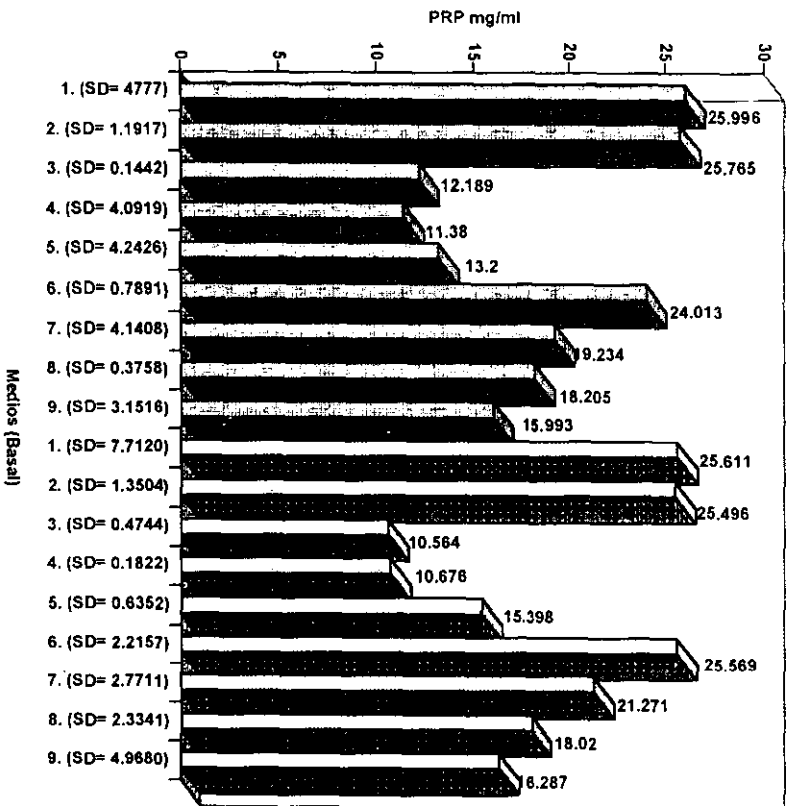
TIEMPOS / MEDIOS	PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)			PRODUCCION DE PRP µg/ml (670 nm)	
	T0	T24	T48	T24	T48
I	0.1896	1.0783	1.7466	20.5968	33.2451
	0.1917	1.0933	1.8331	27.4762	25.7770
X	0.1984	1.0060	1.7403	29.9272	17.8236
	0.1932	1.0592	1.7733	25.9957	25.6112
II	0.1822	0.8901	1.8682	26.6317	24.1590
	0.1349	1.0839	1.8389	26.2610	26.8599
	0.1891	0.8299	1.7593	24.4073	25.4908
	0.1687	0.9346	1.8221	25.7657	25.4969
III	0.1779	0.8190	1.4492	12.1933	10.3058
	0.1361	0.7878	1.3620	12.0491	11.1148
	0.1742	0.7953	1.2500	12.3375	10.2809
	0.1627	0.8007	1.3537	12.1891	10.5636
IV	0.1827	0.9296	1.6605	13.9852	10.8784
	0.1847	1.0250	1.5912	13.5321	10.5174
	0.1801	0.9675	1.2336	6.6821	10.6543
	0.1825	0.974	1.4951	11.3807	10.6766
V	0.1578	0.7756	1.6327	17.4867	16.1060
	0.1541	0.8736	1.9982	9.4127	15.2223
	0.1802	0.7998	1.2004	15.7100	14.8737
	0.1673	0.8163	1.6104	14.2000	15.3979
VI	0.1808	1.1185	1.4119	24.3867	25.6152
	0.1717	1.1758	1.5856	24.5514	27.7685
	0.1822	1.0722	1.2745	23.4097	23.3375
	0.1815	1.1555	1.4240	24.0132	25.5691
VII	0.1769	1.1529	1.7553	20.5350	18.1099
	0.1551	1.1728	1.6206	14.6031	23.2628
	0.1692	1.1106	1.1496	22.5741	22.4538
	0.1634	1.2461	1.5085	19.2347	21.2712
VIII	0.1876	1.2265	1.9068	18.4548	20.2009
	0.1937	0.7691	1.2250	18.3930	15.5583
	0.1833	0.9211	1.1960	17.7751	18.3040

X	0.1881	0.9722	1.2426	18.2050	18.0196
SX	0.1918	0.7704	1.1388	17.1160	21.9310
	0.1759	0.7405	1.2393	18.4392	14.3634
	0.1876	0.70003	1.0545	12.4405	12.5711
X	0.1851	0.7369	1.1442	15.9933	16.2870
				6.9882	6.4923

GRÁFICA No. 7  
OPTIMIZACION DE MEDIO INH 2ª SERIE  
PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)



### GRÁFICA NO. 7-A OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH 2ª SERIE PRODUCCIÓN DE PRP $\mu\text{g/ml}$



En esta segunda serie ( tabla 8, gráfica 7-A) se observó que la producción de PRP aumento notablemente, pero a diferencia de la primer serie no se encontraron diferencias significativas entre los medios I que presenta mayor concentración de todos los elementos, el medio II con una concentración inferior en glucosa y mayor en los elementos restantes, y el medio VI con una concentración inferior en casaminoácidos y mayor en los otros dos compuestos; teniendo nuevamente una producción elevada al disminuir los casaminoácidos y elevar el extracto de levadura y la glucosa.

Debido a que la producción de PRP fue similar entre los medios I, II y VI fue conveniente realizar una tercer serie considerando la concentración del medio VI como concentración basal para determinar así cuales son las mejores condiciones de cultivo para continuar con el experimento.

De esta manera, la tercer serie tuvo una concentración basal de 5g/l de casaminoácidos con concentraciones superiores de 7.5 g/l e inferiores de 2.5 g/l; 5.625 g/l de extracto de lavadura y de glucosa con concentraciones superiores de 8,437 g/l e inferiores de 2.812 g/l; siguiendo el mismo modelo aplicado en las dos series anteriores (cuadro 5).

**CUADRO No. 5 OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH (BOX-WILSON)  
3ª SERIE**

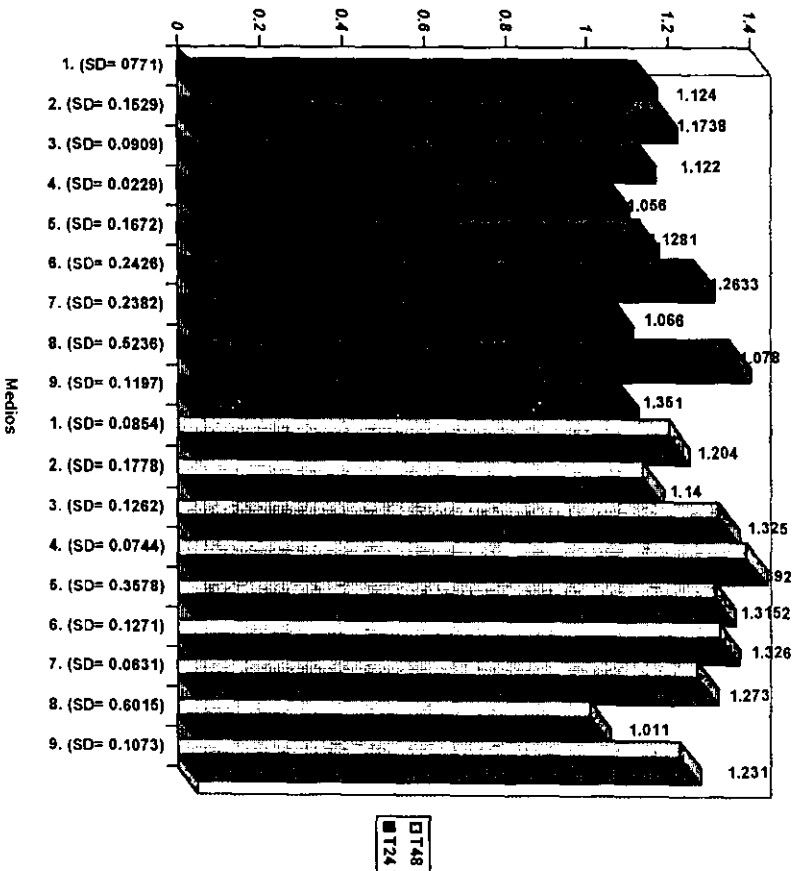
<b>Matraz / nutriente</b>	<b>Casaminoácidos</b>	<b>Ext. Levadura</b>	<b>Glucosa</b>
I	+	+	+
II	+	+	-
III	+	-	+
IV	[7.5 g/l]	[2.812 g/l]	[2.812 g/l]
Basal V	[5 g/l]	[5.625 g/l]	[5.625 g/l]
VI	[2.5 g/l]	[8.437 g/l]	[8.437 g/l]
VII	-	+	-
VIII	-	-	+
IX	-	-	-

TABLA No. 9  
OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH (BOX-WILSON)  
3ª SERIE

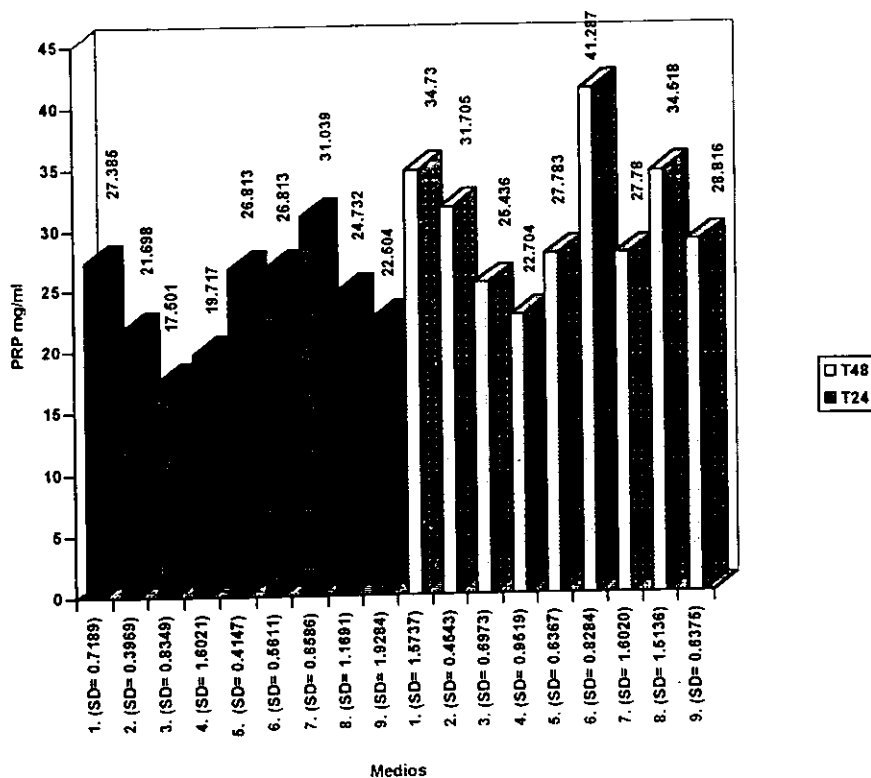
TIEMPOS / MEDIOS	PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)			PRODUCCION DE PRP $\mu\text{g/ml}$	
	T0	T24	T48	T24	T48
I	0.1589	1.0349	1.1415	27.8922	33.9962
	0.1694	1.1681	1.1693	27.7075	33.6616
	0.1276	1.1691	1.3014	26.5649	36.5393
X	0.1519	1.1240	1.2040	27.3849	34.7297
II	0.1534	1.0021	1.09615	21.2424	31.1855
	0.1589	1.2238	1.1428	21.9021	31.9886
	0.1531	1.2955	1.3171	21.9549	31.9551
X	0.1551	1.1738	1.1004	21.6983	31.7050
III	0.1492	1.025	1.1890	16.5981	25.2964
	0.1500	1.1368	1.4384	17.7064	26.1998
	0.1394	1.2051	1.3479	18.2341	24.8280
X	0.1462	1.1223	1.3251	17.5008	25.4360
IV	0.1489	1.0301	1.3271	17.8911	23.3587
	0.1642	1.0720	1.3777	20.3980	21.6157
	0.1455	1.0872	1.4737	20.8730	23.1549
X	0.1528	1.0564	1.3928	19.7176	22.7049
V	0.1496	1.0682	1.0615	26.4936	28.3413
	0.1549	0.9984	1.1596	27.1533	27.2706
	0.1475	1.0169	1.7246	26.3881	27.7391
X	0.1506	1.1281	1.3152	26.8127	27.7830
VI	0.1580	1.3105	1.1839	31.1643	41.9265
	0.1511	1.0005	1.3665	30.5310	40.3538
	0.1570	1.3789	1.4286	31.4282	41.5919
X	0.1553	1.2633	1.3263	31.0394	41.2873
VII	0.1538	1.3437	1.3132	23.7756	29.5764
	0.1512	0.9290	1.3075	24.5409	27.2706
	0.1464	0.9290	1.2011	25.0867	28.5010
X	0.1504	1.0665	1.2739	24.7322	27.7803
VIII	0.1598	1.1955	0.9542	23.2743	35.7362
	0.1310	0.9240	1.0067	23.0896	35.0001
	0.1356	1.0352	1.0742	21.1632	32.8251
X	0.1424	1.3517	1.0111	22.5044	34.5183
IX	0.1212	1.1953	1.1214	26.6256	29.2448

	0.1584	0.9560	1.2363	28.7102	29.2448
	0.1499	1.0852	1.3360	24.8876	28.1406
X	0.1431	1.0788	1.2312	26.7292	28.8166
				4.1608	5.5037

GRÁFICA NO. 8  
 OPTIMIZACION DE MEDIO INH 3ª SERIE  
 PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)



GRÁFICA No. 8-A  
OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO INH 3ª SERIE  
PRODUCCION DE PRP µg/ml





La gráfica 8-A de esta tercera serie mostró que efectivamente las mejores condiciones para el cultivo se presentaron con concentraciones bajas de casaminoácidos y concentraciones elevadas de extracto de levadura y de glucosa; además se observó que en las concentraciones utilizadas, la liberación de PRP es mucho mayor que con las concentraciones utilizadas en el medio original.

Con los resultados obtenidos se estableció que las tres series fueron mucho más eficaces en la producción de PRP, que en el medio original, ya que, incluso la primer serie que fue la más moderada en cuanto a liberación del polisacárido tuvo a un nivel máximo de 14.52  $\mu\text{g}$  de PRP por ml de cultivo, siendo que en el medio original el máximo nivel alcanzado fue tan solo de 9.43  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; más aun si se consideran las series 2 y 3 donde fueron alcanzadas liberaciones de 25.9 y 41.2  $\mu\text{g}$  de PRP por ml de cultivo respectivamente. De esta manera, dentro de las tres series, las diferencias en la liberación de PRP sintetizado fueron estadísticamente significativas; también la respuesta producida en el medio basal de la tercera serie, fue mayor que la producida en los medios basales de la primera y segunda serie, así como las diferencias mostradas por cada serie permitieron estrechar las concentraciones, considerando como medio óptimo para la liberación de PRP el utilizado en la tercera serie, que fue más eficaz que el de la primer serie.

Posteriormente, a la determinación de la concentración óptima del medio, se realizó una cinética con el mismo para comprobar la efectividad de este medio optimizado en cuanto a la producción de PRP, la finalidad de esta segunda cinética fue probar si las concentraciones de nutrientes obtenidas a lo largo de la experimentación fueron suficientes para incrementar la producción de PRP con relación al medio original. En esta segunda cinética se obtuvieron los siguientes resultados:

CUADRO No. 6  
CIMETICA 2. MEDIO OPTIMIZADO

Nutrientes	[Requerida]	[Requerida / 50 ml]	Stock
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.8 g/l		0.036 g/ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.4 g/l		0.248 g/ml
NaCl	8.1 g/l		0.162 g/ml
Casaminoácidos	2.5 g/l	0.125 g	0.2 g/ml
Glucosa	8.437 g/l	0.4218 g	0.05 g/ml
Ext. levadura	8.437 g/l	0.4218	0.2 g/ml
Hemina	10 mg/l		10 mg/ml
NAD	20 mg/l		10 mg/ml

T° = 36 - 36.5°C  
pH = 7.3  
r.p.m. = 120 - 140  
Volumen / superficie = 80% aire  
Placas BHI: 24 horas

TABLA No. 10  
CINETICA 2. MEDIO OPTIMIZADO

Tiempo	D.O. 490 nm	Desv. Est.	PRP µg/ml	Devs. Est.
T0	0.1782		0.6432	
	0.1891		0.6181	
	0.1743		0.7804	
$\bar{x}$	0.1805	0.0076	0.7475	0.0924
T1	0.2208		1.8439	
	0.2436		2.9462	
	0.2041		1.9323	
$\bar{x}$	0.2228	0.0198	2.2408	0.6124
T2	0.3601		2.0426	
	0.3672		2.3691	
	0.3196		2.9136	
$\bar{x}$	0.3489	0.0256	2.4417	0.4400

T3	0.3942		3.1423	
	0.4581		4.4381	
	0.3999		3.1592	
X	0.4207	0.0411	3.5798	0.7432
T4	0.5137		6.1643	
	0.5892		4.9137	
	0.4971		6.4177	
X	0.5333	0.0490	5.8319	0.8052
T5	0.6983		7.2432	
	0.6042		6.8432	
	0.6889		6.1681	
X	0.6638	0.05118	6.6849	0.5387
T6	0.6642		8.4391	
	0.6056		8.8322	
	0.7891		7.3211	
X	0.6863	0.0937	8.1974	0.7839
T7	0.8636		12.1416	
	0.8436		8.3689	
	0.8633		10.2436	
X	0.8568	0.0111	10.2513	0.8863
T24	1.1391		36.4297	
	1.2341		31.2916	
	0.9301		30.1481	
X	1.1011	0.1655	32.6231	3.3457
T48	1.3470		42.1517	
	1.0024		38.9771	
	1.0430		40.0200	
X	1.1308	0.1883	40.3829	1.6181

De la misma manera que en la cinética del medio sin optimizar, este cuadro fue analizado posteriormente, junto con una tercera cinética.

El siguiente paso del presente trabajo de experimentación fue modificar los parámetros ambientales, variando algunas condiciones como el pH, para determinar bajo que niveles de este, el crecimiento y la producción de PRP fue más óptimo; las diferentes concentraciones de pH utilizadas en esta prueba fueron consultadas de distintos autores (Porter y Smith, 1977; Porter y colaboradores, 1976; Rae y colaboradores; y otros):

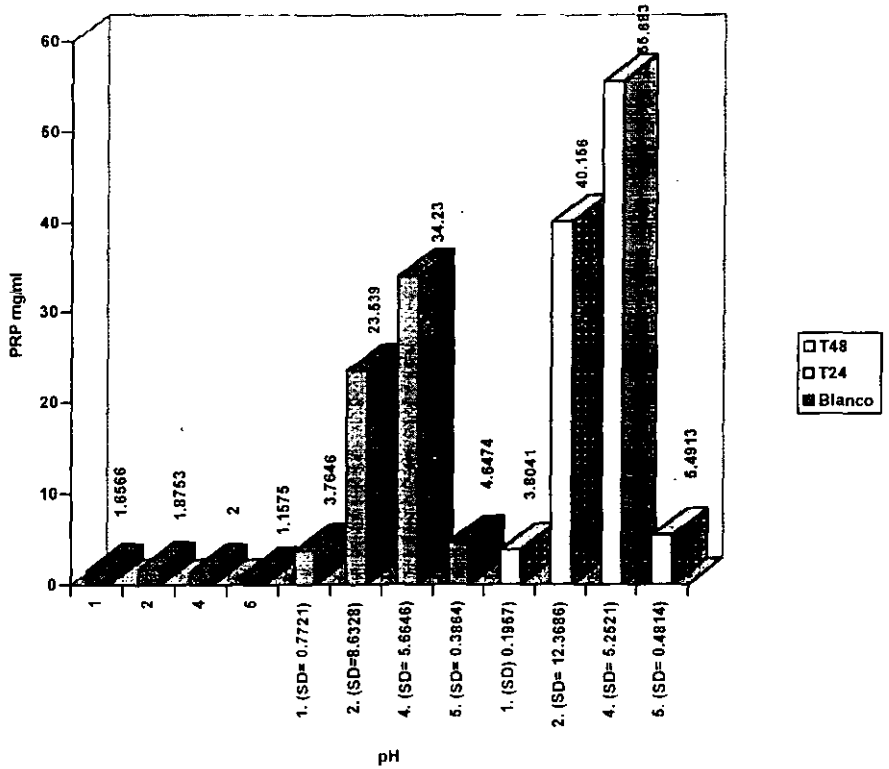
**TABLA No. 11**  
**EXPERIMENTO pH**

Tiempos / Medios / [ pH ]	PRODUCCION DE BIOMASA (D.O. 490 nm)			PRODUCCION DE PRP $\mu\text{g/ml}$ (670 nm)		Blanco
	T0	T24	T48	T24	T48	
1/5.0	0.1582	0.0249	0.0363	2.8847	3.6735	
	0.1766	0.0533	0.0402	4.0802	3.7097	
	0.1942	0.0644	0.0671	4.3291	4.0292	1.6566
x	0.1763	0.0475	0.478	3.7646	3.8041	
2/6.0	0.1795	1.1505	1.5618	14.3240	26.2698	
	0.1492	1.0255	1.3856	31.4019	49.9697	
	0.1541	1.4607	1.2247	25.0621	44.2586	1.8753
x	0.1609	1.2887	1.3907	23.5399	40.1566	
3/7.3	0.1722	1.3873	1.7430	20.2922	32.6150	
	0.1445	0.9289	1.4757	36.3459	42.0788	
	0.1637	1.0971	1.3001	36.4152	49.1460	1.8654
x	0.1601	1.1377	1.5062	31.0133	41.2733	
4/8.0	0.1716	0.9482	1.5582	39.9214	54.1616	
	0.1332	0.9470	0.6751	28.5925	61.5341	
	0.1542	0.9681	1.0565	34.1847	51.3678	1.5536
x	0.1549	0.9544	1.0967	34.2300	55.6833	
5/9.0	0.1341	0.1001	0.0286	4.9240	5.0534	
	0.1320	0.1005	0.0777	4.2059	6.0068	
	0.1504	0.2011	0.0900	4.8124	5.4133	1.1575
x	0.1388	0.1339	0.0654	4.6474	5.4913	
				14.3709	22.3984	

TABLA No. 11 -A  
 EXPERIMENTO DE pH.  
 PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g} / \text{ml}$

Medios [ pH ]	PRODUCCION DE PRP $\mu\text{g}/\text{ml}$ (670 nm)	
	T24	T48
1/5.0	2.8847	3.6735
	4.0802	3.7097
	3.7646	4.0292
X	4.3291	3.8041
2/6.0	14.3240	26.2698
	31.4019	49.9697
	25.0621	44.2586
X	23.5933	40.1566
3/7.3	20.2922	32.6150
	36.3459	42.0788
	36.4152	49.1460
X	31.0133	41.2733
4/8.0	39.9214	54.1616
	28.5925	61.5341
	34.1847	51.3678
X	34.2300	55.6833
5/9.0	4.9240	5.0534
	4.2059	6.0068
	4.8124	5.4133
X	4.6474	5.4913
	14.3709	22.3984

GRÁFICA No. 9  
EXPERIMENTO DE pH  
PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g/ml}$



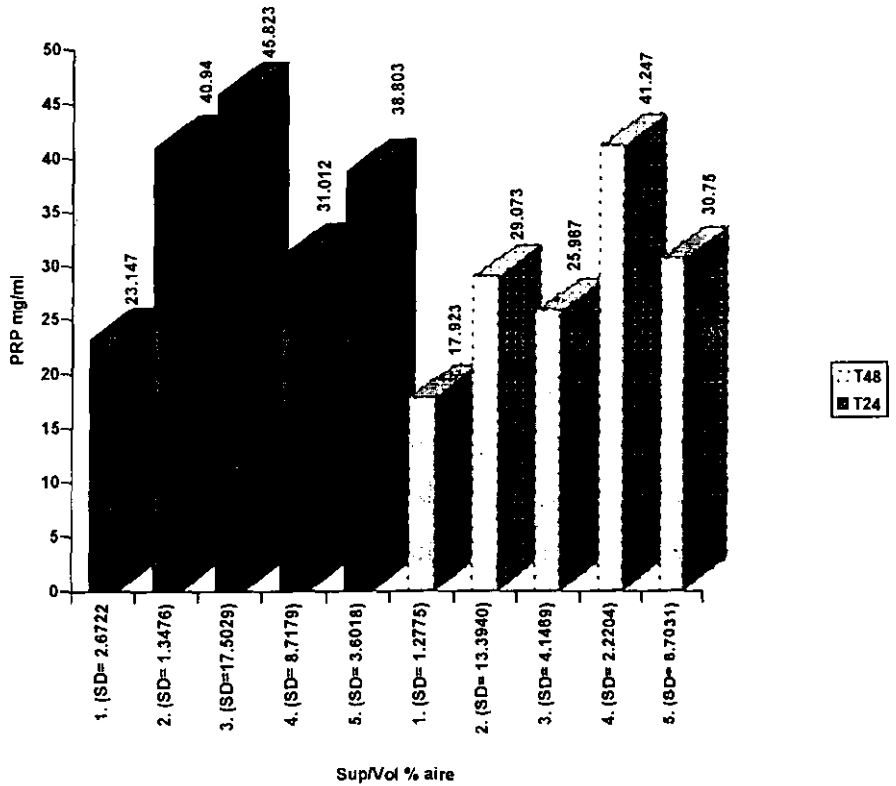
Puede observarse en la tabla 11 que el pH óptimo se encontró entre 7.3 y 8.0; ya que la producción de PRP fue mucho mayor en los medios con este potencial de hidrogeno, esto fue apreciado perfectamente en la desviación estándar que se presento mucho mayor en los medios entre 7.3 y 8.0 de pH, lo que indico que existieron diferencias significativas entre un nivel y otro, por lo que se recomienda mantener el medio de cultivo bajo estos niveles.

Otra de las condiciones que fue tomada en cuenta fue la aireación, la cual también fue variada entre el 20 y el 90% en el medio, de acuerdo con una mayor o menor aplicación de revoluciones por minuto ( r.p.m.) en los medios de cultivo, obteniéndose lo siguiente:

**TABLA No. 12**  
**EXPERIMENTO SUPERFICIE / VOLUMEN**

TIEMPOS / MEDIOS % DE AIREACION	PRODUCCION DE BIOMASA D.O 490 nm			PRODUCCION DE PRP µg/ml (670 nm)	
	T0	T24	T48	T24	T48
1(20% aire)	0.2150	0.6231	1.0474	24.3471	16.5023
	0.1000	0.7134	0.9615	20.0900	18.3115
	0.1782	0.8439	0.9893	25.0168	18.9694
X	0.1644	0.7268	0.9994	23.1466	17.9233
2(40% aire)	0.1787	0.8218	1.2683	39.7973	13.6514
	0.1738	0.9357	1.1428	42.4282	35.8007
	0.1730	0.9432	1.0917	40.6105	37.7744
X	0.1751	0.9002	1.1686	40.9400	29.0733
3(60% aire)	0.2762	1.0109	1.2121	65.3404	26.6901
	0.1874	1.0417	1.4969	31.5222	21.5462
	0.1841	1.3201	1.3666	40.6015	29.7700
X	0.2159	1.1242	1.3581	45.8233	25.9666
4(80% aire)	0.2496	0.8866	1.2719	21.2858	41.2284
	0.1445	0.9289	1.4757	38.1232	39.0354
	0.1741	1.0121	1.4000	33.6268	43.4762
X	0.1894	0.9425	1.38825	31.0119	41.2466
5(90% aire)	0.1893	0.8563	1.1289	42.8108	24.1778
	0.1586	0.9377	1.5082	37.7883	27.4673
	0.1646	0.9972	1.3249	35.8272	40.6253
X	0.1705	0.9337	1.2540	38.8033	30.7500
				11.2276	10.0441

GRÁFICA No. 10  
SUPERFICIE / VOLUMEN  
PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g/ml}$





En este caso (tabla 12 y gráfica 10) se observó que la mejor aireación se encontró entre el 60 y el 80% de aire para el medio teniendo con ello una mejor respuesta en la producción de PRP.

Porter y colaboradores (1976) y Porter y Smith (1977), demostraron que la producción del polisacárido en un medio óptimo puede favorecerse si se incluye un control en parámetros ambientales tales como: T°, aireación y pH. Dichos parámetros pueden ser controlados u optimizados a través del método Box-Wilson, como se realizó en las concentraciones de nutrientes del medio.

Finalmente, una vez que se determinaron todos los factores que promueven la máxima respuesta para la producción de PRP, se realizó una cinética en un medio optimizado que contempla un pH entre 7.3 y 8.0 y una aireación de entre el 70 y 80%; lo que arrojó los resultados siguientes:

**CUADRO No. 13**

<b>CINÉTICA 3. MEDIO OPTIMIZADO + PARÁMETROS AMBIENTALES</b>				
T° = 36 - 36.5°C				
pH = 7.3 - 8.0				
r.p.m. = 120 - 140				
Volumen / superficie = 70 - 80% aire				
Placas BHI: 24 horas				

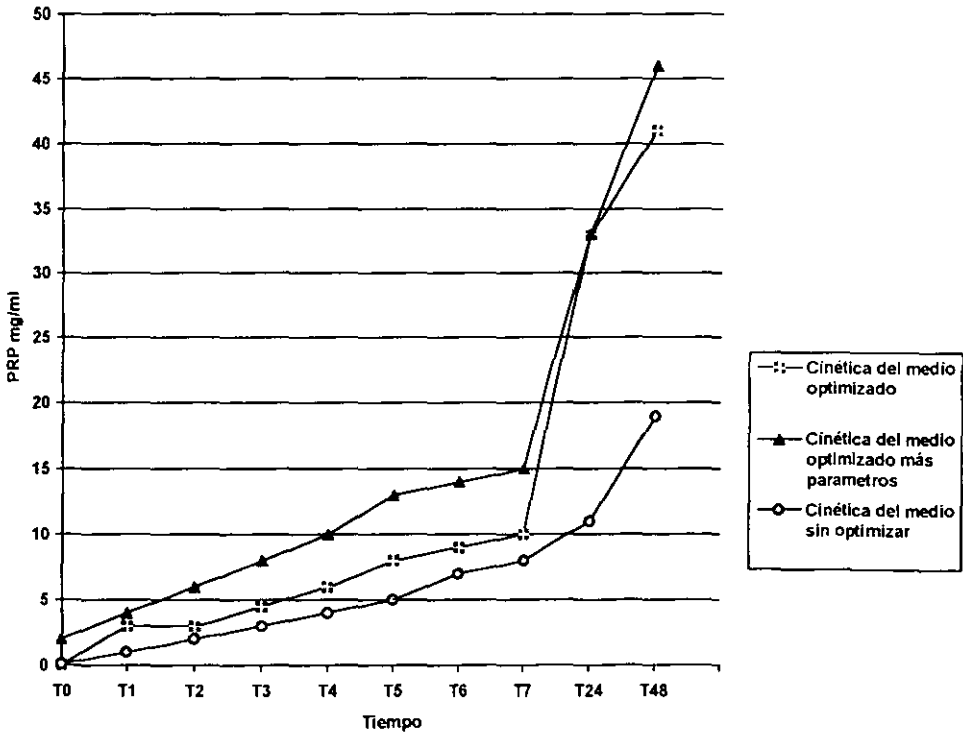
<b>Tiempo</b>	<b>D.O. 490 nm</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>PRP µg/ml</b>	<b>Desv. Est.</b>
<b>T0</b>	0.1504		0.6643	
	0.1693		0.6972	
	0.1381		0.6481	
<b>X</b>	0.1526	0.0157	0.6698	0.0250
<b>T1</b>	0.2019		3.1281	
	0.1893		4.2333	
	0.1942		1.9884	
<b>X</b>	0.1951	0.0063	3.1166	1.1224
<b>T2</b>	0.1824		6.9632	
	0.2446		5.4581	
	0.2791		4.6691	

X	0.2353	0.0490	5.7000	1.1645
T3	0.3973		6.4389	
	0.3843		8.1423	
	0.4022		8.2142	
X	0.3946	0.0092	7.5984	1.0048
T4	0.5093		6.9132	
	0.5970		8.1601	
	0.6000		9.2436	
X	0.5687	0.0515	8.1056	1.1661
T5	0.6883		8.2483	
	0.6841		12.2436	
	0.6792		10.0130	
X	0.6838	0.0045	10.1683	2.0021
T6	0.7642		12.8416	
	0.7061		14.1124	
	0.7246		12.9300	
X	0.7316	0.0296	13.2946	0.7085
T7	0.7674		14.1691	
	0.8681		16.9633	
	0.7200		10.9676	
X	0.7838	0.0756	14.0333	3.001
T24	1.4361		35.9742	
	1.3080		36.0041	
	1.3102		32.3109	
X	1.3514	0.0733	34.7630	2.1236
T48	1.1673		47.1219	
	0.9643		46.1503	
	0.9231		42.1591	
X	1.0182	0.1307	45.1371	2.6262

Una vez que se obtuvo el medio optimizado, considerando ya los parámetros ambientales óptimos, se puede apreciar de manera general que la producción de PRP en el medio original alcanzó un valor máximo de 8.37 µg de polisacárido por ml de cultivo; en tanto que el medio optimizado sin considerar los parámetros ambientales promueve una mayor producción de PRP, teniendo niveles de liberación del polisacárido superiores a los 40 µg de PRP por ml de cultivo; pero en este último medio se aumentó notablemente la producción de PRP hasta alcanzar un nivel de liberación máximo superior a los 45 µg por ml de cultivo, con lo que se puede decir que este medio es el

más eficaz para la producción capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Todo esto puede apreciarse mejor en la siguiente gráfica:

**GRÁFICA No. 11**  
**CINÉTICA DE MEDIOS**  
**PRODUCCION DE PRP  $\mu\text{g/ml}$**



De esta manera, es que se alcanza la mayor producción de PRP con el medio optimizado incluyendo el pH de entre 7.3 y 8.0; la temperatura de entre 36 y 36.5°C, las r.p.m. de entre 120 y 140, y la aireación de 70 a 80%, así como una concentración específica de los nutrientes tomada de la cinética número dos.

INDRE (1998) menciona que *Haemophilus influenzae* tipo b presenta un desarrollo óptimo entre los 35 – 38°C, sin embargo durante el transcurso del presente trabajo se demostró que dicha bacteria tiene un rango restringido de 36-36.5°C para su desarrollo, esto incluye su incubación desde placa hasta su incubación en medio de cultivo líquido.

**Nota:**

## **CUANTIFICACION DE PRP/ RIBOSA**

El método de cuantificación de PRP presentó un punto de gran importancia en la investigación, al ser un método no estandarizado. En la mayoría de las investigaciones el polisacárido capsular a sido medido principalmente por inmunoprecipitación a través de antisueros. Sin embargo, para dicho procedimiento se requiere tomar distintas características que debe poseer el antisuero, que en muchos casos es específico contra el tipo de cepa que se requiere precipitar, es decir, hay especificidad para cepas homologas; o si no poseen ninguna relación las cepas, deben ser inmunológicamente idénticas.

El método cuantitativo de Massachussett proporciona facilidad y rapidez, el cual puede ser utilizado para diferentes polisacáridos microbianos. Zomennof y Leidy (1953); Porter y Smith (1977); Massachussett (1990), mencionaron la precipitación del polisacárido capsular de Hib en sobrenadantes de cultivos a través del detergente catiónico hexadecyltrimethylammonium, comúnmente llamado cetavión, aprovechando la polaridad del polisacárido. Favoreciendo en un 80% la precipitación bajo ciertas condiciones de temperatura y pH con un 20% de contaminantes precipitados ( ácidos nucleicos y proteínas). El uso de orcinol en este método, puede presentar pequeñas intervenciones en la lectura de absorción , sin embargo puede ser empleado para este punto una línea de corrección para la interferencia del orcinol.

## CONCLUSIONES

1. De las cinco cepas sometidas a experimentación, se selecciono a la cepa I por las siguientes características: A) colonias descritas como "R"; B) cepa aislada de casos de meningitis; C) Presencia de gran tamaño capsular (Prueba de coagulación y gran mucosidad); D) Buen crecimiento y producción de PRP durante su incubación; E) Estabilidad (no muta).
2. El medio de cultivo INH es el más adecuado para la producción de *Haemophilus influenzae* tipo b al presentar los tres componentes principales: 1) crecimiento (factor X y V); 2) elementales (fosfatos y NaCl) y 3) energéticos (casaminoácidos, extracto de levadura y glucosa).
3. Siendo NAD y Hemina los principales factores de crecimiento para el desarrollo de *Haemophilus influenzae* tipo b se determino que las siguientes concentraciones son las más optimas: 20mg/l de NAD y 10 mg/l de Hemina.
4. En cuanto a la presencia y ausencia de los factores energéticos (casaminoácidos extracto de levadura y glucosa) se determino que son indispensables tanto como los factores de crecimiento y elementales para el desarrollo de *Haemophilus influenzae* tipo b.
5. El método Box-Wilson demostró ser una buena base estadística para la toma de decisiones en la optimización de medios de cultivo líquidos, permitiendo obtener una mejor respuesta en la producción del polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.
6. Un medio optimizado bajo condiciones de cultivo como: pH 7.3-8.0, temperatura de 36-36.5°C, una aireación (superficie/volumen) 70-80% y un inoculo de 0.15 – 0.2 nm favorecen en un 60% la producción y liberación de PRP.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Bailey, S. 1981. *Diagnostico microbiológico*. 7ª edición, Ed. Salvat, México.
2. Bolsa Médica. 1999. "Para fines de 1999 aumentara en forma significativa porcentaje de vacunados contra *Haemophilus influenzae* tipo b (HIB) en América. México". Internet, página: <http://www.udh.state.va.us/spanish/haemop.html>.
3. Brooks, G. E. 1996. *Microbiología Médica*. 15ª Edición, Ed. Manual Moderno, México.
4. Bryan, A. H. 1976. *Bacteriología*. Ed. Continental, México.
5. Duval, J y M. Mora. 1977. *Técnicas en Bacteriología*. Ed. Jims, España.
6. Echániz, G. 1999. "Vacuna Conjugada". *CISEI*. 27 (Número especial):
7. Elander, R.P. 1990. *Bioteología Básica*. Ed. Salvat, México. 219-252pp.
8. Gallego, S y F. Abad . 2000. "Los nuevos macrólidos: aplicacionew terapeuticas", *JANO EMC.* 58 (1327):
9. Hernández, D. R., E. Hinojosa y A. M. Mesta. 1997. "Una modificación al método de Box-Wilson para la optimización de medios de cultivo". *Información Tecnológica*. 8 ( 4 ): 261-266.
10. Hernández, P. M. 1996. "Impacto Mundial de la Vacunación con PRP/D y sus combinaciones". *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. IX (Número especial):
11. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). 1998. "Manual de Procedimientos para el aislamiento e identificación de *Haemophilus*". *Publicación técnica del INDRE*. No. 19: 11-59.

12. Kurikka, S., H. Kägthy, L. Saarinen, P. Rönberg y J. Eskola. 1995. "Immunologic Priming by one dose of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in infancy". *The Journal Infectious Diseases*. 172 (Número especial): 1268-1272.
13. Margaya, N. 1999. "Valoración de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la meningitis causada por *H. influenzae*". *Medica Clinica*. 112 (1):
14. Masson, A. 1984. *Tratado de Microbiología*, Ed. Masson. México.
15. Morante, A y J. Díez. 1999. "Enfermedad invasora por *Haemophilus influenzae* tipo b en la comunidad de Valencia". *Medica Clínica*. 112 (1): 20-23.
16. Pace, G.W. 1984. *Biología Básica*. Ed. Salvat. México. 449-462pp.
17. Pittman, M. 1931. "Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*". Hospital of the Rockefeller Institute for Medical Research. (Número especial): 471-492.
18. Porter, A., R. Johnston y D. H. Smith. 1972. "Human Serum Activities *Haemophilus influenzae*, type b". *The Journal of Clinical Investigation*. 51 (Número especial):
19. Porter, A., J. Pitt y D. H. Smith. 1976. "Synthesis and release of Polyribophosphate by *Haemophilus influenzae* Type b In Vitro". *Infection and Immunity*. 13 (2): 581-589.
20. Rae, M. C., R. S. Baker y D. E. Dorman. 1975. "Capsular Polymer of *Haemophilus influenzae*, Type b". *Journal of Biological Chemistry*. 250 (13): 4926-4930.
21. Rocca, B. 1998. "La medicina hoy". *JANO EMC*. 55 (126):
22. Rosenberg, E. 1961. "Further studies on Polyribophosphate". *Journal of Biological Chemistry*. 236 (11):

23. Stephen, I. M. y P. Anderson. 1984. *Tratado de Microbiología*. Ed. Salvat, México. 591-595pp.
24. Toumanen, E. 1993. "Superación de la Barrera hematoencefálica". *Investigación y ciencia*. (Número Especial):
25. Tregnaghi, M. 1999. "Vacuna anti *Haemophilus influenzae* tipo b". *Revista de Enfermedades en Pediatría*. 11(48):236-251.
26. Lunsford, L. 2000. "Enfermedad del tipo B de la gripe Hemophilia (Hib)". Internet, página. <http://www.udh.state.va.us/spanish/haemop.html>.
27. Zamenhof, S., G. Leidy, P. Fitzgerald, H. Alexander y E. Chargraff. 1953. "Polyribophosphate the Type-Specific Substance of *Haemophilus influenzae* type b". *Journal of Bacteriology Chemistry*. 203:695-704.