



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"**

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS CLASE 1_gA CONTRA
LPS DE Salmonella typhi EN CALOSTRO Y SUERO DE
MADRES EN PUERPERIO POR ANALISIS
INMUNOENZIMATICO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
MARTHA PATRICIA AGUIRRE ZARCO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	GENERALIDADES.....	8
III.	MATERIAL Y METODOS	17
IV.	RESULTADOS.....	23
V.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	36
VI.	CONCLUSIONES.....	38
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	40

ABREVIAÇÕES.

IgM	IgM secretoria
CC	Componente Secretor
LPC	Lipopolisacárido
Tiv	Tivelosa
Man	Manosa
Ram	Ramosa
Glc	Glucosa
Gal	Galactosa
GlcNac	N-Acetilglucosamina
EtN	ETanolamina
Hep	L-glicero-D-manoheptosa
KDO	2-ceto-3-Deoxioctonato
BSA	Albumina Sérica Bovina
ul	microlitro
ml	mililitro
ug	micrograma
rpm	revoluções por minuto
M	Molar
N	Normal
FBS .	Amortiguador Salino-Fosfatos
FBS-Tween	Amortiguador Salino-Fosfatos-Tween.

I. INTRODUCCION.

Diferentes grupos de investigación han demostrado la presencia de inmunoglobulinas IgA en secreciones bronquiales, fluidos intestinales, calostro, - leche y saliva (Hanson y cols., 1979).

La caracterización de la IgA secretoria (IgAs), inmunoglobulina predominante en la mayoría de las secreciones humanas, ha creado un campo de interés en la inmunidad humana local, ya que, los conocimientos sobre la IgAs, han definido a ésta, como, una entidad diferente y separada de la inmunidad sistémica. La transferencia selectiva de IgAs del tejido epitelial hacia las secreciones ha sido tomado como punto de partida para explicar y definir la inmunidad local (Brandtzaeg y Fjellangre, 1970).

Estudios realizados por Tomasi y cols., en 1965, encontraron que la mayor parte de la IgA sérica (Fig. No. 1a), difería de la IgA de las glándulas parótidas, ya que, ésta presentaba un coeficiente de sedimentación más alto, 11S, y poseía un determinante antigénico adicional. Su peso molecular fué estimado en 390 000 por Newcomb y cols., en 1968. Posteriormente, Tomasi, demostró que la IgA proveniente de saliva y de calostro humano eran similares (Tomasi y cols., 1965).

Por otra parte, South indicó que el determinante antigénico específico de la IgAs humana podría ser atribuido a un componente proteico asociado, el cual estaba presente en forma libre, en secreciones carentes de IgA (South y cols., 1966). Y, de acuerdo a la mayoría de las evidencias acumuladas, dicha proteína se combinaba con dos unidades de IgA constituyendo la molécula de IgA completa (Newcomb y cols., 1968), como se puede observar en la Fig. No. 1b.

Asimismo, South sugirió que la secreción selectiva normal de IgA era dependiente de su asociación con el componente, al cual denominó "Pieza de Transporte" (South y cols., 1966); otro grupo de investigadores le nombró "Cadena T" -- (Cebra y cols., 1967) y, por último, Asofsky le denominó "Componente Secretor" (CS), (Asofsky y cols., 1969)

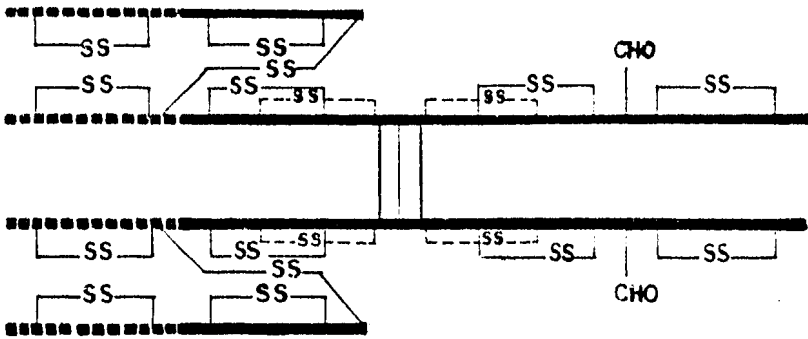


FIG. No. 1a Estructura propuesta para la IgA (7S).

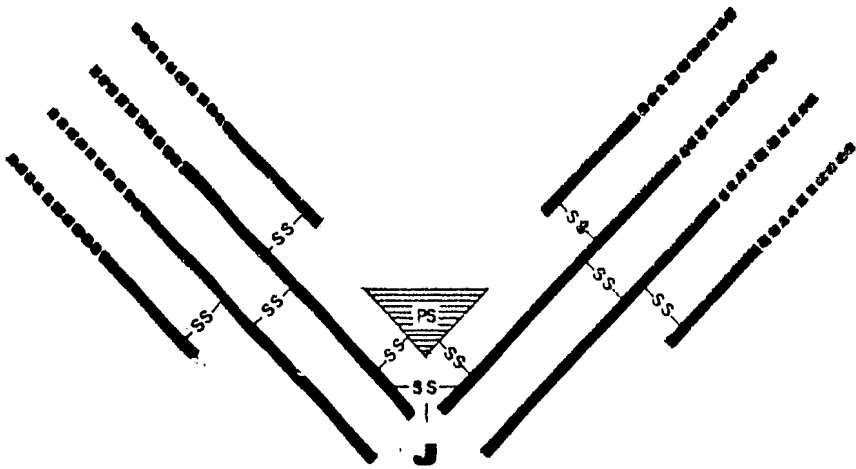


FIG. No. 1b Estructura propuesta para la IgA secretoria (11S).

(Tomado de: Margni, R.- Inmunología e Inmunquímica. Fundamentos. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires. p. 96-148, 1980).

El componente secretor es una glucoproteína cuyo peso molecular es de --- 80 000 y, es producido por las células epiteliales de las superficies mucosas y glándulas exócrinas en mamíferos y aves. Se encuentra asociado a inmunoglobulinas poliméricas de la clase IgA e IgM pentamérica. Al componente secretor, se le han atribuido funciones, tales como, conferir protección a la molécula - de IgAs contra degradación por enzimas proteolíticas y, dar estabilización a - a la estructura cuaternaria de los complejos IgAs (Kühn y cols., 1979).

El transporte de la IgAs hacia las secreciones va a depender de la interacción de dos tipos de células: las células plasmáticas, que producen IgA polimérica, junto con la cadena J, y las células epiteliales que producen el componente secretor (Crago y cols., 1979).

La cadena J, es un polipéptido con peso molecular de 26 000 d, rica en enlaces -SH, uniéndose a la IgA mediante enlaces disulfuro. Su función parece ser la de participar en el proceso de polimerización, probablemente por formación de uniones covalentes de una cadena J a dos unidades monoméricas de IgA, independientemente de los monómeros que compongan el polímero (Margni, y cols., --- 1980).

Por otra parte,, Barandzaeg sugirió que el componente secretor presente en las membranas de las células epiteliales puede actuar como un receptor de - proteínas y, además, es responsable del transporte de esta IgAs a través de las células epiteliales hacia las secreciones (Brandtzaeg, 1975).

De nuevo, Kühn demostró que el componente secretor se enlaza específicamente a células plasmáticas de la glándula mamaria (Kühn y cols., 1979). Al mismo tiempo, Brandtzaeg y cols., indicaron que el primer paso en el proceso de la - transferencia de las inmunoglobulinas a través del epitelio secretor consiste en la unión de éstas al componente secretor que actúa como un receptor para las mismas, mostrando una afinidad específica no covalente in vitro hacia la IgAs.- Asimismo, propuso el siguiente modelo para el transporte de IgAs: la incorporación de la cadena J en la IgAs, induce un arreglo configuracional que permite la formación del complejo IgA con el componente secretor en la membrana de las células epiteliales. Este complejo presente sobre la membrana de las células epi-

teliales estimula la pinocitosis y las moléculas de IgAs completas son transportadas en vesículas citoplasmáticas hacia el lumen glandular, como se observa en la Fig. No. 2 (Brandtzaeg y cols., 1979).

Por otro lado, en el calostro humano se han encontrado anticuerpos específicos de clase IgA, dirigidos contra antígenos de enterobacterias, con los cuales, no está en contacto directo la glándula mamaria (Lamm y cols., 1978).

Hanson y cols., propusieron un modelo para explicar la presencia de anticuerpos específicos clase IgAs en glándula mamaria, en donde, linfocitos de tejido asociado a intestino (Placas de Peyer), después de ser estimulados antigénicamente, viajan vía conducto torácico y posteriormente por la corriente sanguínea hacia las glándulas mamarias, en donde se liberarán anticuerpos IgAs dirigidos contra antígenos enterobacterianos, como se muestra en la Fig. No. 3 (Hanson y cols., 1979).

Lo anterior, es apoyado por los estudios de Godblum y cols, en donde, encontró anticuerpos específicos clase IgAs en calostro humano después de llevar a cabo una inmunización ~~analítica~~ con una cepa inocua de E. coli (Godblum y cols., 1975). Por su parte, Lamm, confirmó que los linfocitos asociados a intestino están comisionados para la producción de IgAs, los que al llegar a la glándula mamaria se diferenciarán en células plasmáticas productoras de IgAs. Este fenómeno, está limitado en el período cercano al término del embarazo y durante el período de la lactancia (Lamm y cols., 1979).

Se ha especulado mucho sobre la función que estos anticuerpos contra antígenos de enterobacterias pudieran tener en el calostro humano. La mayoría de los investigadores, han coincidido en asignar a estos anticuerpos un papel protector a los recién nacidos contra infecciones causadas por diferentes enterobacterias (Hanson y cols., 1979). Además, se ha sugerido, que los niños alimentados con leche materna, reducen su incidencia a infecciones gastrointestinales (Godblum y cols., 1975).

Parmely observó que las cantidades de leucocitos en calostro son importantes, las que incluyen macrófagos con actividad fagocítica, células polimorfonucleares y linfocitos de varios tamaños (Parmely y cols., 1976). Por su parte, Díaz-Joanen

R E R ————— retículo endoplásmico

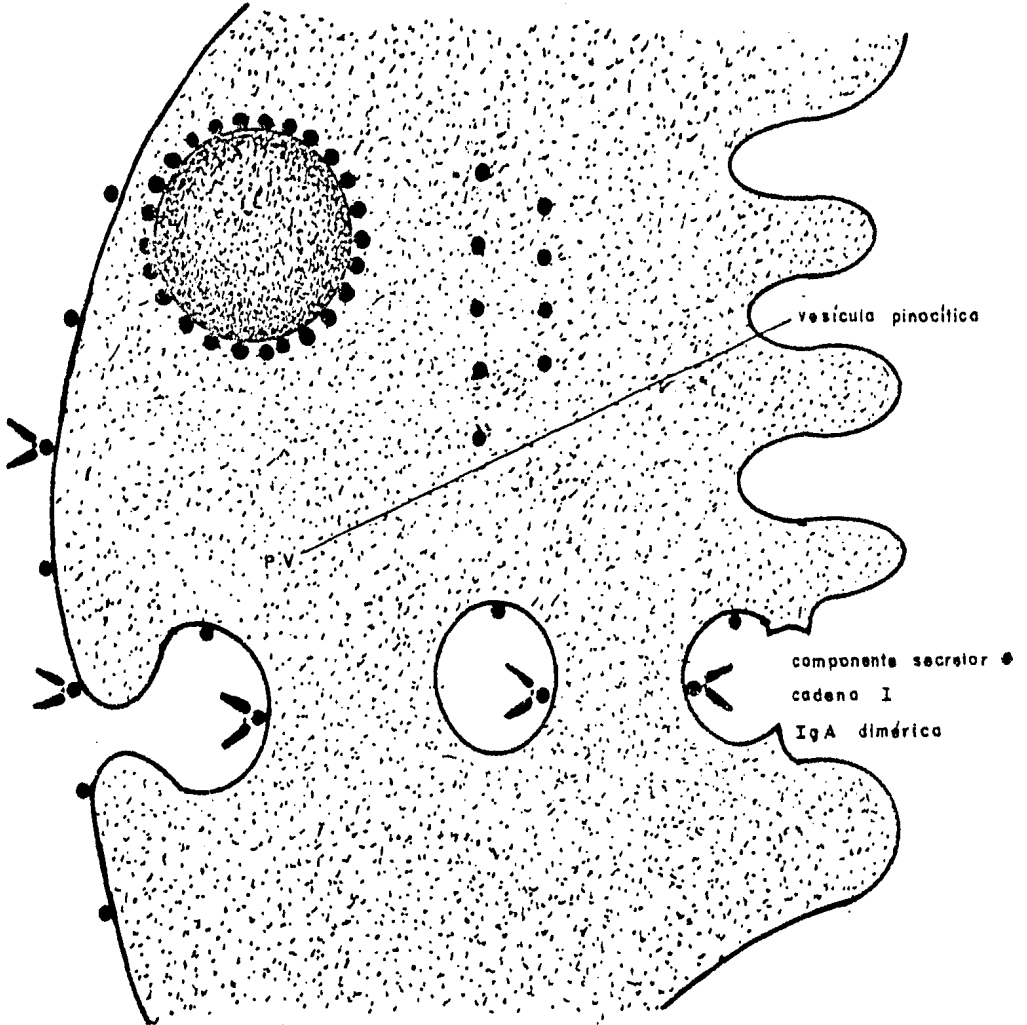


FIG. No. 2 Modelo de transporte de IgA a través del epitelio secretor hacia el lumen glandular. La cadena I, al incorporarse a la IgA dimerica induce un arreglo configurativo que permite la formación del complejo IgA con el componente secretor. Esto estimula la pinocitosis y las moléculas de IgAs completos son transportados al lumen glandular. (Tomado de: Brandtzaeg: secretory Immunity and Infection advances in Experimental medicine and biology, Plenum Press [07: 255].)

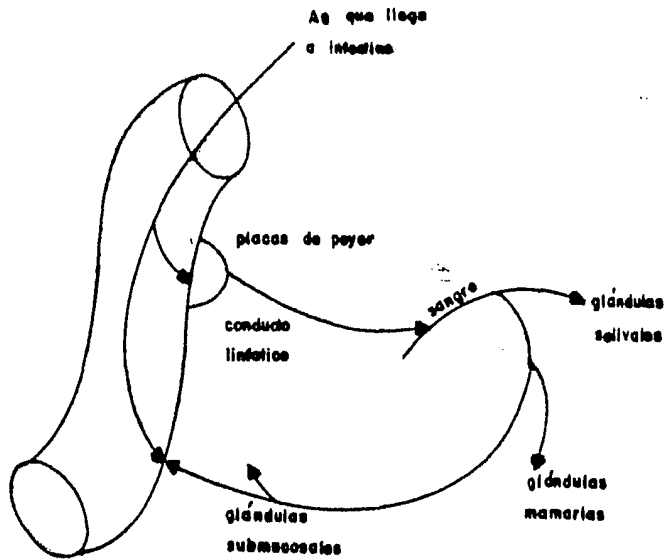


Fig. No. 3 Modelo para explicar la presencia de Ac específicos contra Ag de enterobacterias, en glándula mamaria. Linfocitos asociados a intestino, después de ser estimulados antgénicamente viajan vía conducto torácico y posteriormente corriente sanguínea, hacia glándulas mamarias o glándulas salivales en donde liberan Ac IgA-s - específicos contra Ag de enterobacterias.

(Tomado de: Hanson, L., et al.- Secretory IgA antibodies to enterobacterial - Virulence antigens: their induction and possible relevance. En: Secretory Immunity - and infection. Advances in Experimental medicine and biology. Ed. by Jerry Mc Ghee and Jiri Mesteck. Plenum Press, 107: 165-170, 1979).

informó de la presencia de tres tipos de linfocitos en el calostro: Linfocitos B, Linfocitos T y otro tipo al que denominó células Hull (Díaz-Joanen y cols., 1974).

Ogra, en una investigación realizada en 200 mujeres para determinar las concentraciones de IgA en leche materna, encontró, que sus niveles, exceden a los valores encontrados en suero (200± 60 mg/100 ml) de 4 a 8 veces, en los primeros cinco días. Observando en el calostro una concentración de 158 mg/g de proteína durante el primer día, 113 mg de IgA/g de proteína en el segundo día, y a los 180 días una concentración de 20 a 27 mg de IgA/g de proteína (Ogra y cols., 1979).

En la siguiente lista se presentan los anticuerpos específicos que han sido encontrados en calostro y leche materna, de acuerdo a un trabajo presentado por Ogra y cols., 1983.

BACTERIAS

E. coli (Antígenos "O" y "K" y enterotoxinas).

Salmonella spp

Shigella spp.

Vibrio cholerae

Streptococcus pneumoniae

Bordetella pertussis

Clostridium diptheriae

Clostridium tetani

Streptococcus mutans

VIRUS

Rotavirus

Poliovirus 1, 2 y 3.

Echovirus 6 y 9

Coxsackievirus A9 y B3

Virus Sincitial Respiratorio

Citomegalovirus

Virus Influenza A

Virus Herpes Simplex

Arbovirus: Dengue

Japonés B.

HONGOS

Candida albicans

PARASITOS

Entamoeba histolytica

Tomado de: Ogra, P., et al. Colostrum derived immunity and maternal-neonatal interaction. En: The secretory Immune System. Plenum Press. ED. by Jerry McGhee and Jiri Mestecky 409: 83-91, 1983).

De acuerdo a lo anterior, se piensa que la concentración selectiva de inmunoglobulinas y linfocitos T en el calostro humano durante el período inmediato al parto, y su transferencia al recién nacido durante la alimentación con leche materna, es importante para el mismo, ya que, junto con constituyentes nutriciona-

les se administran ingredientes inmunológicamente activos en forma concentrada, en un período en el que los mecanismos de defensa de las mucosas del recién nacido aún no han sido estimulados, (Ogra y cols., 1979). Además, Adinolfi y cols., encontraron que en situación normal, los anticuerpos de leche no son absorbidos por las mucosas gastrointestinales en cantidades importantes, - lo que sugirió que estos anticuerpos juegan un papel importante en la inmunidad local del recién nacido (Adinolfi y cols., 1966).

II GENERALIDADES.

1. FIEBRE TIFOIDEA

La fiebre tifoidea es la enfermedad producida por la infección de Salmonella typhi, la que después de invadir la mucosa intestinal, se distribuye por vía sanguínea y conduce a una infección generalizada con manifestaciones clínicas de fiebre, ataque al estado general y lesiones ulcerativas en el intestino. La infección muestra marcada tendencia a recidivar, y al desarrollo de complicaciones graves intestinales.

S. typhi es un bacilo gramnegativo, móvil, perteneciente a la Tribu Salmonellas de la familia Enterobacteriaceae; es una salmonela adaptada al hombre. Perteneció al grupo D en la clasificación Kauffman-White de las salmonelas y comparte con 96 especies de ese grupo los antígenos somáticos 9 y 12; los flagelos contienen el antígeno "d" y, en la superficie posee el antígeno "Vi". La fórmula: 9, - 12, "d", "Vi" denota Salmonella typhi en forma abreviada, de acuerdo a la clasificación antes citada.

La infección tifoídica tiene origen hídrico; el agua es contaminada por la eliminación fecal de S. typhi procedente de un enfermo o un portador. No se han reportado reservorios animales. Su capacidad para permanecer viable en el suelo, en los depósitos de agua, en las corrientes de agua contaminada y en las aguas negras, permite que el agua potable y la utilización de ésta para el riego de hortalizas, puedan contener Salmonella typhi.

Algunos epidemiólogos consideran que la exposición continua de un individuo a S. typhi desde los primeros años de vida, conduce a un cierto grado de inmunidad al llegar a la edad adulta.

Salmonella typhi es infectante en función de la virulencia de la bacteria, de la cantidad del inóculo y menos claramente de las condiciones del huésped.

Las se pueden reproducir en la luz intestinal antes de penetrar la mucosa del intestino delgado; a continuación sigue la fase de bacteremia que distribuye al germen en todo el organismo, previa localización en los ganglios linfáticos mesentéricos.

El cultivo de S. typhi en la sangre ha sido considerado como la prueba definitiva para el diagnóstico. El coprocultivo es positivo desde el final de la primera semana de infección. La reacción de Widal practicada con las cejas -- 0970 y H901 pueden ayudar al diagnóstico si los títulos contra ambos antígenos son 1:160 o mayores (Kumate, J., 1976).

2. ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.

El género Salmonella comprende una gran variedad de especies patógenas para el hombre y animales.

La estructura de la pared celular de las bacterias gramnegativas fue estudiada por Lüderitz, como se puede observar en la Fig. No. 4 (Lüderitz, O., 1977) y a su vez, está constituida por la peptidoglicana y la membrana externa, Fig. No. 5 (Joklik y cols., 1980).

a) Peptidoglicana.- Es un polímero complejo que se encuentra formado por moléculas de N-Acetilglucosamina y ácido N-Acetilmurámico en forma alterna, así como cadenas laterales tetrapeptídicas idénticas fijadas al ácido N-Acetilmurámico y un conjunto de puentes peptídicos transversos idénticos (Jawetz, E., 1981). Además es responsable de la rigidez de la pared celular (Davis & Dulbeco, 1977) y, se encuentra unido a la membrana externa a través de la lipoproteína de Brauh (Braun, V., 1969).

b) Membrana Externa.- Se compone de fosfolípidos, proteínas y lipopolisacárido (LPS) componente característico y específico de las bacterias gramnegativas que se localiza exclusivamente en dicha membrana (Miura y cols., 1969).

3. ESTRUCTURA DEL LIPOPOLISACARIDO (LPS).

Los lipopolisacáridos de las bacterias gramnegativas son complejos macromoleculares que, contienen los determinantes antigénicos somáticos de las bacterias. Químicamente el LPS está compuesto por dos partes: un complejo heteropolisacárido y una región lipídica conocida como Lípido A (Shands, J., 1971).

De acuerdo a análisis estructurales, se sabe que los LPS de las salmonelas es

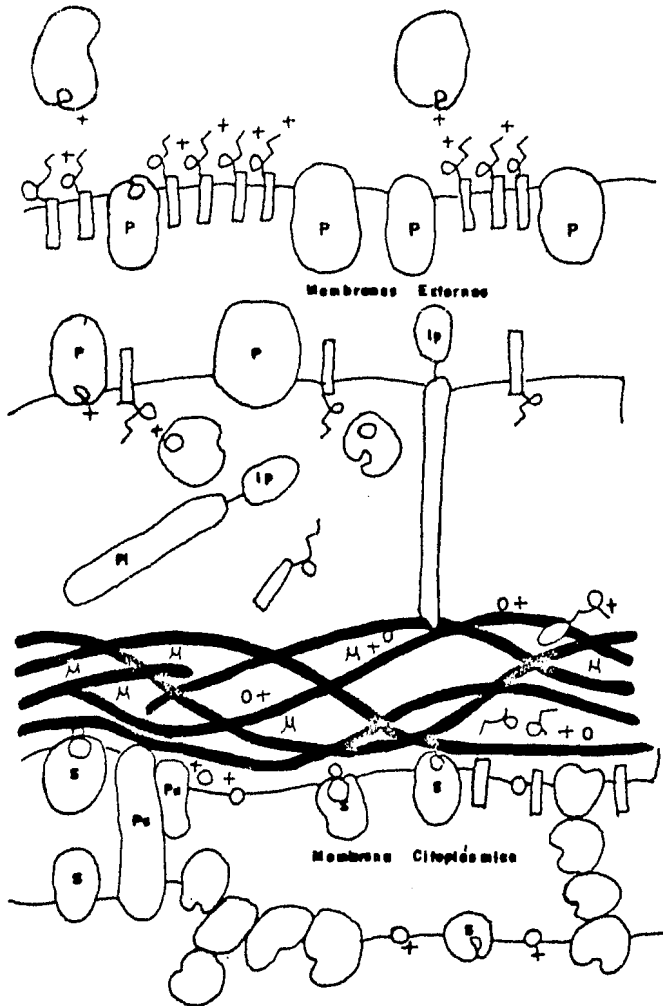
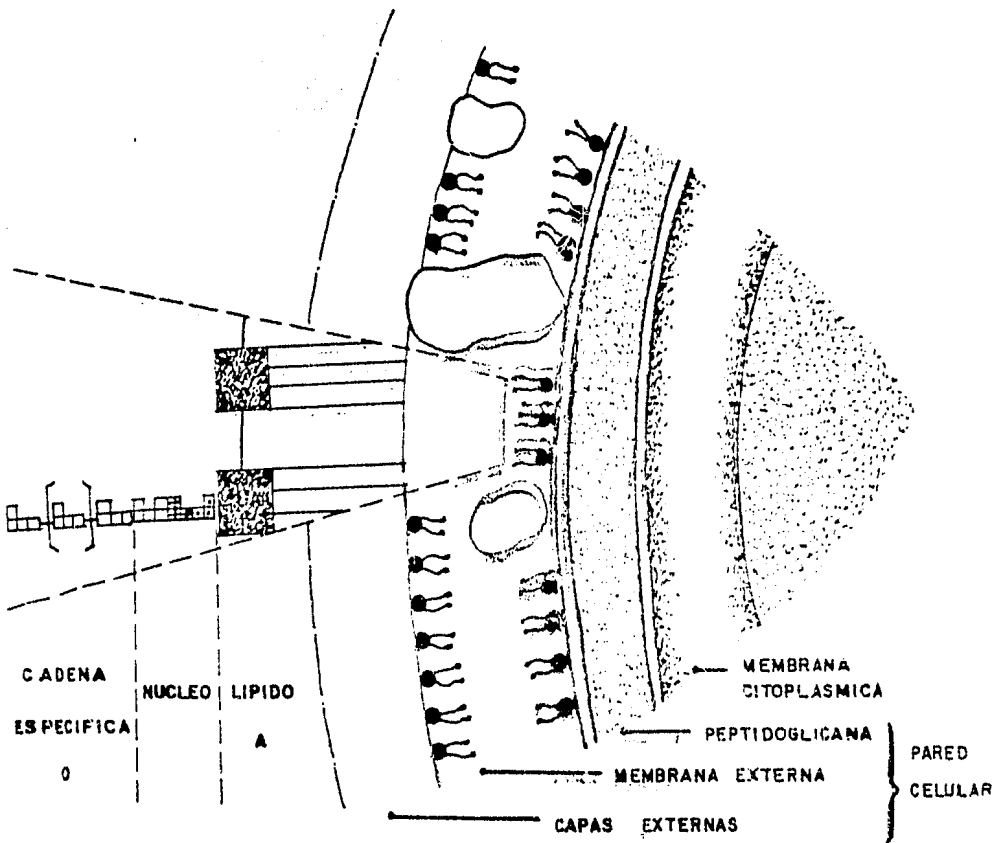


FIG. No. 4 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.

S- PROTEINA ESTRUCTURAL DE MEMBRANA CITOPLASMICA.
P- PROTEINAS ESTRUCTURALES Y ENZIMATICAS DE LA MEMBRANA EXTERNA.
lp- PORCION LIPIDICA DE LA LIPOPROTEINA DE BRUCE
pl- PORCION PROTEICA DE LA LIPOPROTEINA DE BRUCE
 (Tomado de: Lüderitz, O. Endotoxins and other cell wall components of Gram negative bacteria and their biological activities. Microbiology. American Society for microbiology, Washington DC. p. 239-246, 1977).



BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

(Tomado de: Joklik, W. Willet, H, and AMOS, D.- Microbiologia 17 Ed. Appleton Century Crofts, p.106 1980).

tan constituidos por largas cadenas conteniendo heteropolímeros compuestos -- por tres distintas regiones (Westphal, O., 1975).

REGION I..- Consiste de unidades repetitivas de oligosacáridos, los que poseen azúcares específicos. Una gran variedad de unidades repetitivas han sido reveladas dentro de las bacterias gramnegativas. Entre los azúcares que contienen se encuentran: hexosas, pentosas, azúcares compuestos como aminoazúcares, ácido hexurónico y ácido hexosaminurónico (Westphal, O., 1975). Pero, la secuencia y tipos de enlace de los residuos monosacáridicos individuales dentro de la unidad repetitiva es una característica única para un LPS dado y para una cepa bacteriana (Cummins., C., 1962). Así, en la Fig. No. 6 se presentan las unidades de repetición de la cadena "O" específica para Salmonella typhi 9, 12.

REGION II..- También conocida como core o núcleo basal. Mientras que la composición y estructura de las cadenas "O" específicas varían ampliamente, la estructura del núcleo basal parece ser constante en todo el género Salmonella y a su vez se encuentra estrechamente relacionado con otros géneros de enterobacterias tales como Escherichia y Shigella.

El núcleo basal es un complejo que puede ser dividido en dos secciones: 1) Una región interna, la cual se encuentra unida al lípido A y que está formada por L-glicero-D-manoheptosa, 2-ceto-3-Deoxioctonato (KDO), fosfato y etanolamina y, 2) Una región exterior, la cual, en Salmonella se caracteriza por un pentasacárido compuesto de glucosa, galactosa y N-Acetilglucosamina, como se observa en la Fig. No. 7, (Osborn & Rothfield, 1971).

REGION III..- La región polisacárida del núcleo basal está unida a la Región III, o mejor conocida como lípido A, mediante enlaces cetocídicos. Consiste de un glucosamino disacárido acilado llevando residuos de fosfato en las posiciones 1' y 4' (Galanos y cols., 1975); los enlaces éster fosforil de la posición 4' están parcialmente substituidos por 4-amino-4-deoxi-L-arabinosil (4-AraN), (Rietschel y cols., 1975).

4. ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO (E L I S A).

Durante las dos últimas décadas se han incrementado el número y variedad de

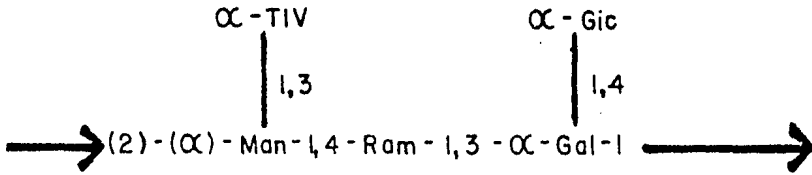


FIG. No. 6 UNIDADES DE REPETICION "O" ESPECIFICA DE SALMONELLA typhi 9,12

(Tomado de: Westphal, O. Bacterial Endotoxins. 10th.-Symp. Copenhagen, Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 49: 1-43, 1975).

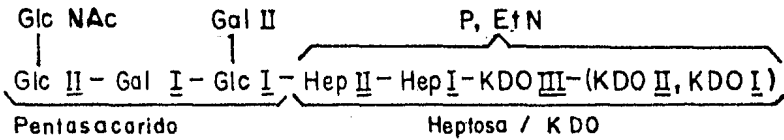


FIG. No. 7 Estructura del nucleo basal o Region II del Lipopolisacarido de SALMONELLA. Se observa el pentasacarido y las heptosas unidas AL KDO.

(Tomado de: Lüderitz, O., et al.- Isolation and chemical and Immunological. Characterization of bacterial Lipopolysaccharide. Microbial toxins. Ed. by. George Wernbrum and Solomon Kadis, Academic Press Vol IV, p. 145- 205, 1971).

de pruebas para Inmunodiagnóstico. Una de las razones para esto, ha sido el desarrollo de métodos en los cuales se utilizan antígenos o anticuerpos marcados resultando así, pruebas con un muy alto nivel de sensibilidad y especificidad (Voller y cols., 1978).

Así, en la búsqueda de nuevo métodos, Voller y Cols., demostraron que las enzimas podían ser ligadas a anticuerpos o antígenos formando conjugados en los cuales se conservara tanto la actividad inmunológica como enzimática. Es así, como surgió una nueva prueba para inmunodiagnóstico, conocida como ensayo inmunoenzimático ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), (Voller y cols., 1978).

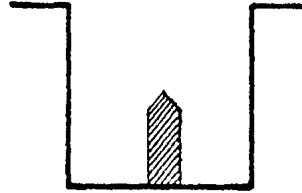
METODO INDIRECTO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS.

Ha sido muy utilizado en enfermedades infecciosas para la cuantificación de anticuerpos específicos. El antígeno se pega a la fase sólida y, se incuba con la muestra problema; si existen anticuerpos específicos reaccionarán con su respectivo antígeno. Después se lava y se añade el conjugado anticuerpo-enzima, se incuba de nuevo y, por último se añade el sustrato correspondiente y se procesa a leer el color desarrollado (Voller y cols., 1978). Ver Fig. No. 8.

Carlsson y cols., describieron un ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos contra antígenos de Salmonella en pacientes con fiebre tifoidea (Carlsson y cols., 1975). Por otra parte, Sippel y cols., describieron un ensayo inmunoenzimático utilizando como antígenos proteínas de membrana externa de Salmonella typhi en sueros de pacientes con fiebre tifoidea, observando que la prueba posee alta sensibilidad para la determinación de estos anticuerpos (Sippel, y cols., 1978).

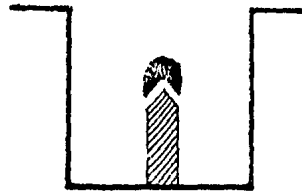
1 EL Antigeno se absorbe a la placa

Lavar



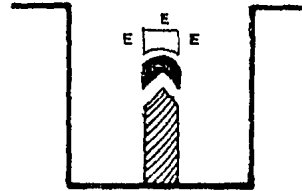
2 Se agrega el suero: los Anticuerpos especificos se unen a su Antigeno

Lavar

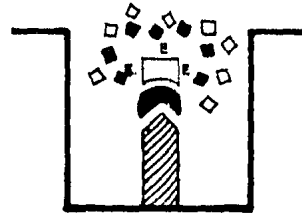


3 Agregar Anticuerpo ligado a enzima

Lavar



4 Agregar Sustrato



Cantidad Hidrolizada \propto Cantidad de Anticuerpo presente

FIG. No. 8 Ensayo Inmunoenzimatico tipo Indirecto.

(Tomado de: Voller et al Bull. Wld. Hlth. Org. 53: 55-56, 1976).

O B J E T I V O S

1. Establecer si en muestras de calostro y sueros respectivos, de mujeres en puerperio, existen anticuerpos clase IgA dirigidos contra lipopolisacárido de Salmonella typhi cepa 6901 por análisis Inmunoenzimático - ELISA.
2. Estandarización del método inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos clase IgA específicos contra LPS de Salmonella typhi.
3. Comparación de los resultados obtenidos por análisis inmunoenzimático con los obtenidos por la técnica de Hemaglutinación pasiva, para una mejor interpretación de los mismos.
4. Establecer los valores de IgA total en las muestras de calostro por el método de Inmunodifusión Radial.

III MATERIAL Y METODOS.

1. OBTENCION Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO Y CALOSTRO.

30 muestras de suero y calostro fueron obtenidas de mujeres internadas en el Hospital General de Salubridad (SSA), entre el primero y tercero días después del parto, con edades entre los 15 y 35 años. Las muestras de calostro se obtuvieron manualmente y, las de sangre fueron obtenidas por punción venosa.

Las muestras de calostro fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, con el fin de su deslipidización y eliminación de elementos tales, como células. Después de centrifugar, la capa superior resultante es eliminada y, la capa intermedia es extraída, quedando en el fondo un sedimento el cual es eliminado también, de acuerdo al método descrito por Lemaitre-Coelho. Por último, las muestras se conservaron a -10°C hasta su uso.

Las muestras de sangre fueron colocadas en una estufa a 37°C por 30 minutos para la formación del coágulo; después, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos y posteriormente, los sueros fueron separados. Se conservaron a -10°C .

2. PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA EL ANALISIS IMMUNOENZIMATICO.

a) Recubrimiento de los discos de los discos de papel con antígeno LPS de *Salmonella typhi* (De acuerdo al método descrito por Lehtonen y cols., 1980).

Se cortaron discos de papel No. 597 (Schleicher & Schuell) con un diámetro de 13 mm. Se pesaron 3 g de los mismos, se colocaron en un recipiente y se les añadió 30 ml de NaOH 3 N, agitando 10 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada hasta eliminar todo el NaOH 3 N. Al terminar, se agregaron 180 ml de Na_2CO_3 0.1 M junto con 6 g de bromuro de cianogeno, (BrCN) previamente disuelto en 6 ml de acetonitrilo (CH_3CN), se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente se lavaron con agua destilada hasta la eliminación del bromuro. Por otro lado se pesaron 0.02 mg de lipopolisacárido de *S. typhi*, obtenido por el método ya descrito por Westphal y Kaan (1965) y, se disolvieron en 60 ml de borato de sodio 0.025 M y, ésta solución fue añadida a los discos. Se dejaron en agitación toda la noche a 4°C , lavando al día siguiente con amortiguador borato de sodio 0.025M.

Después se añadió una solución de 60 ml de borato de sodio 0.025 M y glicina - 5 mM, dejando en agitación a temperatura ambiente por 45 minutos. Al final, se lavaron con amortiguador Tris-HCl 0.05 M junto con albúmina sérica bovina 0.1 mg/ml. Se conservaron a 4°C hasta su uso.

2.2 Purificación de anti-IgA Humana.

Se preparó una columna de inmunoadsorbente a partir de aminohexilsepharosa- (Sigma Fine Chemicals), y se inmovilizaron anticuerpos IgG humanos, de acuerdo al método descrito por Cambiaso, en 1975, con lo cual se obtuvo una columna de IgG-Sepharosa 4 B. A ésta, se pasaron 5 ml de suero de conejo anti-IgA secretoria y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, el anticuerpo resultante anti-IgA, libre de IgG, se pasó a través de una columna de IgA-Sepharosa 4 B (preparada de igual manera) incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Después, la columna se lavó con amortiguador PBS y los anticuerpos anti-IgAs de la columna de sepharosa fueron eluidos con NH_4SCN 1.5 M (Dandliker y cols., 1967), recolectando alícuotas de 1 ml; se midió la absorbancia de éstas y, las que presentaron lecturas mayores a 0.1 a 280 nm, se reunieron y se dializaron contra PBS. Por último, se concentraron por ultrafiltración.

2.3 Preparación del Conjugado anti-IgA con Fosfatasa Alcalina.

De acuerdo a la técnica desarrollada por Avrameas (1969).

5 mg de la enzima fosfatasa alcalina tipo VII (Sigma Fine Chemicals) se mezclaron con 850 ml de una solución de anti-IgA humana a una concentración de 2 mg/ml (purificada en el paso anterior) en amortiguador PBS durante 24 horas; después, se ajustó a un volumen de 1 ml con PBS y se añasiere 10 μ l de glutaraldehído al 20% (Sigma Fine Chemicals), se agitó y se dejó en reposo 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar, se dializó con amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 8 y se ajustó a un volumen final de 4.85 ml con el mismo amortiguador, añadiendo azida de sodio al 10%, junto con 50 mg de albúmina sérica bovina.

2.4 Titulación del Conjugado anti-IgA-Fosfatasa Alcalina.

De acuerdo al método descrito por Voller y cols. (1979), se llevó a cabo la titulación del conjugado. Se hicieron diluciones dobles en amortiguador carbonato-

tos 0.1M, pH 9.6, de una IgA humana, empezando con una concentración, empezando con una concentración de 32 ug/ml, y así sucesivamente hasta completar 8 diluciones, quedando la última dilución con una concentración de 0.25 ug/ml. De estas diluciones, se tomaron 100 ul de cada una y se agregaron a una placa de poliestireno (Munc Immunoplates Denmark) en la siguiente forma: la primera dilución (32 ug/ml) se colocó en cada uno de los pozos de la primera hilera horizontal; en la segunda hilera de pozos horizontal, se colocó la siguiente dilución (16 ug/ml) y así, hasta la octava y última dilución (0.25 ug/ml). Se dejó a 4°C toda la noche, lavando tres veces con solución PBS-Tween y añadiendo después 100 ul de albúmina sérica bovina al 0.1 %, después se lavó con PBS-Tween. Por otra parte, se hicieron diluciones dobles de la anti-IgA- Fosfatasa alcalina, desde una dilución de 1:50 hasta una dilución de 1:1600 y, de cada una de estas se añadieron 100 ul en los pozos de la misma placa, pero esta vez, en forma vertical, quedando cada hilera de la placa con una dilución diferente, y se dejó a 4°C toda la noche. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS Tween y por último, se añadió a cada pozo 100 ul del sustrato de la enzima, p-Nitrofenilfosfato (M.A. Bioproducts) a una concentración de 1 mg/ml en amortiguador carbonatos 0.1 M, se incubó 30 minutos a 37°C, interrumpiendo la reacción con 25 ul de NaOH 3 N. El color desarrollado, se determinó en un lector (Titerteck Multiskam) a 405 nm. El título del conjugado se tomó en la última dilución que presentó una lectura mayor a 1.0 de absorbancia.

2.5 Análisis Inmunoenzimático de tipo Indirecto para la determinación de Anticuerpos clase IgA anti-LPS de Salmonella typhi.

Las muestras de calostro, así como los sueros, fueron descongelados hasta el día en que se utilizaron. Cada muestra fue analizada por duplicado.

Se colocaron 300 ul del diluyente para las muestras en cada tubo, se añadió 5 ul de la muestra problema (suero o calostro), incubando dos horas a 37°C. Después se lavó 7 veces con solución de lavado PBS-Tween; se añadió el conjugado anti-IgA-fosfatasa alcalina en una dilución 1:200, se incubó dos horas a 37°C y,

al término, se lavó 7 veces con PBS tween, transfiriendo el disco a un tubo limpio. Se añadió el sustrato p-Nitrofenilfosfato 1 mg/ml en amortiguador carbonatos 0.01 M y se incubó 15 minutos a 37°C, interrumpiendo la reacción con 100 ul de NaOH 3N. El color desarrollado, por el producto de la reacción enzimática, fué determinado en un espectrofotómetro (coleman 4/8) a 405 nm (Voller y cols., 1978).

El testigo positivo utilizados como referencia fué un suero de paciente con fiebre tifoidea, con hemocultivo positivo y presentando además, un título hema-glutinante de 1:200. Como control negativo se utilizó seroalbúmina bovina.

Las lecturas de las absorbancias de las muestras de calostro y suero, se interpretaron de la siguiente manera: la absorbancia del control positivo se consideró como el 100% y, la lectura de la muestra problema fué referida a la lectura del control positivo tomada como el 100%, como se describe a continuación:

$$\% \text{ de Absorbancia en relación al control positivo} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo}} \times 100$$

Esto, según la fórmula descrita por Lin y cols., (1981).

La preparación de las soluciones utilizadas para el análisis inmunoenzimático, se presentan al final del trabajo (Apéndice).

3. TECNICA DE HEMAGLUTINACION PASIVA.

3.1 Obtención del Lipopolisacárido crudo de Salmonella typhi cepa 0901

La cepa Salmonella typhi 0901 se sembró en medio de tripticasa soya agar (Bioxon) y se incubó por 48 horas a 37°C. Después, se cosechó con solución salina estéril y se calentó durante dos horas a 100°C. Se dejó enfriar y se centrifugó a 5000 rpm 10 minutos; el sobrenadante fué precipitado con alcohol de 96° y así se obtuvo el lipopolisacárido crudo. Se conservó a -10°C.

3.2 Sensibilización de los eritrocitos de carnero con LPS crudo de S. Typhi.

La sensibilización de los eritrocitos de carnero se llevó a cabo según Meter, E., 1956. Los eritrocitos de carnero, conservados en solución de Alsevers estéril, se lavaron tres veces con sol. amortiguadora de PBS, centrifugando a 2500 rpm durante 10 minutos. Se tomó 0.1 ml del paquete de eritrocitos lavados y se-

mezclaron con 0.2 ml del lipopolisacárido crudo; se dejó en incubación en baño maría a 37°C, 30 minutos con agitación continua. Se lavaron tres veces y al término el paquete de eritrocitos se llevaron a un volumen final de 5 ml con PBS, obteniendo así, una solución de eritrocitos de carnero sensibilizados al 2%. Esta solución debe ser preparada el mismo día en que va a ser utilizada.

3.3 Tratamiento de las muestras problema.

Las muestras de suero fueron de complementadas a 56°C en baño maría durante 30 minutos. Enseguida, las muestras de calostro y suero fueron adsorbidas con eritrocitos de carnero, en la siguiente proporción: 100 ul de la muestra más 10 ul de eritrocitos de carnero previamente lavados con PBS; se dejaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 1500 rpm, tres minutos, conservando el sobrenadante, el cual fué utilizado en la técnica de Hemaglutinación pasiva.

3.4 Técnica de Hemaglutinación en Tubo

Las muestras problema pretratadas fueron analizadas por diluciones dobles, desde una dilución de 1:10 hasta una dilución 1:1280, las diluciones se realizaron con PBS, a un volumen final de 0.5 ml. Después, se añadieron 50 ul de eritrocitos de carnero sensibilizados con LPS al 2% y se incubó a 37° en baño maría por 30 minutos. Después, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por tres minutos y se determinó el título hemaglutinante (Williams & Chasem 1977). Simultáneamente, se probó un control positivo que consistió de un suero hiperinmune de conejo, empezando con una dilución de 1:100 hasta una dilución de 1:12800.

El título hemoaglutinante, se tomó en el tubo inmediato anterior en donde se observó un botón, esto es, eritrocitos sedimentados, que a diferencia de los eritrocitos que aglutinarán, no formaron la clásica malla aglutinante.

El criterio para considerar una muestra problema como positiva, fué basado en la reacción de aglutinación bacteriana de Widal, en la que, muestras con títulos de 1:160 o mayores se consideraron como positivas, y por lo tanto, será el título de referencia para que una muestra se tome como positiva.

4. TECNICA DE INMUNODIFUSION RADIAL PARA LA DETERMINACION DE IgA TOTAL EN LAS MUESTRAS DE CALOSTRO.

El procedimiento utilizado para la determinación de los niveles de IgA total en las muestras de calostro fué de acuerdo a la técnica desarrollada por Mancini y cols., en 1969. Se preparó una solución de agarosa al 1% en solución salina, se fundió hasta 56°C; se tomaron 15 ml de la solución de agarosa y se le añadió 175 ul de antisuero anti-IgA, se homogeneizó, vertiéndolo después sobre una placa de vidrio. Se practicaron orificios sobre la placa y se colocaron 5 ul de cada muestra de calostro. Simultáneamente, se colocaron concentraciones conocidas de IgAs, purificada por el método de Kobayashi (1971), para establecer la curva estándar de IgA. Se empezó con una concentración de 10 mg/ml de IgAs y, por diluciones dobles, se obtuvieron las siguientes concentraciones de IgA secretoria: 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml y 0.312 mg/ml. Se dejó la placa a temperatura ambiente durante 72 horas y, posteriormente los halos de precipitación formados fueron medidos. La IgA secretoria utilizada se probó por Inmunolectroforesis, para ver su especificidad, de acuerdo a Williams y Grabar.

Coefficiente de Correlación:

$$r = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{N \sum X^2 - (\sum X)^2} \sqrt{N \sum Y^2 - (\sum Y)^2}}$$

I V R E S U L T A D O S.

1. Titulación del conjugado anti-IgA-Fosfatasa alcalina

La dilución 1:200 fué la que presentó una absorbancia mayor a 1.0. Por tanto, ésta fué la dilución a la que el conjugado anti-IgA-Fosfatasa alcalina fué utilizado para el ensayo inmunoenzimático.

2. Purificación de anticuerpos IgAs.

Por inmunoelectroforesis se probó la especificidad de los anticuerpos IgAs obtenidos por el método de Kobayashi, con los que observó la especificidad de los mismos.

3. Resultados del análisis Inmunoenzimático y Hemaglutinación Pasiva.

Los resultados de las 30 muestras de calostro analizadas por los métodos de inmunoenzimático y hemaglutinación pasiva, se presentan en la Tabla 1. Estos resultados son el promedio de dos lecturas de absorbancia, ya que se analizaron por duplicado. Asimismo, se observan los porcentajes de absorbancia en relación al control positivo, el cual presentó un promedio de absorbancia de 1.02, valor que fué considerado como el 100% y al que fueron referidas las absorbancias obtenidas de las muestras problema, enseguida se aprecian los títulos hemaglutinantes respectivos y por último la interpretación de los resultados. Así, de las 30 muestras de calostro, sólo 13 resultaron positivas, es decir, con niveles significativos de anticuerpos anti-LPS, lo que viene a representar un 43.3% del total de las muestras de calostro. Lo anterior fué basado en el criterio, de una muestra que presentara un título de 1:160 o más, según la reacción de aglutinación bacteriana de Widal, se consideró como positiva.

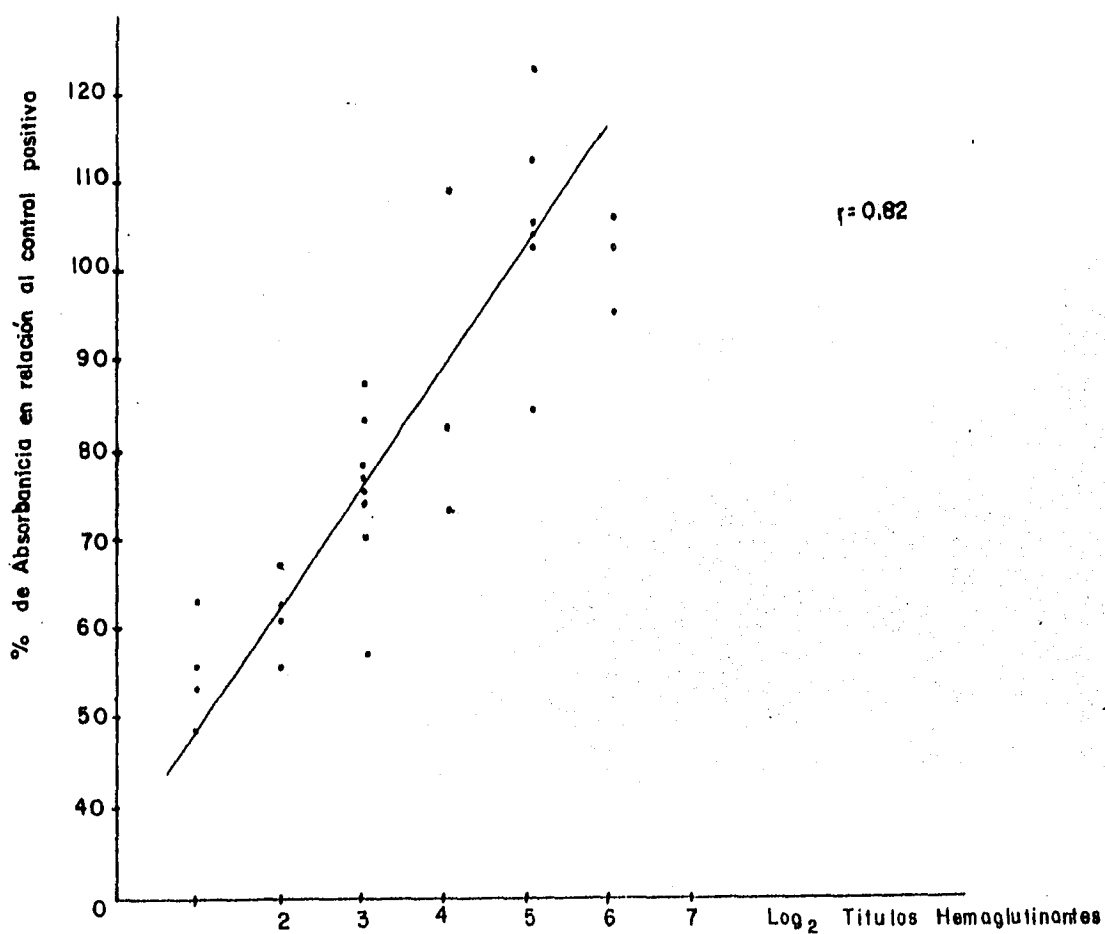
Las muestras positivas por hemaglutinación presentaron porcentajes mayores al 80% por análisis inmunoenzimático, a excepción de dos muestras.

Se compararon los resultados obtenidos por hemaglutinación y el análisis inmunoenzimático de las muestras de calostro, graficando los porcentajes de absorbancias en relación al control positivo contra los títulos hemaglutinantes en los logaritmos base 2, encontrando un coeficiente de correlación $r = 0.82$, lo que nos indica la correlación existente entre ambos métodos, como se observa en la Gráfica No. 1.

T A B L A 1. Resultados de las muestras de calostro por análisis inmunocinmático y hemaglutinación pasiva.

MUESTRA	ABSORBANCIA*	% DE ABSORBANCIA	TÍTULO HEMAGLUTINANTE	INTERPRETACION
1.	1.05	120.5 %	1:320	+
2.	0.59	57.8 %	1:80	-
3.	0.90	88.2 %	1:80	-
4.	0.62	60.7 %	1:40	-
5.	0.63	62.7 %	1:40	-
6.	0.97	95.1 %	1:640	+
7.	0.77	75.4 %	1:80	-
8.	0.83	81.3 %	1:160	+
9.	0.85	83.3 %	1:320	+
10.	0.41	40.1 %	1:40	-
11.	0.82	80.3 %	1:80	-
12.	1.14	112.0 %	1:320	+
13.	0.70	68.6 %	1:320	+
14.	0.76	74.5 %	1:80	-
15.	0.55	53.9 %	1:20	-
16.	0.50	49.0 %	1:20	-
17.	0.75	73.5 %	1:160	+
18.	0.69	67.6 %	1:40	-
19.	0.58	56.8 %	1:20	-
20.	1.11	109.0 %	1:160	+
21.	1.06	104.0 %	1:320	+
22.	1.06	104.0 %	1:320	+
23.	0.72	70.5 %	1:80	-
24.	1.08	106.0 %	1:640	+
25.	0.58	56.8 %	1:40	-
26.	1.05	102.0 %	1:640	+
27.	1.05	103.0 %	1:320	+
28.	0.65	63.7 %	1:20	-
29.	0.80	78.4 %	1:80	-
30.	0.77	75.5 %	1:80	-
Control (+)	1.02	100.0 %	1:800	+
Control (-)	0.35	34.3 %		

* Promedio de las lecturas de absorbancias de las muestras individuales probadas por duplicado.



GRAFICA No 1. Resultados de las muestras de colostro por los metodos INMUNOENZIMATICO y HEMAGLUTINACION pasiva.

Asimismo, los resultados de las 30 muestras de suero correspondientes, por análisis inmunoenzimático y hemaglutinación pasiva, se presentan en la Tabla 1. De manera análoga, en la primera columna se observan las absorbancias de las muestras, enseguida los porcentajes de absorbancias en relación al control positivo, título hemaglutinante respectivo y, por último la interpretación del resultado. De las 30 muestras analizadas, 9 presentaron títulos mayores a 1:160, lo que significa un 30% del total de las muestras de suero contienen anticuerpos específicos anti-LPS de S. typhi.

De igual manera, las muestras de suero que fueron positivas presentaron porcentajes de absorbancias mayores al 80%. En la Gráfica No. 2, se compararon los resultados de las 30 muestras de suero por análisis inmunoenzimático y hemaglutinación pasiva, encontrando un coeficiente de correlación de $r = 0.80$; se graficaron los porcentajes de absorbancia en relación al control positivo contra el logaritmo base 2 de los correspondientes títulos hemaglutinantes.

Los resultados de las muestras de calostro y suero, se analizaron en conjunto en la Tabla 3; en donde, podemos observar que un número mayor de las muestras de calostro, presentaron anticuerpos específicos anti-LPS (43.3%), en comparación con las muestras de suero, que sólo fué un 30.0%.

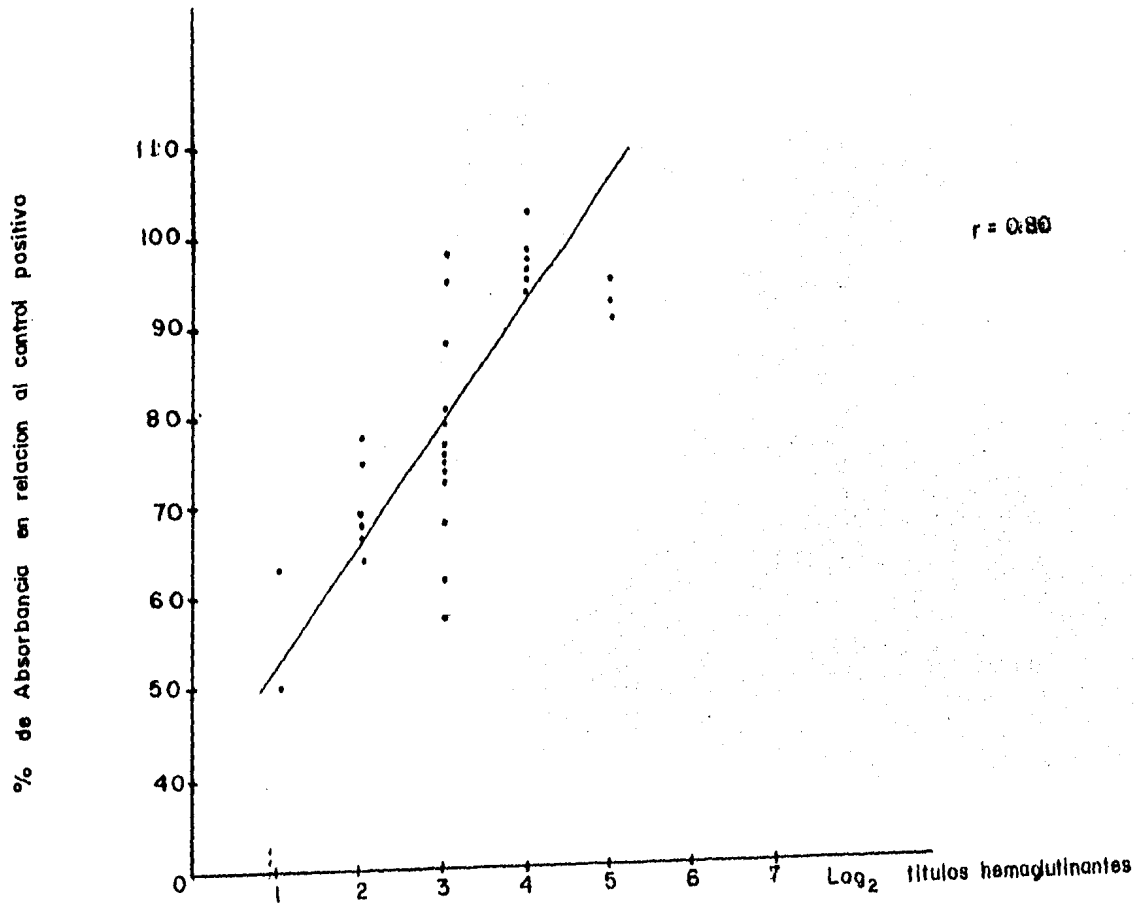
TA B L A 3. Resultados de las muestras de calostro y suero analizados en conjunto.

No. Total de Muestras		Muestras Positivas	% Del total de Muestras
CALOSTROS	30	13	43.3 %
SUEROS	30	9	30.0 %

T A B L A 3. Resultados de las muestras de suero por análisis inmunoenzimático y hemaglutinación pasiva.

<u>MUESTRA</u>	<u>ABSORBANCIA*</u>	<u>% DE ABSORBANCIA</u>	<u>TITULO HEMAGLUTINANTE</u>	<u>INTERPRETACION</u>
1.	0.76	74.5 %	1:80	-
2.	0.62	60.7 %	1:80	-
3.	0.66	64.7 %	1:40	-
4.	0.78	76.5 %	1:80	-
5.	0.97	95.1 %	1:160	+
6.	0.96	94.1 %	1:160	+
7.	0.65	63.7 %	1:20	-
8.	1.00	98.1 %	1:160	+
9.	0.94	92.1 %	1:320	+
10.	0.93	91.1 %	1:80	-
11.	0.81	79.4 %	1:80	-
12.	0.92	91.1 %	1:320	+
13.	0.82	80.3 %	1:80	-
14.	0.70	68.6 %	1:40	-
15.	0.97	95.1 %	1:320	+
16.	1.00	98.1 %	1:80	-
17.	0.77	75.5 %	1:80	-
18.	0.51	50.0 %	1:20	-
19.	1.05	102.9 %	1:160	+
20.	0.79	77.4 %	1:40	-
21.	0.58	56.8 %	1:80	-
22.	0.76	74.5 %	1:80	-
23.	0.70	68.6 %	1:80	-
24.	0.97	95.1 %	1:80	±
25.	0.76	74.5 %	1:80	-
26.	0.98	96.5 %	1:160	-
27.	0.97	95.5 %	1:160	+
28.	0.76	74.5 %	1:40	-
29.	0.71	69.6 %	1:40	-
30.	0.69	67.6 %	1:40	-
Control (+)	1.02	100.0 %	1:800	
Control (-)	0.35	34.3 %		

* Procedimiento de las lecturas de absorbancia de las muestras de suero probadas por duplicado.



GRAFICA No. 2. Resultados de las muestras de suero por los metodos INMUNOENZIMATICO y HEMAGLUTINACION pasiva

4. Comparación de los resultados obtenidos por análisis Inmunoenzimático y Hemaglutinación Pasiva en las muestras de calostro y suero.

En la Tabla 4., se presentan los porcentajes de absorbancia en relación al control positivo de las muestras de calostro y suero y, al efectuar los cálculos correspondientes no se encontró correlación entre ambos porcentajes de absorbancias obtenidos.

T A B L A 4. Resultados de las muestras de calostro y sueros respectivos — por análisis inmunoenzimático.

<u>%. DE ABSORBANCIA EN RELACION AL CONTROL POSITIVO</u>					
<u>PRUEBA</u>	<u>SUERO</u>	<u>CALOSTRO</u>	<u>PRUEBA</u>	<u>SUERO</u>	<u>CALOSTRO</u>
1.	74.5 %	122.5 %	16.	98.1 %	49.0 %
2.	61.7 %	57.8 %	17.	75.5 %	73.5 %
3.	64.7 %	88.2 %	18.	50.0 %	66.6 %
4.	76.5 %	60.7 %	19.	102.9 %	56.0 %
5.	95.1 %	62.7 %	20.	77.4 %	109.0 %
6.	94.1 %	95.1 %	21.	56.8 %	104.0 %
7.	63.7 %	75.4 %	22.	74.5 %	104.0 %
8.	98.1 %	81.3 %	23.	68.6 %	70.5 %
9.	92.1 %	83.3 %	24.	95.1 %	106.0 %
10.	91.1 %	40.1 %	25.	74.5 %	56.8 %
11.	79.4 %	80.3 %	26.	96.5 %	103.0 %
12.	91.1 %	112.0 %	27.	95.1 %	103.0 %
13.	80.3 %	68.6 %	28.	74.6 %	63.7 %
14.	68.6 %	74.5 %	29.	69.6 %	78.4 %
15.	95.1 %	53.9 %	30.	67.6 %	75.5 %
Control (100%)		100.0 %			

Coefficiente de Correlación $r = 0.01$.

Del mismo modo, los resultados obtenidos por hemaglutinación pasiva de las muestras de calostro, así como sus sueros respectivos, se presentan en la ---
 Tabla 5. De manera análoga, no se encontró correlación entre los títulos hemaglutinantes de las muestras de suero con la muestra de calostro correspondiente.

T A B L A 5. Resultados de las muestras de calostro y suero respectivo por Hemaglutinación Pasiva.

<u>T I T U L O S H E M A G L U T I N A N T E S</u>					
<u>MUESTRAS</u>	<u>SUERO</u>	<u>CALOSTRO</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>SUERO</u>	<u>CALOSTRO</u>
1.	1:80	1:320	16.	1:80	1:20
2.	1:80	1:80	17.	1:80	1:160
3.	1:40	1:80	18.	1:20	1:40
4.	1:80	1:40	19.	1:160	1:20
5.	1:160	1:40	20.	1:40	1:160
6.	1:160	1:640	21.	1:40	1:320
7.	1:40	1:40	22.	1:80	1:320
8.	1:160	1:160	23.	1:80	1:320
9.	1:320	1:320	24.	1:80	1:640
10.	1:80	1:40	25.	1:80	1:40
11.	1:80	1:80	26.	1:160	1:640
12.	1:320	1:320	27.	1:160	1:320
13.	1:80	1:320	28.	1:40	1:20
14.	1:40	1:80	29.	1:40	1:80
15.	1:320	1:20	30.	1:40	1:80

Control positivo 1: 3200

Coefficiente de correlación $r = 0.28$

5. Concentración De IgA total en las muestras de calostro por Inmunodifusión Radial.

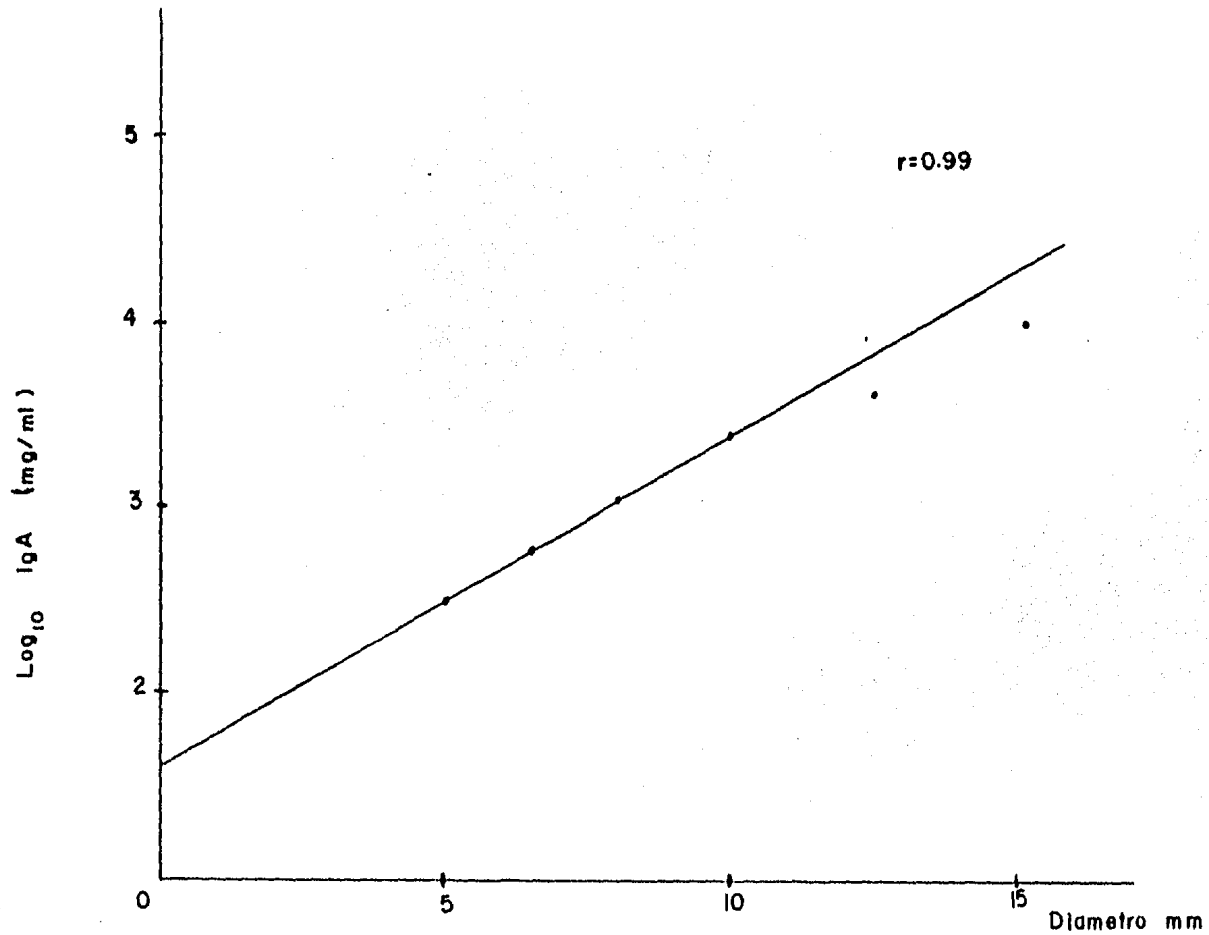
Los diámetros de los halos de precipitación obtenidos en la inmunodifusión radial para establecer la curva estándar de IgA total se presentan en la Tabla 6. En la primera columna, se observan las concentraciones de IgA en ug/ml, enseguida se expresan las concentraciones en logaritmos base 10, y finalmente -- los diámetros de los halos de precipitación por triplicado.

T A B L A 6. Curva estándar para la determinación de IgA total en las muestras de calostro por Inmunodifusión Radial.

<u>IgA ug/ml</u>	<u>Log 10</u>	<u>Diámetro (mm)</u>
10 000	4.00	15.5, 15.5, 14.5
5 000	3.69	12.5, 12.5, 12.5
2 500	3.39	10.0, 10.0, 10.0
1 250	3.09	8.0, 8.0, 8.5
625	2.79	7.0, 6.5, 6.0
312	2.49	5.0, 4.5, 4.0

Con los datos anteriores se estableció la curva estándar IgA, graficando -- la concentración de IgA en logaritmo base 10, contra el diámetro de los halos de precipitación, encontrando un coeficiente de correlación $r = 0.99$, como se observa en la Gráfica No. 3.

A partir de la curva estándar, se extrapolaron los diámetros de los halos de precipitación de las muestras de calostro para establecer los valores de IgA total. En la Tabla 7, se presentan las concentraciones de IgA total obtenidas en las 26 muestras de calostro analizadas.



GRAFICA No. 3. Curva Stándar IgA

T A B L A 7. Concentración de IgA Total en las 26 muestras de calostro

<u>MUESTRA</u>	<u>CONCENTRACION IgA</u> (mg/ml)	<u>MUESTRA</u>	<u>CONCENTRACION IgA</u> (mg/ml)
1.	5.01	14.	0.56
2.	11.58	15.	0.58
3.	19.95	16.	0.56
4.	0.63	17.	12.58
5.	0.63	18.	0.79
6.	3.98	19.	10.00
7.	1.25	20.	5.12
8.	3.98	21.	1.07
9.	12.59	22 .	15.84
10.	0.56	23 .	12.58
11.	12.58	24.	5.12
12.	1.99	25.	1.17
13.	1.58	26.	12.58

Se observa gran variación en las concentraciones de IgA total en las 26 muestras de calostro, las cuales, van desde 0.56 mg/ml hasta una concentración de 19.95 mg/ml de calostro, obteniendo una media de 5.61 mg/ml y una desviación estándar de 5.8°.

6. Comparación de las concentraciones de IgA total presente en las muestras de calostro con los títulos hemaglutinantes.

Se compararon los valores de IgA total presente en las muestras de calostro, contra los títulos hemaglutinantes respectivos, como se observa en la Tabla 8, al mismo tiempo el coeficiente de correlación $r = 0.39$, indica la falta de correlación que existe entre la concentración de IgA y el título hemaglutinante..

T A B L A 8. Comparación de los niveles de IgA presente en las muestras de calostro con los títulos hemaglutinantes.

<u>MUESTRA</u>	<u>IgA (mg/ml)</u>	<u>TITULO</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>IgA (mg/ml)</u>	<u>TITULO</u>
1.	5.01	1:320	14.	0.56	1:20
2.	1.58	1:80	15.	1.58	1:160
3.	19.95	1:80	16.	0.56	1:40
4.	0.63	1:40	17.	0.58	1:20
5.	0.63	1:40	18.	0.79	1:160
6.	2.98	1:640	19.	10.00	1:320
7.	1.25	1:80	20.	5.12	1:320
8.	2.98	1:160	21.	1.07	1:80
9.	12.58	1:320	22.	15.84	1:640
10.	0.56	1:40	23.	12.58	1:640
11.	12.58	1:320	24.	5.12	1:320
12.	1.99	1:320	25.	1.07	1:20
13.	1.58	1:20	26°	12.58	1:80

Coefficiente de correlación $r = 0.39$.

7. Comparación de las concentraciones de IgA total en las muestras de calostro con los porcentajes de absorbancia obtenidos.

Los valores de IgA total presente en las muestras de calostro fueron comparados contra los porcentajes de absorbancia en relación al control positivo obtenidos por análisis inmunoenzimático, como se muestra en la Tabla 9; no se encontró correlación, lo cual, puede sugerir, que las muestras de calostro con mayor concentración de IgA total, deban presentar mayor cantidad de anticuerpos específicos contra LPS de S. typhi.

T A B L A 9. Comparación de los niveles de IgA total en las muestras de calostro y porcentajes de absorbancia obtenidos por análisis inmunoenzimático

<u>MUESTRA</u>	<u>IgA (mg/ml)</u>	<u>% de ABSORBANCIA</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>IgA (mg/ml)</u>	<u>% DE ABSORBANCIA</u>
1.	5.61	123.0%	14.	0.56	49.0%
2.	1.58	59.8%	15.	1.58	73.5%
3.	19.95	89.2%	116.	0.56	66.6%
4.	0.63	60.7%	17.	12.58	56.9%
5.	0.63	62.7%	18.	0.79	109.0%
6.	3.98	96.0%	119.	10.00	104.0%
7.	1.25	76.4%	20.	5.12	104.0%
8.	3.98	92.3%	21.	1.07	70.5%
9.	12.59	84.1%	22.	15.84	106.0%
10.	0.56	40.1%	23.	12.58	103.0%
11.	12.58	112.0%	24.	5.12	103.0%
12.	1.99	68.6%	25.	1.07	63.70%
13.	1.58	53.9%	26.	12.58	78.45%

Coefficiente de correlación $r = 0.47$.

1. Coefficiente de Variación (CV).

Para observar la reproductibilidad del ensayo inmunoenzimático, se presenta las lecturas de absorbancia de una muestra sextuplicado, junto con la desviación estándar obtenida, la media y el coeficiente de variación, como se muestra en la Tabla 10.

T A B L A 10: Absorbancias por Sextuplicado.

1. 0.75	4. 0.68
2. 0.69	5. 0.68
3. 0.70	6. 0.73
$\bar{x} = 0.70$	D.E. = 0.012 C.V. = 1.71

V DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados demuestran la presencia de anticuerpos específicos clase IgA anti-LPS de Salmonella typhi en 13/30 de las muestras. El criterio establecido para considerar una muestra positiva, fué análogo al título reportado por Middel en su reacción de aglutinación bacteriana, tomando como positiva una muestra, aquella que presentara un título hemaglutinante de 1:160 o mayor.

La existencia de tales anticuerpos específicos en calostro, pudiera explicarse de acuerdo a el modelo planteado por Roux en 1977, donde linfocitos B -- precursores de IgA, que se encuentran localizadas en placas de Peyer del intestino delgado, después de ser estimulados antigénicamente, migran hacia nódulos mesentéricos en donde pasan por un proceso de división y diferenciación, llegando al conducto torácico y posteriormente a la corriente sanguínea para localizarse finalmente en superficies mucosas del intestino delgado, glándula mamaria y otras superficies mucosas (Roux y cols., 1977).

La presencia de anticuerpos específicos en el grupo de mujeres estudiadas -- podría sugerir una infección reciente, por Salmonella typhi, una vacunación en un lapso menor a dos años, o bien, que se pudiera tratar de portadoras sanas.

Por otra parte, los resultados obtenidos por el análisis inmunoenzimático -- correlacionan con la técnica de hemaglutinación pasiva, presentando un coeficiente de correlación de $r = 0.82$ y $r = 0.80$, para las muestras de calostro y suero respectivamente, lo cual indica la funcionalidad del ensayo inmunoenzimático.

Los valores de IgA total obtenidos en las muestras de calostro por inmunodifusión radial, presentaron gran variabilidad, ya que var desde 19.99 mg/ml de calostro. A su vez, se observó que no existe correlación entre las concentraciones de IgA obtenidas en las muestras de calostro y sus respectivos porcentajes de absorbancia en relación al control positivo, ya que se observó un coeficiente de correlación $r = 0.47$, lo que puede sugerir, que no necesariamente las muestras con mayor concentración de IgA total, presenten mayor cantidad de anticuerpos específicos contra LPS de Salmonella typhi.

Por último, los anticuerpos anti-LPS de Salmonella typhi presentes en las muestras de calostro y la transferencia de éstos al recién nacido mediante la alimentación con leche materna, va implicar gran importancia biológica para él debido a la probable participación de estos anticuerpos específicos en la protección a infecciones por S. typhi. Lo anterior, se suma a evidencias anteriores, apoyando que la alimentación con leche materna protege al recién nacido -- contra infecciones gastrointestinales, aunado a otros factores que contiene el calostro y leche con propiedades anti-infecciosas, tales como lisozima, lactoferrina y células que incluyen macrófagos, linfocitos T y B (Hanson y cols., 1972), los cuales, se ha reportado, están involucrados en la producción de anticuerpos -- específicos contra antígenos "O" y "K" de E. coli (Carlsson y cols., 1976), antígenos "O" de Shigella (Carlsson, 1972), antígenos "O" de V. cholerae (Svennerholm y cols., 1978) y, contra enterotoxinas de E. coli y V. cholerae (Holmgren y cols., 1976). Asimismo, investigaciones sobre linfocitos B productores de anticuerpos IgA en leche materna, han demostrado gran parte de estas células -- producen anticuerpos contra antígenos enterobacterianos (Ahlstedt, y cols., 1975).

VI CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos por el análisis inmunoenzimático y por la técnica de Hemaglutinación pasiva muestran la presencia de anticuerpos clase IgA específicos dirigidos contra lipopolisacárido de Salmonella typhi en las muestras de suero y calostro.

Por otra parte, se observó que en las muestras de suero 9 de 30, y en las de calostro, 13 de 30, fueron el total de las muestras positivas. Asimismo, se observó, que un título de 1:80 fué el que presentó mayor frecuencia, esto pudiera explicarse, debido a las condiciones de saneamiento ambiental que prevalecen, como lo es la falta de agua potable, el riego de hortalizas con aguas negras, etc, y por consiguiente una exposición continua del individuo a Salmonella typhi.

Se llevó a cabo la estandarización del ensayo inmunoenzimático, utilizando, para ello discos de papel filtro, como fase sólida, siendo este hecho, de gran importancia en nuestro país, ya que de no utilizar estos, se tiene que recurrir a otro tipo de fases sólidas como placas, tubos, discos o perlas de poliestireno o polivinilo. Esto implica, la importación de ese material y aunado a su alto costo, representan una desventaja del método, junto con la limitante de aparatos lectores. Por consecuencia, las ventajas de la utilización de discos de papel filtro son su bajo precio, la prueba se puede realizar en un tubo, y la lectura de las absorbancias se lleva a cabo en un espectrofotómetro común.

Cabe mencionar también, que el ensayo inmunoenzimático posee la ventaja de poder determinar inmunoglobulinas clase específicas, en este caso, IgA específica contra LPS de S. typhi.

Al ser comparados los resultados del ensayo inmunoenzimático con los resultados obtenidos por la técnica de hemaglutinación pasiva, se observó correlación entre ambos métodos, presentando coeficientes de correlación de 0.82 y 0.80, para las muestras de calostro y suero respectivamente. La técnica de hemaglutinación pasiva y los resultados obtenidos por ésta, fueron de gran ayuda, ya que, en base a ellos se estableció el criterio para establecer una muestra positiva o negativa

en el ensayo inmunoenzimático.

Los niveles de IgA total obtenidos en las muestras de calostro presentan gran variación, ya que van en un rango de 0.56 hasta 19.99 mg/ml de calostro. Estos valores no correlacionan con los porcentajes de absorbancia obtenidos por el análisis inmunoenzimático, lo cual, indica que las muestras con mayor concentración de IgA total, no necesariamente presentan altos niveles de anticuerpos IgA específicos contra el LPS de Salmonella typhi.

Por último, se hace resaltar la importancia de la alimentación con calostro y leche materna al recién nacido, ya que junto con ingredientes nutricionales, se administrado con anticuerpos específicos, células fagocíticas, y otros factores inmunológicamente activos en un período, en el que, los mecanismos de defensa del recién nacido, aún no han sido estimulados.

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001 M P.M. : 203.31 g 203.31 g - 1 mol
 x - .001 mol
 x = 0.2 g de
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

NaCl 0.15 M P.M. 58.44g 58.44g - 1 mol
 x - 0.15 mol
 x = 8.76g de NaCl

Na_2HPO_4 0.03 M P.M. 141.98 g 141.98g - 1 mol
 x - 0.03 mol
 x = 4.25 g de
 Na_2HPO_4

Aforar con agua destilada a 1000 ml.

d) Diluyente para el Sustrato .

Na_2CO_3 0.012 M P.M. 105.99g 105.99g - 1 mol
 x - 0.012 mol
 x = 1.27 g de
 Na_2CO_3

NaHCO_3 0.016 M P. M. 84.01 g 84.01 g - 1 mol
 x - 0.016 mol
 x = 1.34 g de
 NaHCO_3

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001 M P.M. 203.31 g 203.31 g - 1 mol
 x - 0.001 mol
 x = 0.2 g

Aforar con agua destilada a 1000 ml

e) Solución de lavado PBS-tween 20

Tween-20 0.03% 0.03 ml - 100 ml de PBS
 x - 1000 ml
 x = 0.3 ml PBS-Tween-20

Aforar con PBS a 1000 ml

V I I B I B L I O G R A F I A .

1. Adinolfy, M., Glynn, A., and Lansday, M. 1966. Serological proportions of IgA antibodies to E. coli present in human colostrum. Immunol. 10: 517-521.
2. Ahlstedt, S., Carlsson, E., Hanson, L.A. and Goldblum, R.M. 1975. Antibody - production by human colostrum cells. I. Immunoglobulin class, specificity - and quantity. Scand. J. Immunol., 4: 535-538.
3. Asofsky, R., Binaghi, R.A., Edelman, G.M., Goodman, H.C., Kabat, E., Kojima, J. and Trnka, Z., 1969. An extension of the nomenclature for immunoglobulins. Bull. Wld. Hlth. Org. 41: 975-979.
4. Avraamas, S. 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use - of conjugate for detection of antigens and antibodies. Immunochemistry. 6:45-50.
5. Brandtzaeg, P. and Fjellanger, I. 1970. Human Secretory Immunoglobulins. - Scand. J. of Haematology. Supplementum No. 12., Copenhagen. 12: 1-101.
6. Brandtzaeg, P. and Savilahti, E. 1979. Further evidence for a role of secretory component (SC) and J. chain in the glandular transport of IgA. En: Secretory and Infection. Advances in experimental medicine and biology. Vol. - 107. Ed. by Jerry Macghee and Jiri Kestocky. Plenum Press. 107: 219-225.
7. Brandtzaeg, P. 1975. Blocking effect of the J Chain and J-Chain antibody on the binding of secretory component to human IgA and IgM. Scand. J. Immunol. 4: 937-942.
8. Braun, V. 1969. Chemical characterisation, spatial distribution and function of lipoprotein (murein lipoprotein) of the E. coli cell wall. Eur. J. Bio - chem. 10: 416-436.
9. Cambiaso, C.L., Gofinet, A. and Vaerman, J.F. 1975. Glutaraldehyde-activated Aminohexil-Derivative of sepharosa 4B. As a new versatile immunosorbent. Immunochemistry. 12: 273-276.
10. Carlsson, H. E. and Linderb, A. 1975. Quantitation of Salmonella "0" antibodies in human sera by enzyme linked immunosorbent assay Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol. 48: 485-494.

11. Carlsson, B., Ahlstedt, S. and Hanson, L.A. 1976. Escherichia coli "0" antibody content in milk from healthy Swedish mothers and mothers from a very low socioeconomic group of a developing country, Acta Paediatr. - Scand. 65: 417-423.
12. Carlsson, B., Meitert, T. and Garon, E. 1978. Antibody response in breast milk after oral immunization of pregnant women with a live Shigella vaccine. Manuscript in preparation.
13. Cebra, J.J. and Small, P.A. 1967. Polypeptide chain structure of rabbit - immunoglobulins III. Secretory IgA immunoglobulin from colostrum. Biochemistry. 6: 503-505.
14. Crago, S.S. and Prince, S.J. 1978. Molecular-cellular interactions in the secretory IgA system. En: Secretory Immunity and infection. Advances in - experimental medicine and biology. Vol. 107. Ed. by Jerry Macghee and Jiri Kestocky. Plenum Press. 167: 203-214.
15. Cummins, C.S. 1962. Immunochemical specificity and location of antigens - in the bacterial cell. Microbial. Classification. 20. th. Symposium of the Society for general Microbiology University. Press London. p. 212-239.
16. Dan Miller, W.B., Alonso, R. and Saussure, V.A. 1967. The effect of chae - tropic ions on the dissociation of antigen-antibody complexes. Biochemistry. 6: 1120-1129.
17. Davis, B.D. and Dubelico. 1977. Salmonellas. En: Tratado de Microbiología. Barcelona (España). Salvat Editores. p. 703.
18. Diaz-Joannon, E. and Williams, R.C. 1974. T and B lymphocytes in human - colostrum. Cll. Immunol. and Immunopath. 3: 248-255.
19. Godblum, R., Ahlstedt, S., Carlsson, B. and Hanson, L. 1975. Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunization. Nature October 30, 257: 797-799.
20. Galanos, C. and Luderitz, O. 1975. Electrodialysis of Lipopolisaccharide - and their conversion to uniform salt form. Eur. J. Biochem. 54: 603-610.

21. Hanson, L.A., Ahlstedt, S., Carlsson, B., Ellstrom, S., Kaijser, F., Lindblad, B. and Sohl, A. 1970. New Knowledge in human milk: immunoglobulin. *Acta Paediatr. Scand.* 67: 577-580.
22. Hanson, L.A., Ahlstedt, S. and Carlsson, B. 1979. Secretory IgA antibodies to enterobacterial virulence antigens: their induction and possible relevance. In: *Secretory Immunity and Infection. Advances in experimental medicine and biology.* Ed. by Jerry R. Macghee and Jiri Masticky. Plenum Press. - 107: 165-170.
23. Holgrem, J., Hanson, L.A., Carlsson, B. and Lindblad, B. 1976. Neutralizing antibodies against Escherichia coli and Vibrio cholerae enterotoxins in human milk from a developing country. *Scand. J. Immunol.* 5: 307.
24. Jawetz, E., Melnick, and Adelberg, J. 1981. *Manual de Microbiologia*. Ed. - El manual moderno. México, 1981. p. 12-15.
25. Joklik, W.K., Willet, H.P. and Amos, D. 1960. *Microbiology* 17 Ed. Appleton Century Crofts. p. 105.
26. Kobayashi, K. 1971. Studies on human secretory IgA. Comparative studies of the IgA-bound secretory piece and free secretory piece protein. *Immunology.* 2: 785-800.
27. Kühn, L. and Knackenbuhl, J.P. 1979. Role of the secretory component as a sialoglycoprotein, in the specific uptake of IgA dimer by epithelial cells. *J. of biological chemistry.* No. 2. 254: 11072-11081.
28. Kumate, J.R. y Gutiérrez, G. 1976. *Fiebra Tifoidea.* Manual de Infectología. Ed. Ediciones médicas del Hospital Infantil de México. México D.F. - p. 11-20.
29. Lamm, M. and Carrington, P. 1979. Development of the IgA system in the mammary gland. In: *Secretory Immunity and Infection. Advances in experimental medicine and biology.* Ed. by Jerry Macghee and Jiri Masticky. Plenum Press. 107: 35-40.
30. Lehtonen, O.P. and Viljanen, M.K. 1960. Antigen attachment in ELISA. *J. Immunol. Methods.* 14: 61.

31. Lantiva-Solano, I., Acosta, A.G., Barranzo, G., and others. In vivo transfer of polymeric IgA from blood into bile. *Immunol.* 45: 361.
32. Lin, T.H., Hubert, B.P., Chiu, C.T. and Zarco, R. 1981. Simple stannic chloride enzyme linked immunosorbent assay for human antibodies to Enterobacter histolytica. *Journal of Clin. Microbiol.* Apr. No. 4. 19: 846-851.
33. Ladman, C. 1977. Endotoxins and other cell wall component, of Gram negative Bacteria and their Biological activities. *En: Microbiology.* American Society For Microbiology, Washington, D.C. p. 235-246.
34. Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.P. 1969. Immunochemical Quantitation of antigens by simple radial immunodiffusion. *Immunochemistry.* 6: 225-237.
35. Margni, R. 1980. *IMUNOLOGIA E IMMUNOCHEMICA.* Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. Via Monte 2164- Buenos Aires. 2a. Ed.p. 120-157.
36. Miura, T. and Mizushima, S. 1969. Separation and properties of outer and cytoplasmic membranes in E. coli. *Biochimica et Biophysica Acta.* 193:268.
37. Mumford, R.W., Normansell, D. and Stanworth, D.R. 1968. A structural study of human exocrine IgA globulin. *J. Immunol.* 101: 905.
38. Ogra, P.L., Losonsky, G.A. 1983. Colostrum-derived immunity and maternal-neonatal interaction. *En: The Secretory Immune system.* Annals of the New York Academy of Sciences. Ed. by Jerry Macghee and Jiri Mastovsky. Plenum Press. 409: 62-84.
39. Neter, E. 1956. Bacterial hemagglutination and haemolysis. *Bact. Rev.* 20: 156.
40. Ogra, S.C., Weintraub, D. and Ogra, P.L. 1979. Immunologic aspects of human colostrum and milk. *En; Secretory Immunity and Infection.* Advances in experimental medicine and biology. Ed. by Jerry Mastovsky. 107:

42. Osborn, M. and Rothfieldil. 1971. Biosynthesis of the core region of Lipopolysaccharide . Microbial toxins. Ed. by George Weinbaum, Solomon Kadis and Samuel Ajl. Bacterial Endotoxins. Academy Press. New York and London. 4: 331-340.
43. Farnely, H.J., Beer, A., Billinghamo, R. 1976. In vitro studies on the T-Lymphocyte population on the human milk. The J. Exp. Med. 144: 358-369.
44. Rietschel, E.T., Hase, S., King, T. and J. Redmond. 1975. Chemical structure of lipid A. In: Microbiology Washington. D.C. p. 262-267.
45. Roux, K., McWilliams, Michael. and Phillips-Quagliata, J. 1977. Origin of IgA-secreting plasma cells in the mamary gland. The J. of exp. med. 146: 1311-1320.
46. Shands, J.W. 1971. The Physical structure of bacterial lipopolisaccharides. Chapter 3. Microbial. Toxins. Bacterial Endotoxins. Ed. George Weinbaum, - Salomon Kadis. Academy Press. N.Y. 4: 127-129.
47. Sippel, J.E., Mamay, H.K. and Weiss, J. 1978. Outer membrane protein antigens in enzyme linked immunosorbent assay for Salmonella enteric fever and Meningococcal meningitis. J. of Clin. Microbiol. Apr. p. 372-376.
48. South, M.A., Cooper, M.D., Wolheim, F.A. and Hong, R. 1966. The IgA system I. studies of the transport and immunochemistry of IgA in the saliva. J. - Exp. Med. 123:615.
49. Svannerholm, A.M., Holgram, J., Hanson, L.A. 1978. Parenteral cholera vaccination boosts a secretory IgA response. Scand. J. Immunol. In Press.
50. Tomassi, T.B., Tan, E.M. and Salamon, A. 1965. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. J. Exp. Med. 121: 101-104.
51. Voller, A., Bartlett, A. 1976. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. Journal of Clin, Path. 31:507-500.
52. Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. 1979. The enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatechlaboratories, Inc. p. 23-33.

52. Westphal, O. and Kaun, J. 1965. Bacterial lipopolisaccharides. Extraction with phenol-water and further application of the procedure. *Int Methods - in Carbohydrate Chemistry. General Polysaccharids*. Academy Press. N. Y. - and London. 5: 83-91.
53. Westphal, O. 1975. Bacterial Endotoxins. *Int. Archs. Allergy, Appl. Immunol.* 49: 1-43.
54. Williams, C.A., Jr. and Gabar, W. 1955. Immunoelectrophoresis. *J. Immunol.* 74: 150-397.
55. Williams, A.C. and Chase, M.W. 1977. *Methods in Immunology and Immunochemistry*. N.Y. Academic Press. 4: 26-32.