

Patricia Gómez de León C.*, Roberto Cabrera Contreras*
y Margarito Rincón Vázquez*

14
Capítulo

Respuesta de anticuerpos a proteínas de membrana externa de *Haemophilus influenzae* b

Haemophilus influenzae del serotipo b es una de las principales causas de meningitis y otras enfermedades invasivas tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, inclusive México¹⁻⁴.

En nuestro país se cuenta con una información muy limitada acerca de la epidemiología de enfermedades por *H. influenzae* b (Hib); sin embargo, los resultados de varios estudios basados en casos de ingresos a hospitales de la Ciudad de México indican que Hib es el microorganismo más frecuente en la meningitis bacteriana. Publicaciones recientes acerca de casos de meningoencefalitis bacteriana en niños menores de cinco años, indican que Hib se presenta con una frecuencia del 25%, o mayor, en relación con los demás agentes etiológicos bacterianos⁵⁻⁷. El periodo de mayor riesgo para infecciones por Hib en México es el que comprende a niños con edades entre 3 y 6 meses⁷.

A pesar de la disponibilidad de antimicrobianos adecuados, el 5% de niños con meningitis mueren y un 10 a 30% sufren secuelas neurológicas graves¹.

* Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, México.

Con la finalidad de prevenir esta enfermedad por Hib los trabajos recientes de investigación se han orientado hacia el conocimiento y comprensión de la patogénesis y la inmunidad.

Durante el proceso infeccioso, la bacteria expone al sistema inmunitario del huésped varios antígenos de superficie, mismos que se han considerado como candidatos útiles en la elaboración de vacunas. La superficie de Hib está constituida por la cápsula de polirribosilribitol fosfato (PRP), proteínas de membrana externa (PME), lipooligosacáridos (LOS) y fimbrias.

Recientemente, y en virtud de que la primera vacuna liberada constituida por el PRP puro, ha demostrado no proteger a los niños en edad de mayor riesgo, se han autorizado otras tres vacunas conjugadas para su empleo en EUA: a) un oligosacárido derivado del polirribosilribitol fosfato acoplado a una toxina no tóxica de *Corynebacterium diphtheriae* CRM 197, b) PRP acoplado a toxoide diftérico y c) PRP acoplado a un complejo de proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* del grupo B. Una cuarta vacuna conjugada PRP-toxoide tetánico se encuentra bajo evaluación clínica. Sin embargo, a la fecha, no se ha definido la eficiencia protectora de estas vacunas conjugadas y parece que la concentración de anticuerpos séricos antes de la vacunación y la localización geográfica de las poblaciones estudiadas influyen la magnitud de la respuesta de anticuerpos⁸.

En ninguna de estas vacunas conjugadas se han incluido proteínas propias de *Haemophilus influenzae* b.

Anticuerpos séricos dirigidos hacia PME de Hib inducen protección en contra de la infección experimental por este microorganismo y son las opsoninas predominantes en los sueros de individuos humanos sanos. Además, estos anticuerpos facilitan la bacteriólisis mediada por el complemento^{9,10}. Existen algunos trabajos acerca de la respuesta de anticuerpos en sueros de niños con meningitis hacia algunas PME de Hib. Varios autores han encontrado presencia de anticuerpos específicos en contra de las PME de 51, 60 y 98 kilodaltones (kDa) en el suero de individuos enfermos¹¹⁻¹³.

El principal objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de anticuerpos IgG hacia PME de Hib en sueros de niños enfermos de meningitis y comparar estos hallazgos con la respuesta en sueros de niños sin evidencia de infección o enfermedad previa por Hib.

CEPAS BACTERIANAS Y CRECIMIENTO

Se utilizaron las cepas HU y H2 de *H. influenzae* serotipo b. Ambas cepas se obtuvieron de líquido cefalorraquídeo de niños con meningitis. La primera fue donada por la doctora Celia Alpuche, del Hospital Infantil de México, "Federico Gómez". La cepa H2 empleada como referencia corresponde a una colección de cepas de Hib.

Estas bacterias se conservaron, hasta su uso, congeladas a -70°C en leche descremada al 20 por ciento. Las cepas se sembraron sobre placas frescas conteniendo gelosa, infusión de cerebro y corazón (*Difco Laboratories*, Detroit, Mich.) suplementado con fluido de Fildes¹⁴.

PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA

La fracción rica en proteínas de membrana externa se separó de los demás componentes celulares mediante centrifugación diferencial en gradientes discontinuos de sacarosa¹⁵. Las bacterias se crecieron en caldo BHI-Fildes al 5% hasta la fase logarítmica tardía; después se cosecharon y se lavaron con amortiguador Tris 0.01 M pH 7.5. Dichas células se rompieron mediante sonicación (*Branson Sonic Power*, Danbury, Conn.). La suspensión conteniendo fragmentos celulares se diluyó en el mismo amortiguador y se centrifugó a 20 000 xg durante 15 min.

Se colocó una muestra alícuota del sobrenadante sobre un gradiente discontinuo de sacarosa, conteniendo sacarosa al 15% en EDTA 0.01 M-Tris 0.01 M, pH 7.5 y un colchón en el fondo de sacarosa al 70% (p/v) en la misma solución amortiguadora. Este gradiente de sacarosa se centrifugó a 60 000 xg durante 6 h; la fracción membranal ubicada en la interfase se colectó y se le denominó fracción de membrana total (FMT). La FMT se resuspendió y se dializó contra Tris 0.01 M pH 7.5 durante 24 h. Posteriormente, se centrifugó a 65 000 xg durante 60 min. El sedimento se resuspendió en 6 mL y este volumen se aplicó a otro gradiente discontinuo de sacarosa: 5 mL de sacarosa al 15% (p/v), 7.5 mL de sacarosa al 50% (p/v) y 3.5 mL de sacarosa al 70% (p/v) en el mismo amortiguador de Tris-EDTA. Se centrifugó a 60 000 xg durante 14 h. La fracción situada en la interfase entre el 50 y 70% de sacarosa, rica en proteínas de membrana externa, se dializó contra Tris 0.01 M - Na EDTA 0.01 M durante 36 h; las muestras se liofilizaron y se almacenaron a -70°C .

La concentración de proteínas de la fracción PME se determinó mediante el método de Lowry y cols¹⁶.

SUEROS HUMANOS

Las muestras de suero se obtuvieron de niños admitidos al Hospital Infantil de México "Federico Gómez" con meningoencefalitis por *Haemophilus influenzae* tipo b. En este estudio se consideraron solamente aquellos pacientes con aislamiento y coaglutinación en prueba de látex positivos.

En este grupo de pacientes se incluyeron 20 niños. El suero en fase aguda de 10 de ellos se obtuvo dentro de los ocho primeros días después de la hospitalización. Se obtuvieron 10 muestras no pareadas de suero de niños en fase de convalecencia entre los días 30 y 40 después de iniciados los síntomas. Las edades de los pacientes variaron entre 5 meses y 10 años.

El grupo testigo estuvo formado por 20 muestras de suero de niños sin antecedentes de enfermedad invasiva por Hib. Las edades de estos niños variaron entre 3 meses y 8 años de edad.

SUEROS DE RATÓN

Se inmunizaron seis ratones blancos suizos de la cepa CD-1 con cuatro inyecciones subcutáneas de 50 µg de LPS de Hib, extraído por el método de Westphal y Jann¹⁷. Los ratones se sangraron por punción cardíaca siete días después de la última inmunización; el suero obtenido se almacenó congelado a -70° C.

ELECTROFORESIS E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Las PME de las cepas de Hib se separaron por electroforesis según el procedimiento de Laemmli¹⁸ empleando poliacrilamida al 5% pH 8.0 en el gel concentrador, y al 10% pH 6.8 en el gel separador. Las concentraciones finales de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) y persulfato de amonio fueron de 0.035 y 0.35%, respectivamente. Cincuenta µg de proteína de las muestras de membrana externa se mezclaron con un amortiguador de solubilización y se calentaron a 100° C. Se aplicó la

corriente adecuada hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el final del gel analítico. La transferencia electroforética de las PME del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se realizó siguiendo el método de Towbin y cols¹⁹.

Las proteínas electrotransferidas se sumergieron en amortiguador de bloqueo conteniendo 0.12% Tris base, 0.87% NaCl (TBS), 4% leche descremada y 0.02% azida de sodio. Las tiras de membrana de nitrocelulosa (NTC) se incubaron en concentraciones óptimas de IgG de cabra anti-IgG humanas conjugado a peroxidasa (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, Mo.), en amortiguador TBS. Después de lavar en TBS-T (0.12% Tris base, 0.87% NaCl y 0.1% Tween 20), las muestras se lavaron con solución TB (0.12% Tris base pH 6.8). Las tiras conteniendo al antígeno se incubaron inmediatamente en solución sustrato (2mM 4-cloro-1-naftol en metanol 1:4 y 0.08% de H₂O₂). Una vez desarrollado el color, se fotografiaron y se conservaron en la oscuridad.

Con la finalidad de detectar la posible contaminación de LPS en las preparaciones de PME, las proteínas se sometieron a una electroforesis y se probaron por inmunoelectrotransferencia con el suero hiperinmune de ratón anti-Hib-LPS, que se preparó como se describió. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron en diluciones apropiadas de suero de conejo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (*Sigma Chemical Co.*, St. Luis, Mo).

INMUNODIFUSIÓN

La presencia de anticuerpos dirigidos en contra del LPS de *H. influenzae* se detectó mediante inmunodifusión doble en gel, de acuerdo con el método de Ouchterlony²⁰; se empleó el suero hiperinmune de ratón anti-LPS. El gel se preparó con agarosa al 1% en amortiguador de fosfatos (0.05 mM Na₂ HPO₄ -NaH₂ PO₄, 0.02 M NaCl y 0.01% mertiolate [pH 6.8]). Se llenaron pozos de 3 mm de diámetro con 25 µL de cada extracto. Se utilizaron muestras de 370 µg de LPS para los pozos centrales y se colocaron diluciones apropiadas de suero hiperinmune de ratón anti-LPS en los pozos externos. Las preparaciones se incubaron a temperatura ambiente y después se lavaron con solución salina isotónica. Las laminillas se tiñeron y se removió el exceso de colorante.

PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PME

Las fracciones derivadas de las cepas H2 y HU de *Haemophilus influenzae* mostraron un perfil de 12 y 15 bandas, respectivamente. Las fracciones de membrana externa de la cepa HU mostraron la presencia de cuatro proteínas con pesos moleculares de 28.5, 33, 96 y 100 kDa, las cuales no se detectaron en la cepa H2. Las proteínas de 37 y 79 kDa presentes en la cepa H2 no se encontraron en la cepa HU.

De acuerdo con lo anterior, la cepa HU mostró un 84.6% de homología con respecto a la cepa H2 usada como de referencia, para hacer este cálculo se estimó el porcentaje de correspondencia entre las bandas de ambas cepas (figura 14-1).

Las proteínas mayoritarias en ambas cepas fueron las de pesos moleculares de 27 y 43 kDa. No se consideraron en el análisis algunas proteínas minoritarias poco aparentes con pesos moleculares mayores de 100 kDa.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

ANTICUERPOS HACIA PME EN SUEROS DE PACIENTES

Diecinueve de veinte pacientes (95%) tuvieron anticuerpos IgG en contra de PME. Fueron reconocidas proteínas con pesos moleculares entre 16 y 100 kDa por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes (figura 14-2).

Nueve de diez (90%) de las muestras de suero de pacientes en fase aguda mostraron anticuerpos IgG en contra de PME de Hib. Un rango de 3 a 13 PME fueron reconocidas por anticuerpos presentes en estas muestras de suero. Las PME que reaccionaron más frecuentemente con los anticuerpos fueron las de 16 (80%), 27 (80%), 36.5 (60%), 43.5 (70%) y 96 (60%) kDa. La respuesta de los sueros de enfermos se observa en la figura 14-2.

En relación con los sueros de pacientes convalecientes, el número de PME reconocidas varió entre 2 y 15. La respuesta de anticuerpos en este grupo de niños fue diferente en el sentido de que hubo una mayor variabilidad en la respuesta de anticuerpos hacia las diferentes PME. Las proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia, fueron las

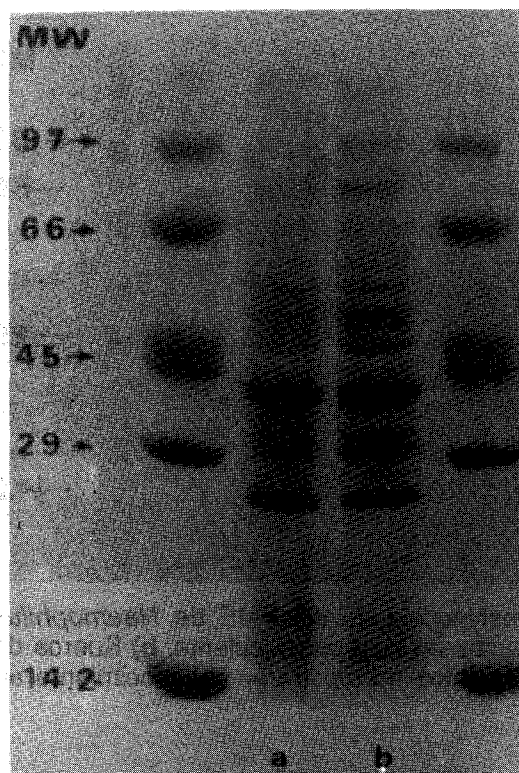


Figura 14-1. Electroforesis en gel de poliacrilamida —SDS de las PME de las cepas H2 y HU de *Haemophilus influenzae* b; **a)** cepa de referencia H2; **b)** cepa HU. Se colocaron 50 μ g de proteína (PME) en cada carril. Se indica con flechas el peso molecular (PM) de los estándares utilizados.

de 16 (80%), 27 (80%), 43.5 (60%), 47 (70%), 52 (70%), 96 (80%) y una proteína mayor de 100 (60%) kDa. En la figura 14-2 se muestra una inmunoelectrotransferencia representativa, realizada con los sueros de los pacientes convalecientes y de fase aguda.

El análisis permitió, además, hacer una estimación semicuantitativa de la reacción antígeno-anticuerpo con base en la intensidad de color observada para cada uno de los antígenos (PME) sobre las tiras de nitrocelulosa. (Un suero se consideró como negativo para una proteína cuando no se observó ninguna banda, en este caso se asignó un valor de 0, de 1+ cuando la reacción fue débil, de 2+ si ésta fue moderada y de 3+ cuando fue intensa.) Los datos se registraron como intensidades de reacción en unidades arbitrarias (UA). En la figura 14-3 se muestran las proporciones de la intensidad de reacción correspondientes a cada 1 de los 3 grupos estudiados.

La mayor intensidad de reacción mostrada por los sueros de los pacientes (en fase aguda y convalecientes) correspondió a la PME de

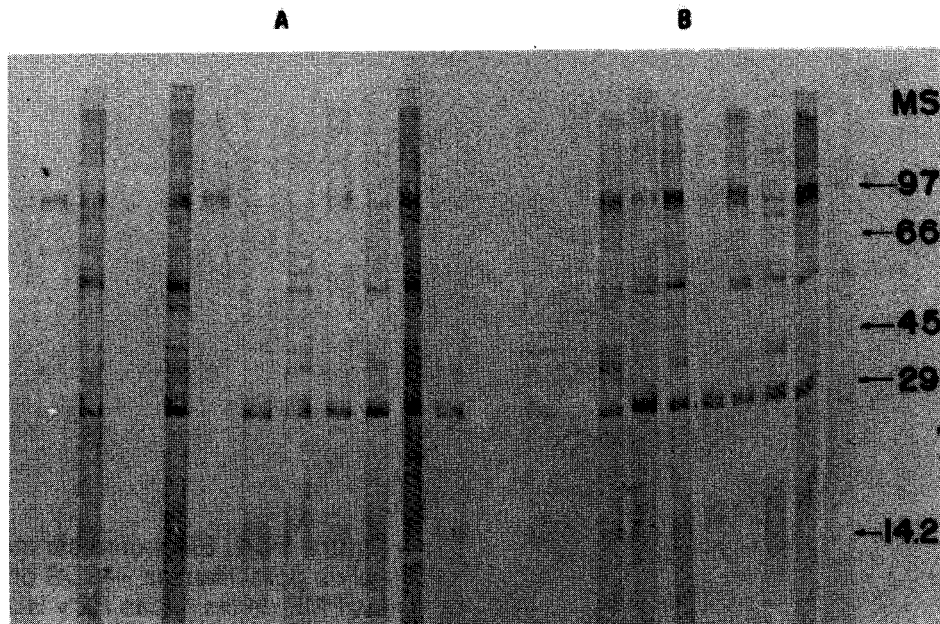


Figura 14-2. Inmunolectrotransferencia de las PME de *Haemophilus influenzae* b. a) Sueros de pacientes en fase convaleciente. b) Sueros de pacientes en fase aguda; dos de éstos no mostraron reconocimiento alguno por las PME estudiadas.

27 kDa (figura 14-3). Se registraron niveles de intensidad altos, pero menores que los anteriores, para las PME de 43.5, 52 y 96 kDa y las de 28.5, 43.5, 47, 52 y 96 kDa tratándose de los sueros de fase aguda y convalecientes, respectivamente. Las demás PME mostraron intensidades de reacción más bajas. Comparativamente con los sueros de pacientes en fase aguda, los sueros de los convalecientes tuvieron intensidades de reacción mayores hacia estos antígenos.

ANTICUERPOS HACIA PME EN SUEROS DE NIÑOS SANOS

De los 20 sueros de niños sin antecedentes de enfermedad invasiva, 18 (90%) presentaron respuesta de anticuerpos hacia las PME de Hib; los anticuerpos presentes en estos sueros reconocieron sólo a cinco PME; éstas fueron las de 27 (50%), 36.5 (55%), 43.5 (5%), 57 (35%) y la de 96 (15 por ciento) kDa. Cada suero control reconoció entre 1 y 3 PME. Todos los niños sanos menores de dos años tuvieron anticuerpos dirigidos hacia estas PME. Este hecho podría indicar cierta relación

con la edad. Comparativamente con los sueros de pacientes, los sueros de niños control reconocieron a un menor número de PME.

Los antígenos que presentaron una mayor intensidad de reacción con los sueros del grupo contrastante o testigo fueron las proteínas de 27 y 36.5 kDa (figura 14-3).

Si bien los tres grupos estudiados mostraron frecuencias altas de reconocimiento hacia la PME de 27 kDa, los pacientes en fase aguda tuvieron la mayor frecuencia (80 por ciento).

INMUNODIFUSIÓN E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON SUEROS DE RATÓN

Los geles de inmunodifusión fueron utilizados con la finalidad de confirmar la presencia de anticuerpos anti-LPS en el suero inmune de ratón. Se observó una banda de precipitación aparente cuando se empleó suero de ratón hiperinmunizado con LPS de Hib. Por tanto, este antisuero fue el apropiado para descartar la posible contaminación de LPS en nuestras fracciones de PME (datos no mostrados).

Ninguna de las preparaciones de PME analizadas después de la transferencia, mostró una respuesta hacia el LPS cuando se incubaron con anti LPS preparado en ratón. Estos resultados indicaron que si bien algunas proteínas debieron tener LPS unido, bajo las condiciones metodológicas empleadas, las bandas observadas correspondieron únicamente a complejos inmunes formados por anticuerpos que reconocieron a las PME y no al LPS de Hib.

CONSIDERACIONES GENERALES

Estudios previos han demostrado que los anticuerpos séricos inducidos en contra de PME protegen en contra de Hib²¹⁻²³. Otros datos sugieren que las actividades opsonica y bactericida mediadas por el complemento son los mecanismos responsables de inmunoprotección inducida por anticuerpos en contra de proteínas de membrana externa de Hib²³⁻²⁵. La clase de anticuerpos que generalmente está involucrada en estos procesos

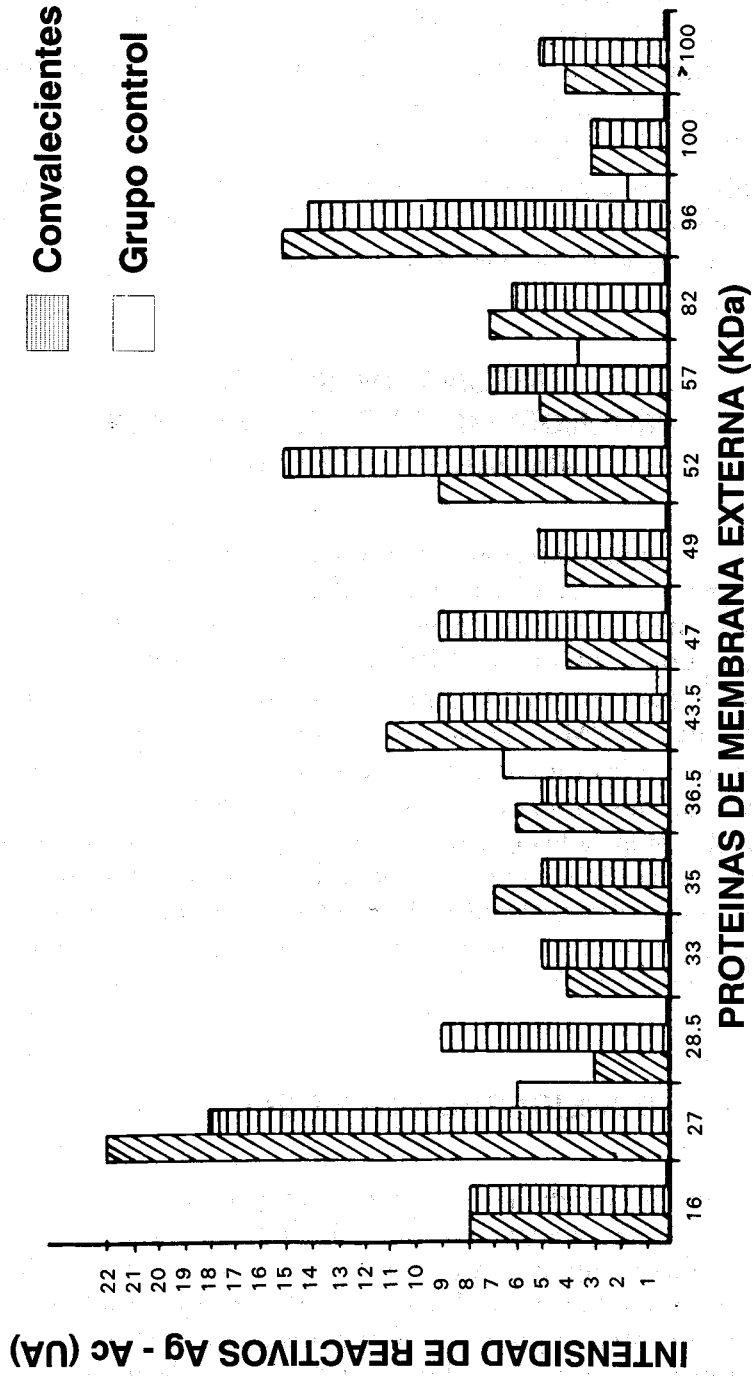


Figura 14-3. Estimación semicuantitativa de la intensidad de reacción de antígeno-anticuerpo (IgG) observada en tiras de membrana de nitrocelulosa. La intensidad de reacción se determinó en base a unidades arbitrarias (UA), como se indica en la sección sobre Inmunoelctrotransferencia (pág. 213).

de protección en contra de la enfermedad por Hib es la IgG. Ésta es producida comúnmente durante la fase aguda de la enfermedad y es inducida preferentemente por antígenos proteicos.

El estudio analiza la presencia de esta clase de anticuerpos en el suero de niños con meningitis por Hib confirmada bacteriológica y serológicamente. Todos los sueros de fase aguda y la mayoría de los sueros en fase convaleciente obtenidos de niños enfermos, mostraron respuesta de anticuerpos hacia varias PME; estos resultados concuerdan con los de trabajos previos^{26,27}. La presencia de anticuerpos IgG hacia PME de Hib observada en los sueros de niños sanos indica la presencia de: 1) epítomos de reacción cruzada entre Hib y otros serotipos de *H. influenzae*; 2) entre cepas de Hib y otras bacterias con antígenos similares o iguales; 3) anticuerpos de origen materno o, 4) producidos durante infecciones subclínicas previas por Hib.

Frecuentemente el suero de niños sanos tuvo anticuerpos en contra de una PME de 36 kDa. Existe un reporte sobre respuestas de anticuerpos hacia una PME de 40 kDa¹³. En el mismo estudio se encontraron respuestas de anticuerpos hacia las PME de 51 y 60 kDa en el suero de pacientes durante la fase aguda de la enfermedad. Erwin y cols.¹¹, confirmaron una respuesta significativa de anticuerpos hacia una PME de 98 kDa en pacientes convalecientes de meningitis por este microorganismo. Se observaron respuestas de anticuerpos similares durante la fase aguda, pero dirigidas en contra de proteínas de 27, 43.5, 52 y 96 kDa. Las diferencias entre estos resultados y los de estos autores podrían explicarse parcialmente con base a las diferencias en los procedimientos técnicos de aislamiento de PME.

También se detectó frecuencias de respuestas hacia una proteína de 43.5 kDa, tanto en suero de fase aguda, como de convalecientes. Esta proteína tiene un PM próximo al de la proteína porina P2 señalada anteriormente²⁸. En esos estudios se indicó que la proteína P2 expresa múltiples determinantes bactericidas y algunas de estas regiones antigénicas e inmunogénicas son reconocidas por anticuerpos bactericidas^{28,29}. El patrón electroforético de PME de las cepas HU y H2 fue semejante al encontrado por otros autores³⁰⁻³². Se presume que las diferencias encontradas en la respuesta sérica de pacientes infectados se debió fundamentalmente a factores del huésped.

A pesar de que algunos investigadores han demostrado contaminación de LPS en sus fracciones de PME^{12,13}, en las preparaciones no se detectó LPS. Esto podría indicar que la respuesta sérica obser-

vada correspondió a anticuerpos dirigidos en contra de las proteínas de Hib. Se sugiere la realización de estudios subsecuentes para confirmar estos hallazgos.

AGRADECIMIENTOS

Reconocemos la excelente asistencia técnica para la realización de este trabajo por parte del M.V.Z. Margarito Rincón Vázquez. ■

REFERENCIAS

1. Munson RS, Kabeer MH, Lenoir AA, Granoff DM: Epidemiology and prospects for prevention of disease due to *Haemophilus influenzae* in developing countries. *Rev Infect Dis* 1989;(Suppl II):S588-S597.
2. Arredondo G, Espinoza L, Zepeda H: Infecciones por *Haemophilus influenzae*. Problema actual en pediatría. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1987;44:777-785.
3. Lagos R, Horwiz I, Musser JM et al: Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* within families in Santiago, Chile. *J Infect Dis* 1991;164:1149-1153.
4. Gómez de León P, Cabrera R, Cravioto A: *Haemophilus influenzae* b: una revisión de los determinantes de patogenicidad y de la respuesta inmune a la infección. *Salud Pública de México* 1991;31:504-512.
5. Gómez de León P, Cabrera R: Vacunas contra *Haemophilus influenzae*: presente, pasado y futuro. *Salud Pública de México* 1992;274-286.
6. González N, Torales A, Gómez D: *Infectología Clínica Pediátrica*. México: Editorial Trillas, 1988.
7. López P, Gómez B, Sequeira S, Moreno M: Actualidades en meningitis bacteriana. *Diagn Ter Infectol* 1990;10:75-87.
8. Holmes S, Murphy T, Anderson S et al: Immunogenicity of four *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in 17-to 19-month-old children. *J Pediatr* 1991;118:364-371.

9. Heterington SV: Antibody to outer membrane proteins is the dominant opsonic antibody in normal human serum against *Haemophilus influenzae* type b. *Immunology* 1989;67:87-91.
10. Gómez de León P, Gómez B, Molinari S, Cabrera R: Antibody response of Mexican children to outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b. Dallas, Texas.: The 91st General Meeting of the American Society for Microbiology, 1991:117. (Abstract).
11. Erwin AL, Keny GE, Smith AL, Stull TL: Human antibody response to outer membrane proteins and fimbriae of *Haemophilus influenzae* type b. *Can J Microbiol* 1988;34:723-729.
12. Claesson BA, Lagergard T, Trollfors B, Gotherfors L, Jodal U: Serum antibody response to capsular polysaccharide, outer membrane and lipooligosaccharide in children with invasive *Haemophilus influenzae* type b infections. *J Clin Microbiol* 1987;25:2339-2343.
13. Kimura A, Gulig GH, Mc Cracken M, Loftus TA, Hansen EJ: A minor high-molecular weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infect Immun* 1985;47:253-259.
14. Fildes P: A new medium for the growth of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1920;1:129-130.
15. Yamato I, Anraku Y, Hirosawa K: Cytoplasmic membrane vesicles of *Escherichia coli* 1. A simple method for preparing the cytoplasmic and outer membranes. *J Biochem (Tokio)* 1975;77:705-718.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
17. Westphal O, Jann K: LPS extraction with phenol-water and further applications of the procedure. En: *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press, 1954.
18. Laemmli VK: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1979;227:680-685.
19. Towbin HT, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
20. Ouchterlony Q: Diffusion in gel methods for immunological analysis. En: Kallos P (Ed.). *Progress in Allergy*, New York: S. Karger, 1958.
21. Shenep JL, Munson R, Barenkamp S, Granoff DM: Further studies of the role of noncapsular antibody in protection against experimental *Haemophilus influenzae* type b bacteremia. *Infect Immun* 1983; 42:257-263.
22. Hansen E, Robertson S, Gulig P, Frisch C, Haanes EJ: Immuno-protection of rats against *Haemophilus influenzae* type b disease mediated

- by monoclonal antibody against *Haemophilus influenzae* type b outer membrane protein. *Lancet* 1982;i:366-368.
23. Musher D, Goree A, Murphy T et al: Immunity to *Haemophilus influenzae* type b in young adults: correlation of bactericidal and opsonizing activity of serum with antibody to polyribosylribitol phosphate and lipooligosaccharide before and after vaccination. *J Infect Dis* 1986;154: 935-943.
 24. Noel GJ, Mosser D, Edelson PJ: The role of the alternate complement pathway and the CR3 receptor in serum dependent macrophage phagocytosis of *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr Res* 1988;23:377 A.
 25. Heterington SV, Patrick CC, Hansen EJ: Outer membrane protein binding sites of complement component 3 during opsonization of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1993;61:5157-5163.
 26. Van Alphen L, Riemens T, Zanen HC: Antibody response against outer membrane components of *Haemophilus influenzae* type b strains in patients with meningitis. *FEMS Microbiol Lett* 1983;18:189-195.
 27. Gulig PA, Mc Cracken G, Frisch CF, Johnston K, Hansen E: Antibody response of infants to cell-surface exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1982;37:82-88.
 28. Hasse E, Campagnari A, Sarwar J et al: Strain specific and immunodominant surface epitopes of the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1991;59:1278-1284.
 29. Murphy T, Barthos L: Human bactericidal antibody response to outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1988;56:2678-2679.
 30. Granoff D, Munson R: Prospects for prevention of *H. influenzae* type b disease by immunization. *J Infect Dis* 1986;153:448-461.
 31. Barenkamp S, Munson R, Granoff D: Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profiles. *J Infect Dis* 1981;143:668-676.
 32. Loeb MR, Smith D: Human antibody response to individual outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 1982; 37:1032-1036.