

*Mal de las vacas locas: su influencia en la obtención del antígeno principal de *Haemophilus influenzae* tipo b*

Jonatan Hernández-Roche, Osmir Cabrera Blanco, Maribel Cuello-Pérez, Luis Riverón Martínez, Arturo Talavera Coronel, Ana H. Callís-Díaz y Gustavo Sierra-González.

Instituto Finlay, Avenida 27, No. 19805, Apartado Postal 16017. Código Postal 11600, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: jhernandez@finlay.edu.cu; jonatanhr@gmail.com.

Recibido: 20 de mayo de 2004. Aceptado: 26 de marzo de 2004.

Palabras clave: heminas, Hib, medios de cultivo, polisacárido capsular.
Key words: culture medium, hemin, Hib, capsular polysaccharide.

RESUMEN. Se evaluaron los parámetros fundamentales del proceso de obtención del polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b tales como: medio de cultivo, tipo de hemina empleada como factor de crecimiento y la expresión de cápsula polisacáridica por diferentes cepas. Los medios de cultivo evaluados fueron: infusión cerebro corazón, Müeller Hinton y una variante de Frantz modificado. Las heminas que fueron evaluadas procedieron de las casas comerciales siguientes: Fluka (origen bovino), Sigma (origen equino), ICN (origen porcino) y Calbiochem (origen bovino). Las cepas evaluadas fueron H1am/90, H1am/97, H2am/96 y Eagan; y la 170 no tipable como control negativo. La concentración del polisacárido capsular fue determinada mediante el método de Finn, en los tres experimentos realizados. Los resultados demostraron que la variante de Frantz modificado permitió un crecimiento de la bacteria cuatro veces mayor, con una mayor expresión polisacáridica superior con respecto a los demás medios evaluados ($p < 0,05$). Este medio cumple satisfactoriamente las regulaciones de la OMS. Con la utilización de la hemina de la casa Fluka, se obtuvo un incremento de la expresión polisacáridica de 17,2 % superior a las restantes ($p < 0,05$); sin embargo, su uso está contraindicado por su origen. El empleo de la heminas de las casas Sigma e ICN arrojaron resultados satisfactorios, lo que permite su utilización en los cultivos de *Haemophilus influenzae* tipo b. Por otra parte, la cepa H1am/97 evidenció una expresión polisacáridica superior ($p < 0,05$) entre las evaluadas, lo que demuestra la variabilidad existente por parte de las cepas evaluadas.

ABSTRACT. The fundamental parameters in the process of obtaining capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b such as: culture medium, type of hemin, as factor of growth and the expression of the capsule polysaccharide by the strains were evaluated. The evaluated cultures media were: infusion brain heart, Müeller Hinton and a variant of modified Frantz. The evaluated hemin was from the different commercial houses: Fluka (bovine origin), Sigma (equine origin), ICN (pig origin) and Calbiochem (bovine origin). The evaluated strains were H1am/90, H1am/97, H2am/96, Eagan and 170 non-typable, as negative control. In these experiments the concentration of capsular polysaccharide was determined by Finn's method. The results demonstrated that variant of modified Frantz allowed a bacterial growth four times higher than other culture media ($p < 0,05$). In addition this culture medium allowed to increase the expression capsular polysaccharide regarding the other culture media. This culture medium completes the WHO regulations satisfactorily. The use of hemin from Fluka commercial house reflected an increase of 17,2 % over the remaining ones ($p < 0,05$). The hemin of Sigma and ICN threw satisfactory results too. However the use of hemin from Fluka and Calbiochem houses is contraindicated by its origin. These results allow the use of hemin from Sigma and ICN in the culture of the *Haemophilus influenzae* type b. On the other hand, the strain H1am/97 showed a superior expression of capsular polysaccharide ($p < 0,05$) among those evaluated, demonstrating the variability of the expression of polysaccharide from the strains evaluated.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por *Haemophilus influenzae* (Hi) son reconocidas en el ámbito mundial como un problema de salud, sobre todo, para las edades más tempranas.¹⁻³ *H. influenzae* muestra cepas encapsuladas y no encapsuladas en dependencia de la presencia o no de cápsula polisacáridica. Las cepas no encapsuladas, generalmente, no producen bacteriemia, mientras que el 95 % de los casos de meningitis y otras enfermedades bacteriémicas causadas por Hi se deben al serotipo b encapsulado.¹ *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) constituye la causa más frecuente e importante de meningitis bacteriana no epidémica en niños menores de cinco años, cuyo efecto puede ser severo y dejar secuelas neurológicas permanentes en aquellos que sobreviven. Se estima que más de 500 000 niños pequeños mueren anualmente en el mundo debido a esta enfermedad. Dentro de las infecciones producidas por Hib se encuentran también la celulitis, epiglotitis, neumonía y artritis séptica.^{1,3} La obtención de vacunas efectivas contra Hib ha sido objeto de trabajo de numerosos grupos e instituciones científicas en el mundo fundamentalmente, en los últimos 15 años.^{4,6} Las variantes de productos vacunales, en su mayoría plantean como componente primordial el antígeno polisacáridico capsular tipo b, copolímero lineal de unidades repetitivas de polirribosil-ribitol-fosfato (PRF).⁷⁻⁹ De forma general,

para la obtención de vacunas basadas en el PRF nativo se ha descrito la utilización de cepas muy productoras de este polisacárido como la Eagan crecida en medios de cultivo infusión cerebro corazón (ICC) y Müller Hinton (MH), suplementados con hemina bovina y nicotinamida adenindinucleotido (NAD).¹⁰⁻¹² En la última década, con la aparición de la encefalitis espongiforme de los bovinos, llamada *enfermedad de las vacas locas* en todos los ambientes regulatorios, incluyendo a Cuba,¹³⁻¹⁹ se rechaza el empleo de materias primas de origen bovino, principalmente, de cerebro, corazón y hemoderivados. Estos nuevos elementos obligan tanto a los investigadores como a los productores de vacunas a desarrollar investigaciones que les permitan la sustitución de estas materias primas (componentes de los medios de cultivo y factores de crecimiento) por otras provenientes de otros orígenes.^{13,14}

Este trabajo estuvo dirigido a la solución de problemas críticos en la obtención de polisacárido capsular de Hib, con el objetivo de poder contar con esta materia prima activa, que cumpla con los parámetros exigidos por la OMS²⁰ para este tipo de producto con vistas a la formulación de la vacuna contra el Hib.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de diferentes medios para el cultivo de *H. influenzae* tipo b

El cultivo se realizó utilizando una cepa de Hib (H1am/97), perteneciente a la colección del Instituto Finlay, Ciudad de La Habana. La cepa fue crecida en los medios a evaluar: ICC, MH y variante de Frantz modificado (VFM). Estos cultivos fueron suplementados con factores de crecimiento apropiados NAD y hemina. Los cultivos fueron desarrollados hasta el final de la fase logarítmica o inicios de la fase estacionaria en un tiempo comprendido entre 8 a 10 h. Al finalizar los cultivos, se procedió a cuantificar la expresión polisacáridica en los diferentes medios de cultivo empleados, mediante la metodología descrita por Finn.²¹ Se realizaron cuatro experimentos por variante.

Evaluación de diferentes tipos de hemina para la expresión de polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b

Los cultivos fueron desarrollados de la misma forma y condiciones que se describen anteriormente. Se

realizaron cuatro experimentos por variante. La cepa de Hib utilizada para este estudio fue la H1m/97 y el medio de cultivo la VFM, debido a resultados satisfactorios obtenidos con este medio en los experimentos realizados anteriormente y que se ha aplicado para otros tipos de polisacáridos como el *Salmonella typhi*.¹⁹

Las variantes de hemina empleadas fueron: Fluka: hemin chloride Biochemika, Lot. 332714 (51280) origen bovino; Sigma: hemin chloride, Lot. 97H0360 (H-7903), origen equino; Calbiochem hemin chloride, Lot. 6739 A (198820), origen bovino e ICN hemin chloride, Lot. B20557 (3741), de origen porcino. Al finalizar el cultivo, se evaluó la incidencia de la utilización del tipo de hemina en la expresión del polisacárido capsular de Hib según la metodología descrita por Finn.²¹

Evaluación de la expresión polisacáridica por parte de diferentes cepas de *H. influenzae*

En este experimento, se utilizaron las cepas tipo b, aislada de casos clínicos cubanos. Las cepas empleadas en este estudio fueron: H1am/90; H2am/96; H1am/97; Eagan (de referencia internacional). Se utilizó como control negativo la cepa 170 no tipable (no presenta cápsula polisacáridica). Los ensayos se realizaron a doble ciegas. Se incluyó como control negativo una cepa no tipable. Se realizaron cuatro réplicas de cada ensayo, por cepa. En este experimento, se utilizó la VFM como medio de cultivo. La cuantificación de la expresión de PRF por parte de cada cepa de *H. influenzae*, se determinó según la metodología descrita por Finn.²¹

Análisis estadístico

Los datos resultantes, tanto de la evaluación de las cepas, medios de

cultivo, así como los tipos de hemina, en su incidencia en la expresión de polisacárido capsular de *H. influenzae*, fueron procesados en el laboratorio sobre una base de datos de Microsoft Excel. Para la evaluación de la expresión de PRF se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y se aplicó el programa Statistic Graphics/98 para el cálculo de los estadígrafos (media, desviación estándar, coeficiente de variación y error de la media) y el análisis de las medias.

RESULTADOS

Evaluación de diferentes medios para el cultivo de *H. influenzae* tipo b

Al evaluar el crecimiento de *H. influenzae* tipo b en los diferentes medios de cultivo estudiados, se comprobó que al final del cultivo con la VFM se obtienen densidades ópticas cuatro veces mayores con respecto a los demás medios, siendo su fase de latencia despreciable, mientras que en los demás medios, esta fue de 2 h (Fig. 1). Las diferencias en cuanto a las fases de latencia pueden deberse a que los inóculos utilizados en estos experimentos, fueron tomados a las 5 h de cultivo, lo que significa que el inóculo del medio VFM se encontraba al final de la fase logarítmica; mientras que los correspondientes a los medios ICC y MH se encontraban en plena fase estacionaria. No se consideró importante reevaluar estas condiciones, homogenizando los inóculos por el estadio fisiológico y no por el tiempo, dado que el medio VFM permitió un rendimiento muy superior a los restantes, lo que no se afectaría por la disminución del período de latencia del ICC y del MH, pues solamente disminuiría el tiempo de cultivo para obtener el mismo rendimiento.

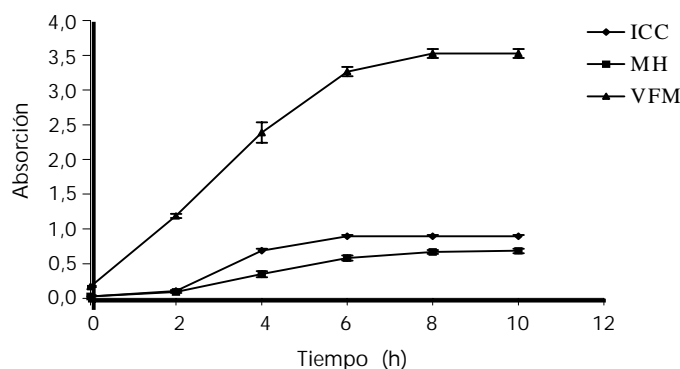


Fig. 1. Curvas promedio de crecimiento de *Haemophilus influenzae* tipo b en los distintos medios de cultivo evaluados. (N = 4). ICC Infusión cerebro corazón. MH Müller Hinton. VFM Variante de Frantz.

La fase de latencia de VFM resultó despreciable, mientras que en las variantes ICC y MH fue de dos horas. Todas las curvas de los medios a partir de las 8 h inician fase estacionaria.

A través del método de Finn²¹ se evaluaron las concentraciones de polisacárido obtenidas, en los diferentes medios de cultivo utilizados y se comprobó que el empleo del medio VFM asegura una mayor expresión de la cápsula polisacarídica por parte del microorganismo. Se obtuvo un incremento promedio de PRF del 20,5 % con respecto al ICC. El medio ICC mostró un incremento promedio de PRF del 23,4 % con respecto al MH (Tablas 1 y 2).

Análisis estadístico

A los datos tabulados anteriormente, se les realizó un análisis estadístico, el cual mostró que los resultados de la expresión polisacarídica en el medio VFM, eran significativamente superiores.

Varianza:

Prueba	Valor
Cochran:	0,465
P:	0,771
Bartlett's:	1,041
P:	0,852
Hartleys:	1,974

P > 0,05, nivel de confianza del 95 %.

Las pruebas estadísticas mostradas, en la prueba de la hipótesis nula, indican que las desviaciones estándar son similares y que no existen diferencias significativas entre ellas.

En el análisis del ANOVA se observó la existencia de diferencias significativas entre las medias de las variables analizadas con un nivel de confianza del 95 %.

Se pudo observar la existencia de diferencias significativas (p < 0,05) entre las medias de concentración de PRF en los medios de cultivos utilizados (Tablas 1 y 2), no así dentro de un mismo medio.

Evaluación de diferentes tipos de hemina para la expresión de polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b

La cuantificación de PRF, en el caso de la utilización de diferentes tipos de hemina arrojó que la variante 1, proveniente de la casa comercial Fluka, mostraba resultados superiores en comparación con las demás (Fig. 2).

Las concentraciones de PRF que se obtuvieron mediante el empleo de las heminas procedentes de las firmas Fluka y Sigma (35 y 30,5 µg/mL, respectivamente) estuvieron por encima de la media (28 µg/mL). El análisis estadístico demostró la ausencia de diferencias significativas dentro de un mismo grupo.

La utilización de la hemina proveniente de la casa comercial Fluka fue la de mejores resultados en cuanto a la expresión polisacarídica (casi cinco veces más que lo obtenido con la hemina de la Sigma). Los resultados obtenidos con la utilización de la hemina de Sigma e ICN son estimados como satisfactorios, considerando lo reportado por Finn en cuanto al nivel de expresión polisacarídica.²¹ Los resultados obtenidos con la hemina de la casa comercial Calbiochem no fueron satisfactorios (casi 14 veces menor que lo obtenido con la hemina de Fluka).

Evaluación de la variabilidad de la expresión de polisacárido capsular por parte de distintas cepas de *H. influenzae* tipo b

Según se pudo comprobar (Fig. 3) la expresión de PRF por parte de la

cepa H1am/97 resultó el doble de las restantes, incluso de la Eagan de referencia internacional, lo que permitió valorar el empleo de determinada cepa y seleccionar una adecuada en la expresión polisacarídica.

Las cepas clínicas expresan mayor cápsula polisacarídica que la cepa Eagan. No se evidenciaron diferencias significativas en los experimentos dentro de un mismo grupo. La cepa 170 no se muestra (Fig. 3) debido a la ausencia de producción de cápsula, lo que concuerda con su característica no tipable. Se pudo observar (Fig. 3) que la expresión polisacarídica por parte de las cepas estudiadas difieren, hecho que corrobora lo expuesto por Finn²¹ en cuanto a la variabilidad de la expresión de PRF por parte de las cepas de Hib como se muestra en las tablas 3 y 4.

Tabla 1. ANOVA de clasificación simple de la producción del polisacárido de *H. influenzae* tipo b (PRF) en cada uno de los medios evaluados.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Radio- F	P
Entre grupos	712,247	2	356,123	6 199,4***	0,000
Dentro de los grupos	0,516	9	0,057		
Total	712,764	11			

*** Significativo para p < 0,05; nivel de confianza del 95 %.

Tabla 2. Prueba de múltiple rango. Método 95 % LSD.

Medios de cultivo	Diferencia	± Límites
VFM - ICC	9,852 5*	0,383
VFM - MH	18,865*	0,383
ICC - MH	9,012*	0,383

* Existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 %. VFM Variante de Frantz modificado. ICC Infusión cerebro corazón. MH Müller Hinton.

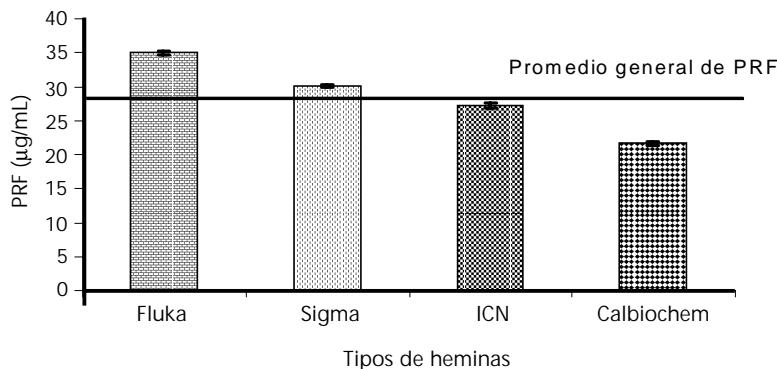


Fig. 2. Expresión del polisacárido de *H. influenzae* tipo b (PRF) con las heminas evaluadas provenientes de diferentes casas comerciales (Fluka, Sigma, ICN y Calbiochem).

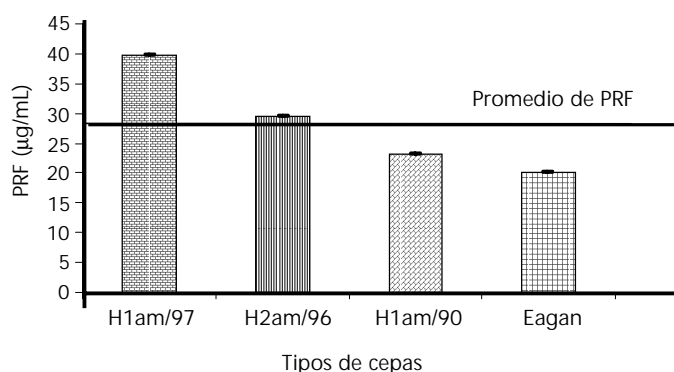


Fig. 3. Expresión media del polisacárido de *H. influenzae* tipo b (PRF) por parte de cada cepa evaluada.

Tabla 3. ANOVA de los resultados de la evaluación de las cepas de *H. influenzae* tipo b en la expresión del polisacárido capsular (PRF).

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Radio- F	P
Entre grupos	902,936	3	300,979	3 964,37	0,000
Dentro de los grupos	0,911	12	0,076		
Total	903,847	15			

$P < 0,05$. Diferencia significativa entre los grupos analizados con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 4. Análisis estadístico por LSD de los resultados de la evaluación de las cepas de *H. influenzae* tipo b en la expresión del polisacárido capsular (PRF).

Cepa	Diferencia	± Límites
H1am97 - H2am96	*10,272	0,424
H1am97 - H1am90	*16,565	0,424
H1am97 - Eagan	*19,648	0,424
H2am96 - H1am90	*6,292	0,424
H2am96 - Eagan	*9,375	0,424
H1am90 - Eagan	*3,082	0,424

* Existen diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de igualdad de varianza

Prueba de Cochran: 0,279
de Bartlett's: 1,005
de Hartleys: 1,287

$P > 0,05$; nivel de confianza del 95 %.

Resultado de particular importancia que los valores de p son mayores de 0,05, lo que indica que no existen diferencias significativas para un 95 % de intervalo de confianza.

DISCUSIÓN

La "Enfermedad de las Vacas Locas",¹³⁻¹⁵ ha generado en diversos países una ola negativa, respecto al uso de medios de cultivos constituidos por extractos de tejidos de animales, sobre todo, de origen bovino, los cuales se emplean en diversas producciones biológicas. Debido a ello, en estos momentos, la utilización del

medio VFM para la producción de la vacuna anti-Hib podría adquirir múltiples ventajas, ya que se puede emplear como sustituto de los medios convencionales para el cultivo de Hib, donde el microorganismo manifiesta un crecimiento satisfactorio.

Por otra parte, mediante la micropurificación y cuantificación de PRF en los distintos medios evaluados, se comprueba una mayor expresión de cápsula polisacáridica en la VFM, evidenciándose la existencia de diferencias significativas entre los valores de PRF en los diferentes medios. Además, garantiza un mejor proceso de purificación de polisacárido, lo cual está dado por su composición mucho más sencilla y la ausencia de macromoléculas que pudieran interferir en el proceso.

Hilleman,²² Marbug²³ y Anderson,²⁴ entre otros, han reportado resultados similares con medios salinos. Es significativo señalar que estos medios son mucho más económicos que los convencionales como el ICC y el MH.

Por otra parte, debido a la "Enfermedad de las Vacas Locas",^{13,14} el empleo de la hemina, de origen bovino, está contraindicado en el mundo, (sobre todo para las vacunas conjugadas contra Hib). Por lo tanto, es imprescindible la utilización de las heminas de origen equino y porcino. Es necesario señalar que si se utilizara la hemina de origen bovino, sería necesario aplicar una batería analítica adicional para comprobar la ausencia de residuos de componentes de este origen, o contar con un aval del fabricante, el cual asegure que está libre de componentes de origen bovino. Es conocido que la hemina no está relacionada directamente con la expresión polisacáridica, ya que se utiliza como factor esencial que interviene en el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, un mayor crecimiento redundará en una mayor cantidad de células y por lo tanto, en una mayor cantidad de cápsula polisacáridica. Los presentes resultados mostraron que existe variabilidad en el total de polisacárido expresado y obtenido mediante la utilización de los distintos tipos de hemina, algo no conocido hasta este momento.²⁰

El análisis de la evaluación de la variabilidad de la expresión de polisacárido capsular por parte las cepas de *H. influenzae* tipo b, mostró la existencia de diferencias entre ellas. Es significativo señalar que este experimento fue realizado a doble ciegas y se introdujo una cepa no tipable (no produce cápsula) para corroborar la efectividad de la técnica empleada. La concentración de PRF en la cepa 170 fue de 0,015 µg/mL. Este pequeño valor se debe a la presencia de glucosa en el medio de cultivo empleado, la cual causa un falso positivo a la determinación de ribosa y PRF. Este valor se tuvo en cuenta a la hora de la determinación correcta de PRF. Estos resultados demuestran la efectividad de la aplicación de la micropurificación del PRF y su cuantificación, ya que es capaz de discriminar entre cepas que contengan cápsula polisacáridica y aquellas que no la poseen, permitiendo su utilización como un método complementario a la caracterización de las cepas de *H. influenzae*. Estos resultados demuestran que la

aplicación de esta técnica permite evaluar en cuánto se está expresando el antígeno principal, cómo influye el tiempo de conservación de la cepa en la expresión polisacáridica y el sitio de aislamiento de la cepa (líquido encefalorraquídeo, sangre, nasofaringe). Todo esto repercute en la selección de la cepa vacunal adecuada para la obtención del principal factor de virulencia. Es significativo señalar que este procedimiento no está descrito para ningún otro microorganismo, para los cuales se emplean métodos más engorrosos y de costos elevados.

De manera general, según los resultados de este trabajo, la estrategia a seguir en la obtención del antígeno fundamental de la vacuna contra *H. influenzae* será el diseño de medios de cultivo, como la VFM, y la utilización de factores de crecimiento que cumplan satisfactoriamente las regulaciones de la OMS²⁰ debido al llamado "Mal de las Vacas Locas" y que contribuyan a la disminución de los costos de la vacuna. Además, es muy importante la adecuada selección de la cepa que se va a emplear en la obtención de este antígeno, ya que como se demuestra en el trabajo, existen diferencias significativas en cuanto a la expresión de la cápsula polisacáridica por parte de las cepas.

CONCLUSIONES

Debido a la *enfermedad de las vacas locas* existen parámetros reguladores que deben cumplirse en la obtención del PRF, tales como el medio de cultivo, la hemina a utilizar entre otros aspectos. Los resultados sugieren la utilización de la VFM como medio de cultivo para Hib, así como la hemina de origen equino y porcino. Además, este tra-

bajo evidenció diferencias significativas en la expresión polisacáridica al variar los parámetros en la obtención de PRF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aubrey R. and Tang C. The pathogenesis of disease due to type b *Haemophilus influenzae*. **Methods Mol. Med.**, **71**, 29-50, 2003.
2. Capiou C., Poolman J., Hoet B., Bogaerts H. and Andre F. Development and clinical testing of multivalent vaccines based on a diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: difficulties encountered and lessons learned. **Vaccine**, **21**, 2273-87, 2003.
3. Curtis N., Duke T., Fuller D. and Shann F. Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. **Lancet**, **361**, 1564, 2003.
4. McVernon J., Johnson P.D., Pollard A.J., Slack M.P. and Moxon E.R. Immunologic memory in *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine failure. **Arch. Dis. Child.**, **88**, 379-83, 2003.
5. Greenberg D.P. and Feldman S. Vaccine interchangeability. **Clin. Pediatr. (Phila)**, **42**, 93-9, 2003.
6. Garner D. and Weston V. Effectiveness of vaccination for *Haemophilus influenzae* type b. **Lancet**, **361**, 395-6, 2003.
7. Segal S. and Pollard A.J. The future of meningitis vaccines. **Hosp. Med.**, **64**, 161-167, 2003.
8. Ada G. and Isaacs D. Review. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.**, **9**, 79-85, 2003.
9. Ugozzoli M., Mariani M., Del Giudice G., Soenawan E. and O'Hagan D.T. Combinations of protein polysaccharide conjugate vaccines for intranasal immunization. **J. Infect. Dis.**, **186**, 1358-61, 2002.
10. Swennen B. and Sternon J. Conjugate vaccines. **Rev. Med. Brux.**, **23**, A237-46, 2002.
11. Chokephaibulkit K. Combination vaccines. **J. Med. Assoc. Thai.**, **85**, Suppl. 2, S694-9, 2002.
12. International Conference on Emerging Infectious Diseases. **Infect. Dis.**, **5**, 1999, 2000.
13. Hilleman M.R. (Vacas). Overview of the needs and realities for developing new and improved vaccines in the 21st century. **Intervirolgy**, **45**, 199-211, 2002.
14. Bren L. FDA continues work to help prevent mad cow disease. **FDA Consum.**, **36**, 31-2, 2002.
15. Concepcion G.P. and Padlan E.A. Are humans getting 'mad-cow disease' from eating beef, or something else? **Med. Hypotheses**, **60**, 699-701, 2003.
16. Enserink M. Infectious diseases. Is the U.S. doing enough to prevent mad cow disease? **Science**, **292**, 1639-41, 2001.
17. TIME. Morning Edition. A fatal beef crisis. 18-23, 1996.
18. Tamargo I., Torano G., Rodríguez O., Perez M. and Llop A. Characterization of *Haemophilus influenzae* obtained from invasive disease in Cuban children under five years of age. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro; **94**, 477-78, 1999.
19. Sierra G. Mal de las Vacas Locas. **Vaccinmonitor**, **6**, 2-3, 1997.
20. OMS Serie de Informes Técnicos 814.41. Informe. Ginebra, 22, 1991.
21. Finn Ch. European patent Application No. 0 546 349 A2, 1993.
22. Hilleman M.R. Coupled *H. influenzae* vaccine. Patent US 4. 459. 286, 1984.
23. Marburg S. Covalently modified polyanionic bacterial polysaccharides, stable covalent conjugates of such polysaccharide and immunogenic protein with bigeneric spaces, and methods of preparing such polysaccharides and conjugates and of confirming covalency. Patent US 4. 695.6241, 1987.
24. Anderson P.W. Immunogenic conjugates. Patent US 4 761 283. 20, 1988.
25. Kabat E.A. and Mayer M.M. Carbohydrate estimation en Experimental Immunochimistry.; (2nd ed.), Thomas C.C., Springfield, III, 501-37, 1961.