

18
27
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"



DETERMINACION DE ANTICUERPOS DE LAS CLASES
IgA e IgG CONTRA EL POLISACARIDO CAPSULAR DE
Klebsiella pneumoniae K-8 EN MUESTRAS DE SUERO DE
CORDON UMBILICAL, SUERO DE MADRES EN PUERPE-
RIO Y CALOSTRO MATERNO POR EL METODO
DE ELISA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA :

MARIA INES DEL PILAR GARCIA ROCA

CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEX.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGINA-
ABREVIATURAS	1
RESUMAN	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	21
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	39
APENDICE	40
BIBLIOGRAFIA	42-

ABREVIATURAS.

UCIN	unidad de cuidados intensivos neonatales.
PHN	polimorfonucleares.
Ig	inmunoglobulinas.
x g	unidades gravitacionales.
SSF	solución salina fisiológica.
°C	grados centígrados.
PBS	solución salina fosfatos.
ul	microlitros.
ml	mililitros.
ug	microgramos.
min.	minutos.
hrs.	horas.
PBS-Tween	solución salina fosfatos - Tween.
ASB	albúmina sérica bovina.
DS	desviación estándar.
SCU	suero de cordón umbilical.
SM	suero materno.
CALOS.	calostro.
ELISA	análisis inmunoenzimático.
LC	línea de corte.
MO	microorganismo.
nm	nanómetros.
Neg.	negativo.

RESUMEN.

Se ha demostrado que en el calostro y leche materna existen mecanismos de protección tanto inespecíficos como específicos, los cuales pueden intervenir en la defensa del neonato.

Con la finalidad de determinar si la madre posee anticuerpos contra *Klebsiella* y además si es capaz de transferirlos al feto por vía trasplacentaria y al recién nacido a través del calostro y leche materna, fueron obtenidas y analizadas cincuenta muestras tanto de suero materno así como de suero de cordón umbilical y calostro de madres sometidas a operación cesárea en el "Hospital de la Mujer" de la Secretaría de Salud.

A dichas muestras se les determinó presencia de anticuerpos de las clases IgA e IgG contra el polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae K-8* por análisis inmunoenzimático. Se observó que el 26 % de los sueros maternos y el 10 % de los sueros de cordón umbilical fueron positivos ya que presentaron mayor absorbancia a la línea de corte de 0.351 y 0.132 respectivamente; mientras que el 20 % de las muestras de calostro fueron positivas con una línea de corte de 0.124.

Estos resultados indican la presencia de IgG e IgA contra *Klebsiella* en las madres, los cuales pueden ser transferidos al recién nacido en mayor proporción por el calostro, en el caso del feto el paso de IgG materna por vía trasplacentaria es menor.

INTRODUCCION.

Las infecciones bacterianas en el recién nacido son una de las causas -- más frecuentes de morbilidad y mortalidad en México. Dichas infecciones representan mayor importancia cuando se adquieren en forma intrahospitalaria (1,2).

Las infecciones nosocomiales en las cuales Klebsiella pneumoniae es una -- de las bacterias más frecuentemente aislada (Tabla I), han mostrado una tendencia de incremento progresivo en los últimos años, siendo la mayoría de los aislamientos cepas que presentaban resistencia a los antimicrobianos (3).

El género Klebsiella fué descrito inicialmente por Friedlanders (4,5). Perteneció a la familia Enterobacteriaceae, es considerado como un agente patógeno oportunista causante de bacteremias, neumonías, septicemias e infecciones del tracto urinario (6).

Buchanan y Gibbons (1974) describen tres especies de Klebsiella las cuales son Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozaenae y Klebsiella rhinoscleromatis (5,7), mientras que Cowan y cols. reconocen cinco especies siendo estas: Klebsiella pneumoniae, Klebsiella rhinoscleromatis, Klebsiella ozaenae, Klebsiella aerogenes y Klebsiella edwardsii (7). Las propiedades bioquímicas de este género de bacterias se presenta en la Tabla II.

Klebsiella se presenta morfológicamente como bacilo gram negativo, constituido por tres capas: la membrana citoplasmática, la membrana de peptidoglucán que mantiene la rigidez y la forma de la célula, y la membrana externa -- formada por un complejo de lipopolisacáridos (LPS), fosfolípidos y proteínas (Fig. 1).

El lipopolisacárido es una sustancia de alto peso molecular, termoestable, inmunogénica que constituye el antígeno O somático, del cual hasta el mo

mento se conocen doce tipos diferentes (3).

Klebsiella crece formando colonias grandes, mucoides debido a la presencia de cápsula, la cual está formada por polisacáridos constituidos por varios azúcares como la glucosa, lactosa, ramosa; tiene además otros componentes como los grupos formilo, acetilo y ácido pirúvico (8). La cápsula determina las características del antígeno K de la bacteria, identificándose hasta el momento 80 serotipos capsulares para Klebsiella pneumoniae. Se han encontrado reacciones cruzadas entre algunos antígenos capsulares de Klebsiella, como son: K1 con K6, K2 con K7, K7 con K10; así como reacciones cruzadas con otros antígenos capsulares presentes en otras bacterias como son: Streptococcus pneumoniae tipo 2 con Klebsiella K2; Escherichia coli K55, K34, K37 y K39 con Klebsiella K7, K8, K10 y K11 respectivamente (9).

En cuanto a los serotipos capsulares aislados en unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), existen reportes de K1, K17, K26 y K33 (10, 11, 12).

El antígeno O, el antígeno K (13), así como la producción de bacteriocinas (14) y la presencia de plásmidos que le confieren resistencia a los antimicrobianos (15), se consideran factores de patogenicidad que posee Klebsiella.

La mayor susceptibilidad del neonato a las infecciones se atribuye a diversos factores, incluyendo mecanismos específicos e inespecíficos de defensa.

Entre los mecanismos inespecíficos de defensa destaca una disminución en la respuesta inflamatoria, siendo más lenta y menos intensa. La actividad quimiotáctica y fagocítica de los polimorfonucleares y monocitos se encuentra disminuida. Los PMN, tienen un menor poder de reducción del colorante nitroazul de tetrazolio lo que indica que el sistema oxidativo de los PMN es menor que en el adulto; los macrófagos muestran un funcionamiento deficiente. Las

concentraciones del complemento, específicamente C1q, C2, C3, C4, C5, factor-B, properdina y complemento hemolítico (CH50) se encuentran disminuidas (16).

En lo referente a los mecanismos específicos y particularmente el sistema humoral, se sabe que la IgG es la única inmunoglobulina con capacidad de pasar a través de la barrera placentaria encontrándose a niveles iguales o superiores a las de la madre en el recién nacido de término (17).

La IgM no atraviesa placenta. El recién nacido presenta de 10 a 20 mg/dl de suero, aumentando los niveles séricos hasta alcanzar los niveles normales del adulto a los dos años de edad (16).

La IgA sérica tampoco atraviesa la placenta detectándose hacia el quinceavo día de vida extrauterina en casi todos los lactantes y alcanza una concentración de 30 mg/dl, a los seis meses de vida. La IgA secretora es detectable en las lágrimas del recién nacido entre los 10 a 20 días de edad, posteriormente en la saliva y finalmente en el suero (17).

La IgD se encuentra en suero en cantidades equivalentes al 1 % respecto a los niveles del adulto, incrementándose durante el primer año de vida, hasta los niveles del adulto.

La IgE no está en el neonato, pero aparece en el transcurso del primer año de vida; elevándose en un año hasta el 30 % de los valores séricos del adulto (16,17).

El calostro y la leche materna, productos de secreción de la glándula mamaria en la lactancia, poseen componentes inmunológicos celulares y solubles: entre estos últimos se pueden mencionar a la IgA 11S (secretora) e IgA 7S (sérica), la primera se encuentra en una concentración en el calostro de 158 mg/gr. de proteína al segundo día post-parto y de 20 a 27 mg/gr. de proteína a los 180 días post-parto (21).

La IgA 11S es más resistente que la 7S a los cambios de pH y a la activi--

dad proteolítica de las enzimas gástricas e intestinales, es concentrada en secreciones y en la superficie de las mucosas donde desempeña un papel importante en la inmunidad local contra patógenos respiratorios e intestinales. La inmunoglobulina G, que participa fijando complemento, en la precipitación - neutralización de toxinas y virus (18,19), se encuentra en niveles de 1.2 a 4.9 mg/ gr. de proteína en el calostro y la leche materna (19).

La concentración de IgM, en el calostro es de 29 mg/gr de proteína declinando a los 120 y 180 días después del parto hasta un límite de 3.5 a 4.1 mg/gr de proteína. En menor concentración encontramos a las inmunoglobulinas IgE e IgD (20).

El componente C3 del complemento se encuentra en una concentración de 0.25 a 0.33 mg/ml de calostro dicho factor tiene la propiedad de ser opsónico y -- anafilotóxico.

La lactoferrina y la transferrina componentes del calostro y leche materna, se presentan en una concentración de 2 a 6 mg/ml de calostro; estos componentes poseen alta capacidad de captar el hierro y como consecuencia evitan la multiplicación bacteriana al impedir la utilización del hierro por el MO. - Otros componentes del calostro son: lisozima, factor de crecimiento del Bacillus bifidus, lípidos relacionados con resistencia estafilocócica y monoglicéridos que tienen actividad contra Herpes simple (18,20). Se han identificado una gran variedad de sustancias inmunorreguladoras, incluyendo el factor inhibidor de la migración de macrófagos, factor estimulante de IgA, interferón e interleucina 1 (21,22). También se encuentran numerosos elementos celulares - que incluyen monocitos, macrófagos, células T, linfocitos B, células plasmáticas, PMN y células epiteliales (20,21).

De acuerdo a lo anterior, se puede afirmar que el recién nacido presenta algunas limitaciones en torno a sus defensas inmunológicas dentro de las cua-

les destaca la inmunidad humoral. Sin embargo a diferencia de otros mamíferos el humano recibe por vía trasplacentaria una adecuada dotación de IgG materna y por ende protección pasiva. En el caso del calostro y leche humanos, la demostración de factores de defensa solubles y celulares ha permitido plantear que este fluido y la alimentación al seno materno, como se ha comprobado en otros mamíferos, representa otro mecanismo de transferencia de inmunidad pasiva. Estas consideraciones han permitido plantear nuevos conceptos en torno al tratamiento de la sepsis neonatal.

Sin embargo es bien reconocido que el éxito del tratamiento estriba en el diagnóstico oportuno de la infección. Si bien el diagnóstico clínico tiene limitaciones por ser inespecífico, el aislamiento del agente agresor, o demostración de su antígeno o anticuerpos específicos nos permiten precisar el tratamiento.

Para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas los métodos serológicos han adquirido gran importancia por su utilidad práctica y aplicación clínica de algunos de ellos (23). Entre estos sistemas se pueden mencionar la aglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo y, más recientemente, el análisis inmunoenzimático (ELISA).

Este último fué descrito por Voller y cols. en 1971. Ellos demostraron -- que las enzimas podían ser acopladas a anticuerpos o antígenos formando conjugados, los cuales conservaban tanto la actividad inmunológica como la enzimática. El método en sí requiere una fase sólida en la cual se lleva a cabo la reacción (24). Dicho método ha tenido una gran aplicabilidad ya que se ha utilizado como prueba de diagnóstico para detección de enfermedades parasitarias - (25, 26, 27), de infecciones virales (28), de infecciones bacterianas (28). Además del campo de la infectología, el método de ELISA tiene una gran aplicación en otras áreas médicas como la endocrinología, inmunopatología y hemato-

logía (23).

Se han desarrollado diversos tipos de análisis inmuno-enzimático (29) entre los que se encuentran:

a) Sistema de inmunoensayo enzimático indirecto: en este sistema, en antígeno puede ser acoplado en la fase sólida, dicho antígeno reaccionará en los anticuerpos específicos presentes en la muestra problema, a posteriormente será adicionado en conjugado (anticuerpo unido a una enzima) así como el sustrato adecuado; siendo evidencia las reacciones antígeno anticuerpo por medio de una reacción zimática. En este sistema la intensidad es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico presente en la muestra problema (Fig. 2a).

La ventaja de este método es que puede ser utilizado para la determinación de antígeno o anticuerpos (30,31).

b) Método de doble anticuerpo, este método requiere de dos anticuerpos específicos, uno de ellos se une a la fase sólida y el segundo se encuentra acoplado a una enzima. La característica principal del que antígeno es debe poseer, por lo menos dos determinantes antigenicos por molécula (Fig. 2b).

La desventaja de este método es de que requiere de anticuerpos elaborados en diferentes especies de animales, y hay un incremento en el número de lavados y etapas de incubación (31).

c) Unión competitiva: Se utiliza en la determinación de antígeno. En este método el antígeno no marcado compete por la unión con el anticuerpo que se encuentra unido en la fase sólida y del cual se tiene una cantidad de antígeno limitada.

En este caso la intensidad de color es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (Fig. 2c).

La ventaja que presenta este método es la de ser más rápido que el de doble anticuerpo ya que disminuyen el número de lavados y etapas de incubación (30).

El análisis inmunoenzimático cumple con los requisitos de especificidad, sensibilidad y rapidez que anteriormente sólo presentaba el radioinmunoensayo. Además emplea reactivos estables, no utiliza material radiactivo, requiere de menor equipo, puede ser automatizado y es aplicable para la detección tanto de antígenos como de anticuerpos (9,26).

TABLA I: Micoorganismos identificados en infecciones intrahospitalarios en el Hospital Infantil de México en 1978.

La muestra tomada fué de 100 egresos (22).

MICROORGANISMOS	FRECUENCIA
Kiebsiello sp.	30.0%
S. aureus	29.4%
E. coli	23.0%
Pseudomonas sp.	13.4%
Proteus sp.	2.1%
S. epidermidis	1.1%
S. viridans	0.5%
C. albicans	0.5%

TABLA II: Se muestran algunas de las propiedades bioquímicas que presenta - Klebsiella pneumoniae (5,32).

PROPIEDADES DE Klebsiella pneumoniae

Bacilo gram negativo			
Aerobio, anaerobio facultativo			
Cápsula de polisacáridos			
Movilidad	(-)	Sacarosa	(+)
Lactosa	(+)	Rojo de metilo	(-)
V-P	(+)	KCN	(+)
Glucosa	(+)	Ureasa	(+) lenta
Manitol	(+)	Gelatina	(-)
Indol	(-)	Malonato	(+)
Citratos	(+)	Lisina	(+)
Ornitina	(+)	Arginina	(-)
Ac. Sulfhídrico	(-)	DNasa	(-)
Arabinosa	(+)	Lipasa	(-)
Inositol	(+)	Hidrólisis	
Manitol	(+)	Tween 80	(-)
Salicina	(+)		

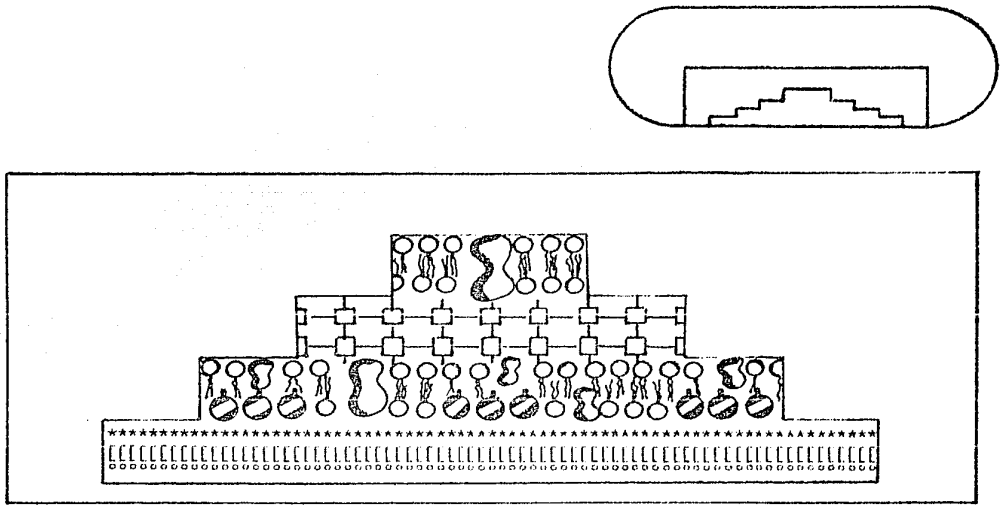
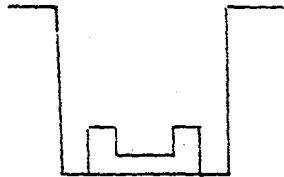


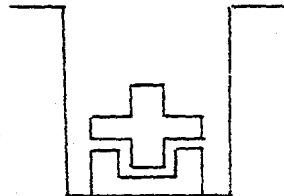
Fig. 1: Representación esquemática de un bacilo gram negativo, mostrando algunas de las partes que lo constituyen.

- | | | | |
|--|---|--|----------|
| | Membrana citoplasmática.
Membrana externa. | | LPS |
| | Peptidoglicán. | | Cápsula. |

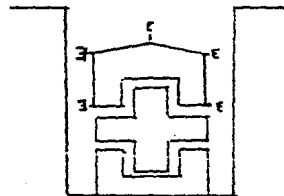
1. Adsorción del antígeno.



2. Adición del suero problema.



3. Anticuerpo marcado con enzima.



4. Sustrato.

5. Lectura de absorbancia del producto de reacción.

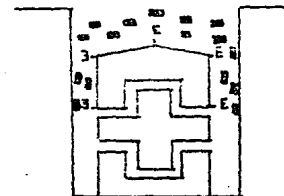
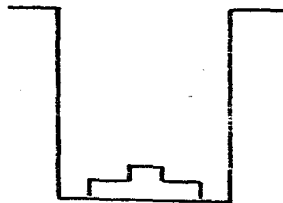
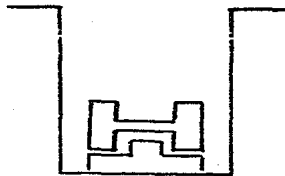


FIG. 2a: Esquema del método indirecto de ELISA (26)

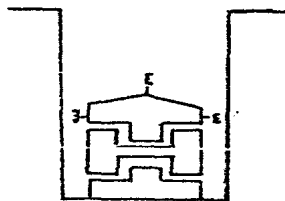
1. Adsorción del anticuerpo.



2. Adición del antígeno.



3. Anticuerpo marcado con enzima.



4. Adición del sustrato.

5. Lectura de absorbancia del producto de reacción.

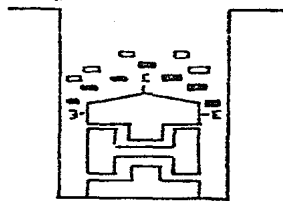
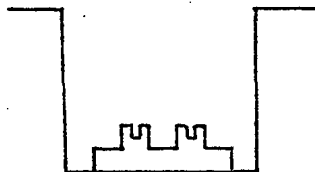
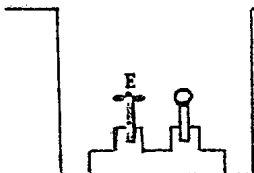


FIG. 2b: Esquema del método de doble anticuerpo ELISA (26).

1. Adsorción del antígeno.

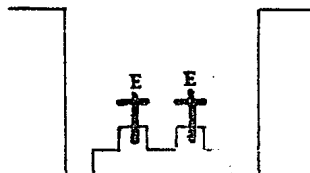


2A. Antígeno marcado con enzima
Antígeno desconocido

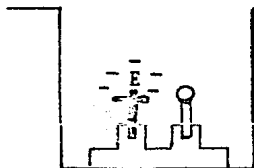


E

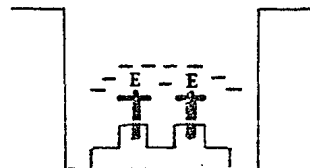
2B. Antígeno marcado con enzima



3A. Sustrato -



3B. Sustrato -



4. Lectura de absorbancia del producto de reacción.

FIG. 2c: Esquema del método competitivo ELISA (26).

HIPOTESIS.

Las mujeres en edad reproductiva en nuestro medio presentan anticuerpos -
circulantes IgG e IgA contra el antígeno capsular de Klebsiella pneumoniae, -
que en el momento del embarazo y la lactancia pueden ser transferidos al feto
y al recién nacido por vía trasplacentaria y a través del calostro y leche ma-
terna.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se necesitan técnicas de laboratorio con mayor sensibilidad, especifici-
dad y rapidez para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Debido a que -
el recién nacido posee un sistema inmune deficiente en muchos aspectos al ---
compararlo con el adulto, y considerando que Klebsiella pneumoniae es un agen-
te patógeno oportunista que infecta al neonato con gran frecuencia, es impor-
tante determinar si existen anticuerpos contra este microorganismo en mujeres
en edad reproductiva y además si se produce la transferencia de dichos anti-
cuerpos al feto y al recién nacido por vía trasplacentaria o a través del ca-
lostro y leche materna.

OBJETIVOS.

1.- Elaboración y estandarización de un método inmunoenzimático (ELISA) - para la determinación y cuantificación de anticuerpos del tipo IgG e IgA contra Klebsiella pneumoniae K-8, utilizando el polisacárido capsular como antígeno.

2.- Determinar la presencia y concentración de anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular de Klebsiella pneumoniae K-8, en muestras de calostro humano, suero de madres en puerperio y suero de cordón umbilical de recién nacidos.

3.- Hacer una comparación de los datos obtenidos por hemaglutinación pasiva, con los obtenidos por el método de inmunoenzimático y determinar si existe correlación entre ambos métodos.

MATERIAL Y METODOS.

1.- OBTENCION Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS HUMANAS DE SUERO Y CALOSTRO.

Se recolectaron cincuenta muestras de sangre periférica de mujeres primíparas y multiparas sometidas a cesárea en el " Hospital de la Mujer " de la - Secretaria de Salud, así como muestras de sangre de cordón umbilical de sus - recién nacidos respectivos. A estas madres también se les tomaron muestras de calostro entre el primero y cuarto día post-parto. La edad de las pacientes - de este estudio fué entre 16 a 40 años.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa e incubadas a - 37 °C por 30 min., para facilitar la formación y retracción del coágulo; pos- teriormente fueron centrifugadas a 480 xg por 15 min. en una centrifuga refri- gerada Sorvall. Los sueros obtenidos se separaron y almacenaron a -20 °C en - un congelador American hasta el momento de su uso.

Las muestras de calostro fueron obtenidas por expresión manual y centrifu- gadas a 1935 xg por 15 min. en una centrifuga refrigerada Sorvall. La capa lí- pidica y el paquete celular fueron eliminados, sólo se almacenó el sobrenadan- te separado, a -20 °C en un congelador American hasta el momento de su uso.

2.- OBTENCION DE SUERO HIPERINHUNE DE CONEJO.

2.1 Preparación de una cepa de Klebsiella pneumoniae inactivada para ser utilizada como inmunógeno.

Se utilizó una cepa de Klebsiella pneumoniae serotipo K-8, aislada duran- te una epidemia de sepsis neonatal en el Centro Médico " La Raza " del Insti- tuto Mexicano del Seguro Social en el año de 1976 y proporcionado por la Es- cuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. El

inmunógeno se preparó mediante la técnica descrita por James y cols. (27).

Se cultivó Klebsiella pneumoniae K-8 en placas de agar Worrel Ferguson a 37 °C durante 24 hrs cosechándose con 10 ml de agua formalinizada al 0.5% y agregando 10 ml de acetona al 50 %.

Las bacterias fueron centrifugadas a 5900 xg por 30 min. en una centrifuga refrigerada Sorvall, se eliminó el sobrenadante y el paquete obtenido se lavó tres veces con 10 ml. de acetona al 50 %, las bacterias fueron resuspendidas en 1 ml de acetona y se dejó secar a temperatura ambiente, el polvo obtenido fué triturado en un mortero estéril para obtener un polvo más fino, el cual se conservó en un frasco estéril a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

2.2 Esquema de inmunización a conejos.

Fueron utilizados dos conejos albinos de la raza Nueva Zelanda con una edad aproximada de tres meses y peso de 2500 a 3000 gr. Se tomó una muestra sanguínea para determinar la presencia de anticuerpos naturales contra Klebsiella. Los conejos fueron inoculados, con el antígeno previamente preparado, en la vena marginal de la oreja llevando a cabo el siguiente esquema de inmunización:

DIAS DE INOCULACION INTRAVENOSA	PESO SECO DE BACTERIA DILUIDO EN SOL. SALINA (mg)
0	0.5
3	1.0
7	2.0
10	3.0
14	4.0
17	5.0

Una semana después de la última inoculación se tomaron muestras de sangre para la determinación de anticuerpos contra *Klebsiella*.

Por vía intracardiaca se obtuvieron 15 ml de sangre, que se incubó a 37 °C por 30 min, para la formación y retracción del coágulo. El suero obtenido fué almacenado a 20 °C hasta el momento de su uso, considerandose como suero hiperimmune. Dicho suero fué titulado por el método de hemaglutinación pasiva.

Con el mismo procedimiento se obtuvo suero de conejos no inmunizados, fué almacenado de la misma manera y se utilizó como suero normal. Fué titulado por hemagiutinación pasiva.

3.0 DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL POLISACARIDO CAPSULAR DE *Klebsiella pneumoniae* K-8, POR HEMAGLUTINACION PASIVA.

3.1 Recubrimiento de los eritrocitos O y Rh positivo humano con polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* K-8.

Los eritrocitos se recubrieron con polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* K-8 proporcionado por la Dra. Ana María Mesta de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional; dicho polisacárido presentó una concentración de azúcares totales del 53 % por el método de Dubois y el 64 % por el método de Somogy, además se realizó cromatografía en capa fina en la cual las bandas que aparecieron corresponden a la glucosa, galactosa y ácido glucurónico, no se detectaron aminoácidos (42). Los eritrocitos se lavaron tres veces con solución salina fosfatos (PBS) a un pH de 7.2 fueron centrifugados a 480 xg por 15 min., en una centrifuga refrigerada, se tomó 0.1 ml de eritrocitos del paquete obtenido en el tercer lavado. A este se le adicionó 0.4 ml de una solución del polisacárido a una concentración de 1-mg/ml en SSF. Fueron incubados en baño maría a 37 °C por una hora con agitación constante; se resuspendieron en PBS y se lavaron tres veces. El paquete

obtenido en el último lavado se resuspendió en un volumen final de 5 ml. de PBS, quedando los eritrocitos sensibilizados en una concentración del 2 %.

3.2 Técnica de hemaglutinación pasiva en microplaca.

Las muestras de suero normal e hiperinmune de conejo fueron sometidas a 56 °C en baño maría por 30 min. para eliminar los factores del complemento. Las muestras fueron analizadas en diluciones dobles, desde 1:2 a 1:4096 en microplacas de poliestireno marca Microtiter de 96 pozos de fondo en U. Las diluciones se hicieron con PBS hasta un volumen final de 100 ul. Se adicionaron 25 ul de los eritrocitos sensibilizados por pozo incubándose a temperatura ambiente tres horas. El título hemaglutinante se determinó según la técnica de Williams y Chase (34).

Los controles que se utilizaron se muestran en la siguiente tabla:

CONTROLES	TITULO POR HEMAGLUTINACION
Eritrocitos humanos del grupo <u>O</u> , Rh positivo sensibilizados + SSF.	Negativo
Eritrocitos humanos del grupo <u>O</u> , Rh positivo sin sensibilizar + SSF.	Negativo
Eritrocitos sensibilizados + SNC	Negativo
Eritrocitos sin sensibilizar + SNC	Negativo
Eritrocitos sensibilizados + SCHíper	1:512
Eritrocitos sin sensibilizar + SCHíper	Negativo

SNC: SUERO NORMAL DE CONEJO.

SCHíper: SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO.

3.3 Búsqueda de anticuerpos hemaglutinantes en contra de Klebsiella pneumoniae en muestras de suero de cordón umbilical, suero materno y calostro.

Las muestras fueron analizadas con la técnica de hemaglutinación pasiva-

en microplaca, descrita en el punto anterior (3.2).

4.0 ESTANDARIZACION DEL METODO INMUNOENZIMATICO TIPO INDIRECTO (ELISA) PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA Klebsiella pneumoniae.

4.1 Recubrimiento de microplacas de poliestireno con diferentes preparaciones de Klebsiella pneumoniae.

Se utilizaron diferentes preparaciones antigénicas de este germen serotipo K-8: a) bacteria deshidratada con acetona, de la cual se resuspendieron 16 microgramos (μg) en un ml. de una solución amortiguadora de carbonatos a pH - de 9.6; b) bacteria sometida a calentamiento de 121 °C, a 15 libras de presión por 15 min. y c) polisacárido capsular disuelto en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6.

La preparación de bacterias sometida a calentamiento presentó una concentración de carbohidratos de 0.4 mg/ml y de proteínas de 0.050 mg/ml. Dichas - concentraciones se determinaron por el método de Antrona (36) y de Folin (35) respectivamente.

Se utilizaron microplacas de poliestireno de fondo plano (Nunc Denmark y - Corstar) de 96 pozos, en las cuales se colocaron 100 μl de cada una de las diferentes preparaciones por triplicado. Se incubaron toda la noche a 4°C; se lavaron tres veces con solución salina fosfatos-Tween 20 a pH de 7.2 (PBS-Tween) y se bloquearon los sitios libres con una solución de albúmina sérica bovina al 2 %, incubándose por dos horas. Se lavaron nuevamente con PBS-Tween, - adicionaron 100 μl de los sueros normal e hiperinmune de conejo y se incubaron por dos horas a 37°C. Se realizaron lavados y se adicionaron 100 μl de un conjugado anti-IgG de conejo unido a peroxidasa (Cappel) en una dilución de - 1:5000. incubándose dos horas a 37°C. Se lavó la microplaca y se adicionaron-

100 ul del sustrato orto - fenilen diamina (Sigma Chemical Company); se incubó en la obscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, - se detuvo la reacción con 20 ul de una solución de ácido sulfúrico al 2.5 N - en cada pozo. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector "Reader ELISA" Behring con un filtro de 490 nm.

4.2 Determinación de anticuerpos contra Klebsiella pneumoniae K-8 en suero de conejo.

La determinación se realizó de acuerdo al método de Salvatore y cols. (37).

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano, a las cuales se les adicionó 0.05 mg del polisacárido capsular de Klebsiella pneumoniae K-8 disuelto previamente en amortiguador de carbonatos a pH de 9.6, y se dejó incubando la microplaca a 4°C toda la noche. Las placas fueron lavadas - tres veces con PBS-Tween.

Los sueros normal e hiperinmune de conejo se diluyeron 1:10 con PBS y se les adicionó 20 ul de albúmina sérica bovina (ASB) se adicionaron 100 ul de - dicha dilución a cada pozo por quintuplicado; se incubaron dos horas a 37°C - se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween y se adicionaron 100 ul por pozo del conjugado anti - IgG de conejo, se incubo y lavó. Se adicionaron 100 - ul del sustrato orto-fenilen diamina, se incubó 30 min. en la obscuridad y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico al 2.5 N. Las lecturas se realizaron - en un lector "Reader ELISA" Behring a 490 nm.

4.3 Titulación del conjugado anti-IgG humana unido a peroxidasa (Cappel - Cooper Biochemical).

La titulación del conjugado se realizó de acuerdo al método descrito por Voller y cols. (27). Se hicieron diluciones dobles en amortiguador de carbona

tos 0.1 M a pH 9.6 de IgG humana de los laboratorios Cappel. Inicialmente se hizo una dilución con una concentración de 32 ug/ml, aumentando la dilución progresivamente hasta completar una dilución hasta ajustar una concentración de 0.35 ug/ml. De cada una de estas diluciones se tomaron 100 ul y se colocaron en placas de poliestireno (Nunc y Costar) de 96 pozos de fondo plano de la siguiente manera: en la primera hilera horizontal, en cada uno de los pozos se colocó la dilución cuya concentración correspondía a 32 ug/ml, en la segunda hilera la de 18 ug/ml y así sucesivamente hasta completar las diluciones. Se incubó toda la noche a 4°C, lavando posteriormente tres veces con PBS Tween. Se adicionaron 100 ul de ASB al 1 % a cada uno de los pozos y se incubó por dos horas a 37°C y nuevamente se lavó la microplaca. Por otra parte, se hicieron las diluciones dobles del conjugado anti-IgG humana unida a peroxidasa (Cappel) desde una dilución 1:50 hasta 1:1600, de cada una de éstas, se adicionaron 100 ul por pozo a la misma placa en hileras verticales y se dejó a 4°C toda la noche. Posteriormente se lavó tres veces con PBS-Tween, se añadieron 100 ul del sustrato orto-fenilén diamina en un amortiguador de ácido cítrico y fosfato dibásico de sodio con peróxido de hidrógeno, incubándose a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 min., deteniendo la reacción con 20 ul de ácido sulfúrico al 2.5 N. Las lecturas se efectuaron en un lector "Reader ELISA" Behring a 490 nm.

4.4 Determinación de anticuerpos de las clases IgG e IgA contra Klebsiella pneumoniae K-8 en muestras de suero de cordón umbilical, suero materno y calostro por el método de ELISA.

El procedimiento fué el mismo que se realizó para la determinación de anticuerpos en las muestras de suero de conejo.

Los conjugados utilizados fueron el anti-IgG humana unido a peroxidasa -- con título de 1:1000, el cual fue obtenido experimentalmente; y para el conjugado anti-IgA unido a peroxidasa (Sigma Chemical Company), en este caso la dilución empleada fué de acuerdo al fabricante.

RESULTADOS.

1.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES EN EL SUERO DE CONEJO - HIPERINMUNE.

El suero de conejo inmunizado presentó un título hemaglutinante de 1:512- mientras que el suero de conejo no inmunizado no presentó título hemaglutinan- te.

2.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES EN LAS DIFERENTES MUES-- TRAS HUMANAS RECOLECTADAS.

Los títulos recolectados para las muestras de suero de cordón umbilical - suero de madres en puerperio y calostro, se analizaron por el método de hema- glutinación pasiva. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA I

Determinación de anticuerpos hemaglutinantes contra Klebsiella pneumoniae en calostro y sangre periférica de mujeres sometidas a cesárea, y en el suero de cordón umbilical de los recién nacidos respectivos.

# MUESTRA	SM	SCU	CALOS.	# MUESTRA	SM	SCU	CALOS.
1.	1:64	Neg	Neg	26.	Neg	Neg	Neg
2.	1:64	Neg	Neg	27.	1:32	Neg	Neg
3.	Neg	Neg	Neg	28.	1:16	Neg	Neg
4.	1:2	Neg	Neg	29.	1:32	Neg	Neg
5.	Neg	Neg	Neg	30.	Neg	Neg	Neg
6.	1:2	Neg	Neg	31.	1:4	1:4	Neg
7.	Neg	Neg	Neg	32.	Neg	Neg	Neg
8.	1:2	Neg	Neg	33.	1:2	Neg	Neg
9.	Neg	Neg	Neg	34.	1:128	Neg	Neg
10.	1:4	Neg	Neg	35.	1:2	Neg	Neg
11.	Neg	Neg	Neg	36.	Neg	Neg	Neg
12.	Neg	Neg	Neg	37.	Neg	Neg	Neg
13.	Neg	Neg	Neg	38.	Neg	Neg	Neg
14.	Neg	Neg	Neg	39.	Neg	Neg	Neg
15.	Neg	Neg	Neg	40.	Neg	Neg	Neg
16.	Neg	Neg	Neg	41.	1:16	Neg	Neg
17.	Neg	Neg	Neg	42.	Neg	Neg	Neg
18.	Neg	Neg	1:2	43.	1:32	1:4	Neg
19.	Neg	Neg	1:8	44.	1:16	Neg	Neg
20.	1:32	1:4	Neg	45.	Neg	Neg	Neg
21.	1:64	Neg	Neg	46.	Neg	Neg	1:2
22.	Neg	Neg	Neg	47.	1:128	Neg	Neg
23.	Neg	Neg	1:2	48.	Neg	Neg	Neg
24.	1:64	Neg	Neg	49.	Neg	Neg	1:2
25.	1:128	Neg	Neg	50.	Neg	Neg	Neg

Neg: NEGATIVO.

3. ESTANDARIZACION DEL METODO INMUNOENZIMATICO (ELISA).

3.1 El primer paso fué el de evaluar diferentes antígenos de Klebsiella pneumoniae K-8 para la mejor inmovilización en microplacas de poliestireno. Los resultados se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Recubrimiento de placas con diferentes antígenos de Klebsiella pneumoniae K-8 para la estandarización del método de ELISA.

En esta tabla se muestran las absorbancias obtenidas para los diferentes antígenos probados, así como su desviación estándar.

TIPO DE ANTIGENO	ABSORBANCIA PROMEDIO
Bacteria deshidratada (16 ug/ml)	0.064 ± 0.046
Bacteria sometida a calor	0.063 ± 0.049
Polisacárido capsular.(16 ug/ml)	0.125 ± 0.039

La bacteria sometida a calentamiento presentó una concentración de proteínas de 0.050 mg/ml, y de carbohidratos de 0.4 mg/ml.

De acuerdo a los resultados obtenidos, fué utilizado el polisacárido capsular, ya que presentó una mayor absorbancia y una menor desviación estándar.

3.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL POLISACARIDO CAPSULAR --
PARA EL RECUBRIMIENTO DE LAS MICROPLACAS DE POLIESTIRENO.

Fueron probadas diferentes concentraciones del polisacárido capsular de -
Klebsiella pneumoniae K-8, para lo cual se utilizaron los sueros normal e hi-
perimmune de conejo y como control albúmina sérica bovina (ASB). Los promedios
de seis lecturas y sus respectivas desviaciones estándar se muestran en la --
Tabla III.

TABLA III

Determinación de la concentración óptima del polisacárido de Klebsiella -
pneumoniae, inmovilizado en microplacas de poliestireno.

HUESTRA	100 ug/ml	50 ug/ml	25 ug/ml
SCHiper	0.509 ± 0.261	0.505 ± 0.113	0.532 ± 0.350
SNC	0.117 ± 0.032	0.134 ± 0.019	0.122 ± 0.050
ASB	0.169 ± 0.032	0.185 ± 0.028	0.218 ± 0.051

Tomando en cuenta los resultados que se muestran en la Tabla III la con-
centración del polisacárido capsular K. pneumoniae que se decidió utilizar -
fué la de 50 ug/ml, por presentar mayor absorbancia y menor desviación estándar.

3.3 TITULACION DE CONJUGADO ANTI-INMUNOGLOBULINAS HUMANAS UNIDAS A PEROXIDASA.

Se utilizó la dilución 1:1000 del conjugado anti-IgG unido a peroxidasa - que fué la que presentó una absorbancia de 1.0.

En cuanto al conjugado anti-IgA, la dilución empleada 1:1000 fué la recomendada por el fabricante.

3.4 DETERMINACION DE LA REPRODUCTIBILIDAD DEL METODO INMUNOENZIMATICO --- (ELISA) A DIFERENTES DIAS.

En la Tabla IV se muestran los promedios de tres muestras de suero de --- personas adultas normales probadas por cuadruplicado, en tres diferentes días. Además se muestran los resultados de dos muestras de un control positivo para Klebsiella pneumoniae ensayado el mismo número de veces.

TABLA IV

MUESTRA	\bar{X} DIA 1	\bar{X} DIA 2	\bar{X} DIA 3
C1(+)	0.496	0.525	0.532
C2(+)	0.392	0.371	0.356
10003	0.297	0.330	0.243
10159	0.265	0.273	0.303
10108	0.185	0.222	0.259

4.0 COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS METODOS INMUNOENZIMATICO Y HEMAGLUTINACION PASIVA PARA SUERO DE CORDON UMBILICAL, SUERO MATERNO Y CALOSTRO.

En las tablas V, VI, VII se muestran los resultados obtenidos por duplicado en cada una de las diferentes pruebas.

TABLA V

Título de anticuerpos por hemaglutinación pasiva y el método inmunoenzimático en muestras de suero de cordón umbilical; probadas por duplicado

# MUESTRA	TITULO HEMA	\bar{X} .ABS. IgG ELISA	# MUESTRA	TITULO HEMA	\bar{X} ABS. IgG ELISA
1.	Neg	0.070	26.	Neg	0.055
2.	Neg	0.100	27.	Neg	0.082
3.	Neg	0.046	28.	Neg	0.208
4.	Neg	0.126	29.	Neg	0.084
5.	Neg	0.077	30.	Neg	0.061
6.	Neg	0.043	31.	1:4	0.055
7.	Neg	0.100	32.	Neg	0.108
8.	Neg	0.090	33.	Neg	0.036
9.	Neg	0.101	34.	Neg	0.035
10.	Neg	0.095	35.	Neg	0.105
11.	Neg	0.081	36.	Neg	0.228
12.	Neg	0.072	37.	Neg	0.050
13.	Neg	0.109	38.	Neg	0.117
14.	Neg	0.060	39.	Neg	0.030
15.	Neg	0.084	40.	Neg	0.043
16.	Neg	0.072	41.	Neg	0.065
17.	Neg	0.122	42.	Neg	0.066
18.	Neg	0.053	43.	1:4	0.060
19.	Neg	0.138	44.	Neg	0.089
20.	1:4	0.091	45.	Neg	0.092
21.	Neg	0.090	46.	Neg	0.100
22.	Neg	0.053	47.	Neg	0.092
23.	Neg	0.150	48.	Neg	0.032
24.	Neg	0.071	49.	Neg	0.062
25.	Neg	0.164	50.	Neg	0.100

..TABLA VI.

Título de anticuerpos por hemaglutinación y por el método de ELISA en muestras de suero materno, probadas por duplicado.

# MUESTRA	TITULO HEMA	\bar{x} ABS. IgG ELISA	# MUESTRA	TITULO HEMA	\bar{x} ABS. IgG ELISA
1.	1:64	0.367	26.	Neg	0.157
2.	1:64	0.314	27.	1:32	0.167
3.	Neg	0.101	28.	1:16	0.126
4.	1:2	0.200	29.	1:32	0.539
5.	Neg	0.129	30.	Neg	0.310
6.	1:2	0.251	31.	1:2	0.318
7.	Neg	0.268	32.	Neg	0.509
8.	1:2	0.280	33.	1:2	0.287
9.	Neg	0.482	34.	1:128	0.420
10.	1:4	0.371	35.	1:2	0.146
11.	Neg	0.345	36.	Neg	0.200
12.	Neg	0.445	37.	Neg	0.396
13.	Neg	0.310	38.	Neg	0.044
14.	Neg	0.341	39.	Neg	0.343
15.	Neg	0.191	40.	Neg	0.300
16.	Neg	0.253	41.	1:16	0.082
17.	Neg	0.276	42.	Neg	0.147
18.	Neg	0.144	43.	1:32	0.668
19.	Neg	0.195	44.	1:16	0.221
20.	1:32	0.409	45.	Neg	0.345
21.	1:64	0.385	46.	Neg	0.060
22.	1:128	0.490	47.	1:128	0.230
23.	Neg	0.248	48.	Neg	0.075
24.	1:64	0.461	49.	Neg	0.160
25.	1:128	0.130	50.	Neg	0.105

Neg: NEGATIVO
HEMA: HEMAGLUTINANTE.

TABLA VII

Título de anticuerpos por hemaglutinación pasiva y por ELISA en muestras de calostro, por duplicado.

# MUESTRA	TITULO HEMA	\bar{X} ABS. IgA ELISA	# MUESTRA	TITULO HEMA	\bar{X} ABS. IgA ELISA
1.	Neg	0.130	26.	Neg	0.067
2.	Neg	0.080	27.	Neg	0.128
3.	Neg	0.040	28.	Neg	0.051
4.	Neg	0.100	29.	Neg	0.162
5.	Neg	0.109	30.	Neg	0.133
6.	Neg	0.118	31.	Neg	0.050
7.	Neg	0.095	32.	Neg	0.200
8.	Neg	0.070	33.	1:2	0.134
9.	Neg	0.033	34.	Neg	0.155
10.	Neg	0.066	35.	Neg	0.041
11.	Neg	0.105	36.	Neg	0.056
12.	Neg	0.100	37.	Neg	0.131
13.	Neg	0.109	38.	Neg	0.069
14.	Neg	0.143	39.	Neg	0.037
15.	Neg	0.104	40.	Neg	0.088
16.	Neg	0.055	41.	Neg	0.078
17.	Neg	0.060	42.	Neg	0.038
18.	1:2	0.080	43.	Neg	0.120
19.	1:8	0.172	44.	Neg	0.040
20.	Neg	0.097	45.	Neg	0.107
21.	Neg	0.100	46.	1:2	0.020
22.	Neg	0.070	47.	Neg	0.124
23.	1:2	0.115	48.	Neg	0.100
24.	Neg	0.194	49.	1:2	0.070
25.	Neg	0.105	50.	Neg	0.069

Neg: NEGATIVO

HEMA: HEMAGLUTINANTE

En la Tabla VIII se muestran las lecturas efectuadas por duplicado en muestras de suero materno, suero de cordón umbilical y calostro; así como el valor medio, la desviación estándar y la suma de estos últimos para el establecimiento de la línea de corte.

TABLA VIII

Determinación de la absorbancia base o línea de corte, para las diferentes muestras humanas.

SCU IgG	SM IgG	CALDSTRO IgA
0.057	0.160	0.080
0.061	0.205	0.040
0.062	0.228	0.118
0.061	0.322	0.070
0.081	0.293	0.066
0.073	0.279	0.143
0.101	0.303	0.172
0.064	0.105	0.100
0.102	0.118	0.105
0.077	0.132	0.067
0.181	0.286	0.069
0.174	0.282	0.050
0.124	0.337	0.154
0.090	0.376	0.069
0.083	0.301	0.088
0.107	0.272	0.078
0.094	0.379	0.040
0.148	0.374	0.070
0.046		
$\bar{X} = 0.094$	$\bar{X} = 0.264$	$\bar{X} = 0.087$
DS = 0.038	DS = 0.087	DS = 0.037
$\Sigma = 0.132$	$\Sigma = 0.351$	$\Sigma = 0.124$

Σ : SUMATORIA ENTRE LA MEDIA Y LA DESVIACION ESTANDAR.

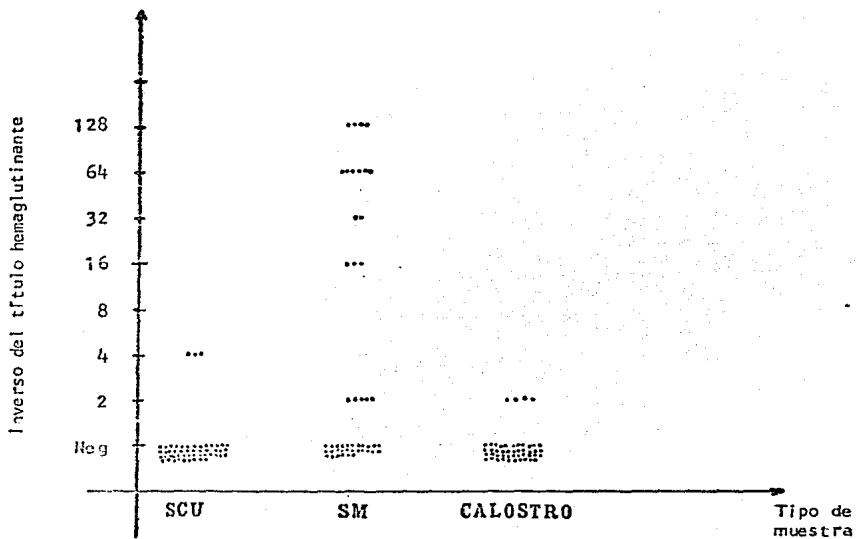
\bar{X} : MEDIA

DS : DESVIACION ESTANDAR

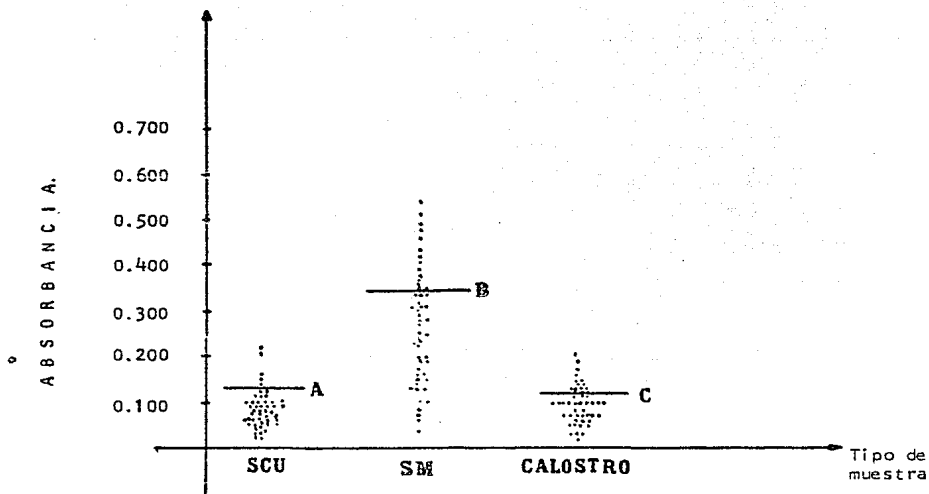
SM : SUERO MATERNO

SCU : SUERO DE CORDON UMBILICAL

Gráfica # 1: Representación gráfica de los datos ----
obtenidos por el método de Hemaglutinación
pasiva, mostrados en las tablas V, VI, VII.



Gráfica # 2: Representación gráfica de los datos obtenidos por el método de ELISA, mostrados en las tablas V, VI, VII.



Línea de corte { A: 0.132
 { B: 0.351
 { C: 0.124

La absorbancia a utilizar como línea de corte es: 0.132 para el suero de cordón umbilical, 0.351 para el suero materno y 0.124 para calostro.

En la Tabla IX se muestran los porcentajes de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras humanas recolectadas con respecto a un control positivo, el cual pertenece a un niño con hemocultivo positivo para Klebsiella pneumoniae, y cuya absorbancia fué de 0.557 considerandos este valor como 100%.

TABLA IX

Porcentajes de absorbancia en ELISA, en muestras de suero de cordón umbilical, suero materno y calostro, en relación a un suero control positivo.

# MUESTRA	% SH	% SCU	% CALOS	# MUESTRA	% SH	% SCU	% CALOS
1.	65.58	12.56	23.33	26.	28.19	9.87	12.03
2.	56.37	17.95	14.36	27.	29.98	14.72	5.33
3.	18.13	8.26	7.18	28.	22.62	37.34	9.16
4.	35.90	22.62	17.95	29.	96.77	16.03	29.08
5.	23.16	13.82	19.57	30.	55.66	10.95	23.38
6.	45.06	7.72	21.18	31.	57.09	9.87	8.96
7.	48.11	17.95	17.06	32.	91.38	19.38	35.90
8.	50.26	16.15	12.56	33.	51.53	6.46	24.06
9.	86.54	18.13	5.92	34.	75.40	6.28	27.82
10.	66.60	17.05	11.85	35.	26.21	18.85	7.30
11.	62.11	14.54	18.85	36.	35.90	37.34	10.05
12.	74.50	12.92	17.95	37.	71.55	8.97	23.52
13.	23.80	12.56	19.57	38.	72.90	21.00	12.83
14.	61.22	10.77	25.67	39.	61.56	5.30	6.64
15.	34.29	15.08	18.67	40.	53.86	7.72	15.80
16.	45.42	12.93	9.87	41.	14.72	11.66	14.00
17.	49.55	21.90	10.77	42.	26.39	11.84	6.32
18.	25.85	9.51	14.36	43.	119.92	10.77	21.54
19.	35.00	24.77	30.77	44.	39.60	15.97	7.18
20.	73.43	16.33	17.41	45.	97.84	16.51	19.21
21.	69.12	16.15	17.95	46.	10.77	17.95	3.59
22.	89.59	9.51	12.56	47.	41.29	16.51	22.26
23.	44.52	26.92	20.65	48.	13.17	5.75	17.95
24.	82.76	12.74	34.82	49.	28.72	11.13	12.57
25.	23.34	29.44	18.85	50.	18.85	17.95	12.38

Para determinar la correlación entre la absorbancia, tanto de IgG como de IgA entre las diferentes muestras; se tomaron aquellas muestras que presentaron una densidad óptica igual o mayor a 0.300 en las muestras de suero materno así como sus respectivos sueros de cordón umbilical y calostro, calculando posteriormente el coeficiente r de Pearson, también se determinó la diferencia estadística.

En las Tablas X y XI se muestran los datos obtenidos por duplicado para la determinación de IgG e IgA en las diferentes muestras.

TABLA X

En esta tabla se muestran los datos de absorbancia, así como los datos de correlación y diferencia estadística para IgG de las diferentes muestras.

# MUESTRA	SM	CALOSTRO	SCU
1.	0.365	0.021	0.070
2.	0.314	0.014	0.100
9.	0.482	0.019	0.101
19.	0.195	0.042	0.138
24.	0.461	0.015	0.071
29.	0.539	0.026	0.084
30.	0.310	-----	0.061
31.	0.318	-----	0.055
32.	0.509	0.024	0.108
34.	0.420	0.017	0.035
37.	0.396	0.022	0.050
39.	0.343	0.018	0.030
40.	0.300	-----	0.043
43.	0.668	-----	0.060
45.	0.345	0.021	0.092

Correlación entre:

Calostro y suero materno: $r = -0.408$ $t = 2.90$ $p < 0.01$

Suero de cordón umbilical y calostro: $r = 0.596$ $t = -2.04$ $p < 0.05$

Suero materno y suero de cordón umbilical: $r = -0.104$ $t = 2.87$ $p < 0.01$

TABLA XI:

Correlación y diferencia estadística para la determinación de IGA en las diferentes muestras humanas.

# MUESTRA	SH	SCU	CALOSTRO
1.	—	0.000	0.130
2.	—	0.000	0.080
9.	0.174	0.000	0.033
19.	0.117	0.007	0.172
29.	0.111	0.011	0.162
30.	0.051	0.000	0.133
31.	0.010	0.000	0.050
32.	0.081	—	0.200
34.	0.088	0.000	0.155
39.	0.017	0.003	0.037
40.	0.055	0.000	0.088
43.	0.014	0.000	0.120
45.	0.030	—	0.107

Correlación entre:

Suero materno y calostro: $r = 0.198$ $t = -0.958$ $p < 0.1$

Suero de cordón y calostro: $r = 0.334$ $t = 2.19$ $p < 0.05$

Suero materno y suero de cordón: $r = 0.467$ $t = -2.82$ $p < 0.01$

En la Tabla XII se muestran los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos de la clase IgG por el método de ELISA en muestras de suero de pacientes hospitalizados en el servicio de infectología del "Hospital Infantil de México", los cuales presentaron hemocultivo positivo para diferentes agentes bacterianos.

TABLA XII

Determinación de anticuerpos por el método de ELISA en sueros de pacientes hospitalizados en el servicio de infectología del "Hospital Infantil de México".

AGENTE AISLADO EN HEMOCULTIVO	ABS. IgG ELISA
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.224
<i>Salmonella</i> sp.	0.073
<i>Salmonella</i> sp.	0.102
<i>Salmonella</i> sp.	0.134
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.268
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.445

DISCUSION.

El recién nacido es considerado como un hospedero inmunocomprometido (16, 17), con una mayor susceptibilidad a las infecciones.

Entre los agentes asociados con infecciones en el recién nacido en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales se encuentra Klebsiella pneumoniae. Este microorganismo presenta diversos mecanismos de patogenicidad, incluyendo - la presencia de cápsula la cual le sirve como mecanismo de evasión a la fagocitosis (9). Para este germen al igual que otros microorganismos encapsulados es necesaria la presencia de anticuerpos específicos, los cuales junto con - el complemento puedan promover la opsonización bacteriana y facilitar la fagocitosis por los polimorfonucleares (40).

En estudios efectuados recientemente en el Centro Médico Nacional se demostró la presencia de anticuerpos de la clase IgA contra Entamoeba histolytica y Salmonella typhi (25,27) en muestras de calostro y leche materna provenientes de mujeres mexicanas.

Tomando como base lo anteriormente mencionado fué planteado el proyecto, - para la determinación de la presencia de anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular de Klebsiella pneumoniae K-8.

Para efectuar la determinación de anticuerpos fué necesaria la estandarización del método de ELISA.

De acuerdo a los datos mostrados en las Tablas II y III, la partícula antigénica a utilizar para el recubrimiento de la microplaca de poliestireno - fué el polisacárido capsular de Klebsiella pneumoniae K-8, a una concentración de 50 ug/ml; el criterio que se siguió para definir estos parámetros fué en base a la mayor densidad óptica y menor desviación estándar.

En lo referente a la reproductibilidad del método, fueron efectuadas las determinaciones de anticuerpos por un período de tres días a cinco diferentes muestras, obteniéndose las lecturas de absorbancia promedio representadas en la Tabla IV; mediante un análisis de varianza no paramétrica efectuada por el método de Friedman (45), se encontró que existe reproductibilidad de la técnica con una $p < 0.05$.

La determinación de anticuerpos se llevó a cabo por la técnica de hemaglutinación pasiva, así como por el método de ELISA. Al hacer una comparación de los resultados obtenidos en ambos métodos se encontró que no existía correlación entre ellos.

Esto puede ser explicado de la siguiente forma: el método de hemaglutinación pasiva llega a detectar de 8 a 10 ug de proteína, además, con esta técnica no es posible detectar cual o cuales clases de anticuerpos son los que se encuentran mayormente como respuesta a un estímulo antigénico. En el caso del método de ELISA es posible determinar hasta nanogramos de proteína, así como cada una de las clases de anticuerpos específicos dirigidos contra un mismo antígeno.

La técnica de hemaglutinación pasiva sólo sirvió como marco de referencia lo adecuado en este caso para poder realizar una comparación más confiable entre métodos es el de utilizar técnicas con sensibilidad y especificidad semejante como podría ser la Inmunofluorescencia o el Radioinmunoensayo.

Uno de los problemas que surge en el método de ELISA es el de determinar la positividad de las muestras; para lo cual fué necesario determinar anticuerpos por esta técnica tanto de la clase IgA como de la IgG, en otro grupo de muestras diferentes al de nuestro estudio, dichos resultados fueron tomados para obtener una línea base o de corte, la cual se estableció sumando el promedio de las lecturas de absorbancia y su respectiva desviación estándar; el-

criterio para determinar la positividad o negatividad de cada una de las muestras en estudio es el de, los valores de absorbancia menores o iguales a la línea de corte son negativos y los valores mayores a dicha línea de corte son positivos.

En el caso de los sueros de cordón umbilical la LC = 0.132 se observa que sólo el 10 % de las muestras fueron positivas; mientras que en los sueros maternos se encontro LC = 0.357 obteniéndose el 26 % de positividad y finalmente para el calostro la LC fué de 0.124 presentándose en un 20 % de las muestras.

Estos resultados nos indican que algunas madres poseen anticuerpos circulantes contra este germen y que además los puede transferir al neonato a través del calostro como IgA, pero la transferencia de IgG es menor por vía transplacentaria. Además se sabe que en el calostro existen anticuerpos específicos y que la presencia en la glándula mamaria se puede deber a: transporte desde el suero; por la migración de linfocitos sensibilizados asociados al intestino, a la glándula mamaria (43) teniendo un control hormonal; o bien por la estimulación local de linfocitos residentes en la glándula mamaria (44).

Otro de los criterios para definir la positividad de las muestras fué el establecido mediante el porcentaje de absorbancia de las diferentes muestras con respecto a un suero control positivo el cual se obtuvo de un niño de 4 años de edad cuyo nemocultivo fué positivo para Klebsiella pneumoniae; al sexto día de la infección le fueron determinados anticuerpos de la clase IgG - contra este M.O. por el método de ELISA, obteniéndose una absorbancia promedio de 0.557 considerándose este como el 100 %, debido a que la infección se encuentra presente en este momento y se supone con cierta reserva que el sistema inmune se encuentra estimulado por dicha razón, por lo cual se esperaría una mayor cantidad de anticuerpos.

Por otro lado para poder tomar este criterio es necesario el tener más de un suero proveniente de pacientes con infección producida por este germen a las cuales se les deberá determinar anticuerpos tanto de la clase IgG como IgM, ya que esta última es la estimulada en mayor proporción, cuando el antígeno ^{es} t₁mo independiente, como es el caso de los azúcares presentes en la cápsula de Klebsiella pneumoniae (40).

Se puede observar en la Tabla IX que las muestras de suero materno presentan mayor porcentaje de absorbancia que el suero de cordón umbilical y el calostro, de dichas muestras solamente el 11 % tienen mayor absorbancia tomando como referencia 0.396. De este 11 % de suero materno el 54.5 % presentó a su vez mayor porcentaje en las respectivas muestras de calostro. Hay que tomar en cuenta que las muestras del estudio corresponden a pacientes aparentemente sanos, mientras que el control positivo fué donado por un paciente con infección reciente.

Para determinar si existe alguna relación entre la presencia de anticuerpos maternos específicos circulantes y los encontrados en el suero de cordón y calostro fué necesario determinar ambos tipos de anticuerpos IgG e IgA en dichas muestras cuya absorbancia fuera mayor a 0.300 y los respectivos sueros de cordón umbilical y calostro, los resultados son mostrados en las Tablas X y XI a los datos obtenidos se les determinó el coeficiente de correlación r de Pearson y además la diferencia estadística, aplicando el parámetro t de Student (41). No se encontró correlación, sin embargo existe una diferencia estadísticamente significativa. Esto nos indica que no existe una relación entre la cantidad de anticuerpos presentes en circulación materna y los encontrados en calostro.

Con el objetivo de determinar si el método funciona para el diagnóstico -

de infecciones producidas por K. pneumoniae se efectuó la determinación de IgG por el método de ELISA en muestras obtenidas de sueros de niños hospitalizados, los cuales presentaron hemocultivo positivo a diferentes gérmenes. Los resultados se muestran en la Tabla XII; en dicha tabla se puede observar que una de las muestras presenta mayor absorbancia, dicha muestra fue de un paciente con infección por Klebsiella pneumoniae

Estos resultados no son contundentes para definir si el método puede ser utilizado para establecer el diagnóstico. Es necesario efectuar otras pruebas para la aceptación o rechazo del método como es el de determinar especificidad, además definir un criterio para evaluar la positividad o negatividad de las muestras y realizar una comparación entre técnicas que posean una sensibilidad y especificidad semejante.

Se sugiere realizar la determinación de anticuerpos con un mayor número de sueros provenientes de pacientes infectados con diferentes agentes bacterianos, sobre todo por infecciones producidas por Escherichia coli ya que es uno de los gérmenes bacterianos que presentan reacción cruzada con Klebsiella (9). Se deberá efectuar la determinación de anticuerpos de la clase IgM sérica debido a que la cápsula se encuentra constituida por antígenos típicos independientes los cuales producen estimulación para la producción de IgM (40).

CONCLUSIONES.

La determinación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Klebsiella pneumoniae fué realizado tanto por el método de hemaglutinación pasiva así como por el método de ELISA, en dichas determinaciones no se encontró correlación.

Las muestras de suero de cordón umbilical, suero materno y calostro presentaron el 10 %, 26 % y el 20 % respectivamente en la determinación de anticuerpos por el método de ELISA, de acuerdo a estos resultados, se observa que las madre presentan anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular de Klebsiella y además se sugiere que pueden ser transferidos por medio del calostro en forma de IgA y en una menor proporción IgG por suero de cordón umbilical.

En base a estas observaciones se sugiere que aquellos neonatos que no son alimentados con calostro y leche materna pueden tener mayor susceptibilidad a las infecciones producidas por Klebsiella.

Como punto final es importante tener en cuenta que "in vivo" la respuesta inmunológica no solo depende de la presencia de anticuerpos, sino además existen otros mecanismos, tanto celulares como humorales, los cuales se interrelacionan para combatir a los agentes patógenos, y que deben ser evaluados también.

APENDICE.

SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA pH = 7.0

Cloruro de sodio	3.50 g
Agua destilada	1000.00 ml

SOLUCION SALINA FOSFATOS pH = 7.2

Cloruro de sodio	8.47 g
Fosfato dibásico de potasio	3.13 g
Fosfato monobásico de potasio	1.36 g
Agua destilada	1000.00 ml

SOLUCION SALINA FOSFATOS-TWEEN pH = 7.2

Solución salina fosfatos	1000.00 ml
Tween 20	0.50 ml

AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO pH = 9.6

Bicarbonato de sodio	1.59 g
Carbonato de sodio	2.93 g
Agua destilada	1000.00 ml

AMORTIGUADOR DE SUSTRATO pH = 5.0

Acido cítrico	0.1 M	24.3 ml
Fosfato dibásico de sodio	0.2 M	25.7 ml
Agua oxigenada al 30 %	40.0 ul por cada cien ml de -	

amortiguador de sustrato.

SUSTRATO

Orto-fenil en diamina	40.0 mg por cien ml de amor-
tiguador.	

MEDIO DE WORDEL - FERGUSON.

Cloruro de sodio	2.0 g
Sulfato de potasio	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.3 g
Sacarosa	20.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ambrosius K., M. Salazar. 1983. Aspectos morfológicos de las infecciones y de la septicemia en recién nacidos. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 40:--- (12);691-95
- 2.- Vargas A., E. Escobedo., A. Mercado. 1985. Epidemiología de las bacterias en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 42:(5):306-10
- 3.- Braude I. A., Charlese y J. Fierer. 1984. Microbiología Clínica. Panamericana, Buenos Aires. pp. 3-12, 278-280.
- 4.- Crys S. J., E. Furer, and R. Germanier. 1984. Protection against fatal Klebsiella pneumoniae burn wound sepsis by passive transfer of polysaccharide. Infect. Immun. 45:(1):139-44
- 5.- Buchanan R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore. pp. 322-28.
- 6.- Ambrosius K., M. Salazar. 1986. Las enfermedades de etiología bacteriana observadas en necropsias. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 42:(1):57-62
- 7.- Cruickank R., J. P. Duguid., B. P. Marmion and R. M. Swain. 1980. Medical Microbiology. The practice of medical microbiology. New York. pp. 435-59
- 8.- Heidelberg M., J. B. G. Kwapinski. 1973. Faam Immunochemistry of bacterial polysaccharides. University Park Press. pp. 56-60.
- 9.- Methods in Microbiology. 1984. Serotyping of Klebsiella. Ed. T. Bergan Academic Press. 4:(14):143-64.
- 10.- Suenning N. W., A. N. Bekassy., P. Christensen and C. Kamme. 1984. Nosocomial Klebsiella pneumoniae infection. Clinical and Hygienic Measures in neonatal intensive care unit. Scand. J. Infect. Dis. 16:29-35.

- 11.- Hill H. R., C. E. Hunt and J. M. Matsen. 1974. Nosocomial colonization with *Klebsiella*, type 26 in neonatal intensive care unit associated with an outbreak of sepsis meningitis and necrotizing enterocolitis. The Journal of Pediatrics. 85:(3):415-19.
- 12.- Hable K. A., J. M. Matsen., D. J. Wheeler., C.E. Hunt and P. G. Quie. 1972. *Klebsiella* type 33 septicemia in an infant intensive care unit. The Journal of Pediatrics. 80:(6):920-24.
- 13.- Hisuta K., M. Ohta., M. Mori., T. Masegawa., I. Nakashima and N. Kato. 1983. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group; relationship to their capsular (K) types. Infect. and Immun. 40:(1):56-61
- 14.- Bauerfeind A., C. P. Muller and R. Schneider. 1981. Bacteriocins as - tool in analysis of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections. Journal of Clinical Microbiology. 14:(1):15-19.
- 15.- Casewell W. M., and I. Phillips M. A. 1981. Aspects of the Plasmid-Mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. The American Journal of Medicine. 70:459-62.
- 16.- Felgin y Cherry. 1983. Tratado de enfermedades infecciosas pediatricas . Interamericana, España. 1:845-55.
- 17.- Avery G. B. 1981. Neonatología, Fisiopatología y manejo del Recién -- Nacido. 2^a Edición. Inter-Médica Buenos Aires, Argentina. pp. 687-707.
- 18.- Shashikala S., M. Scand., J. Prakash. 1984. Anti-infective properties of breast milk. Indian. J. Pediat. 51:451-57.
- 19.- Ahlstedt S., B. Carlsson., L. A. Hanson and R. M. Goldblus. 1975. Anti-- body production by human colostrum cell. Scand. J. Immunol. 4:535-39.
- 20.- Ogra S. S. and P. L. Ogra. 1978. Immunologic aspects of human colostrum and milk. The Journal of Pediatrics. 92:(4):546-49.

- 21.- Ogra P. L., M. Fishaut y C. Theodore. 1984. Inmunología de la leche - materna e interacciones madre-hijo. Infectología. 4:(11):281-85.
- 22.- Kumate J. y G. Gutiérrez. 1984. Manual de infectología. Décima edición Ed. Francisco Mendez Cervantes Mex. D. F. pp.434-39.
- 23.- Voller A., D. E. Bidwell and A. Bartdett. 1976. Enzyme immunoassay in diagnostic medicina. Theoretical and Practica. 53:55-64.
- 24.- Yolken R. H. 1982. Immunoassay for the detection of infections anti-- gensin body fluids current limitations and future prospects. Reviews of Infec-- tion Diseases. 4:(1):35-66.
- 25.- Acosta G., V. Cote., A. Isibasi y J. Kumate. 1985. Anticuerpos anti-- Entamoeba histolytica de clase IgA en calostro de mujeres mexicanas. Revista de Inmunología. 4:(1):24-27
- 26.- Nakamura R. M., W. R. Dito., E. S. Tucker. 1978. Immunoassay in the - clinical laboratory. Alan R.- Liss, inc. New York. pp.81-147.
- 27.- Voller A., A. Bartlett and D. E. Bidwell. 1976. Enzyme immunoassay - for parasitic diseases. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 70:(2):98-105.
- 28.- Yolken R. H., H. Whakim., T. Clem. 1977. Enzyme-linked immunosorbent-- assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastro-- enteritis. Lancet. 6:263-66.
- 29.- Oellerich M. 1980. Enzyme immunoassay in clinical chemistry present - status an trends. J. Clin.Chem. Clin. Biochem. 18:197-208.
- 30.- Iglesias S. L., S. Torres., A. Isibasi y G. Acosta. 1985. Análisis -- inmunoenzimático. Rev. Mex. Patol. Clin. 32:(2):53-58.
- 31.- Wisdom G. B. 1976. Enzyme Immunoassay. Clin. Chem. 22:(8):243-55.

32.- Giono S. y V. R. Dowell. 1984. Curso de actualización. Papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de infecciones oportunistas e intrahospitalarias. Manual de laboratorio. Editado por la UNAM, México D. F. pp. 60-65.

33.- Green J. H., Nan E. P., R. C. Bolin and W. K. Harelli. 1970. Use of acetone-dried vaccines for preparing capsular antisera against the *Klebsiella* group and the lyophilization of *Klebsiella* cultures. Appl. Microbiol. 20:416-20.

34.- Williams A. C. and Chase M. W. 1977. Methods in immunology and immunochemistry. N. Y. Academic Press. 4:26-32

35.- Kabat Elven A., M. Mayer Manford. 1981. Inmunoquímica experimental. - Segunda edición. La Prensa Medica Mexicana, México. pp. 526-33.

36.- Dreywood R. 1976. Reactions for total hexoses. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 18:4999.

37.- Salvatore N., T. Pizzella., M. Russo and B. Galanti. 1984. Serodiagnosis of typhoid fever by mination of anti-Salmonella typhi lipopolisaccharide antibodies. Journal of Clinical Microbiol. 20:(4):718-21.

38.- Voller A., D. E. Bidwell and Bartlett. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dintech Laboratories, Inc. pp. 23-33.

39.- Aguirre Z. M., Acosta G. 1985. Determinación de anticuerpos clase IgA contra LPS de Salmonella typhi en calostro y suero de madres en puerperio por análisis inmunoenzimático. Tesis. FES-C UNAM.

40.- Stites D.P., H. Hugh Fundemberg., J. D. Stobo., J. V. Well. 1985. Inmunología básica y clínica. Ed. Manual Moderno, Mex. D. F. pp 22-31, 201-225, 607-54.

41.- Downie N. M., R. W. Heath. 1973. Métodos Estadísticos Aplicados. Ed. Harla, México. pp. 193-203, 328.

42.- Mesta A. M. 1980. Klebsiella pneumoniae como agente patógeno primario. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Microbiología). Instituto Politécnico Nacional.

43.- Weis P., Roux h.E., H. William. 1978. Hormonal induction of the secretory immune system in mamary gland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:2928.

44.- Cote V.E. 1984. Determinación de anticuerpos específicos anti-amibade la clase IgA en muestras de calostro y suero humano. Tesis. FES-C UNAM.

45.- Siegel S. 1985. Estadística no Paramétrica. Ed. Trillas, México. pp.- 195-203, 314-315.