



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

PRESENCIA DE ANTIGENO COMÚN ENTEROBACTERIANO
(ECA) EN UNA CEPA DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA
CULTIVADA EN UN MEDIO AZÚCARO

Nombre del sustentante: **MARIA ELISA DRAGO SERRANO**

Carrera: **QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

- I INTRODUCCION
- II GENERALIDADES
 - A. Relación huésped-parásito en la endiasis
 - B. El Antígeno Común Enterobacteriano (ECA)
 - C. Métodos Inmunológicos para el estudio del ECA
- III MATERIAL Y METODOS
- IV RESULTADOS
- V DISCUSION
- VI RESUMEN
- VII BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

El avance de los estudios inmunoparasitológicos en la amibiasis, ha sido propiciado en gran parte, con el empleo del medio axénico (9) que permitió el cultivo estéril de amibas. El uso de este medio ha hecho posible obtener extractos crudos de amibas libres de bacterias, los cuales son empleados en estudios seroepidemiológicos (19), además se han podido clonar en condiciones estériles, diferentes cepas de E. histolytica con grados variables de patogenicidad (10). Desde que se dispone de este medio, se han impulsado los estudios que tratan de determinar las posibles causas de la diferente virulencia que exhiben diferentes cepas de E. histolytica, cuando se les utiliza para retar experimentalmente y por diferentes vías, a animales de diversas especies (31).

A pesar de que es posible obtener antígenos amibianos para su análisis químico (23), los intentos de caracterizar química y antigénicamente diferentes cepas de E. histolytica no han dado resultados satisfactorios ya que, a diferencia de las bacterias, estos protozoarios además de ser células de un tamaño mucho mayor que las bacterias, poseen una compleja estructura antigénica situada sobre una membrana que se halla en constante movimiento (29). Estas características morfológicas de las amibas, difieren considerablemente de la estructura antigénica rígida y repetitiva que conforma la pared celular de las bacterias.

Los resultados obtenidos en diferentes trabajos sobre los antígenos de E. histolytica (14), no han definido alguna sustancia que pueda tener un papel relevante en la relación huésped-parásito que, en el caso de la amibiasis invasora, continúa siendo un terreno poco conocido. En contraste con esto, se ha recibido mucho mayor información sobre diferentes antígenos de enterobacterias que apoyan una relación huésped-parásito cada vez más conocida y estudiada (21).

Uno de los antígenos bacterianos que ha sido objeto de numerosas investigaciones (39), es el antígeno común enterobacteriano (ECA).

La presencia de este antígeno en algunos serotipos de E. coli ha sido relacionada a la probable capacidad patógena / al grado de virulencia de estas bacterias (32). Diversos grupos de investigadores han realizado estudios sobre los antígenos de otras bacterias tratando de establecer una relación entre el específico antigénico de las mismas y su capacidad para invadir / provocar una infección (1).

Estos trabajos tienen su base en la hipótesis (30) de que un agente infectante pueda reconocer ciertos receptores situados en la membrana celular de los tejidos del huésped, hacia los cuales tiene afinidad y capacidad para acoplarse, y que esta interacción microorganismo-receptor, tal vez sea el primer paso para que un agente infectante pueda invadir y establecerse en los tejidos hacia los cuales el microorganismo tiene afinidad.

En relación con el antígeno común enterobacteriano (Enterobacterial Common Antigen ECA), las observaciones más importantes sobre el papel de este antígeno en la incidencia de infecciones, se realizaron sobre niños menores de seis meses, en los cuales se comprobó que sus episodios diarreicos se relacionaban con una disminución en el contenido de ECA en E. coli aislados en el curso del episodio diarreico agudo (3).

Como el ECA es un antígeno que también se halla presente en la mucosa intestinal humana (43) y Entamoeba histolytica es un protozoo que, al igual que Escherichia coli tiene su hábitat en la mucosa del intestino, se propuso como objetivo de trabajo, determinar si los trofozoitos de la cepa HK-9 de E. histolytica cultivada en condiciones axénicas, contenía o no el ECA presente tanto en la mucosa intestinal como en las enterobacterias.

II. GENERALIDADES

A. Relación huésped-parásito en la amibiasis

A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre la patogenicidad de E. histolytica, aún no se conocen completamente los diferentes mecanismos responsables de los diversos grados de virulencia, que pueden tener algunas cepas de este protozoario (10). La capacidad del parásito para provocar enfermedad en el huésped, tiene su contraparte en la capacidad de este último para defenderse de la infección causada por E. histolytica. De este modo, la suma de múltiples factores puede provocar un estado de portador sano o una enfermedad grave.

Para que E. histolytica pueda ejercer su efecto patógeno, necesita hallar ciertas condiciones favorables en el huésped, determinadas por ciertos factores tales como, el pH y el potencial redox del lumen intestinal, la nutrición, la flora comensal del intestino, el nivel de colesterol sérico, el balance hormonal etc. Pero no sólo el huésped proporciona el medio ambiente adecuado para que la amiba pueda crecer y desarrollarse, sino que además intervienen factores de tipo genético e inmunológico que podrían influir en la diferente susceptibilidad de diversas especies animales a la infección por estas amibas. Se ha reportado que los gatos, hamsters y cobayos son susceptibles a la infección amibiana, mientras que los perros, conejos, monos, ratas y ratones son resistentes (6).

La desnutrición se ha señalado como uno de los factores más importantes que influyen en la aparición de la infección amibiana. Aunque este punto no está completamente comprobado, se tienen evidencias experimentales que muestran que, la presencia o ausencia de algunos nutrientes en la dieta, puede contribuir al desarrollo o prevención de la enfermedad.

Se ha podido demostrar que la amibiasis en ratas, se agudiza cuando son alimentadas con una dieta de alto contenido en carbohidratos (39) y la enfermedad desaparece cuando estos animales son sometidos a una dieta con alto contenido de proteínas (13).

Además se ha informado que la deficiencia en la ingesta de ácido ascórbico favorece el desarrollo de la infección amibiana en cobayos (50). Otra observación importante realizada en los mismos animales, es el aumento de la frecuencia de la amibiasis cuando aumentan los niveles de colesterol sérico (3). Existen otros trabajos que informan acerca de la influencia de algunos esteroides para facilitar la aparición de abscesos hepáticos amibianos en cobayos (4) y se ha observado que la administración de corticoides favorece el desarrollo de la infección amibiana en el humano. Sin embargo, esta observación se ha tomado con reserva. Se ha propuesto que el hombre, las deficiencias nutricionales propician la enfermedad ya que la desnutrición puede dar lugar, a la atrofia de la mucosa intestinal y, esta a su vez facilita la penetración de las amibas al interior de la pared intestinal.

Las bacterias comensales del intestino, han sido consideradas como responsables de exaltar la virulencia de las amibas, es decir, excarban la capacidad patógena de estos parásitos para provocar la enfermedad con sus manifestaciones clínicas características.

En trabajos realizados con cultivos axénicos de amibas, se ha observado que al ser prolongados dan lugar a la pérdida de la virulencia de estos parásitos (55). Sin embargo, pueden recuperarla cuando se asocian a bacterias. Según algunos autores la pérdida de la virulencia de estos organismos, se debe a que disminuye su capacidad para enquistarse, esto aún no ha sido comprobado completamente, ya que si se emplea Cri-thidia para mantener a las amibas sin enquistarse, no se altera la virulencia de este protozoario (28).

La proliferación activa de las bacterias no es un requisito necesario para manifestar el aumento de la virulencia de las amibas, ya que este efecto se observa también si se emplean bacterias en fase lag de desarrollo (2). Por otro lado, las amibas asociadas con I. cruzi e inoculadas en cobayos gnotobióticos, no provocan lesiones. Sin embargo, si se emplea E. coli o A. nrocyane en lugar de I. cruzi estos animales presentan colitis ulcerativa (49).

Los resultados de estos experimentos sugieren que la simple aso-

ciación ameba-bacteria no es una condición suficiente para producir lesiones en el huésped, sino que, debe haber cierto sinergismo para que el protozooario y la bacteria den lugar al efecto patógeno.

La respuesta inmune del huésped frente a la ameba ha sido considerado por algunos investigadores como un factor clave en el desarrollo de la amebiasis. La inmunidad, además de implicar el desarrollo de los mecanismos de defensa del huésped, implica la aparición de una gran variedad de reacciones inmunes conocidas de un modo general como hipersensibilidad. Se han hecho reiteradas objeciones sobre la falta de inmunidad adquirida en pacientes que sufren de absceso hepático amebiano, los cuales no logran desarrollar una respuesta inmune protectora contra nuevas reinfecciones, sin embargo otros investigadores opinan lo contrario sobre este problema (20).

La presencia de anticuerpos IgG e IgM no indican, necesariamente la presencia de la infección activa, sino que puede significar una infección pretérita de la ameba sobre los tejidos del huésped (15). No obstante estos anticuerpos pueden servir para propósitos clínicos ya que su presencia puede demostrarse mediante diversas técnicas como la hemaglutinación pasiva, precipitación, aglutinación con partículas de latex y métodos de inmunofluorescencia.

La inmunidad humoral contra los antígenos de E. histolytica, puede ser demostrada mediante pruebas cutáneas cuya positividad indica la presencia de IgE anti-ameba. Otras pruebas cutáneas practicadas en enfermos con absceso hepático amebiano, indican que hay una respuesta celular deprimida contra los antígenos amebianos, aunque esta respuesta tiende a elevarse después de someter al paciente al tratamiento contra el absceso, aún no se conoce si este fenómeno se debe a la inmunidad protectora. (15).

Los experimentos sobre las reacciones de hipersensibilidad inducida al inocular intracelularmente (24) e intraperitonealmente (25) el hígado de hamsters y cobayos, indican el desarrollo de lesiones en los primeros, pero este efecto no se ha observado en los segundos. Sin embargo,

si el hígado de cobayo es infectado con amibas que se inyectaron por vía portal o bien, a través de lesiones intestinales persistentes (37), se pueden desarrollar abscesos hepáticos en los cuales se distinguen lesiones granulomatosas con infiltraciones de linfocitos pequeños. Estas observaciones sugieren que el establecimiento del absceso hepático en el cobayo se debe, tal vez, a una reacción vigorosa frente a la amiba, lo cual da lugar a lesiones primarias debidas quizá a una reacción antígeno-anticuerpo en el hígado que, de este modo, se hace más receptivo al parásito (8).

En los párrafos anteriores se han descrito los aspectos generales del huésped que pueden ayudar a comprender el establecimiento de la amiba para dar lugar a la enfermedad. Pero también es necesario señalar algunas características del parásito que lo hacen más apto para ejercer su efecto patógeno.

Se ha propuesto que la actividad patogénica de las amibas se debe tal vez, a un potencial intrínseco, que es hereditario y que puede regir la diferente patogenicidad de diversas cepas de E. histolytica, además puede influir en la capacidad patógena de las amibas comensales, tales como E. hartmanni, E. coli etc (9).

Los análisis inunofluorescentes de diversas cepas amibianas (17) indican que existen diferencias antígenicas entre las amibas patógenas y las no patógenas. Se ha reportado que las primeras como por ejemplo E. histolytica, dan lugar al aumento en el título de anticuerpos en pacientes que sufren de amibiasis extraintestinal, a diferencia de las amibas comensales que dan lugar a un leve aumento en el título de anticuerpos séricos (45).

Hasta ahora no se han establecido diferencias fundamentales entre las amibas patógenas y las no patógenas en un huésped determinado. En un principio se propuso que la diferencia primordial entre ambos grupos se debía, a la capacidad que tienen las amibas patógenas de penetrar al epitelio de la mucosa intestinal y a su diseminación en los tejidos, facilitada por la presencia de enzimas proteolíticas.

Aún cuando, estas enzimas se hallaron tanto en cepas altamente patógenas como en amibas no patógenas (20), Sargeant (21) desarrolló un método enzimático para clasificar bioquímicamente diferentes cepas de E. histolytica en zinitipos o zinodemas. Este autor determinó que existían patrones enzimáticos en las amibas que coincidían con la patología de la amibiasis, y además correlacionó los patrones enzimáticos que correspondían a las amibas presentes en portadores sanos.

Los intentos de caracterizar químicamente y anti-genicamente diferentes cepas de E. histolytica, con el objeto de determinar cuales antígenos podrían servir como marcadores de la virulencia o bien, para valorar la respuesta inmune del huésped en la amibiasis, aún no han dado resultados satisfactorios.

Este problema ha sido tratado con resultados más halagadores en las bacterias, donde se han definido antígenos que tienen un papel importante en la aparición de algunas enfermedades infecciosas causadas por microorganismos.

Se han llevado a cabo experimentos que tratan de establecer una relación entre el mosaico anti-genico de las bacterias y la capacidad patógena de éstas. Algunos autores han realizado estudios para determinar si los microorganismos dan lugar a una infección, en base a que pueden hallar en los tejidos del huésped ciertas estructuras químicas que actúan como receptores de un determinante anti-genico específico del microorganismo. Uno de los antígenos bacterianos, el cual se ha sugerido, puede estar implicado en esta interacción microorganismo-receptor, es el antígeno común enterobacteriano.

Aunque esta última observación no ha sido completamente corroborada, es importante estudiar más a fondo el posible papel de este antígeno en la relación huésped-parásito de bacterias y también sería importante estudiarlo en las amibas, ya que como se describió en los párrafos anteriores, existen estrechas relaciones entre ambos organismos y que son determinadas en cierta forma, por el hecho de que tanto las amibas como las bacterias, tienen su hábitat en el intestino y que además es interesante hacer notar que en este último, se ha demostrado la presencia del ECA.

Aunque no es posible especular sobre el significado del ECA en las amibas, este trabajo trata de iniciar una línea de investigación que pueda contribuir a esclarecer su posible papel en la patogenicidad de S. histolytica, esto puede ser importante para comprender la relación huésped-parásito en la amibiasis.

B. El antígeno común enterobacteriano

En vista del objetivo propuesto para este trabajo, conviene destacar algunas observaciones importantes que se han realizado sobre el antígeno común enterobacteriano.

Los estudios sobre la composición antigénica de las enterobacterias, fueron iniciados por Kauffmann y han permitido la clasificación de estas bacterias en base a sus diferentes estructuras antigénicas, las cuales han sido denominadas: antígeno somático O (Lipopolisacárido O), antígeno K, antígeno H y el antígeno común enterobacteriano (ECA), el cual hasta ahora, ha sido el único antígeno enterobacteriano en ser identificado.

El ECA fue demostrado por Kunin (14) quien lo detectó mediante la reacción de hemaglutinación entre los glóbulos rojos ferrados con extractos crudos de 145 serotipos O de Escherichia coli y los anticuerpos versus cada serotipo, los cuales se obtenían inyectando a conejos, por vía intravenosa, suspensiones de bacterias muertas por calentamiento a 100°C durante 1 hora. El suero anti E. coli O14 resultó ser el que inducía la mayor aglutinación de los glóbulos rojos sensibilizados con diferentes extractos bacterianos y, en menor proporción, los sueros anti E. coli O55 y anti E. coli O144. Los sueros contra los serotipos restantes no daban lugar a la hemaglutinación.

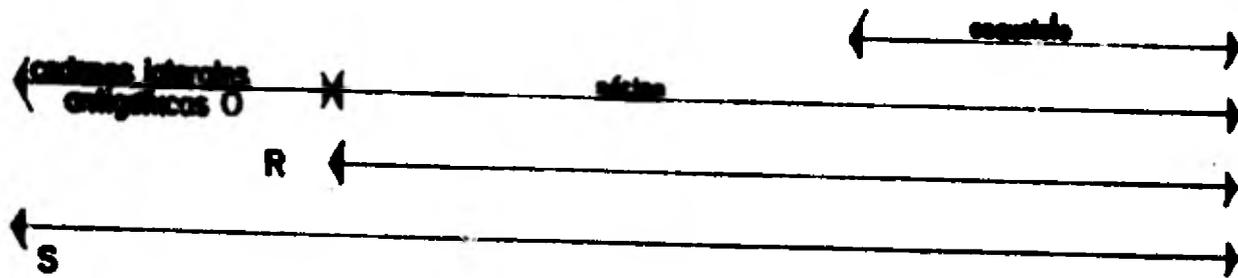
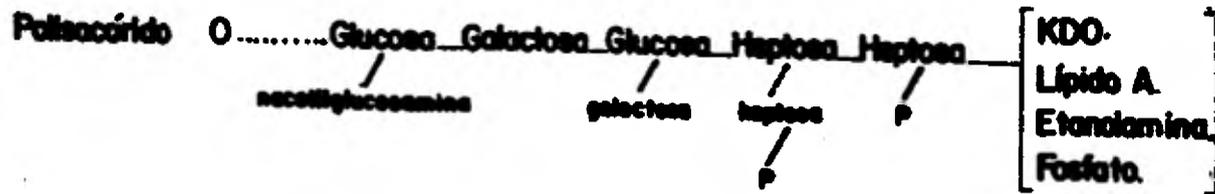
Estos hallazgos indicaban que el suero anti E. coli O14 parecía poseer un alto título de anticuerpos contra un antígeno común a todas las cepas de E. coli, mientras que los otros sueros poseían títulos menores o carecían completamente de ellos. Esto hizo suponer que había un antígeno común que se hallaba presente en estas bacterias en dos formas: una presente en muy pocas cepas, entre ellas el serotipo E. coli O14, cuyas propiedades inmunológicas se deben probablemente a su unión covalente con el núcleo del lipopolisacárido O o antígeno somático O de la pared celular bacteriana, y otra forma haptérica o libre, presente en la mayoría de los diferentes serotipos de E. coli y capaz de ferrar eritrocitos, dando lugar a su aglutinación, pero ineficaz para evocar la formación de anticuerpos.

La aplicación de diversos métodos de aislamiento del ECA (20)(40) ha permitido profundizar el conocimiento acerca de la estructura de este antígeno. Sin embargo, la naturaleza ambivalente de este último, ha dificultado determinar su composición química. Aunque no existe un acuerdo general acerca de la estructura química del ECA, Lannel y Meyer (40), proponen con sólidas evidencias, que este antígeno es un tetraoligómero constituido principalmente por dos amino azúcares: el N-acetil-D-glucosamina y el N-acetil-Manosaminourónico, ambos esterificados con ácido palmítico y ácido acético.

El N-acetil-Manosaminourónico parece ser la molécula que le confiere al ECA sus propiedades antigénicas, ya que está presente en todas las bacterias ECA positivas, mientras que las bacterias ECA negativas carecen de este amino azúcar. El ácido palmítico se ha implicado en la capacidad del ECA hapténico o "libre" para ferrar los glóbulos rojos dando lugar a su aglutinación. Sin embargo, esta propiedad la pierde cuando se somete este hapteno a un previo tratamiento con hidróxido de sodio, en cambio, el tratamiento alcalino aumenta la capacidad del ECA unido al LPS O para ferrar glóbulos rojos (43). Las diferencias en la inmunogenicidad y solubilidad en medio acuoso, se han atribuido a la presencia o ausencia de algunos péptidos unidos al ECA inmunogénico y hapténico respectivamente.

Mediante el empleo de mutantes rugosas de enterobacterias se ha determinado la estructura del LPS O (Lipopolisacárido O), el cual está formado de cadenas polisacáridas que determinan la especificidad de los antígenos polisacáridos O en fase lisa, estos últimos se unen a un núcleo oligosacárido, el cual a su vez está unido al lípido A a través del ácido 2 o 3 dehidrooctanoico (38). En la figura A se ilustra la estructura del LPS O (o antígeno somático O) en cepas lisas y rugosas de enterobacterias (39).

Este núcleo además de ser aceptor de las cadenas polisacáridas O, lo es también del ECA y del antígeno K. La biosíntesis del núcleo y las cadenas polisacáridas O, está regulada por los genes *rfa* y *rfb* respectivamente (41)(33) y la transferencia enzimática del ECA hacia el núcleo oligosacárido está regulada por el gene *rfaI* (52).



ANTIGENO SOMÁTICO O (LPS O).

Fig. A.

La estructura química de los LPS de las enterobacterias, depende de la unión del ECA hacia el núcleo del LPS O. En E. coli se conocen diferentes núcleos oligosacáridos denominados R1, R2, R3, R4; el núcleo de la cepa E. coli K12 (53) (54), mientras que en Salmonellas se conocen varios núcleos denominados Ra, Rb, Rc, Rd y Re (55).

Suzuki (57) logró separar parcialmente el ECA del LPS O al tratar el extracto crudo de cepas no inmunogénicas con alcohol etílico al 95%. El ECA se halló en la fracción soluble (FS) en etanol, y al ser inyectada a conejos, evocaba la formación de anticuerpos anti ECA, aunque elevaba ligeramente el título de anticuerpos anti O, mientras que el LPS O se detectó en la fracción insoluble (FI) y al igual que el extracto crudo, daba lugar a la formación de anticuerpos anti O, pero no anti ECA.

Este mismo autor observó que la mezcla etanólica de la FS más la FI, disminuía notablemente la capacidad de esta última para formar anticuerpos anti ECA, aunque el efecto era menos drástico cuando la mezcla de ambas fracciones se preparaba en medio acuoso. Además observó que la inhibición de la capacidad inmunogénica de la FS, se llevaba a cabo cuando la de esta última más la FI se inyectaba en la vena de conejo, en cambio, este efecto no se observaba cuando ambas fracciones, por separado, se inyectaban simultáneamente en diferentes venas del mismo animal (58), esto indicaba que la inhibición de la capacidad inmunogénica del ECA se debía a una interferencia con el LPS O, más que al efecto de este mismo sobre el conejo.

Chang (52) identificó al lípido A de la fracción insoluble como el responsable de la disminución de la inmunogenicidad de la FS para dar lugar a la formación de anticuerpos anti ECA. Neter y cols. (45) propusieron que el LPS (al cual contiene al lípido A) suprime la formación de anticuerpos en cepas no inmunogénicas, y esta falta de inmunogenicidad es lo que se observa en la mayor parte de las enterobacterias. En cambio, en cepas inmunogénicas como E. coli O:4 no se observa el efecto inauspicioso del LPS O sobre la fracción insoluble, siendo esta última la fracción que evoca la formación de anticuerpos anti O, en estas bacterias (41).

En un estudio realizado por Loyer y cols. (44) descubrieron que ciertas variantes rugosas de núcleo R1 de E. coli inducían un aumento en

el título de anticuerpos anti ECA (cuando estas bacterias calentadas se inyectaban a conejos), en una proporción análoga a la obtenida con E. coli O14 cuyo núcleo es de tipo R4. Al igual que esta última, el tratamiento alcalino de los LPS de estas mutantes R1 aumentaba su capacidad de formar glóbulos rojos para dar lugar a su aglutinación. Estas características comunes indicaban que las bacterias de núcleo R1 tenían un ECA unido al núcleo del LPS O en forma similar al ECA de la cepa E. coli O14 con núcleo de tipo R4.

Paralelamente Whang (24) determinó que el ECA inmunogénico de las mutantes tipo R1 se hallaba en la fracción insoluble en etanol, mientras que las bacterias precursoras lisas, lo contenían en la fracción soluble. La capacidad inmunogénica de las bacterias viables de núcleo R2, R3 y R4, se reducía con el calentamiento.

El posible papel del ECA en la patogenicidad de las enterobacterias ha sido tratado por varios investigadores con resultados aparentemente contradictorios. Por un lado Valtonen (20), empleando bacterias ECA⁺ y ECA⁻ de S. typhimurium, observó que la LD₅₀ (Dosis Letal Media) de las bacterias ECA⁻ era diez veces mayor que la LD₅₀ de las bacterias ECA⁺ al ser inoculadas a ratones. Mientras que Hojyo y cols. (22), comprobaron que al disminuir el contenido de ECA en varios serogrupos de E. coli, aumentaba su virulencia en el estrión de pollo y su patogenicidad en el asa ileal de conejo.

Por otro lado Carrillo y cols. (8) comprobaron que el contenido de ECA en varios serogrupos de E. coli (tanto enteropatógenos como no enteropatógenos) se hallaba disminuido cuando se les aislaba en el curso agudo del episodio diarreico en niños lactantes menores de seis meses de edad, si se lo comparaba con el contenido de ECA en las mismas enterobacterias aisladas en el período convaleciente o antes de la enfermedad.

Se ha señalado que siendo E. coli O14 un serogrupo que posee uno de los títulos más elevados de antígeno común, se aisló excepcionalmente de los coprocultivos analizados de niños con diarrea.

Estas divergencias en cuanto a la posibilidad de que el ECA sea o no un factor de virulencia y la demostración de que el ECA también se halla presente en la mucosa intestinal humana (40), indican que aún faltan por dilucidar algunos aspectos sobre el papel que juega el huésped para facilitar o impedir la invasión de estas bacterias hacia los tejidos.

Esto hace necesario conocer más a fondo las probables interrelaciones del huésped con el ECA y a su vez, las posibles interrelaciones del primero con otros organismos diferentes de las enterobacterias, que también puedan colonizar el tubo digestivo y, al lesionar las células de la mucosa intestinal, provoquen infecciones en el huésped.

Entre estos organismos que poseen un elevado potencial patógeno en el humano se encuentra la Intersalva histolytica, y como ya se describió anteriormente, el cultivo axénico de la cepa HK-5 de este protozoario, representa un material adecuado para determinar si el ECA es compartido por el huésped y por la eriba, solamente en casos de infecciones bacterianas, o si este antígeno representa un denominador común que está presente en todas o en diferentes interrelaciones que ocurren en el intestino del huésped.

C. Métodos inmunológicos para el estudio del ECA.

En la actualidad se han desarrollado diversos métodos de extracción y purificación del antígeno común enterobacteriano, a partir de bacterias no inmunogénicas así como bacterias inmunogénicas. Estos métodos han ayudado a dilucidar la estructura química del ECA para comprender su naturaleza inmunológica y las posibles implicaciones biológicas que podrían tener su origen en la modificación de la estructura química de este antígeno.

Uno de los primeros métodos que fue diseñado originalmente por Vestphal (47), para el aislamiento del antígeno somático O (LPS O), empleando una mezcla caliente fenol-agua, ha sido empleado en la actualidad por varios investigadores para desarrollar métodos de extracción y purificación más finos y específicos para el ECA como por ejemplo, el método propuesto por Hazzarström (20) y el método de Hannel y Mayer (40). Este último ha sido importante en la determinación de la estructura química del ECA, e implica el uso de dos mezclas de extracción efectuada en dos fases, la primera fase de aislamiento usa una mezcla fenol-agua, la cual extrae el LPS O que contiene al ECA y la segunda fase de extracción emplea una mezcla de fenol-cloroforno-éter de petróleo, la cual aísla específicamente el ECA del LPS O. Esta última mezcla fue desarrollada originalmente por Galanos (15) para extraer el LPS de bacterias rugosas.

El trabajo realizado por Suzuki (57) en 1964, ha sustentado gran parte de las investigaciones sobre el ECA, ya que dio inicio a la profundización de los estudios sobre las propiedades químicas y la naturaleza inmunológica de este antígeno. El tratamiento estéril de extractos bacterianos, o cualquier otra muestra biológica sobre la cual se sospecha la presencia del ECA, puede emplearse como método de extracción preliminar, para poder demostrar este antígeno. Además, proporciona información general sobre la solubilidad y la antigenicidad del material obtenido mediante este tratamiento estéril.

El método convencional para demostrar la presencia del ECA extraído previamente de una muestra biológica, es la reacción de inhibición

de la hemaglutinación (HAI), la cual fué empleada por Kunin para demostrar el ECA mediante cruces antígenicos de 143 serotipos de E. coli.

El sistema de reacción heterólogo de la inhibición de la hemaglutinación, requiere del suero anti E. coli 014 previamente titulado mediante la reacción de aglutinación directa y, además, glóbulos rojos de carnero (GRC) sensibilizados con LPSs obtenidos a partir de E. coli 010 o S. typhimurium, que son las bacterias más usuales para preparar el agente sensibilizante de los GRC, ya que poseen alto contenido de ECA en este lipopolisacárido.

El LPS puede prepararse calentando las suspensiones de bacterias antes mencionadas a 100°C durante 1 hora. El sobrenadante obtenido después de centrifugar estas bacterias calentadas corresponde al LPS crudo, en el cual se halla el ECA. También se pueden sensibilizar los GRC con LPSs obtenidos mediante el método de fenol-agua.

Las condiciones óptimas de sensibilización de los GRC se encuentran a 37°C durante 30 minutos y se emplean volúmenes iguales del paquete de GRC con el LPS crudo, o bien en el caso de emplear el LPS obtenido mediante el método de Westphal, se somete previamente este LPS a un tratamiento con NaOH 0.02N a 37°C durante 2 horas en una proporción de 0.2-0.5 mg de LPS/ml de álcali. La sensibilización de los GRC se realiza empleando 5 cc de la suspensión de GRC al 2% más 250 µg del LPS tratado con álcali, y se incuban a 37°C 30 minutos y el exceso de antígeno se elimina hasta ajustar la concentración de los GRC al 2% (33).

Para determinar el título de anticuerpos anti ECA (que son moléculas IgG), se realizan diluciones seriadas del suero anti E. coli 014. Dependiendo de la cantidad de anticuerpos presentes ocurrirá la aglutinación de los GRC sensibilizados. El título de anticuerpos se expresa como la dilución más alta en donde ocurre la hemaglutinación.

La reacción de inhibición se realiza con diluciones progresivas del antígeno que se va analizar; en presencia de anticuerpos de título conocido, ajustando la concentración del suero anti E. coli 014

a 4 dosis mínimas hemaglutinantes (4 D.M.). La reacción antígeno-anticuerpo, es revelada añadiendo los GFC, sensibilizados con el LPS y ajustados al 2%. Las condiciones óptimas de reacción son 37°C 30 minutos. El grado de inhibición de la hemaglutinación es proporcional a la cantidad de ECA presente en la muestra.

La reacción de inhibición de la hemaglutinación es un buen método semicuantitativo para demostrar el ECA debido a su sencillez y especificidad. Sin embargo la inhibición de la inmunohemólisis (33) es un método más sensible que la inhibición de la hemaglutinación para determinar cuantitativamente el ECA (53).

La reacción de inhibición de inmunohemólisis (33) para demostrar el ECA, emplea un sistema hemolítico heterólogo formado por GFC forrados con LPS bacteriano y ajustados a una densidad óptica de 0.5 haciendo la lectura de hemólisis a 530 m μ . La hemólisis total de 0.5 ml de estos eritrocitos con 1.4 ml de agua destilada, provoca la liberación de hemoglobina equivalente a la que contiene una suspensión de 2.5×10^6 glóbulos rojos/ml. Además se requiere de suero anti E. coli O14 y suero de cobayo. El primero es empleado como fuente de anticuerpos anti ECA y el segundo como fuente de complemento. Ambos reactivos deben ser previamente estandarizados a una concentración óptima para emplearlos en la reacción de inhibición de inmunohemólisis. El suero anti E. coli O14 puede ser ajustado (o titulado) mediante la reacción de inmunohemólisis directa.

El principio que rige la inmunohemólisis es la liberación de hemoglobina de los GFC sensibilizados, provocada por la lisis de estas células en presencia del complemento, el cual es activado por los anticuerpos anti ECA que reaccionan con los determinantes antigénicos adsorbidos a la membrana celular de los GFC.

El grado de hemólisis se mide espectrofotométricamente y se expresa como la densidad óptica de la hemoglobina liberada. La densidad óptica puede transformarse en % de hemólisis, el cual expresa directamente el número de GFC lisados, en base a un control de 0% de hemólisis y uno de 100% de hemólisis; los valores que se consideren como límites de con-

HEMAGHEMOLEISIS DIRECTA

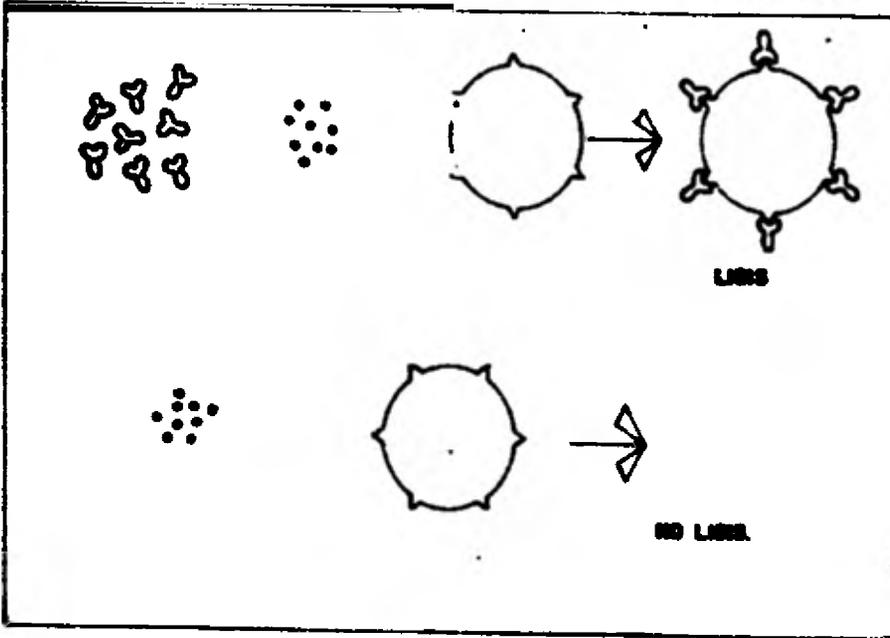
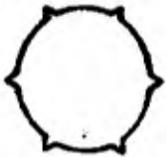


Fig. 2



Anticuerpos



Células rojas de vaca sensibilizadas con el LPS de *S. typhimurium*.



Complemento

fianza en esta determinación, figuran entre el 20 y el 30% de hemólisis.

La liberación de hemoglobina provocada por el sistema hemolítico heterólogo GTC, anticuerpo y complemento, describe una curva parabólica al graficar las unidades 50% hemolíticas (suero de cobayo consumido) contra los recíprocos de las diluciones del suero anti E. coli 014 Fig. C

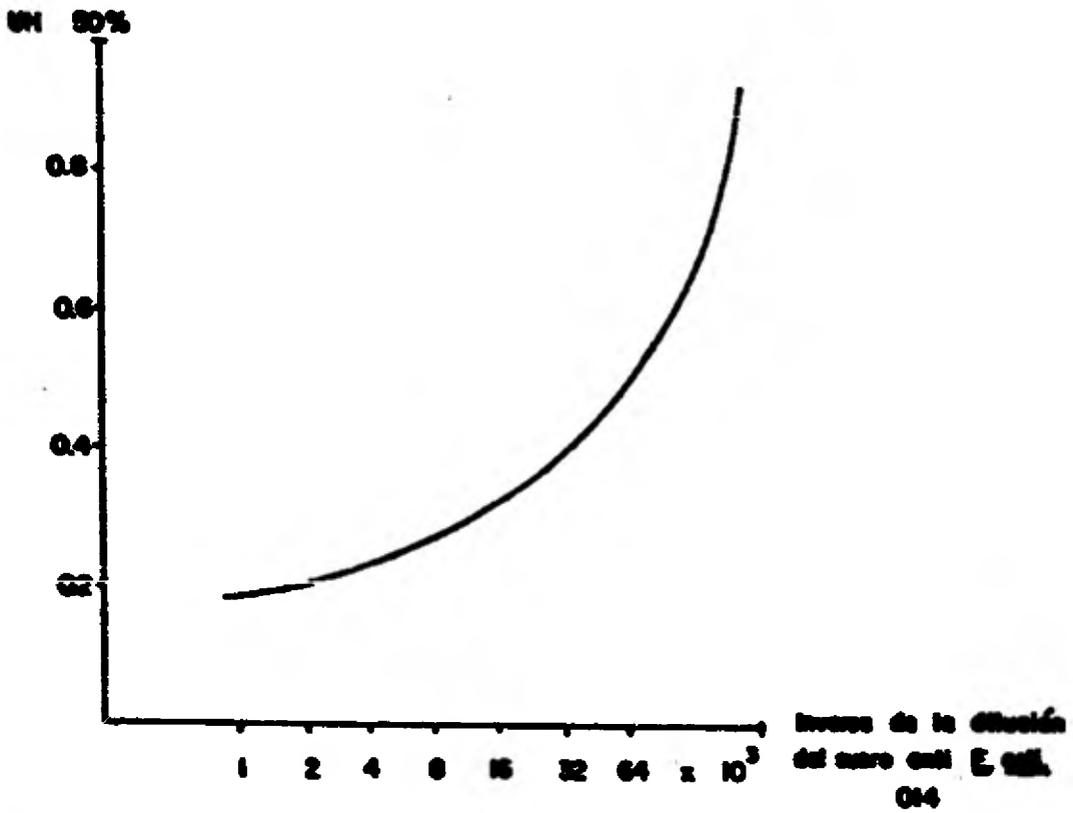
La unidad 50% hemolítica está dada para este sistema de reacción, como la dilución del suero anti E. coli 014 que es capaz de dar lugar a la lisis del 50% de los GTC en presencia de una cantidad constante de complemento, el cual es consumido en esta reacción, bajo estrictas condiciones de estandarización de cada componente del sistema.

El valor de la Unidad 50% hemolítica del suero, puede determinarse transformando los % de hemólisis a unidades de probabilidad y graficando sobre papel semilogarítmico de probitas, el % de hemólisis y la cantidad de suero de cobayo diluido y añadido al sistema en volúmenes crecientes. De este modo se observa que, por cada dilución del suero anti E. coli 014 habrá un determinado consumo de complemento añadido, expresado como los ml de suero de cobayo diluido, necesarios para producir la hemólisis del 50% de los GTC Fig. C.

El método de probitas para determinar la unidad 50% hemolítica es el más recomendable, ya que el grado de hemólisis está sujeto en este método, a las variaciones matemáticas descritas por la curva de distribución normal, la cual es una entidad estadística cuyas características matemáticas y aplicaciones biológicas, han sido exhaustivamente estudiadas y son ampliamente conocidas. En cambio, la función logística de von Krogh, aunque describe matemáticamente el fenómeno dosis-respuesta de un sistema hemolítico, no está sujeto a un tratamiento estadístico rígido, sino que más bien es un método empírico. (6)

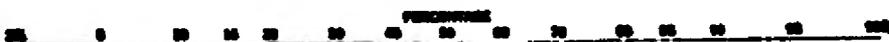
La inhibición de la inanchemólisis empleada para demostrar la presencia de SEA, ocurre en dos etapas, la primera implica la reacción antígeno-anticuerpo, entre el SEA de la muestra y los anticuerpos anti SEA. Esta reacción es revelada al añadir, en una segunda etapa, suero de cobayo, el cual es activado en una cantidad directamente proporcional a la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo presentes.

Reacción de inmunohemólisis Directa.



Curva de titulación del suero E. coli O14, graficando las Unidades 50% Im. milímetros (suero de cobaya) consumidos por diferentes diluciones del suero E. coli O14, empleando como sistema indicador de hemólisis, glóbulos rojos de conejo sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium.

% de hemólisis



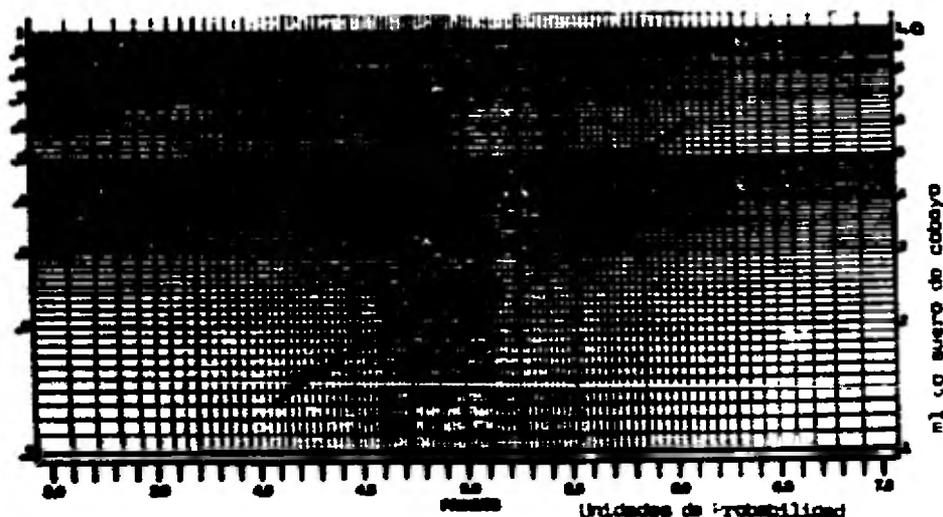
Unidad 50% hemolítica

Dilución 1:1000 del suero anti *E. coli* 014^b

suero de cobayo diluido (ml)	Densidad Óptica a 530 mμ	% hemólisis	Unidad 50% hemolítica ^{***}
0.50	0.39	76	0.27
0.30	0.31	52	
0.20	0.24	48	
0.15	0.11	22	
control ^{***}	0.10	100	

- * Se eligió esta dilución como ejemplo, para determinar la unidad 50% hemolítica de este suero empleando el papel semilogarítmico de probitas K-5-X3-22.
- ** Valor obtenido al extrapolar el valor de 5 unidades de probabilidad.
- *** Hemólisis total obtenida al mezclar 1.4 ml de agua destilada y 0.6 ml de globulos rojos de conejo sensibilizados con el O14 antígeno de *E. typhimurium* haciendo la lectura de la hemólisis a 530 mμ.

Fig. 5



La cantidad de complemento no consumido en esta segunda etapa, se puede titular empleando GRC ferrados con el LPS O o sea, GRC sobre cuya membrana se desarrollará una reacción $Ag-Ab$ entre el EDA adsorbido en la membrana de los GRC y los anticuerpos anti EDA remanentes de la primera etapa de reacción; esta reacción activará a su vez al complejo -mento Fig E. La hemólisis observada después de añadir los GRC, es inversamente proporcional a la cantidad de complemento no consumido, esto a su vez, mide la cantidad de antígeno presente en la primera fase de la reacción.

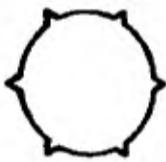
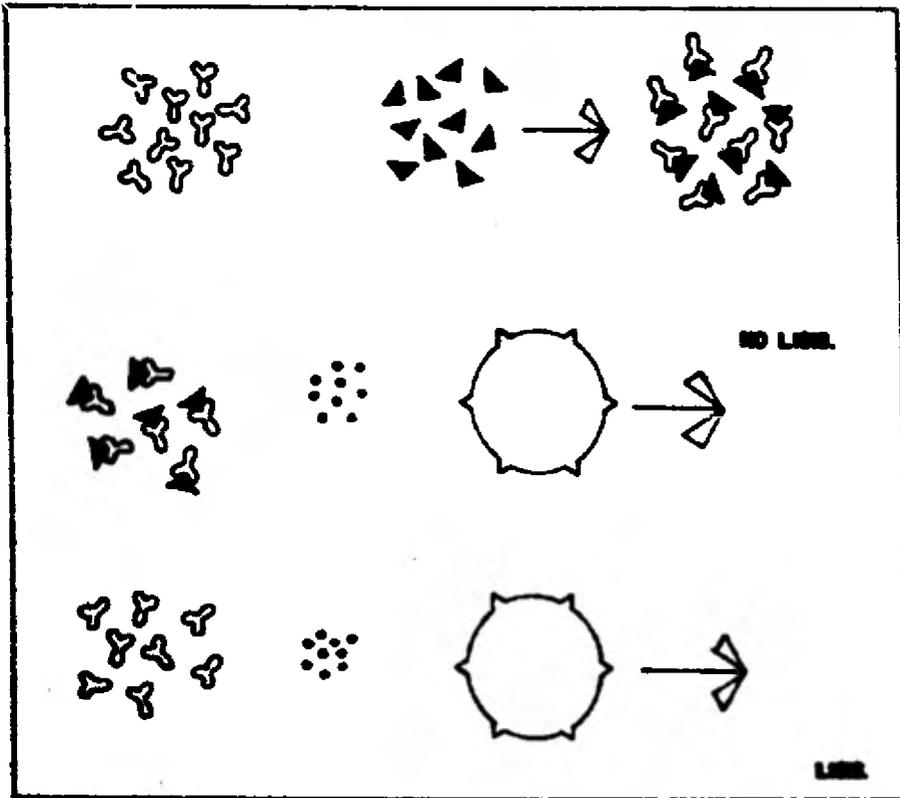
La cantidad de antígeno presente se puede determinar graficando los % de inhibición de hemólisis contra el logaritmo de los microgramos de la muestra titulada, empleando como control 0% de inhibición de hemólisis, los tubos que contienen el suero pre-incubado con el complemento Fig F.

La dilución de suero de cobayo y del suero anti E. coli O14 debe ser la adecuada para evitar cualquier inhibición inespecífica de la hemólisis, esto es, para evitar algún efecto anticomplementario, pero además deben estar en la concentración adecuada para permitir la lisis de una determinada cantidad de GRC, que liberen una determinada cantidad de hemoglobina, para que el sistema funcione como un indicador de la reacción $Ag-Ab$ en la primera fase. Para llenar ambas condiciones, es necesario emplear en este sistema heterólogo de inhibición de hemólisis, la misma cantidad tanto de complemento como de suero anti E. coli O14, de manera que se eviten los efectos anticomplementarios y que, no obstante, también causen la hemólisis. Es por esto que se elige la misma dilución del suero anti E. coli O14 que exige el menor consumo de complemento para dar lugar a la lisis del 50% de los eritrocitos.

Por las razones anteriormente expuestas, se eligió la dilución 1:75 del suero de cobayo para este sistema hemolítico.

Como todos los métodos de análisis serológicos, la reacción de inhibición de inmunohemólisis tiene varias desventajas, una de ellas es que sólo determina concentraciones de la muestra en unidades de peso más bien relativas que absolutas. Sin embargo, la ventaja que representa el

INIBICION DE INMUNOHEMOLISIS.



Células que no se lisan en presencia de el LPS de *S. typhimurium*.



Complemento



Antigeno



Anticuerpo

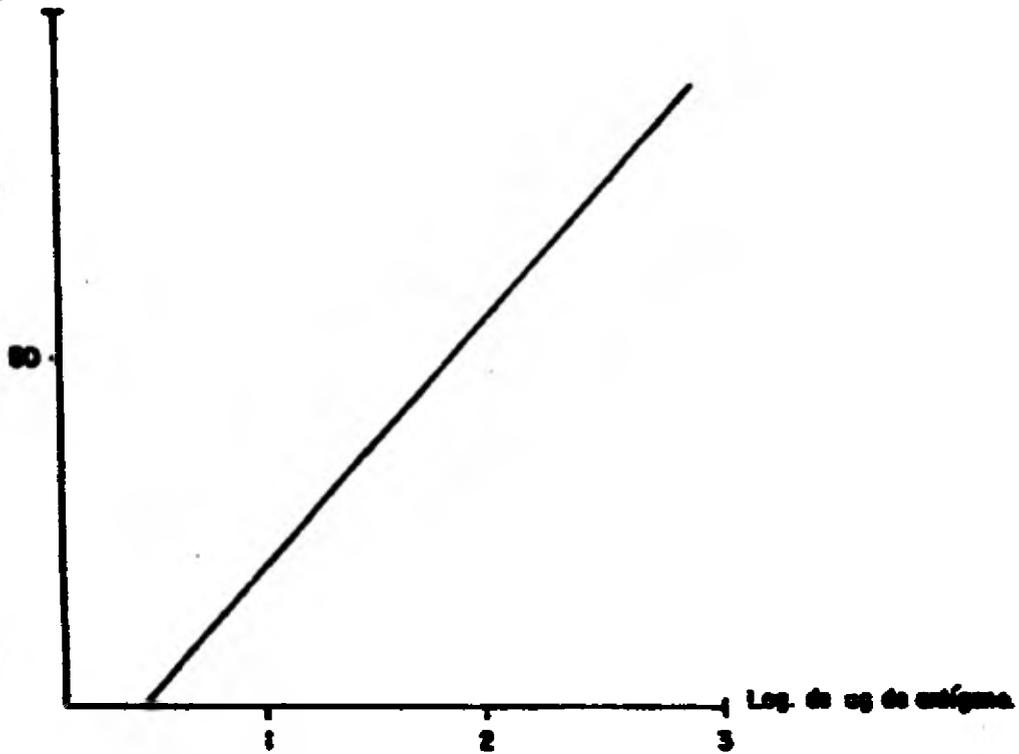
% E

LISIS

NO LISIS

Reacción de inhibición de inmunohemólisis.

% de inhibición de hemólisis



Determinación de la cantidad de antígeno que pre-incubado con el suero anti E. coli O14, consume cierta cantidad de complemento (Ullery), dando lugar a la inhibición de la hemólisis empleando glóbulos rojos de especie sensibilizado con el LPS crudo de Styphi-
antigen, como sistema indicador.

fig. F

uso de este método es su sensibilidad, ya que se ha reportado determinaciones de antígeno polisacárido del orden de 0.01 microgramos por ml y se han podido determinar actividades de anticuerpos en cantidades del orden de 0.001 microgramos de nitrógeno (23).

Los factores que pueden influir en una determinación errónea o verídica en la reacción de inmunohemólisis, son la concentración de iones divalentes de Ca^{++} y Mg^{++} del medio de reacción para que se efectúe la activación del complemento, el tiempo y la temperatura de incubación, etc. Sin embargo, estos factores pueden controlarse debidamente para llevar a cabo una determinación confiable de la cantidad de ECA presente en la muestra a analizar (23).

La reacción de inhibición de inmunohemólisis, implica al mismo tiempo que se efectúa la inhibición de la muestra problema, se trabajen los controles para confirmar que la inhibición de la lisis de los glóbulos rojos se debe exclusivamente a la reacción del antígeno con los anticuerpos específicos.

III. MATERIAL Y METODOS

1. Bacterias

Se emplearon los serotipos de E. coli O3, O6 y O14 y una cepa de Salmonella typhimurium. Estas bacterias pertenecen a la colección de cepas del laboratorio y habían sido previamente caracterizadas, bioquímica y serológicamente por el Profesor Julio Carrillo.

1.1 Los serogrupos E. coli O3 y E. coli O6 fueron cultivados cada uno en 15 cajas petri que contenían 10 ml de medio base para agar sangre previamente esterilizado (autoclave Wilmont Castle Rochester N.Y. Mod H-20), y se dejaron incubor las cajas inoculadas con las bacterias a 37°C durante 24 horas. La extracción del antígeno coagín contenido en las bacterias de ambos serotipos, se realizó según el método de Suzuki (37) con ciertas modificaciones.

Para ello se cosecharon las bacterias empleando 10 ml de solución salina isotónica (SSI) por cada caja. Cada suspensión de bacterias se sometió a tres lavados, empleando 10 volúmenes de SSI y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Centrifuga Servall refrigerada KSB/R). La cuarta resuspensión bacteriana obtenida con el mismo diluyente se calentó a 100°C durante 1 hora y posteriormente, por centrifugación y bajo las mismas condiciones, se separó el sobrenadante del paquete celular sedimentado (precipitado). El primero corresponde al lipopolisacárido crudo (LPS crudo) de cada serotipo, el cual se sometió a un tratamiento con etanol al 95% hasta ajustar su concentración final al 35% empleando un densímetro. Esta mezcla se mantuvo en reposo durante 10 horas, después de las cuales ocurrió la precipitación de la fracción insoluble (FI) mientras que la fracción soluble (FS) permanecía en el sobrenadante.

Ambas fracciones se separaron por decantación y el sobrenadante colectado (FS) se vertió en cajas petri de vidrio, las cuales se colocaron en la estufa (Mediab Mod H-201) a 37°C para evaporar el etanol y recuperar la fracción soluble en forma de un polvo fino, después de raspar la superficie del fondo de la caja petri. El peso en base seca de esta frac-

ción soluble se determinó en la balanza analítica (Oertorius No. 2442).

La fracción insoluble resultante se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos (centrífuga clínica International Equipment Co) para eliminar el exceso del sobrenadante. Este precipitado también se colocó en cajas petri de vidrio para evaporar el alcohol y determinar el peso en base seca de esta otra fracción. La otra muestra del antígeno común en la FS y la FI de cada serogrupo de E. coli, se realizó conforme al método de inhibición de la inmunodifusión (33).

1.2 Para obtener el Lipopolisacárido crudo (LPS crudo) que iba a ser empleado para sensibilización de los glóbulos rojos de camero (37), los cuales sirvieron como indicadores de la reacción de inmunodifusión en el sistema heterólogo, se empleó una ceca de Salmonella typhimurium, la cual se cultivó en 10 cajas petri con medio base base para estar con los crecimientos estériles, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La cosecha se realizó con 10 ml de SSI por caja, las bacterias se lavaron tres veces por centrifugación a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La cuarta resuspensión bacteriana se realizó con el mismo diluyente y se calentó a 100°C durante 1 hora y posteriormente, se centrifugó bajo las mismas condiciones antes mencionadas con el objeto de separar el sobrenadante, que corresponde al LPS crudo. Este líquido fue distribuido en alícuotas de 5 ml y se almacenó en congelación a -4°C.

1.3 Para preparar el suero anti E. coli O14 (al cual posee un alto título de anticuerpos contra el antígeno común) se empleó la ceca antes mencionada, la cual se cultivó en caldo nutritivo TCM incubando a 37°C durante 24 horas. La suspensión bacteriana obtenida se calentó a 100°C durante 2 horas, para inactivar los antígenos K, H de naturaleza proteica y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron posteriormente en SSI y su concentración se ajustó a 900×10^8 bacterias/ml empleando un nefelómetro Colson S. Esta suspensión se inyectó a conejos machos, hembras y adultos de la raza New Zealand, por vía intravenosa, según el esquema de inmunización propuesto por Roberts (12). Una semana después de la última inyección, los conejos se sangraron por punción intracarotídea y el suero obtenido se inactivó

a 55°C durante 30 minutos y se mantuvo a una temperatura de - 4°C, repartiéndose en alícuotas de 0.5 ml. El título de anticuerpos anti ECA se determinó mediante la reacción de inmunohemólisis.

2. Amibas

El cultivo de la cepa HK-9 de E. histolytica en el medio axénico propuesto por Diamond (11) lo realizó el Dr. Antonio Ramírez V. quien proporcionó los tres lotes de amibas con los cuales se realizó el trabajo. La producción de amibas se inició al sembrar un inóculo de la cepa en 100 ml de medio axénico estéril e incubando a 35°C durante 72 horas. Después de cosechar las amibas, se lavaron 6 veces con SSI y se efectuó la cuenta final en la cámara de Neubauer para determinar la cantidad de amibas/ml en diferentes cosechas. Las amibas se guardaron en conservación a - 40°C (congelador Revco S.H. Martín) durante 24 horas antes de liofilizarlas (Lab Con Co Freeze Dry 2). Este proceso se repitió hasta reunir mil millones de amibas correspondiente a un lote.

Estas amibas se sometieron al tratamiento etanólico descrito por Suzuki (57) para determinar si existía una sustancia similar al antígeno común. Para ello se efectuó la resuspensión de las amibas liofilizadas (mil millones) y posteriormente se calentaron a 100°C durante 1 hora. Para obtener el extracto crudo de amibas calentadas, se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente el sobrenadante se sometió a un tratamiento con etanol al 95% siguiendo el mismo procedimiento descrito en 1.1. El mismo tratamiento se aplicó a 50 ml de medio de cultivo axénico estéril y recién preparado para asegurar la ausencia de antígeno común.

3. Reactivos biológicos

3.1 **Glóbulos Rojos de Camero (GRC).** Se empleó sangre de camero la cual se mantuvo en solución Alsever (7) estéril y bajo refrigeración y se guardó en estas condiciones durante 5 días o más antes de su uso. Para preparar la suspensión de los GRC empleados en la reacción de inmunohemólisis, estos eritrocitos se lavaron tres veces con solución amorti-

guardar de trietanolamina (TSE) pH 7.3 centrifugando a 3500 rpm durante 10 minutos, si se observaba hemólisis después del mismo centrifugado se descartaban. Después de sensibilizar los GFC (1.1) con el LPS crudo de S. typhisuis (1.2), se preparó una suspensión de los GFC sensibilizados en el mismo diluyente y se ajustó su concentración final haciendo la lectura de la hemólisis total obtenida con 0.5 ml de la suspensión de GFC sensibilizados, más 1.4 ml de agua destilada utilizando celdillas Coleman.

La lectura final para ajustar los GFC a 2.5×10^8 GFC/ml (empleando un espectrofotómetro Coleman Jr II Mod. 1/20) debe ser una densidad óptica de 0.5, haciendo la lectura de la óptica a 500 m μ ; por tanto, el volumen de diluyente empleado para ajustar esta DO se determinaba mediante la siguiente ecuación:

$$DO_1 V_1 = DO_2 V_2 \quad \text{de donde}$$

DO_1 = Densidad óptica inicial.

V_1 = Volumen de diluyente en donde se realiza la resuspensión inicial de los GFC sensibilizados.

$DO_2 = 0.5$ Es la densidad óptica óptica para ajustar los GFC a 2.5×10^8 GFC/ml.

V_2 = Volumen final de diluyente que debe tener la resuspensión de GFC para ajustar su concentración al valor antes mencionado.

3.2 Complemento. Como fuente de complemento se empleó suero de conejo, el cual se obtuvo sangrando por punción intracardíaca conejos machos, sanos y adultos. El suero fue repartido en alícuotas de 0.5 ml y se mantuvo en congelación a -40°C antes de su uso.

4. Soluciones

4.1 Solución de alaruro de sodio (1.0%) en 0.9% (0.9%).

4.2 Solución anticoagulante de Alsever: Se preparó según una modificación (7) de la fórmula original:

Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	20.00 g
Cloruro de sodio	Na Cl	4.20 g
Acido cítrico	$C_6H_8O_7$	0.55 g
Citrato de sodio	$C_6H_7O_7 Na$	8.00 g
Aguá destilada	H_2O	1 l

Esta solución se esterilizó en autoclave (Wilmont Castle R. N.Y. Mod. H-20) a 15 lbs de presión durante 15 minutos, el pH se ajustó a 6.1 (potenciómetro Metrohm Marin 8-520) y en momento de utilizarla se preparó la mezcla con sangre de conejo fresca, volumen a volumen.

4.3 Solución amortiguadora de trietanolamina (Triethanolamine Buffer Solution) TBS: Se preparó según la siguiente fórmula (28):

Cloruro de sodio	Na Cl	75.00 g
Cloruro de magnesio	$Mg Cl_2 \cdot 6 H_2O$	1.00 g
Cloruro de calcio	$Ca Cl_2 \cdot 2 H_2O$	0.22 g
Trietanolamina	$C_3H_{10}N$	28.0 ml
Acido Clorhídrico 1 N	H Cl	171.0 ml
Aguá destilada	H_2O	1000.0 ml

La cantidad de HCl 1 N fué la necesaria para ajustar el pH a 7.3-7.4, esta solución se esterilizó en autoclave a 15 lbs. de presión durante 15 minutos. En el momento de utilizarla se diluyó 1:10 con agua destilada y se añadieron 10 ml de gelatina al 5% por cada litro de solución preparada.

4.4 Medio de cultivo sérico para Entamoeba histolytica TYI-8-33 (11)

Peptona Nutrienttissue (Bioxon 156-3)		52.0 g
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	20.0 g
Cloruro de sodio	Na Cl	4.0 g
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	1.2 g
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	2.0 g
L-cisteína (Sigma c-7000)		2.0 g
Acido ascórbico (Baker Analyzed)	$C_6H_8O_5$	400.0 mg
Citrato férrico	$C_6H_5O_7 Fe$	45.5 mg
Aguá destilada	H_2O	1700.0 ml

Se ajustó el pH entre 6.3-6.9 con solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N. Se distribuyeron 70 ml del medio en matraces con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave a 75 lbs. de presión durante 15 minutos y se mantuvo en refrigeración. En el momento de usar este medio se agregó suero de bovino (MicroLab de México) inactivado a 50°C durante 30 minutos y la mezcla vitamínica de Diamond (TPS-1 North American Biologicals) en la siguiente proporción:

Medio de cultivo	70 ml
Suero de bovino inactivado	10 ml
Mezcla vitamínica	3 ml

Se realizó la prueba de esterilidad dejándose incubar en la estufa a 37°C durante 24 horas. Este medio debe prepararse bajo estrictas condiciones de esterilidad utilizando: cuarto estéril de cultivo, campana de flujo laminar, mechero Bunsen, material de cristalería estéril, jeringas desechables y el personal que lo prepara debe emplear batas estériles y cubretocas.

4.5 Medio base para agar sangre (BBL)
Fórmula en g/l de agua destilada:

Infusión de músculo cardíaco	375 g
Peptone thiotone	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
pH final	7.3

Se pesaron 40 g de medio deshidratado y se disolvieron en 1 l de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y el medio se distribuyó en cajas petri estériles desechables. Se dejó gelificar el medio y luego se incubaron las cajas a 37°C durante 24 horas como prueba de esterilidad.

4.6 Caldo tripticase de soja (TGA Broth BBL)
Fórmula en g/l de agua destilada:

Digerido pancreático de caseína	17.0 g
Digerido papaínico de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
Agua destilada	1.0 l

Este medio deshidratado se disolvió en agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Luego se distribuyó en matraces, previamente esterilizados, y se dejaron en la estufa a 37°C por 24 horas como prueba de esterilidad.

5. Material de laboratorio

- 5.1 Espectrofotómetro Coleman Jr II mod. 6/20
- 5.2 Potenciómetro Metrohm Herin E-620
- 5.3 Estufa MedLab Mod. H-201
- 5.4 Centrifuga Servall refrigerada Mod. KSB-R
- 5.5 Congelador Revco Mod. SZB CCS-10 W.H. Curtin
- 5.6 Balanza analítica Sartorius Mod. 2042
- 5.7 Centrifuga clínica universal serie 83134 H W.H. Curtin
- 5.8 Centrifuga clínica International Equipment Co. serie 428-14605
- 5.9 Autoclave Wilmont Castle Rochester N.Y. Mod. H-20
- 5.10 Liofilizadora Lab Con Co Freeze Dry 3
- 5.11 Refractómetro Coleman 9
- 5.12 Baño de agua BTL a 37°C
- 5.13 Balanza granataria
- 5.14 Refrigerador

5. Métodos

5.1 Reacción de Inmunohemólisis

Para determinar el contenido de antígeno común en la FI y LFS de E. coli O3, E. coli O6 y E. histolytica, se utilizó la reacción de inhibición de inmunohemólisis. Este método requiere de la previa titulación del suero anti E. coli O14 mediante la reacción de inmunohemólisis directa, la cual se llevó a cabo según el método descrito por Murate y cols. (33) con ciertas modificaciones.

Se emplearon GPC previamente lavados por centrifugación a 3600 rpm durante 10 minutos (centrífuga clínica IC Co) 3 veces, empleando TBS como diluyente. Estos glóbulos rojos se sensibilizaron posteriormente con el LPS crudo de S. typhimurium (1.2) mezclando, volumen a volumen, el LPS crudo y el paquete de GPC. La suspensión se agitó ligeramente y luego se incubó a 37°C durante 30 minutos, después de los cuales se eliminó el exceso de LPS lavando los GPC sensibilizados (GPC^s) con el mismo diluyente y centrifugando bajo las mismas condiciones antes mencionadas, durante 3 veces. La suspensión de GPC^s se ajustó a la concentración óptima como se indicó en el inciso 3.1

Paralelamente, se realizaron diluciones progresivas del suero anti E. coli O14 en TBS, comenzando con una dilución 1:1000 hasta la dilución 1:32000. De cada dilución se midieron alícuotas de 0.25 ml que se distribuyeron en cuatro tubos rotulados como 1, 2, 3 y 4, se añadió sucesivamente complemento (suero de caballo diluido 1:75), solución amortiguadora TBS y GPC^s y previamente ajustados.

Después de incubarse durante 30 minutos a 37°C, la reacción se detuvo añadiendo 0.5 ml del mismo diluyente frío. Los tubos de reacción se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos (centrífuga clínica Universal E.H. Curtin) y se realizó la lectura de hemólisis de cada tubo a una longitud de onda de 530 mμ, reemplazando como blanco el TBS.

En la tabla I se muestra el tratamiento correspondiente a la

dilución 1:4000 del suero, sin embargo, este mismo se aplicó a las otras diluciones del suero.

El cálculo de la unidad 50% hemolítica se determinó el papel semi-logarítmico de probitas K-I-353-22, transformando los porcentajes de hemólisis a unidades de probabilidad y disponiendo los volúmenes de suero de cobayo 1:75 en la escala logarítmica (Fig. D). El valor de la unidad 50% hemolítica corresponde a la intersección de la recta con el valor de 5 de la probita. Al graficar sobre papel milimétrico la relación entre la unidad 50% hemolítica y los recíprocos de las diluciones del suero, se determinó la dilución mínima del suero que exigió el menor consumo de complemento para producir la hemólisis del 50% de los eritrocitos, la dilución 1:4000 del suero se consideró el título óptico.

6.2 Reacción de Inhibición de Inmunohemólisis

Se prepararon soluciones patrón de 1000 microgramos/ml de todas las fracciones, a excepción de la FI de E. coli O3 y de la FI de E. histolytica que fueron diluidas en 100 y en 1500 microgramos/ml respectivamente. A partir de estas soluciones se prepararon diluciones progresivas de cada fracción en TBS y por cada dilución se midieron alícuotas de 0.15 ml que se distribuyeron en tubos rotulados como 1, 2, 3 y 4, posteriormente se añadió 0.25 ml de suero anti E. coli O14 1:4000 (que fue la dilución correspondiente al título del suero) y solución TBS.

Simultáneamente se prepararon controles tanto del suero anti E. coli O14 (anticuerpo) como el de cada fracción (antígeno). El control de anticuerpo se componía de suero anti E. coli O14 más el diluyente TBS y el control de antígeno contenía la fracción respectiva más TBS.

Los tubos se pre-incubaron a 37°C durante 30 minutos y transcurrido este tiempo, a cada tubo se le agregó, en el siguiente orden, suero de cobayo diluido 1:75 y GPC* y previamente ajustada. Los volúmenes empleados de todos los componentes del sistema de reacción se ilustran en la tabla II.

Posteriormente se realizó una segunda incubación a 37°C por 30 minutos, después de los cuales se añadió TSS frío para detener la reacción. Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos y se realizó la lectura del grado de hemólisis de cada tubo a una longitud de onda de 530 mμ. Se empleó como control de hemólisis total la serie de tubos correspondiente al control de anticuerpo.

Se trabajaron de la misma forma la FS y la FI del medio de cultivo sérico para asegurar la ausencia de antígeno conda en este medio.

La unidad SC₅₀ hemolítica para diferentes cantidades de las fracciones fué calculada como se indicó en la inciso 5.1. Se graficaron los % de inhibición de hemólisis versus el logaritmo de los microgramos de cada fracción.

Las rectas obtenidas en las figuras II y III fueron ajustadas por mínimos cuadrados, según la fórmula general descrita en la página 43. y también se calcularon los coeficientes de correlación lineal para cada línea recta.

TABLA I

Protocolo de la reacción de Inmunohemólisis para titular el suero anti E. coli O14

tubo

suero anti E. coli O14 1:4000 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
suero de cobayo 1:75 (ml)	0.50	0.35	0.25	0.15
diluyente TBS pH 7.3 (ml)	0.15	0.30	0.40	0.50
GRC*	0.50	0.70	0.60	0.60

Incubación a 37°C durante 30 minutos

diluyente TBS pH 7.3 (ml)	0.70	0.50	0.50	0.50
---------------------------	------	------	------	------

Centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos y lectura de hemólisis a 530 nm

El protocolo corresponde a los cuatro tubos de la dilución del suero 1:4000, pero se aplicó el mismo tratamiento a las seis diferentes diluciones del suero.

* Glóbulos Rojos de Caballo sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium y ajustados a 2.5×10^8 glóbulos rojos/ml en diluyente TBS pH 7.3

TAOLA II

Protocolo de la reacción de inhibición de inmunohemólisis para titular el contenido de antígeno común en la FI y FS de E. coli 03, E. coli 03 y E. histolytica

tubo		(1)				(2)							
		1	2	3	4	1	2	3	4				
fracción	(ml)*	0.15	0.15	0.15	0.15	-	-	-	-	0.15	0.15	0.15	0.15
siero anti <u>E. coli</u> 014	(ml)**	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	-	-	-	-
diluyente TBS pH 7.3	(ml)	-	0.15	0.25	0.30	0.15	0.30	0.40	0.50	0.25	0.40	0.50	0.50
Pre-incubación a 37°C durante 30 minutos													
siero de cobayo 1:75	(ml)	0.50	0.35	0.25	0.15	0.50	0.35	0.25	0.15	0.50	0.35	0.25	0.15
GC***	(ml)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.50	0.10	0.10	0.10	0.50	0.50	0.50	0.50
Incubación a 37°C durante 30 minutos													
diluyente TBS pH 7.3	(ml)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Centrifugación a 1000 rpm durante 3 minutos y lectura de hemólisis a 530 mμ													

* La tabla corresponde a una dilución cualitativa de la fracción cuyo título de antígeno común se determinó, partiendo inicialmente de una solución patrón de 1000 microgramos/ml a excepción de la FI de E. coli 03 y E. histolytica que fueron diluidas en 100 y 1500 microgramos/ml respectivamente. Del mismo modo se prepararon soluciones patrón de 1000 microgramos/ml de la FI y la FS del medio de cultivo sérico.

** Siero diluido 1:4000, que fue la dilución óptica elegida en la titulación del suero anti E. coli 014 sensibilizado de Carne sensibilizado con el LPS crudo de S. typhimurium y ajustados a 2.5×10^3 células/ml en diluyente TBS pH 7.3

(1) Control de anticuerpo

(2) Control de antígeno

IV RESULTADOS

Reacción de Inmunohemólisis

En la tabla III se muestran los valores de la unidad $50'$ hemolítica conseguida por cada una de las diferentes diluciones del suero anti E. coli 014, e indican el aumento progresivo de los ml de suero de cobayo diluido 1:75 requeridos para dar lugar a la lisis del 50% de los glóbulos rojos de conejo sensibilizados. De aquí que, conforme aumenta la dilución del suero anti E. coli 014 se requiere mayor cantidad de complemento para dar lugar a la hemólisis.

Al graficar las unidades $50'$ hemolíticas (ml de suero de cobayo 1:75) versus los recíprocos de las diluciones del suero anti E. coli 014, se determinó la dilución máxima del suero que admite el menor consumo de complemento esta correspondió a la dilución 1:4000, la cual se consideró el título del suero. Fig. 1

Reacción de Inhibición de Inmunohemólisis

En las tablas IV-XI se muestran los valores de las unidades $50'$ hemolíticas obtenidas al pre-incubar cada una de las fracciones con el suero anti E. coli 014 1:4000.

Conforme aumenta la cantidad de fracción pre-incubada con el suero (a excepción de la fracción soluble de E. histolytica y la fracción soluble e insoluble del medio sérico), se observa un aumento en la unidad $50'$ hemolítica, lo cual indica que se necesita mayor cantidad de complemento para dar lugar a la lisis del 50% de los $50'$, al aumentar la formación de complejos antígeno-anticuerpo, esto a su vez, da lugar al aumento del % de inhibición de la lisis de los eritrocitos.

Al graficar los % de inhibición de hemólisis contra el logaritmo de las microgramos de cada fracción, se observó que la fracción insoluble de E. coli 03, E. coli 05 y E. histolytica provocan la inhibición del 50% de

hemólisis de los GRC*, pero cada uno en diferente proporción, puesto que, mientras la fracción insoluble de E. coli O3 requiere 5.513 microgramos (ug) para inhibir el 50% de hemólisis en un volumen de 1 ml, la fracción insoluble de E. coli O3 da lugar al mismo efecto con 127.033 ug, requiriéndose 451.220 ug de la fracción insoluble de E. histolytica para provocar la inhibición del 50% de los GRC* en 1 ml. Estos resultados indican que la fracción insoluble de E. coli O3 contiene mayor cantidad de antígeno común que la fracción insoluble de E. coli O8 y ésta, a su vez, contiene mayor cantidad de antígeno común que la fracción insoluble de E. histolytica, la cual contiene alguna sustancia que es capaz de reaccionar con los anticuerpos contra este antígeno bacteriano.

La fracción soluble de ambos serotipos de E. coli contienen antígeno común en cantidades cuya diferencia es mínima, ya que la fracción soluble de E. coli O3 inhibe el 50% de hemólisis/ml con 34.18 ug, mientras que la fracción soluble de E. coli O8 requiere de 43.04 ug para producir el mismo efecto. La fracción soluble de E. histolytica no contiene alguna sustancia que de lugar a la inhibición de hemólisis de los GRC*, el mismo resultado se obtuvo con la fracción soluble e insoluble del medio axénico.

En la tabla XII se muestran los % de inhibición para cada una de las fracciones analizadas y se resumen los resultados obtenidos de la cantidad de antígeno capaz de inhibir la hemólisis del 50% de los GRC* en una alícuota de 0.15 ml y en 1.0 ml.

TABLA III

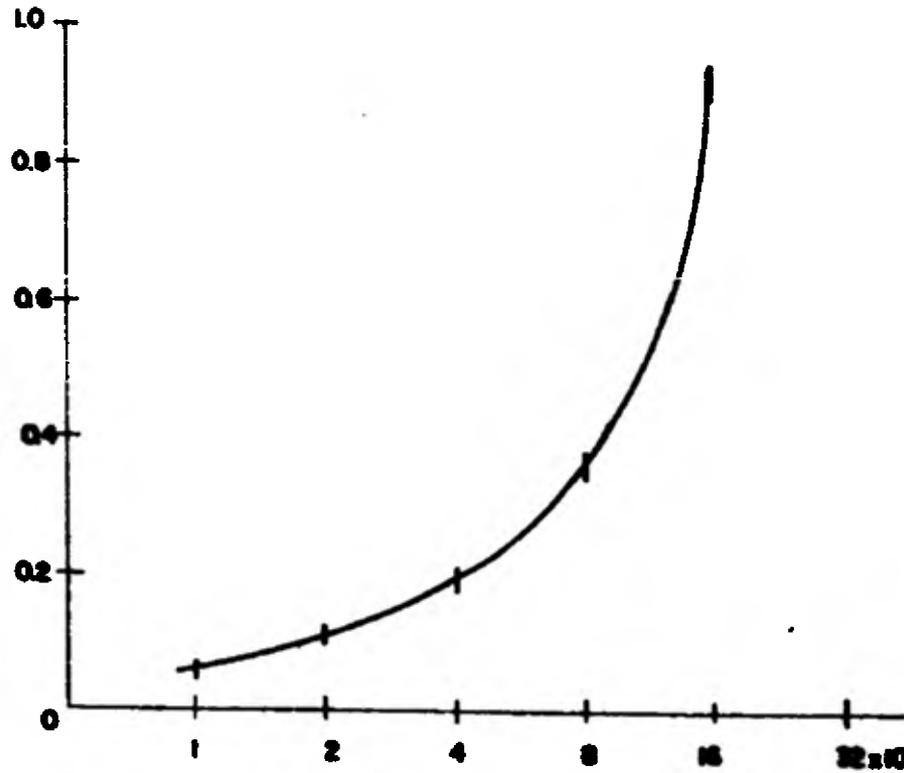
Valor de la UH_{50}^* para diferentes diluciones del suero anti E. coli 014

Dilución	Suero de cobayo 1:75 (nl)	CC	% Hemólisis	UH_{50}^*
1:1000	0.15	0.39	78	0.05
	0.25	0.43	90	
	0.35	0.47	94	
	0.50	0.43	85	
1:2000	0.15	0.33	66	0.11
	0.25	0.44	88	
	0.35	0.40	80	
	0.50	0.48	96	
1:4000	0.15	0.19	38	0.19
	0.25	0.32	64	
	0.35	0.39	78	
	0.50	0.425	85	
1:8000	0.15	0.07	14	0.35
	0.25	0.19	38	
	0.35	0.27	54	
	0.50	0.32	64	
1:16000	0.15	0.045	9	0.80
	0.25	0.09	18	
	0.35	0.13	26	
	0.50	0.17	34	
1:32000	0.15	-	-	-
	0.25	0.04	8	
	0.35	0.08	16	
	0.50	0.07	14	

* Unidades 50% hemolíticas (suero de cobayo 1:75) consumidas por el sistema suero anti E. coli 014 y SCE sensibilizados con el LPS crudo de S. typhi-
murium.

Unidades 50%
Hemolíticas.

Fig. 1



suero de caballo 1:75
GRC #

inverso de la dilución
del suero anti E. coli 014.

Unidades 50% hemolíticas (suero de caballo 1:75) consumidas por diferentes diluciones del suero anti E. coli, para dar lugar a la hemólisis de los glóbulos rojos de conejo sensibilizados con el LPS crudo de S. ty. shinarum (GRC#). La dilución 1:4 000 del suero 014 se considera el título óptimo.

TABLA IV

UH_{50} * consumidos por el sistema suero anti E. coli 014 (1:4000) y GFC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhisurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de FI de E. coli 03.

ug FI	suero de cobayo 1:75 (ml)	OC	hemólisis	UH_{50} *	(1)	(2)	(3)
150	0.15	0.01	2	1.3	0.53	7.71	92.29
	0.25	0.03	6				
	0.35	0.05	10				
	0.50	0.08	15				
75	0.15	0.02	4	0.70	1.42	19.39	80.11
	0.25	0.05	13				
	0.35	0.11	22				
	0.50	0.17	34				
37.5	0.15	0.02	4	0.52	1.92	26.90	73.10
	0.25	0.05	10				
	0.35	0.13	30				
	0.50	0.23	46				
18.75	0.15	0.05	10	0.35	2.85	39.92	60.08
	0.25	0.15	30				
	0.50	0.34	60				
9.37	0.15	0.15	38	0.20	5.00	70.03	29.97
	0.25	0.28	56				
	0.35	0.35	70				
	0.50	0.41	82				
4.69	0.15	0.25	50	0.15	6.60	93.28	6.72
	0.25	0.37	74				
	0.35	0.42	84				
	0.50	0.45	90				
control (-)	0.15	0.27	54	0.14	7.14	100.00	-
	0.25	0.36	76				
	0.35	0.42	84				
	0.50	0.46	92				

* ml de suero de cobayo 1:75 consumidos

(1) ml de suero de cobayo 1:75 consumidos en un volumen de 1.0 ml (UH_{50} /ml)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 ml considerando la UH_{50} /ml del control como el 100% (hemólisis/ml)

(3) inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/ml del control menos la hemólisis/ml de cada probador.

TABLA V

UH_{50} * obtenidos por el sistema suero anti E. coli O14 (1:4000) y GPC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de FI de E. coli O8.

ug FI	suero de caballo 1:75 (ml)	DO	Hemólisis	UH_{50} *	(1)	(2)	(3)
3.75	0.15	0.04	8	2.00	0.50	7.01	92.99
	0.25	0.08	15				
	0.35	0.09	18				
	0.50	0.11	22				
1.875	0.15	0.07	14	0.50	2.00	28.02	71.98
	0.25	0.15	30				
	0.35	0.21	42				
	0.50	0.24	48				
0.937	0.15	0.15	30	0.27	3.70	51.83	48.17
	0.25	0.24	48				
	0.35	0.30	60				
	0.60	0.35	72				
0.469	0.15	0.19	38	0.20	5.00	70.03	29.97
	0.25	0.32	64				
	0.35	0.38	75				
	0.50	0.42	84				
0.234	0.15	0.21	42	0.18	5.55	77.74	22.26
	0.25	0.31	62				
	0.35	0.37	74				
	0.50	0.42	84				
0.117	0.15	0.27	54	0.15	6.66	93.28	6.72
	0.25	0.37	74				
	0.35	0.40	80				
	0.50	0.44	88				
control (-)	0.15	0.27	54	0.14	7.14	100.00	-
	0.25	0.39	78				
	0.35	0.42	84				
	0.50	0.46	92				

* ml de suero de caballo 1:75 consumidos

(1) ml de suero de caballo 1:75 consumidos en un volumen de 1.0 ml (UH_{50} /ml)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 ml considerando la UH_{50} /ml del control como el 100% (hemólisis/ml).

(3) inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/ml del control menos la hemólisis/ml de cada problema.

TABLA VI

UH₅₀* consumidas por el sistema suero anti E. coli 014 (1:4000) y GFC sensibilizadas con el LPS crudo de S. typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de FI de E. histolytica.

ug FI	suero de caballo 1:75 (al)	DO	hemólisis	UH ₅₀ *	(1)	(2)	(3)
225.00	0.15	0.03	6	0.80	1.23	23.77	76.23
	0.25	0.08	16				
	0.35	0.12	24				
	0.50	0.17	34				
112.50	0.15	0.05	10	0.50	2.00	30.03	61.97
	0.25	0.14	26				
	0.35	0.22	44				
	0.50	0.25	50				
56.250	0.15	0.19	33	0.35	2.77	52.57	47.33
	0.25	0.19	33				
	0.35	0.23	46				
	0.50	0.32	64				
28.125	0.15	0.13	26	0.23	3.34	73.01	26.99
	0.25	0.24	42				
	0.35	0.33	65				
	0.50	0.37	74				
14.062	0.15	0.15	30	0.21	4.76	90.50	9.50
	0.25	0.30	60				
	0.35	0.38	76				
	0.50	0.45	90				
control (-)	0.15	0.17	34	0.19	5.26	100.00	-
	0.25	0.35	72				
	0.35	0.40	80				
	0.50	0.47	94				

* al de suero de caballo 1:75 consumidos.

(1) al de suero de caballo 1:75 consumidos en un volumen de 1.0 ml (UH₅₀/ml)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 ml considerando la UH₅₀/ml del control como el 100% (hemólisis/ml).

(3) Inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/ml del control menos la hemólisis/ml de cada problema.

TABLA VII

UH_{50}^* consumidos por el sistema suero anti E. coli 014 (1:4000) y GFC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de FS de E. coli 03.

ug FS	suero de caballo 1:75 (ml)	OO	hemólisis	UH_{50}^*	(1)	(2)	(3)
15	0.15	0.09	19	0.60	1.55	16.6	83.4
	0.25	0.15	30				
	0.35	0.18	36				
	0.50	0.24	48				
7.5	0.15	0.18	35	0.21	4.76	47.6	52.4
	0.25	0.29	53				
	0.35	0.34	60				
	0.50	0.40	60				
3.75	0.15	0.24	48	0.16	6.25	62.5	37.5
	0.25	0.35	70				
	0.35	0.38	76				
	0.50	0.42	84				
1.875	0.15	0.28	56	0.14	7.14	71.4	28.6
	0.25	0.37	74				
	0.35	0.41	82				
	0.50	0.44	88				
0.937	0.15	0.33	66	0.10	10.00	100.0	-
	0.25	0.41	82				
	0.35	0.44	88				
	0.50	0.46	92				
control (-)	0.15	0.33	66	0.10	10.00	100.0	-
	0.25	0.41	82				
	0.35	0.44	88				
	0.50	0.46	92				

* ml de suero de caballo 1:75 consumidos

(1) ml de suero de caballo 1:75 consumidos en un volumen de 1.0 ml (UH_{50}^*/ml)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 ml considerando la UH_{50}^*/ml del control como el 100% (hemólisis/ml)

(3) inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/ml del control menos la hemólisis/ml de cada problema.

TABLA VIII

UH₃₀* contadas por el sistema suero anti E. coli 014 (1:4000) y SRC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con dife. entes cantidades de FS de E. coli 00.

ug FS	suero de cobayo 1:75 (nl)	DO	hemólisis	UH ₃₀ *	(1)	(2)	(3)
	0.15	0.02	4				
18.75	0.25	0.03	10	1.50	0.55	12.55	07.45
	0.35	0.07	14				
	0.50	0.10	20				
9.37	0.15	0.01	12	0.45	2.22	42.21	57.79
	0.25	0.14	20				
	0.35	0.20	40				
	0.50	0.28	36				
4.69	0.15	0.11	22	0.30	3.33	53.31	35.59
	0.25	0.25	50				
	0.35	0.31	52				
	0.50	0.35	70				
2.34	0.15	0.15	32	0.20	4.34	32.51	17.49
	0.25	0.29	51				
	0.35	0.35	70				
	0.50	0.41	82				
1.17	0.15	0.20	40	0.15	5.25	100.00	-
	0.25	0.32	54				
	0.35	0.35	70				
	0.50	0.43	82				
control	0.15	0.20	40	0.19	5.20	100.00	-
	0.25	0.32	54				
	0.35	0.39	73				
	0.50	0.43	80				

* nl de suero de cobayo 1:75 consumidos

(1) nl de suero de cobayo 1:75 consumidos en un volumen de 1.0 nl (UH₃₀/nl)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 nl considerando la UH₃₀/nl del control como el 100% (hemólisis/nl).

(3) inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/nl del control menos la hemólisis/nl de cada problema.

TABLA I.

UH_{50%}* consumidas por el sistema suero anti E. coli 014 (1:4000) y GFC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de FS de E. histolytica.

ug FS	suero de cobayo 1:75 (al)	DO	hemólisis	UH _{50%} *	(1)	(2)	(3)
150	0.15	0.27	54	0.14	7.14	100.00	-
	0.25	0.37	74				
	0.35	0.40	30				
18.75	0.50	0.44	83				
control (-)	0.15	0.27	54	0.14	7.14	100.00	-
	0.25	0.37	74				
	0.35	0.40	30				
	0.50	0.44	83				

* al de suero de cobayo 1:75 consumidos

(1) al de suero de cobayo 1:75 consumidos en un volumen de 1.0 ml (UH_{50%}/ml)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 considerando la UH_{50%}/ml del control con el 100% (hemólisis/ml).

(3) inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/ml del control menos la hemólisis/ml de cada problema.

TABLA II

UH₅₀^{*} consumidas por el sistema suero anti E. coli O14 (1:4000) y GFC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de FI del medio exónico.

ug FI	suero de cobayo 1:75 (nl)	DO	hemólisis	UH ₅₀ [*]	(1)	(2)	(3)
150	0.15	0.23	50				
	0.25	0.38	76	0.12	0.33	100.00	-
	0.35	0.40	80				
18.75	0.50	0.43	85				
	0.15	0.23	50				
control	0.25	0.33	76	0.12	0.33	100.00	-
(-)	0.35	0.40	80				
	0.50	0.43	85				

* nl de suero de cobayo 1:75 consumidas

(1) nl de suero de cobayo 1:75 consumidas en un volumen de 1.0 nl (UH₅₀/nl)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 nl considerando la UH₅₀/nl del control como el 100% (hemólisis/nl).

(3) inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/nl del control menos la hemólisis/nl de cada problema.

TABLA XI

UH_{50} * consumidas por el sistema suero anti E. coli O14 (1:4000) ; GFC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de FS del medio oxénico.

ug FS	suero de cobayo 1:75 (ml)	DO	%hemólisis	UH_{50} *	(1)	(2)	(3)
150	0.15	0.23	56	0.14	7.14	100.00	-
	0.25	0.37	74				
	0.35	0.42	84				
18.75	0.50	0.43	92				
	control (-)	0.15	0.23	56	0.14	7.14	100.00
	0.25	0.37	74				
	0.35	0.42	84				
	0.50	0.46	92				

* ml de suero de cobayo 1:75 consumidas

(1) ml de suero de cobayo 1:75 consumidas en un volumen de 1.0 ml. (UH_{50} /ml)

(2) hemólisis producida en un volumen de 1.0 ml considerando la UH_{50} /ml del control como el 100% (hemólisis/ml).

(3) inhibición de hemólisis del sistema, obtenido al sustraer el 100% de hemólisis/ml del control menos la hemólisis/ml de cada problema.

Recta de Mínimos Cuadrados

Forma general de la recta de mínimos cuadrados

$$Y = A_0 + A_1x$$

De donde: A_0 = ordenada al origen A_1 = pendiente de la rectaSistema de ecuaciones para determinar A_0 y A_1

$$\sum Y = A_0N + A_1\sum x \quad (1)$$

$$\sum X Y = A_0\sum x + A_1\sum x^2 \quad (2)$$

Resolviendo el sistema para A_0 y A_1 se tiene:

$$A_0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \quad A_1 = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

 N = Número de variables del sistemaCoeficiente de Correlación Lineal
(r)

$$r = \frac{+ \sqrt{N(y_{\text{estimada}} - \bar{y})^2}}{\sum (y - \bar{y})}$$

De donde:

 $y_{\text{estimada}} - \bar{y}$ promedio = variación explicada $y - \bar{y}$ promedio = variación total

Ajuste de rectas por mínimos cuadrados y coeficiente de correlación lineal (r) en la relación logarítmica de los microgramos de FI y el % de inhibición de hemólisis en el sistema suero anti *E. coli* O14 y O10 sensibilizados con el LPS crudo de *E. typhimurium*.

FI <u><i>E. coli</i></u> O8					$f(x) = 55.94x + 55.57$
ug	log ug	% inhibición			y estimada $r = 0.93$
	x	y	x^2	xy	
3.750	0.570	50.50	0.3249	53.00	53.03
1.875	0.270	71.95	0.0729	19.43	70.95
0.937	- 0.023	43.17	0.0005	- 1.35	53.99
0.469	- 0.328	29.97	0.1075	- 9.33	35.90
0.234	- 0.630	22.25	0.3969	- 14.02	19.70
0.117	- 0.932	6.72	0.8686	- 8.38	2.52
	<u>- 1.078</u>	<u>272.59</u>	<u>1.7717</u>	<u>40.97</u>	
		\bar{y} 43.34			

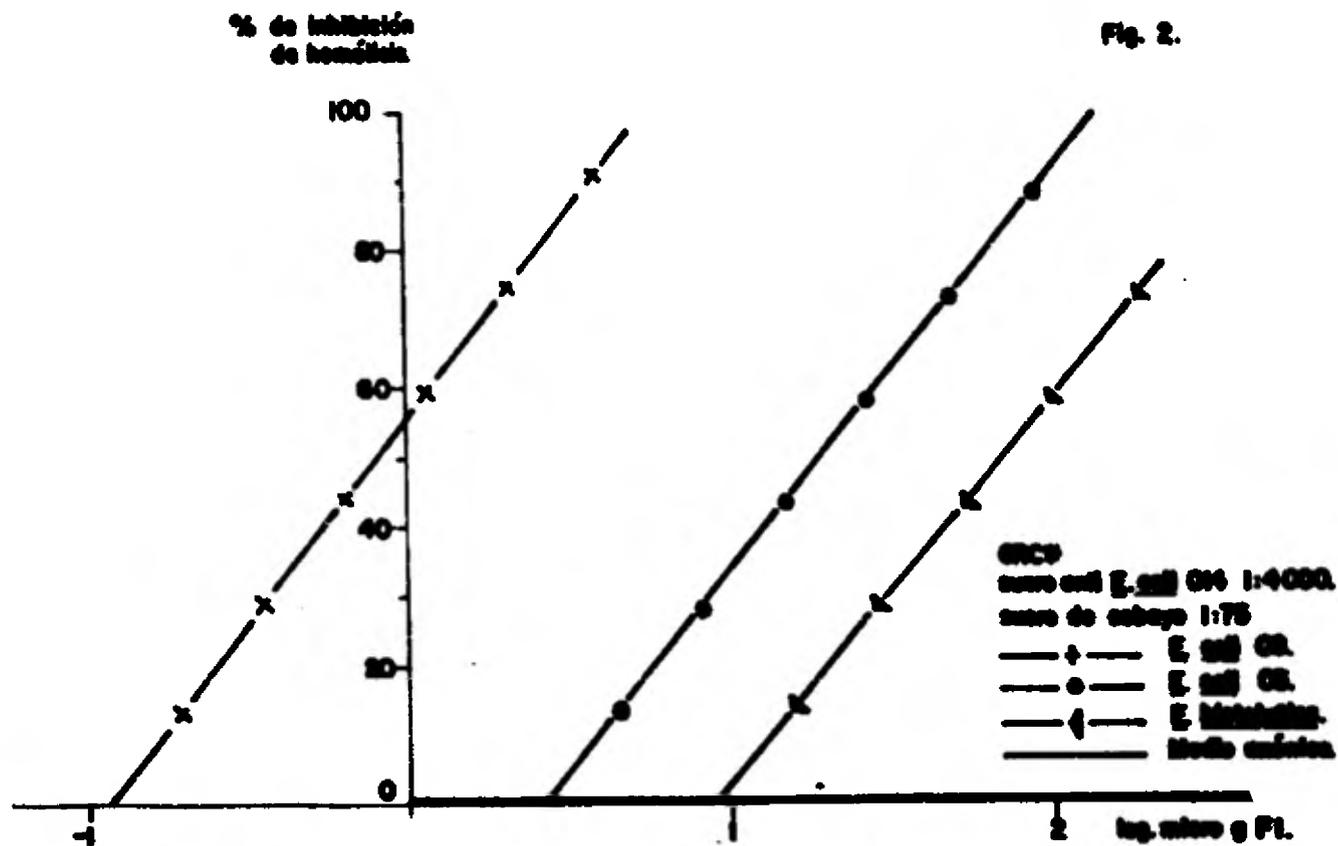
FI <u><i>E. coli</i></u> O3					$f(x) = 30.32x - 22.94$
ug	log ug	% inhibición			y estimada $r = 0.97$
	x	y	x^2	xy	
150.00	2.17	92.29	4.7089	200.25	99.27
75.00	1.87	80.11	3.4969	149.50	82.37
37.50	1.57	73.10	2.4649	114.75	65.43
18.75	1.27	50.03	1.6129	70.20	48.50
9.37	0.97	29.97	0.9409	29.07	31.53
4.69	0.67	6.72	0.4489	4.50	14.79
	<u>6.52</u>	<u>342.27</u>	<u>13.6734</u>	<u>574.29</u>	
		\bar{y} 57.05			

FI <u><i>E. histolytica</i></u>					$f(x) = 56.14x - 53.85$
ug	log ug	% inhibición			y estimada $r = 0.99$
	x	y	x^2	xy	
225.000	2.3522	70.30	5.5320	170.00	73.35
112.500	2.0511	71.57	4.2070	127.10	51.25
56.250	1.7501	47.33	3.0625	82.33	44.40
28.125	1.4480	25.99	2.0990	39.10	27.55
14.062	1.1460	9.50	1.3179	12.52	10.75
	<u>8.7504</u>	<u>222.72</u>	<u>15.2201</u>	<u>440.05</u>	
		\bar{y} 44.40			

Ajuste de rectas por mínimos cuadrados y coeficiente de correlación lineal (r) en la relación logarítmica de los microgramos de FS y el % de inhibición de hemólisis en el sistema suero anti E. coli O14 y GRC sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium.

FS	<u>E. coli</u> O8					$f(x) = 71.73x - 8.17$
ug	log ug	% inhibición				y estimada $r = 0.99$
	x	y	x^2	xy		
18.75	1.2730	87.45	1.6205	111.32		82.92
9.37	0.9717	57.79	0.9442	56.15		61.40
4.69	0.6712	36.39	0.4505	24.62		39.88
2.34	0.3692	17.49	0.1363	6.57		18.35
1.17	0.0682	-	0.0046	-		- 3.14
	<u>3.3533</u>	<u>119.42</u>	<u>3.1561</u>	<u>199.66</u>		
		\bar{y} 39.38				

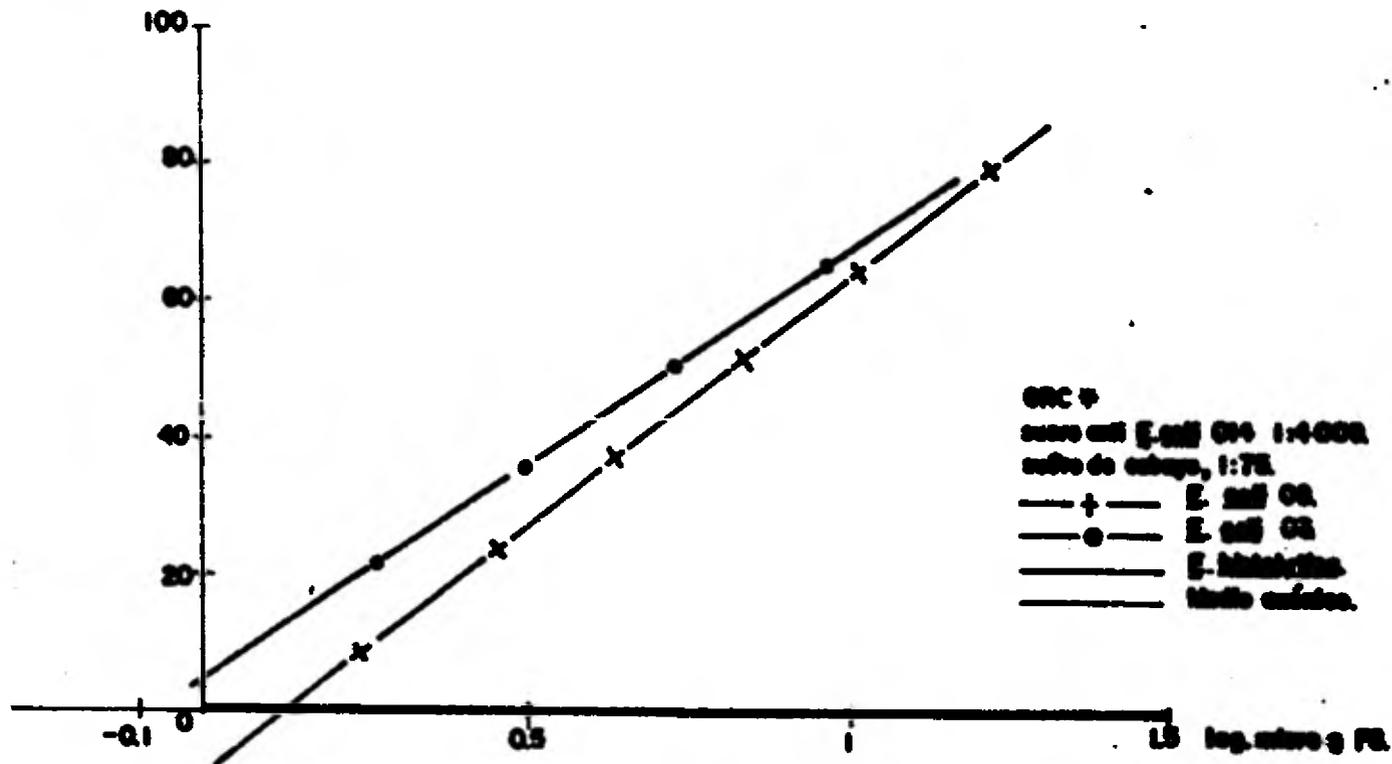
FS	<u>E. coli</u> O3					$f(x) = 63.53x + 4.085$
ug	log ug	% inhibición				y estimada $r = 0.98$
	x	y	x^2	xy		
15.000	1.1761	83.4	1.3832	98.08		78.49
7.500	0.8751	52.4	0.7658	45.85		59.44
3.750	0.5740	37.5	0.3294	21.52		40.35
1.875	0.2730	23.6	0.0745	7.90		21.27
0.937	-0.0280	-	0.0007	-		2.31
	<u>2.8701</u>	<u>201.9</u>	<u>2.5536</u>	<u>173.25</u>		
		\bar{y} 40.38				



% de inhibición de hemólisis con los PI de E. coli O8, E. coli O5 y E. coli O16, empleando el sistema inmunológico heterólogo ORCV, suero anti E. coli O16 y suero de suero complementado. La PI del método clásico no da lugar a la inhibición de la hemólisis.

% de inhibición
de hemólisis.

Fig. 3



% de inhibición de hemólisis con las FE de *E. coli* O14 y *E. coli* O157
empleando el sistema heterólogo CRC+ con *E. coli* O14 y
complemento. La FE del medio control y de *E. coli* O157 no dan
lugar a la inhibición de hemólisis.

TABLA XIII

Resumen de Resultados

Determinación de la cantidad de microgramos de cada fracción que inhibe al 50% de hemólisis/ml en la gráfica de % de inhibición⁸⁷ de hemólisis vs el logaritmo de los μg de cada fracción.

FI <u>E. coli</u> O3		FI <u>E. coli</u> O3		FI <u>E. histolytica</u>	
log μg	% inhibición	log μg	% inhibición	log μg	% inhibición
0.970	83.00	2.17	99.27	2.93	70.00
0.270	70.95	1.97	92.67	2.93	61.20
-0.023	53.00	1.97	83.41	1.75	44.40
-0.323	30.00	1.97	61.00	1.64	27.50
-0.530	19.70	0.97	31.00	1.14	10.00
-0.932	2.32	0.97	14.00		
0.977 μg	50.00	10.035 μg	50.00	20.133 μg	50.00
6.513 μg	50.00/ml	127.033 μg	50.00/ml	437.220 μg	50.00/ml
FS <u>E. coli</u> O3		FS <u>E. coli</u> O3		FS <u>E. histolytica</u>	
log μg	% inhibición	log μg	% inhibición	log μg	% inhibición
1.273	82.02	1.17	70.00	2.17	-
0.971	61.40	0.97	39.66	1.97	-
0.671	30.00	0.97	40.33	1.97	-
0.369	13.30	0.27	21.27	1.27	-
0.060	- 3.14	- 0.03	2.31	0.97	-
6.450 μg	50.00	0.12 μg	50.00	-	50.00
43.04 μg	50.00/ml	36.10 μg	50.00/ml	-	50.00/ml
FS Medio exénico		FI Medio exénico			
log μg	% inhibición	log μg	% inhibición		
2.17	-	2.17	-		
1.97	-	1.97	-		
1.97	-	1.97	-		
1.27	-	1.27	-		
0.97	-	0.97	-		
-	50.00	-	50.00		
-	50.00/ml	-	50.00/ml		

* Este valor se calcula considerando el valor en microgramos de cada fracción que inhibe al 50% de hemólisis fué en una alícuota de 0.10 ml.

El valor en microgramos de cada fracción se determina interpolando en las figuras I y II el punto que equivale al 50% de inhibición de hemólisis y transfiriendo este valor a un eje determinando su antilogaritmo.

** % de inhibición ajustado por mínimos cuadrados.

V. DISCUSION

Existe una amplia literatura que informa, sobre como diversos microorganismos comparten algunos determinantes antígenicos de estructura química similar. Un ejemplo de esto lo constituye la reacción antígenica cruzada entre *E. coli* tipo 01 capsulada y *N. meningitidis* del grupo 2 también capsulada, y se debe a la similitud química del polisacárido capsular de ambas bacterias, el cual está constituido por ácido N-acetilneuramínico (18).

También se han demostrado reacciones antígenicas cruzadas entre bacterias y células animales. Una de las sustancias implicadas en este cruce antígenico es el antígeno de Forssmann, el cual ha sido hallado en células humanas, de caballo, de pollo, en bacterias (19). Además, se ha comprobado que los antígenos que forman los grupos sanguíneos de la membrana de los glóbulos rojos humanos, son capaces de cruzar antígenicamente con células vegetales y bacterias (20) (21). En unos trabajos han atribuido a las reacciones antígenicas cruzadas entre los microorganismos, los tejidos animales, un papel preponderante en la etiología de ciertas enfermedades infecciosas. Un ejemplo bien conocido es la fiebre reumática, en donde se ha sugerido la existencia de un cruce antígenico entre los antígenos del estreptococo y el tejido cardíaco. (27).

Uno de los antígenos que en un principio fué hallado en diferentes serotipos de *E. coli* y en casi todas las enterobacterias, es el antígeno común enterobacteriano (22). Las bacterias Gram positivas y varias Gram negativas como *Staphylococcus*, *Brucella* y *S. portusis*, carecen de este antígeno. Algunos autores como Leffner (23) han discutido la posibilidad de clasificar a las bacterias en la familia Enterobacteriaceae en base a la presencia de este antígeno.

Además de las implicaciones taxonómicas del antígeno común, ha sido muy relevante el hallazgo de las similitudes antígenicas entre el ODA y los tejidos animales. Debido a la importancia que este fenómeno puede tener, el descubrimiento de reacciones cruzadas entre el ODA y las células de la mucosa del colon humano (4), ha permitido afirmar que el ODA

puede estar implicado en la aparición de colitis ulcerativa. En la patogénesis de las lesiones renales en las pielonefritis, se ha relacionado el cruce antigénico entre las células renales / el ECA y se ha propuesto (21) que la débil respuesta del ratón hacia la inmunización con el ECA, se debe posiblemente al cruce antigénico entre este antígeno, con el tejido renal, hepático y bazo de este animal.

Además, la aparición de los episodios diarreicos en niños menores de seis meses (2) ha sido relacionada a los antígenos compartidos entre la mucosa intestinal y E. coli capaces de provocar infecciones.

En este trabajo se reportan los resultados preliminares obtenidos al determinar en un extracto crudo de E. histolytica de la cepa HK-9, la presencia de una sustancia (o sustancias) similar (es) al ECA, capaz de reaccionar con anticuerpos anti ECA, empleando como controles una cepa de E. coli O3 (fase lisa) y de E. coli O9 (cepa rugosa tipo R1). Se eligió la reacción de inhibición de inmunodifusión para determinar el antígeno común debido a que posee mayor sensibilidad que la reacción de inhibición de hemaglutinación (33). Esta última reacción se empleaba como el método de elección para demostrar el antígeno común, sin embargo Marx y cols (42) desarrollaron un método de aglutinación bacteriana directa para detectar este antígeno. Ellos hallaron que los títulos más altos de aglutinación bacteriana (empleando un suero anti ECA de título elevado) se obtenían con variantes inamórficas de tipo R1 y R4, en las cuales el ECA está más expuesto a la superficie de la bacteria. En cambio, en cepas rugosas no inamórficas R2 y R3 y también en cepas de *Salmonella* de núcleo Ra, los títulos fueron menores debido tal vez, a que el ECA no está unido al UPS O, y se encuentra menos expuesto. En bacterias lisas S, la ausencia de aglutinación bacteriana se ha sugerido que puede deberse a que el ECA está "enmascarado" total o parcialmente por las cadenas polisacáridas O (43).

El método de extracción (37) empleado en este trabajo, no puede considerarse como el más adecuado para separar de E. histolytica los antígenos que poseen una similitud antigénica con el ECA, sin embargo se eligió este método de extracción como un método de extracción preliminar para demostrar la presencia de una sustancia (s) proveniente de la

amiba que cruzó (a) antígenicamente con el antígeno común de enterobacterias.

Por esta razón, la cantidad de las fracciones necesarias para inhibir la hemólisis del 10' de los glóbulos rojos de camaro, no debe considerarse como un índice del contenido total de la sustancia (s) antihémolisante similar al ECA, aunque como puede observarse en la tabla VII, las fracciones separadas de las enterobacterias así como los coneos controles, inhibieron la hemólisis del sistema heterólogo, con cantidades significativamente menores que la obtenida con la fracción insoluble de E. histolytica.

Por los resultados obtenidos, se puede concluir que la capa K-9 de E. histolytica posee en la fracción insoluble, una sustancia (s) antihémolisante similar (ar) al ECA. Como esta actividad solamente se demostró en la fracción insoluble, se puede suponer que, probablemente, esta sustancia se encuentra unida a una molécula análoga al U.S. bacteriano, en la misma forma que el ECA inmunogénico de la E. coli 03 se encuentra en la fracción estaminal insoluble.

Por ahora no es posible especular sobre el significado biológico que pueda tener el cruce antígeno entre este protozooario y las enterobacterias; Sin embargo, es importante señalar que este trabajo informa por primera vez, una reacción cruzada entre E. histolytica y los anticuerpos dirigidos contra el antígeno común enterobacteriano, el cual ha sido ampliamente estudiado y caracterizado en bacterias, pero no en este protozooario.

Puede ser importante esta observación en cuanto que las enterobacterias y E. histolytica comparten un mismo antígeno, presente además en las células de la mucosa del colon y sus posibles implicaciones en la relación huésped-parásito.

VI RESUMEN

Se propuso como objetivo de trabajo, determinar si la cepa HK-9 de E. histolytica, cultivada en condiciones axénicas, posee una sustancia similar al antígeno común detectado en casi todas las enterobacterias y en la mucosa intestinal humana.

Para lograr este objetivo se utilizó la reacción de inhibición de inmunodifusión empleando un suero de conejo anti E. coli O14, como fuente de anticuerpos anti ECA. Se utilizaron como controles los serotipos E. coli O3 (H1) y E. coli O3 (fase lisa), los cuales poseen al ECA intracelular en la fracción etanol insoluble y fracción etanol soluble respectivamente.

Los resultados preliminares obtenidos, indican que, la fracción etanol insoluble de la cepa posee una sustancia (o sustancias) antígenicamente similar (es) al ECA, probablemente unida covalentemente a un lipopolisacárido, tal como se halla en el serotipo E. coli O3 de número tipo R1.

GLOSARIO Y ACRONIMIAS

Lipopolisacárido crudo (LPS U): Corresponde al sobrenadante obtenido al centrifugar una suspensión de bacterias calentadas a 100°C durante 1 hora. A este sobrenadante se lo denomina también extracto crudo.

Unidad 50% hemolítica: Mililitros de suero de cobayo diluido, necesarios para provocar la hemólisis del 50% de los glóbulos rojos de conejo sensibilizados con el LPS crudo de S. typhimurium (3008).

Antígeno Común Interbacteriano (ECA): Se encuentra presente en dos formas, una heptónica que se halla presente en la mayor parte de las enterobacterias y capaz de formar ECA para dar lugar a su aglutinación, pero ineficaz para producir la formación de anticuerpos anti ECA. La forma inmunogénica del ECA se halla en un escaso número de bacterias, entre ellas las variantes rugosas de núcleo oligosacárido tipo R1 y R4.

Bacterias no inmunogénicas: Son bacterias incapaces de provocar la formación de anticuerpos anti ECA al ser inyectadas a conejos, en forma de suspensiones bacterianas muertas por calentamiento, esto es debido a que el ECA no se halla unido covalente al núcleo del LPS bacteriano.

Bacterias inmunogénicas: Estas bacterias dan lugar al aumento en título de anticuerpos anti ECA, al ser inyectadas a conejos en forma de suspensiones muertas por calentamiento. El ECA de estas bacterias se halla unido covalentemente al núcleo oligosacárido del LPS O bacteriano.

ECA inmunogénico: Es la forma antigénica del ECA capaz de evocar la formación de anticuerpos anti ECA al ser inyectada a conejos por vía intravenosa. En bacterias no inmunogénicas se halla en la fracción etanol soluble (FS); en cepas inmunogénicas de núcleo R1 y R4 se halla en la fracción etanol insoluble (FI).

SSI: Solución salina isotónica

TBS: Trisethanolamino buffer solution (solución amortiguadora de trietanolamina).

U_{50%}: Unidad 50% hemolítica.

VII BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Archer, J.R. y Rowley, D.A. 1960. A quantitative comparison of antigenic structure of a virulent and avirulent strain of Salmonella typhisuis. Immunol. 17: 351-353.
- 2.- Balsem, F. y Shaffer, J.S. 1953. The effect of viable bacteria on the capacity of strain of large rare Entamoeba histolytica to produce abscess in the hamster liver. Am. J. Trop. Med. Hyg. 7: 17.
- 3.- Biagi, F.F., Robledo, E., Servín, H. y Martuschelli, A. 1962. The effect of cholesterol on the pathogenicity of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 11: 333.
- 4.- Biagi, F.F., Robledo, E., Servín, H. y Morán, G. 1963. Influence of some steroids in the experimental production of amoebic hepatic abscess. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 313.
- 5.- Briles, E.B. y Tomasz, A. 1973. Pneumococcal Forstrom antigen. J. Biol. Chem. 243: 3394-3397.
- 6.- Brandt, H. y Pérez-Jamayo, R. 1970. Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana. México.
- 7.- Campbell, D.H., Garvey, J.S., Greiner, H.C. y Sussdorf, D.H. 1970. Methods in Immunology. 2nd Edition. W.A. Benjamin, N.Y.
- 8.- Carrillo, J., Hashimoto, S. y Kunets, J. 1955. Content of heteroagglutinating antigen in E. coli and its relationships to diarrhea in newborn infants. J. Infect. Dis. 113: 285.
- 9.- Diamond, L.S. 1968. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudin, 1903 and E. histolytica-like amoebae. J. Parasit. 54: 1047.
- 10.- Diamond, L.S., Phillips, B.P. y Bertgis, I.L. 1974. A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated E. histolytica in hamster liver. Arch. Invest. Med. (Méx.) 5 Supl. 2: 423.
- 11.- Diamond, L.S. 1990. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica: Progress and problems. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11 Supl. 1: 47-54.
- 12.- Edwards, P.R. y Ewin, W.H. 1963. Identification of enterobacteria case. Burgess Publishing Co. Minn.
- 13.- Estridge, L. y Hagner, R. 1937. Elimination of amoeba from rats with a high protein diet. J. Parasit. 23: 105.
- 14.- Faria-Velasco, A. y O'Shea, M. de S. 1974. Demostración ultramicroscópica de antígenos de superficie en trofozoítos

- de E. histolytica. II Por técnicas inmunocitofluóricas de alta resolución. Arch. Invest. Med. (Méx) 5 Supl. 2: 318.
- 15.- Fuderberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. y Wells, J.V. 1978. Basic & Clinical Immunology. 2nd Edition. Lange Med. Pub. California.
- 16.- Galanos, C., LÖderitz, O. y Westphal, C. 1969. A new method for extraction of R lipopolisaccharides. Eur. J. Biochem. 9: 245.
- 17.- Goldman, H. y Gleason, N.N. 1972. Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means of fluorescent antibody. IV Relationship of two strains of E. histolytica and one of E. hartmanni demonstrated by cross absorption techniques. J. Parasitol. 49: 773.
- 18.- Grados, O. y Ewing, W.H. 1970. Antigenic relationship between Escherichia coli and Neisseria meningitidis. J. Infect. Dis. 122: 100-103.
- 19.- Gutiérrez, G., Margain, J.L., Castañeda, R., Enríquez, O., Abarca, H. y Sepúlveda B. 1974. Encuesta serológica nacional I. Investigación de anticuerpos contra E. histolytica en una localidad semirural de la costa del Golfo de México. Arch. Invest. Med. (Méx) 5 Supl. 2: 475.
- 20.- Hammarström, S., Carlsson, H.E., Perlmann, P.S. y Svensson, S. 1971. Immunochemistry of the common antigen of Enterobacteriaceae (Kurín). J. Exp. Med. 134: 565-576.
- 21.- Haingren, J., Hanson, L.A., Hala, S.E. y Kaijer, B. 1971. An antigenic relationship between kidney and certain Escherichia coli strains. Int. Arch. Allergy 41: 463-474.
- 22.- Hoyjo, H.K., Miranda, L., Kumate, J. y Carrillo, J. 1969. Efectos enteropatógenicos de E. coli en las asas ileales de conejo y su relación con el contenido de antígeno heteropatógeno. Bol. Med. Hosp. Inf. (Méx.) 26: 15-22.
- 23.- Isibesi, A., Sánchez, N., García, F., y Kumate, J. 1978. Serología con polisacáridos de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 Supl. 1: 235.
- 24.- Jarucilinta, R. y Macgrath, B.G. 1961. Intestinal anaerobiosis associated with anaerobic liver abscess produced by intracecal inoculation of Entamoeba histolytica in hamsters. Am. Trop. Med. Parasit. 55: 313.
- 25.- Jarucilinta, R. y Macgrath, B.G. 1962. The induction of anaerobic

- liver abscess in hamsters by the intraperitoneal inoculation of trypomastigotes of Entamoeba histolytica. Am. Trop. Med. Parasit. 58: 243.
- 26.- Kagan, I.G. 1974. Pathogenicity of E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 5 Supl. 2: 457.
- 27.- Kaplan, H.H. 1955. Antibodies to heart and rheumatic fever; the induction of auto-immunity to heart by streptococcal antigen cross-reactive with heart. Ann. N.Y. Acad. Sci. 124: 324.
- 28.- Kent, J.F. y Fife, H.E. 1950. Precise standardization of reagents for complement fixation. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 12: 103-115.
- 29.- Kettis, A.A. y Sundvist, K.S. 1970. Capping in Entamoeba histolytica acceleration and inhibition by experimental procedures. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis. I.M.S.S. (Méx.) Editores L.S. Diamond y B. Sepúlveda. pag. 324.
- 30.- Kaush, G.T. 1979. Specific membrane receptors: pathogenic and therapeutic implications in infectious disease. Rev. Infect. Dis. 1(3): 517-529.
- 31.- Krasprzak, T. 1970. Interpretation of in vivo studies of virulence of E. histolytica using laboratory rodents. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis. I.M.S.S. (Méx.) Editores. L.S. Diamond y B. Sepúlveda. pag. 636.
- 32.- Kumata, J., Cravioto, J., Hashimoto, S., Vega, L. y Carrillo, J. 1971. Content of common antigen of Escherichia coli and diarrhea of newborns and infants in a Mexican pre-industrial community. Ann. N.Y. Acad. Sci. 170: 350-359.
- 33.- Kumata, J., Carrillo, J. y Hashimoto, E. 1967. Incunohemólisis condicionada con antígenos enterobacterianos. Sci. Med. Hosp. Inf. (Méx.) 24: 275-281.
- 34.- Kurin, C.H., Beard, L.V. y Halasz, N.E. 1962. Evidence for a common heptan associated with endotoxin fractions of E. coli and other enterobacteriaceae. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 111: 100.
- 35.- Lelander, L., Chalou, A.M. y Varon, H. 1972. Recherches sur la présence de l'antigène commun des "Enterobacteriaceae" (antigène Kurin) chez les "Yersinia" "Levinsia" "Aeromonas" et "Vibrio". Ann Inst. Pasteur. Paris. 123: 751.
- 36.- Ullaritz, C., Staub, A.M. y Festhal, O. 1960. Immunochimistry of O and H antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae. Act. Reva. 32: 192.

- 37.- Macgregair, B. G. y Marinovats, C. 1959. Experimental anaebic infection of the liver in the guinea pigs I. Infection via mesenteric vein and portal vein. *Am. Trop. Med. Parasit.* 48:421.
- 38.- Makela, P.H. y Mayer, H. 1974. Participation of lipopolisaccharides genes in the determination of the enterobacterial common antigen; Analysis in Salmonella group B and C. *J. Bacteriol.* 119: 765-770.
- 39.- Makela, P.H. y Mayer, H. 1975. Enterobacterial Common Antigen. *Bact. Rev.* 40: 591.
- 40.- Kannel, D. y Mayer, H. 1976. Isolation and chemical characterization of enterobacterial common antigen. *Eur. J. Biochem.* 86: 361-370.
- 41.- Marx, A. y Petrovici, U. 1976. Role of the rfa locus in the immunogenicity of common enterobacterial antigen (Kurin). *Infect. Immun.* 13: 360-364.
- 42.- Marx, A., Petrovici, U., Nacassou, N., Mayer, H. y Schmidt, G. 1977. Demonstration of enterobacterial common antigen by bacterial agglutination. *Infect. Immun.* 18: 563.
- 43.- Marx, A. y Petrovici, U. 1978. Immunochemical studies on bacterial common antigen. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.* 37: 277-289.
- 44.- Mayer, H., Schmidt, G., Cheng, H.Y. y Netzer, E. 1972. Biochemical basis of immunogenicity of common enterobacterial antigen. *Infect. Immun.* 6: 540-544.
- 45.- Neal, R.A., Robinson, G.L., Lewis, W.P. y Kessel, I.F. 1968. Comparison of clinical observations on patients infected with Entamoeba histolytica with serological titers of their sera. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62: 62.
- 46.- Netzer, E., Cheng, H.Y., Luderitz, G. y Bestphal, G. 1966. Immunochemistry priming without production of circulating bacterial antibodies by endotoxins and its lipid A component. *Nature.* 212: 420.
- 47.- Novotny, A. 1969. *Basic Exercises in Immunochemistry. A laboratory manual.* Springer-Verlag N.Y. Inc. p. 26
- 48.- Parleann, P.S., Hamarström, S., Lagercrantz, R. y Campbell, D. 1967. Auto-antibodies to colon in rats and human ulcerative colitis; cross reactivity with Escherichia coli O14 antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125: 975-980.
- 49.- Phillips, R.B., Jolfe, P.A., Rees, C.W., Gordon, H.A., Erigth, E.H. y

- Heiners, J.A. 1955. Studies on the amoeba-bacteria relation ship in amoebiasis. Comparative results of the intracecal inoculation of germfree, noncontaminated and conventional guinea pigs with E. histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 4:575.
- 50.- Sadun, E.H., Bradin, J.L.Jr. y Faust, E.C. 1951. The effect of ascorbic acid deficiency on the resistance of guinea pigs to infection with Entamoeba histolytica of human origin. Am. J. Trop. Med. 31: 425, 1951.
- 51.- Sergeant, P.G. y Williams, J.E. 1970. The differentiation of invasive and non invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 104.
- 52.- Schmidt, G., Donnal, D., Cayer, H., Whang, H.Y. y Neter, E. 1976. Role of lipopolisaccharides gene for immunogenicity of the enterobacterial common antigen. J. Bact. 125:579.
- 53.- Schmidt, G., Jann, B. y Jann, K. 1974. Genetic and immunochemical studies on Escherichia coli O14:K7:H⁺. Eur. J. Biochem. 42: 303.
- 54.- Schmidt, G., Jann, B. y Jann, K. 1969. Immunochimistry of R lipopolisaccharides of E. coli. Different core regions in the lipopolisaccharides of group B. Eur. J. Biochem. 10:501-510.
- 55.- Springer, G.F. 1933. Inhibition of blood-group agglutinins by substances occurring in plants. J. Immunol. 7: 399-497.
- 56.- Springer, G.F., Williamson, P. y Brandes, W.C. 1961. Blood group activity of Gram negative bacteria. J. Exp. Med. 113: 1077-1083.
- 57.- Suszki, T., Garzynski, E.A. y Neter, E. 1964. Separation by ethanal of common and somatic antigens of Enterobacteriaceae. J. Bact. 88: 1240.
- 58.- Suszki, T., Whang, H.Y. Garzynski, E.A. y Neter, E. Inhibition by lipopolisaccharide (endotoxin) of antibody response of rabbit to common antigen of enterobacteriaceae. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117: 705-700.
- 59.- Taylor, D.J., Greenberg, J.Y. y Josephson, E.S. 1952. The effect of two different diet on experimental amoebiasis in the guinea pig and in the rat. Am. J. Trop. Med. 1:559.
- 60.- Valtonen, H.V., Larinkari, U., Phosila, U., Valtonen, V. y Uekela, P.H. 1976. Effect of Enterobacterial Common antigen on mouse virulence of Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 13:2001.

- 61.- Dikman, P.H. 1949. A comparison of von Krogh formula (logistic function) and method of probits as applied to hemolysis by complement. *J. Immunol.* 63: 403.
- 62.- Wang, H.Y., Luderitz, O., Westphal, O. y Neter, E. 1966. Inhibition by lipid A on formation of antibodies against common antigen of Enterobacteriaceae. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 371-374.
- 63.- Wang, H.Y. y Neter, E. 1962. Immunochemical studies of heteroantigenic enterobacterial antigen (Kurin). *J. Bact.* 64: 1245-1250.
- 64.- Wang, H.Y., Meyer, H., Schmidt, G. y Neter, E. 1972. Immunogenicity of common enterobacterial antigen produced by smooth and rough strains. *Infect. Immun.* 5: 533-539.
- 65.- Wittner, U. y Rosebaum, R.U. 1970. Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. Studies of amoeba from axenic culture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 755.