

17
21j



Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán

Obtención de un Conjugado Polivalente A-E para el
Diagnostico Presuntivo de Salmonella Mediante el
Uso de la Técnica Directa de Anticuerpos Fluorescentes

Tesis Profesional
Que para obtener el Título de
Química Farmaceutica Biologa

Presenta:
Rosaura Galindo Campos

Cuautitlán Izcalli. 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.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
Generalidades	1
Características generales del género Salmonella	1
Estructura Antígenica	3
Clasificación según el esquema de Kauffmann y White	9
Producción de sueros	10
Diagnóstico Microbiológico	13
Diagnóstico Inmunológico	14
Diagnóstico por la técnica de anticuerpos fluorescentes	15
Características de la técnica de anticuerpos fluorescentes	16
Condiciones de reacción de la técnica de anticuerpos fluorescentes	17
OBJETIVOS	20
METODOLOGIA	21
Obtención del antisuero	21
Conjugación del antisuero con Isotiocianato de fluoresceína	32
Evaluación del conjugado fluorescente	37
RESULTADOS	40
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53

I N T R O D U C C I O N

GENERALIDADES

Las infecciones gastrointestinales son conocidas como una de las entidades patológicas de mayor incidencia en el ser humano, independientemente de la edad del sujeto; aunque es preciso, asentar que en los países subdesarrollados es causa importante de muerte infantil. México no es la excepción y una de las primeras causas de consulta y hospitalización es la gastroenteritis, que además, ejerce su mayor impacto entre los niños menores de 5 años (10,24,29).

Por largo tiempo, se han reconocido como agentes causales de gastroenteritis aguda tanto a parásitos como a bacterias, entre estas últimas se encuentran *Shigella*, *Salmonella*, *Escherchia coli* y otros con menos frecuencia. Actualmente el número reconocido de agentes causales de diarrea ha aumentado notablemente (cuadro No. 1) (15,24,23,29,30).

Salmonella es uno de los agentes clásicos en la producción de diarrea, y las infecciones por esta se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo. Su incidencia es mayor en países y zonas de bajos recursos aunque, últimamente se ha observado un incremento en países industrializados debido aparentemente al mayor consumo de productos alimenticios de origen animal que son almacenados y luego distribuidos entre grandes núcleos de población (4,9,11,12,21,24,28,31,34).

La frecuencia con que se aísla *Salmonella* en coprocultivos de niños con diarrea, varía de 3.5 a 13.0%, según los años y las estaciones, un dato que puede explicar la gran incidencia de salmonelosis en nuestro medio es la alta proporción con que se aíslan en materias fecales de animales domésticos (9 a 10%).

Las medidas de control están encaminadas a la detección de las fuentes de contagio, de los transmisores y de los portadores asintomáticos. Además es fundamental el control sanitario de bebidas y alimentos, así como de las personas que los manejan (2).

CARACTERISTICAS GENERALES DEL GENERO SALMONELLA

El género *Salmonella* está compuesto por bacilos cortos, móviles (excepto *S. gallinarum* y *S. pullorum*), gram negativos, no esporulados, de longitud

Cuadro No. 1

Microorganismos causantes de Gastroenteritis

Agentes Clásicos	Nuevos Agentes
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> ^a
<i>Shigella</i> ^a	<i>Escherichia coli</i> -EPEC ^a
<i>Salmonella</i> ^{a,c}	(enterotoxigénica)
<i>Escherichia coli</i> -EPEC ^b	<i>Escherichia coli</i> -EPEC ^b
(serotipos enteropatógenos)	(enteroinvasiva)
<i>Staphylococcus aureus</i> ^c	<i>Yersinia enterocolitica</i> ^b
<i>Clostridium perfringens</i> ^c	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^b
<i>Entamoeba histolytica</i> ^a	<i>Aeromonas hydrophilia</i> ^b
	<i>Clostridium</i> ^b
	<i>Bacillus cereus</i> ^c
	Agentes <i>cereus</i> ^c
	<i>Rotavirus</i> ^a
	<i>Giardia lamblia</i> ^b
	<i>Cryptosporidium</i>

A ^aCausa de gastroenteritis

^bsolo en situaciones especiales, poco comunes

^cimportante en las intoxicaciones alimentarias

Jorge Olarte, 1985.

variable. No germentan la lactosa o sacarosa, a partir de glucosa producen ácidos y en ocasiones gas y además casi siempre producen H_2S . Tienen la propiedad de desarrollarse en presencia de sustancias como el Verde Brillante, Tetratiónato y el Desoxicolato sódico; sustancias que inhiben a otros microorganismos entéricos (2,13).

Sus principales reacciones y propiedades bioquímicas se encuentran enlistadas en la tabla No. 1.

ESTRUCTURA ANTIGENICA

Las salmonelas están constituidas por una serie de sustancias químicas - diversas, que van a formar la estructura celular de la bacteria.

Hay tres grupos de antígenos que son importantes para su clasificación:

Antígenos somáticos "O". - Los antígenos somáticos se encuentran localizados en el cuerpo o soma de la bacteria. Son antígenos termoestables que están compuestos de complejos fosfolípidos y polisacáridos. El análisis del antígeno "O" revela que está constituido de 60% de polisacárido, de 20 a 30% de lípidos y de 3.5 a 4.5% de hexosamina. Este antígeno es resistente al alcohol y ácidos diluidos. (2,14).

La hidrólisis ácida suave de los antígenos "O" determina la formación de - haptenos que reaccionan con los anticuerpos anti-R y anti-O. Por ello, parece que los determinantes antigénicos específicos "O" están localizados sobre una estructura química común. el antígeno R que es de hecho, el núcleo del antígeno "O" (7).

Las cadenas laterales terminales unidas a esta subestructura básica determinan tanto el gran número de reacciones como la especificidad de especie de los antígeno "O" en fase lisa.

La especificidad inmunológica de los antígenos "O" puede estar determinada por pequeñas diferencias estructurales en las cadenas laterales de polisacáridos, por lo demás idénticos (7).

Las diferencias que se han observado entre los antígenos estrechamente relacionados incluyen:

- 1).- Cambios de posición de los enlaces: por ejemplo 1-4 frente a 1-6.
- 2).- Alteración de las configuraciones anoméricas; por ejemplo α frente a β

Tabla No. 1
Reacciones Bioquímicas de Miembros del género Salmonella

Prueba o Substrato	Reacción	%	(%)	Prueba o Substrato	Reacción	%	(%)
H ₂ S (TSI)	+	91.6	(0.8)	Rafinosa	-	3.0	(0.3)
Ureasa	-	0.0		Rammosa	+	90.3	(1.1)
Indol	-	1.1		Malonato	-	0.5	
Rojo de metilo	+	100.0		Mucate	d	73.6	(1.3)
VP	-	0.0		Jordans tar-			
Citrato (Simmons)	d	80.1	(7.0)	trato	+/(+)	89.3	(1.2)
KCN	-	0.3	(0.3)	Acetato de			
Motilidad	+	94.6		sodio	d	80.0	(2.7)
Gelatina (22°C)	-	(1.1)		Maltosa	+	96.0	(1.3)
Descarboxilación				Xilosa	+	94.0	(0.6)
de lisina	+	94.6		Trealos	+	93.5	(1.1)
Hidrolación de				Celobiosa	d	6.5	76.4)
Arginina	+/(+)	58.5	(34.0)	Glicerol	d	4.5	(17.0)
Descarboxilación				Nitrato o			
de ornitina	+	92.7		Nitrito	+	100.0	
Acido de Glucosa	+	100.0		Oxidasa	-	0.0	
Lactosa	-	0.8		Salicin	-		(0.8)
Gas de glucosa	+	100.0		Inositol	d		(0.8)
Sucrosa	-	0.5		Sorbitol	+	94.1	(4.0)
Manitol	+	99.7		Arabinosa	+/(+)	89.2	(0.8)
Dulcitol	d	86.5	(2.7)				

+ positiva con 1 ó 2 días de incubación

(+) reacción positiva después de 3 ó más días

Ewing, W.H. 1986

- no hay reacción

d diferentes reacciones +, (+) -

Las fracciones entre parentesis indican reacción retardada

+/(+) La mayoría de las reacciones son retardadas y algunas ocurren en 1 ó 2 días.

- 3).- Unión de los monosacáridos adicionales, tales como la glucosa, en puntos diferentes de la secuencia repetida.
- 4).- Pérdida de uno de los monosacáridos en las unidades básicas trisacáridas o sustitución de uno de ellos.
- 5).- Presencia o ausencia de grupos acetilos en uno de los azúcares residuales.

Tales modificaciones pueden producirse fácilmente en los antígenos "O" conocidos de Salmonella (7).

Las determinantes de los grupos A, E, D y E, por ejemplo, contiene la secuencia repetida galactosil-manosil-ramnosa y se diferencian sólo en sus configuraciones anoméricas y en los monosacáridos unidos a los trisacáridos básicos (figura No. 1) (7).

Antígenos flagelares "H".- Estos antígenos son de naturaleza proteica, y como su nombre lo indica, son los constituyentes químicos de los flagelos de las bacterias. Son termolábiles, los aminácidos que contienen y el orden en que se encuentran determinan la especialidad. Los antígenos "H" son inactivados lentamente por alcohol. En algunas salmonelas este antígeno presenta la llamada variación de fase, por lo que se denominan difásicas, en otras, no se presenta esta variación y entronces reciben el nombre monotásicas (14).

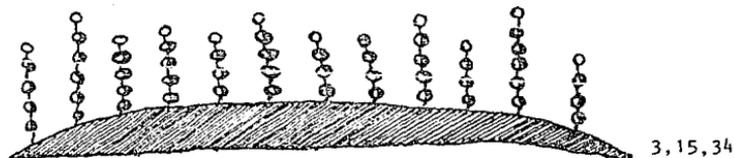
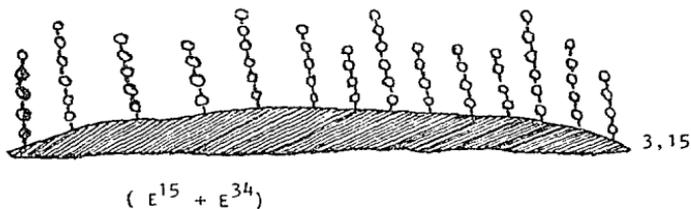
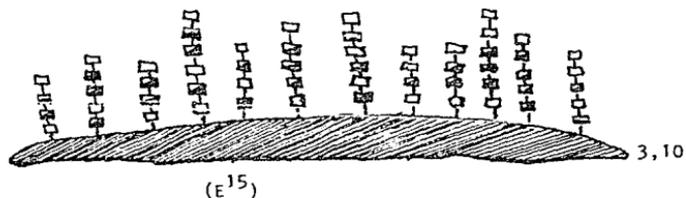
Los antígenos "H" que se encuentran en la primera fase se identifican con letras y se les denominan antígenos principales y los que se encuentran en la segunda fase se designan por números arábigos.

Antígenos de superficie "K".- Estos antígenos también se denominan capsulares, comprenden a los antígenos que se encuentran en la cápsula, o más apropiadamente, en los elementos de envoltura. Cuando se encuentran en cantidades suficientes en la superficie, este antígeno inhibe la aglutinación de suspensiones bacterianas, vivas o muertas, con su respectivo antisuero homólogo "O".

El antígeno K puede ser subdividido de acuerdo a sus características físicas y químicas. Muchas de las variedades del antígeno "K" no son destruidas por la acción del calor, sin embargo algunas características son alteradas por el calentamiento a diferentes temperaturas y período específico de tiempo. El antígeno "K" también es polisacárido. La reacción

Figura No. 1

Representación esquemática de los
antígenos O



□ = α-D-galactosil-D-manosil-L-ramnosa

○ = β-D-galactosil-D-manosil-L-ramnosa

△ = O-acetil

◁ = -D-glucosil

☛ = antígeno R subyacente contenido en el lipopolisacárido
de la pared celular

de aglutinación con este antígeno es lenta y los antisueros producidos tienen títulos bajos. Las principales clases de antígenos "K" que se encuentran en el género *Salmonella* son el antígeno "Vi" y el "M" (2,14).

El antígeno "Vi" fue descrito primeramente por Felix y Pitt, resulta fundamental para aclarar la serología de *Salmonella typhi*. Se destruye por calentamiento a 60°C por una hora, o bien por ácidos y fenol a determinadas concentraciones.

El antígeno "M" o mucoide es otra clase de antígeno "K" que se encuentra en las salmonelas, debido a que alguna fracción de este antígeno es común para muchas salmonelas, no se ha utilizado de manera general para su diferenciación (2).

VARIACION ANTIGENICA

La serología de *Salmonella* está sometida a grandes variaciones y no a estructuras antigénicas rígidas como ocurre con otras bacterias.

Puesto que la clasificación de *Salmonella* depende del entendimiento y reconocimiento de los cambios a que los organismos son sujetos, es necesario enumerar y discutir estos fenómenos (2).

Algunas de las variaciones que se pueden distinguir en el género *Salmonella* son:

Variación de antígeno "H" a "O". - Se ha conocido por muchos años que el tipo de reacción de aglutinación dado por cultivos móviles e inmóviles de la misma bacteria es diferente. Smith y Reagh (1903) y Beyer (1904) reportaron que cultivos de *S. cholerae - suis* dieron una aglutinación flocular y que variantes no móviles produjeron agregados granulares. En la examinación serológica de cepas de *Salmonella* es absolutamente esencial la distinción entre el antígeno H (flagelar) y el antígeno O (somático) y distinguir las reacciones dadas por sus correspondientes aglutininas.

La variación "H" a "O" consiste en el desarrollo de formas no móviles o mutantes de un cultivo móvil. El material genético es aparentemente el responsable del desarrollo del sistema de enzimas que sintetiza la flagelina, si es perdido o alterado de algún modo, resulta en la producción de formas inmóviles (2,14).

Variación de forma S a R.- Es el cambio en la morfología y características de las colonias: de lisas a rugosas. Esto ocurre gradualmente y existen grados intermedios de rugosidad en la transición de formas lisas (S) a rugosas (R). Estos cambios en la morfología de las colonias están relacionados con alteraciones en las características de crecimiento y estabilidad en suspensiones salinas (14).

Esta variación trae consigo cambios antigénicos importantes ya que, los antígenos de las formas "R" difieren de los que se encuentran en las formas "S"

Variación de antígeno "Vi" (Variación V - W).- En este cambio solo afecta al antígeno "Vi". Kauffmann (1935) nombró a las colonias que poseían el antígeno "Vi" colonias V, y a las que carecen de él colonias W. Las colonias V son aglutinables con el antisuero "Vi" pero no con el antisuero "O". La determinación del antígeno "Vi" es importante en el caso de Salmonella typhi (2,14).

Variación de forma.- Esta es una variación cuantitativa en la cantidad de antígeno "O" presentes en la progenie de una especie (2).

Variación de Fase.- El antígeno "H" o flagelar contiene varias constituyentes inmunológicas de tal manera que en una sola especie puede haber 1, 2 ó más antígenos H. Estos antígenos flagelares pueden también presentarse en una o en las dos formas llamadas fase 1 y fase 2. La fase 1 es compartida solamente por muy pocas especies y es extraordinariamente específica.

La fase 2 es compartida por muchas especies y es principalmente inespecífica. Los microorganismos cambian de una fase a otra siendo llamada esta mutación variación de fase (2).

Muchos serotipos bacterianos del género Salmonella puede expresar alternativamente uno o otro de dos tipos flagelares antigénicos diferentes, llamado fase 1 y fase 2. Los genes estructurales que determinan la producción de antígenos como H₁, en todos estos organismos, aunque los flagelos de fase 1 de muchos serotipos son antigénicamente diferentes de los flagelos de fase 1 de otros serotipos. Se considera que estos determinantes genéticos de la producción de antígenos flagelares de fase 1, están consti-

tuidos por una serie de genes alélicos (o sea formas alternas del mismo gen) en forma semejante, los antígenos flagelares de la fase 2 de diferentes tipos son antigenicamente diferentes pero ocupan un locus cromosómico común llamado H_2 . El locus H_2 no está ligado genéticamente al locus H_1 . En cualquier cepa de Salmonella cuando los genes H_2 son activos en la síntesis de flagelos de fase 2, la actividad de los genes H_1 se reprime y viceversa (37).

La frecuencia con la cual se reproducen variaciones de fase 1 a fase 2, o al contrario difiere de cepa a cepa pero puede alcanzar hasta 10^{-3} .

Aunque el mecanismo que afecta esta regulación no es enteramente claro - los datos genéticos indican que está involucrado un sitio de regulación o de control en el locus H_2 o cerca de él.

Se ha sugerido que esta región de control es un elemento IS que regula la transcripción del operon H_2 , el cual codifica no solo antígeno o antígenos de fase 2, sino también a un represor que actúa sobre el operon H_1 .

Los elementos pueden insertarse en cualquiera de las dos orientaciones - dentro de un segmento de DNA (37).

Cambios antiqénicos producidos por bacteriófagos. - En la actualidad se sabe que los virus que infectan a bacterias (bacteriófagos) son capaces de producir cambios de forma, crecimiento y antigenicidad de las enterobacterias en general y, por lo tanto, en Salmonella. Son capaces de afectar a los tres tipos de antígenos, pudiendo transmitir propiedades fisiológicas e inmunológicas nuevas (2).

Las características generales de los antígenos "O", "H" así como uso y producción de antisueros preparados con miembros del género Salmonella - (14).

CLASIFICACION DE LAS SALMONELAS SEGUN EL ESQUEMA DE KAUFFMANN Y WHITE.

La complejidad antigénica de los bacilos entéricos ha sido puesta de manifiesto en el género Salmonella. En gran parte como resultado de los estudios sistemáticos de Kauffmann y White se han identificado aproximadamente 1000 variedades de relación con los antígenos específicos "H" - "O" y "Vi" identificados por medio de pruebas serológicas. Los nombres

de cada una de las especies están dados en el esquema de Kauffmann y White por su estructura antigénica (7)..

Sin embargo, muchos de los antígenos presentan reacciones cruzadas entre - si, indicando que sus determinantes polisacáridos poseen grupos reactivos comunes. En relación con la existencia de estas reacciones cruzadas Kauffmann y White han clasificado a las salmonelas en grupos mayores, designados con letras (A al I) (7).

Más del 95% de las cepas de Salmonella aisladas a partir de las fuentes - naturales se hallan dentro de los primeros 5 grupos (A al E). En este esquema los determinantes antigénicos "O" son designados por números. Debe observarse que todas las especies de un determinado grupo poseen como mínimo un determinante principal de grupo. Pueden hacerse divisiones adicionales en estos grupos, en relación con los determinantes secundarios - "O" (7).

Los miembros de cada grupo establecido en relación con los antígenos "O" pueden subdividirse en especies, según sus antígenos flagelares "H". Una cepa dada puede elaborar en momentos diferentes cada uno de los dos tipos de antígenos "H". Los del primer tipo, denominados antígenos flagelares de la fase 1, son indicados con letras minúsculas y solo se comparten con pocas especies de salmonela; el segundo tipo, antígeno de fase 2, es menos específico son indicados por números.

En el esquema de Kauffmann y White, la elaboración del antígeno "Vi" por una determinada especie se indica con la letra Vi, situadas convencionalmente después de los números que indican los distintos antígenos "O" - (tabla No. 2) (7).

PRODUCCION DE SUEROS

La producción de un suero anti"O" que contenga solo aglutininas para el antígeno termoestable se puede realizar mediante el calentamiento a - - 100°C de un caldo de cultivo con el organismo mediante un baño María o - un autoclave por dos horas y de esta manera son inactivados los antígenos "H". Después que los cultivos son calentados, estos pueden ser preservados con formalina al 0.3%. Los conejos son inyectados vía intravenosa - bajo un programa de inmunización y de esta forma se obtiene el antisuero (hoja 25) (14).

Tabla No. 2
Salmonelas más frecuentemente aisladas tal como aparecen
en el esquema de Kauffmann y White.

Grupo	Tipo	Antígeno O	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
A	<i>S. paratyphi-A</i>	1,2,12	a	-
B	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12	i	1,2
	<i>S. paratyphi-B</i>	1,4,5,12	b	1,2
	<i>S. derby</i>	1,4,5,12	f,g	-
C ₁	<i>S. paratyphi-C</i>	6,7,Vi	c	1,5
	<i>S. infantis</i>	6,7	r	1,5
	<i>S. oranienburg</i>	6,7	m,t	-
C ₂	<i>S. newport</i>	6,8	e,h	1,2
D ₁	<i>S. enteritidis</i>	1,9,12	g,m	-
	<i>S. typhi</i>	9,12,Vi	d	-
	<i>S. gallinarum pollorum</i>	1,9,12	-	-
E ₁	<i>S. anatum</i>	3,10	e,h	1,6
	<i>S. london</i>	3,10	i,v	1,7
E ₄	<i>S. senftenberg</i>	1,3,19	f,g,t	e,n,z,15
G ₁	<i>S. pomona</i>	13,22	z	1,6

El suero anti''0'' es usado en aglutinación en placa para identificar a los antígenos termoestables de la bacteria. La suspensión antigénica para esta prueba puede ser preparada por emulsificación de crecimiento de placas de cultivo en 0.5 ml. de solución salina fenolizada para formar una solución densa.

El suero anti''0'' diluído con solución salina y la dilución depende del título de cada suero, pues cada antisuero nuevo es preparado y titulado con su suero homólogo y es usado en la más alta dilución en que da una reacción de aglutinación fuerte dentro de 30 a 60 segundos (14).

Es posible observar aglutinación cruzada entre serotipos que poseen antígenos ''0'' relacionados. Por esta razón un organismo que tiene los antígenos 4,5,12 puede ser aglutinado no solo por el antisuero derivado de un organismo con idénticos antígenos ''0'', sino que también por un antisuero que contiene aglutininas para los antígenos 4,12,27 puesto que los antígenos 4 y 12 son comunes a ambos serotipos. Por esta razón es necesario usar antisueros adsorbidos para determinar si algún cultivo desconocido tiene algún antígeno en común. Como se mencionó en párrafos anteriores más del 95% de las salmonelas aisladas del hombre y animales menores son miembros de los primeros 5 grupos (A al E) del género Salmonella, por esta razón es importante producir un suero polivalente que contenga aglutininas ''0'' para los antígenos ''0'' poseídos por los miembros de estos cinco grupos, se puede producir un antisuero polivalente que contenga aglutininas contra los antígenos 1 al 10,12,15 y 19 con cultivos lisos de S. paratyphi-A, S. paratyphi-B, S. thompso, S. newport, S. typhi, S. London, S. newington y S. senftenberg.

La suspensión del antígeno se prepara de cada uno de los 8 cultivos, utilizando el mismo método para la producción de antisuero de grupo y mezclando cantidades iguales de cada uno para preparar la vacuna (14).

Los antígenos flagelares de Salmonella son determinados por el uso selectivo de antisueros preparados contra los antígenos ''H'' que poseen los diferentes grupos de Salmonella.

Los antígenos utilizados en la producción de antisueros ''H'' son caldos de cultivo móviles inactivados por medio de la adición de un volumen igual de solución salina conteniendo 0.6% de formalina. Es de gran importancia que solo se utilicen formas con extremada movilidad para la preparación del antígeno ''H'' puesto que este antígeno está asociado con el flagelo de la bacteria y es necesario una actividad móvil para tener una máxima pro-

ducción de antígenos "H" (14).

Los antisueros contra antígenos "H" se utilizan para la identificación preliminar y confirmatoria de los microorganismos.

Estos antisueros son aplicados en la prueba de aglutinación en tubo (14).

En cuanto a la producción del antisuero contra el antígeno "Vi" es necesario que el antígeno se encuentre en la forma Vi.

Cualquier bacteria que posea el antígeno "Vi" puede ser usada en la producción del antisuero. Peloffo (1941) mostró que el antígeno "Vi" no es inactivado por el tratamiento con alcohol absoluto y propuso que el antígeno - para la producción del antisuero "Vi" fuera preparado resemebrando el crecimiento de cultivos puros suspendidos en alcohol absoluto y deshidratando - la bacteria. Este tratamiento inactiva a los antígenos "H". El polvo resultante se suspende en solución salina justamente antes de utilizarse. Algunos autores utilizan la forma "Vi" de Citrobacter 029 (14).

DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

El diagnóstico definitivo de cualquier infección por Salmonella se realiza mediante su aislamiento de muchos de los productos patológicos que se remiten al laboratorio como son los alimentos, sangre, heces, orina, etc(13)

En lo que se refiere al diagnóstico Microbiológico se utilizan medios de enriquecimiento, como el caldo tetracionato o caldo selenito, que son - medio inhibitorios de las bacterias intestinales normales y permiten la multiplicación de las salmonelas. Después de una incubación de 1 a 2 - días a 37°C, se transfiere una alícuota a placas de medios diferenciales y selectivos, o bien es posible examinar los tubos de enriquecimiento por inmunofluorescencia directa, sobre todo en alimentos, con el objetivo de realizar una identificación presuntiva (13).

En cuanto a los medios diferenciales como son el agar Verde Brillante, - MacConkey o de Desoxicolato permiten poner de manifiesto rápidamente a microorganismos no fermentadores de la lactosa como son Salmonella y - Shigella (2,13).

Los medios selectivos como son Verde Brillante y Sulfito Bismuto, favorecen el crecimiento de salmonelas sobre el de los organismos coliformes - (2,13).

Las colonias lactosa negativas que aparecen después de la incubación son

seleccionadas para realizar pruebas bioquímicas TSI, LIA y MIO, finalmente de aquí se seleccionan las bacterias sospechosas de ser salmonela para realizar la prueba de aglutinación en placa y tubo con sueros específicos tanto somáticos como flagelares para determinar el bioserotipo (13).

DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

Aunque el diagnóstico definitivo en la fiebre tifoidea requiere el aislamiento e identificación de Salmonella thphy en diferentes materiales biológicos, estos procedimientos necesitan 2 a 3 días y son, por lo tanto, - útiles para el diagnóstico de anticuerpos contra antígenos "O" de Salmonella, son de gran valor como medios para establecer un diagnóstico de probabilidad y, consecuentemente, la posibilidad de iniciar la terapéutica - antimicrobiana antes de la confirmación bacteriológica.

Actualmente existen varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra antígenos "O" de Salmonella:

- a).- La reacción de Widal que ha sido utilizada desde 1896 pero que posee varias desventajas, como variabilidad en relación con la preparación del antígeno, la técnica de cada laboratorio y personal técnico (25).
- b).- El método de hemaglutinación pasiva que como la reacción de Widal, detecta perfectamente anticuerpos pertenecientes a las inmunoglobulinas M más que inmunoglobulina G.
- c).- La prueba de fijación de superficie que ha sido propuesta como un método más digno de confianza comparado con la hemaglutinación pasiva y la reacción de Widal (sin embargo no ha sido aceptado universalmente por su falta de estandarización, lo que provoca variabilidad en los resultados obtenidos en diferentes laboratorios).
- d).- El ensayo enzimático inmunoespecífico (ELISA) descrito por Carlsson para la identificación de Anticuerpos contra antígenos "O" de Salmonella. Aunque los resultados preliminares demostraron que ELISA es específico y de alta sensibilidad, no han sido establecidos los

títulos de anticuerpos con significado clínico.

En los últimos años se estudia la utilidad de un sistema de contraelectroforesis (CIE) para la identificación de anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) de los antígenos somáticos de *S. typhi*, estandarizada con base en la concentración de carbohidratos del LPS (25,31).

Es importante mencionar que ningún método serológico ofrece, por sí mismo pruebas suficientes para determinar si un paciente sufre una infección de terminada, ya que la existencia de anticuerpos séricos sólo indica que el sujeto ha sido estimulado para producirlos, ya sea como resultado de una infección pasada o presente, como resultado de vacunación o por reinfección, subclínica y, en ocasiones, estas circunstancias pueden condicionar una elevación en el título de anticuerpos semejantes al observado durante el curso de la enfermedad (2,25,31).

DIAGNOSTICO POR LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

La técnica de anticuerpos fluorescentes (AF) es de gran valor cuando se usa para la detección rápida de *Salmonella*, este método acorta el procedimiento produciendo una importante reducción de tiempo y, además, con un costo significativamente menor. Por ejemplo, en la industria alimenticia los productos son muestreados para determinar si están contaminados por *Salmonella*, los procedimientos de cultivo estandar pueden requerir de 5 a 9 días y según fue estimado en 1971 tener un costo entre 5 a 7 dolares por muestra, además el costo de prórroga y almacenamiento de muestra, es incremento proporcionalmente con el transcurso del tiempo durante la prueba (4,5,21, 28,34).

El método de AF introducido por Coons emplea globulinas sericas marcadas con colorantes fluorescentes para localizar el antígeno correspondiente y se ha utilizado con diversas modificaciones para la identificación y visualización de bacterias virus, protozoos, hongos, antígenos de tejidos normales y también para la detección y caracterización de anticuerpos séricos; estas técnicas son un instrumento muy útil en el laboratorio clínico de Microbiología (28,34,36).

Esta técnica fue aplicada por primera vez para la identificación de *Salmonella* durante un estudio realizado por Thomason y colaboradores en 1957,

donde se demostró que los antígenos "O", "Vi" y "H" de Salmonella Typhi pueden ser coloreados individual o colectivamente por el uso de anticuerpos específicos marcados con fluoresceína (4,6)

La técnica de AF directa utilizada para la detección de Salmonella en alimentos fue adoptada por la Asociación Oficial de Químicos Analistas en 1975, ya que tienen algunas ventajas sobre el método convencional de cultivo, pues no es necesario el aislamiento de cultivos puros y los resultados pueden ser obtenidos después de 50 a 55 horas de muestreo (4).

CARACTERÍSTICAS DE LA TÉCNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

El método de anticuerpos fluorescentes combina la sensibilidad y especificidad de la inmunología con la precisión de la microscopía (28).

Especificidad.- El anticuerpo con el cual el colorante fluorescente es conjugado, es una proteína que tiene una alta especificidad reactiva para el antígeno homólogo que se busca, por lo tanto, el anticuerpo solo debe reaccionar con el antígeno de la bacteria, virus, tejido celular etc. para el cual fue preparado (10,28).

Rapidez.- El procedimiento de marcado y examinación microscopía puede ser completado en una o dos horas.

Sensibilidad.- La sensibilidad de esta técnica es alta y puede ser determinada exactamente porque la fuerza de la fluorescencia específica puede ser medida cuantitativamente (28).

En esta técnica un anticuerpo fluorescente potente y específico es muy necesario, por lo tanto, el antisero de partida debe contener un título alto y además debe contener poco o nada de anticuerpos contra el tejido normal (6).

Colorantes.- La intensidad de la fluorescencia es determinada por la absorción característica en amplitud de excitación y eficiencia no es suficiente para que un colorante sea efectivo.

Idealmente un colorante debe conjugarse rápida y firmemente con el anticuerpo, además, tener una buena eficiencia de fluorescencia y suficiente estabilidad (28,36).

Cuando se inició el desarrollo de la técnica de AF (1950) la atención de los investigadores se enfocó principalmente al descubrimiento de los

colorantes que cumplieron las condiciones anteriores. El isocianato de fluoresceína, fue el primer colorante que utilizó Coons y otros investigadores, y encontraron que la conjugación fue irregular y ocasionalmente acompañada por desnaturalización del anticuerpo y reducción de su actividad. Además, el proceso mismo de marcado, resultó difícil de manejar. Con el propósito de vencer estas dificultades se realizó una búsqueda intensiva de otros colorantes (28).

Riggs y sus colaboradores (1958) fueron capaces de sintetizar Isotiocianato de fluoresceína (FITC), en el cual el grupo Isotiocianato sustituyó al cianato en la molécula de tiocianato de fluoresceína (figura No.2) Este colorante con fuerte fluorescencia verde amarillenta, cumple todas las condiciones requeridas por la técnica de AF, y es considerado el responsable del posterior desarrollo y refinamiento de la técnica de anticuerpos fluorescentes (17,28,36).

Posteriormente se descubrió otro colorante fluorescente DANS (ácido 1-dimetilamino-naftalen-5-sulfónico), con fluorescencia amarilla, pero tiene las desventajas de tener una eficiencia baja al ser comparado con FITC y el ser raramente utilizado (36).

Cuando se requiere usar una coloración de contraste se pueden usar otros colorantes fluorescentes rojos como la Rodamina y otros de su serie, sin embargo, su eficiencia fluorescente y el marcado específico es bajo (17, 28,33).

Las proteínas contienen distintos grupos químicos que pueden unirse con los fluorocromos, los grupos amino libres y carboxilo terminal de cada cadena de proteína pueden reaccionar con estos colorantes, además existen grupos amino libres de la lisina que se encuentran al lado de la cadena, así como varios grupos carboxilo terminal en los ácidos aspártico y glutámico residuales (36).

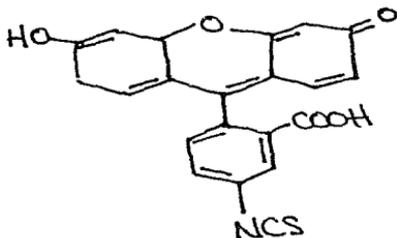
CONDICIONES DE REACCION DE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

La dilución del anticuerpo fluorescente, tiempo y temperatura de marcado, pH del buffer salino y el lavado se checa cuidadosamente (32,36).

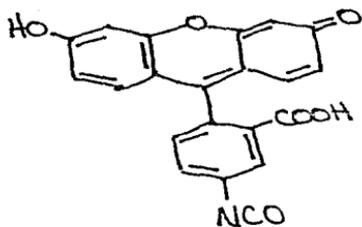
El título del conjugado se determina con el antígeno homólogo, también su habilidad para marcar antígenos relacionados se determina con antígenos heterólogos. Generalmente se prepara una serie de diluciones dobles del conjugado en solución salina y se marcan las muestras apropiadas.

Figura No. 2

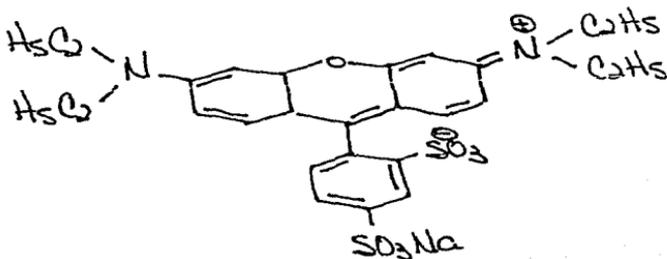
Estructura Química de algunos colorantes
Fluorescentes.



Isotiocianato de Fluoresceína



Isocianato de Fluoresceína



Tetraetil Rodamina

Akiyoshi Kawamura, 1969.

La dilución de trabajo del anticuerpo debe tener de 2 a 4 unidades de coloración (28).

Para medir la especificidad de la técnica de anticuerpos fluorescentes se requiere de los siguientes controles:

Como antígenos, tejidos no tratados o no infectados, tejidos fijados no coloreados, ninguno de estos controles debe mostrar fluorescencia al microscopio. Además de la utilización de anticuerpos heterólogos en la coloración con los cuales no se debe presentar fluorescencia (28).

O B J E T I V O S

- Obtener un suero polivalente para la identificación de microorganismos del género *Salmonella* de los grupos A al E.
- Preparar un conjugado fluorescente para la identificación presuntiva - de las salmonelas que pertenecen a los grupos A al E.
- Mediante la utilización de heces determinar si el conjugado fluorescente es capaz de detectar *Salmonella* y diferenciarla de otras enterobacterias.
- Determinar la correlación entre la técnica de anticuerpos fluorescentes y un método convencional de cultivo para el diagnóstico presuntivo de *Salmonella* a partir de muestras de heces.

M E T O D O L O G I A.

I.- OBTENCION DEL ANTISUERO.

Para producir el antisuero contra los primeros 5 grupos de Salmone-
lla (del A al E) se utilizaron cultivos lisos de S. paratyphi-A, -
S. paratyphi-B, S. tompson, S. newport, S. typhi, S. london, - - -
S. newingron y S. sentenberg (figura No. 3 (14)).

II. a).- Aspecto liso de los colonias al ser observadas al microscopio -
Inocular cada uno de los cultivos por estria curzada en platos
con base de agar sangre (BAB) e incubar durante 18 a 24 horas.
Observar el crecimiento de cada uno de los cultivos al microscopio
estereoscópico y seleccionar 4 colonias lisas de cada uno -
de ellos. Las colonias deben ser circulares, tener bordes ente-
ros y superficie regular, si no son así, se descartan. Inocular
cada una de las colonias seleccionadas en un tubo con 10 ml. de
caldo soya tripticasa (TSB) y en un tubo con 5 ml de base de -
agar sangre inclinado (14, 34).

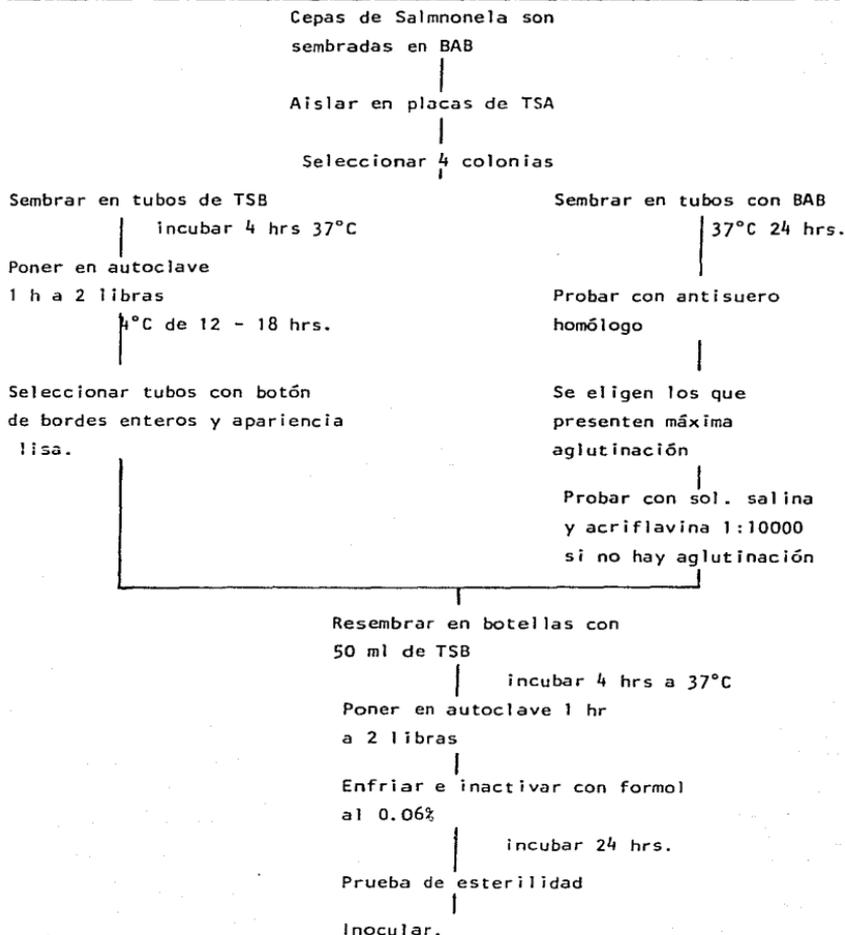
I.1.b).- Formación de botón en caldo soya tripticas.- Incubar los tubos
de TSB ya inoculados durante 4 horas en 37°C posteriormente ca-
lentar a 100°C por una hora y refrigerar a 4 C de 18 a 24 ho-
ras. Al finalizar este período los tubos que contienen a cul-
tivos lisos deben formar botones de sedimentación circulares y
con bordes regulares, los que no los formen así son rugosos y
se descartan (14).

I.1.c).- Aglutación con su suero homólogo, solución salina, suero nor-
mal y conejo y solución de acriflavina.- Este examen se reali-
za con el fin de detectar aglutininas contra Salmonella en el
suero al ser enfrentado con diferentes serotipos de Salmonella,
ésta técnica se realiza como se describe a continuación:

1).- Utilizar placas de vidrio marcadas en cuadros de una pulgada (figu

Figura No. 3

Preparación del antisuero polivalente A - E



ra No. 4).

- 2.- Preparar una solución densa de los antígenos a probar (esta solución se obtiene del crecimiento de los tubos de BAB inclinando que fueron incubados a 37°C por 24 horas y resuspendido en 0.5 ml de solución - salina 0.85% estéril).
- 3.- Colocar 0.1 ml de la dilución del antisuero homólogo de referencia - en los rectángulos. Para cada antígeno utilizado colocar 0.01 ml de solución salina, 0.01 ml de solución de acriflavina a una concentración final de 1:10000 y 0.01 ml de suero normal de conejo (controles)
- 4.- Adicionar una gota del antígeno o probar al antisuero que se encuentra en el protaobjetos y a los controles, mezclar con asa, mover las placas durante un minuto y leer la reacción de cruces.
- 5.- Las mezclas son observadas con ayuda de una lámpara y los grados de aglutinación presentados son reportados como sigue:
 - 4+ = 100% de las bacterias aglutinadas
 - 3+ = 75% de las bacterias aglutinadas
 - 2+ = 50% de las bacterias aglutinadas
 - 1+ = 25% de las bacterias aglutinadas

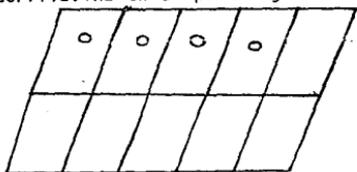
Los cultivos lisos deben aglutinar con su suero homólogo y dar reacción negativa con solución salina, acriflavina y suero normal de conejo, seleccionar los cultivos lisos que den una glutinación de 4+ con su suero homólogo (34,35).

- 1.2.- Preparación de la vacuna.- Inocular botellas que contengan 50 ml de TSB e incubar a 37°C durante 4 horas con el cultivo seleccionado de cada seotipo de Salmonella.
 - Calentar las botellas a vapor fluente (100°C) por una hora.
 - Adicionar 0.3 ml de formalina a cada botella y refrigerar a 4°C durante 24 horas.
 - Realizar una prueba de esterilidad a cada uno de los antígenos, - inoculando 1 ml de cultivo formalizado en una placa de BAB, incu-

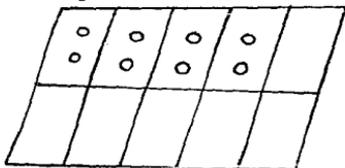
Figura No. 4

Técnica de Aglutinación en placa.

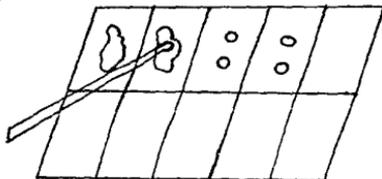
- 1).- Colocar 0.01 ml de suero de referencia, solución salina suero normal y acriflavina en el protaobjetos.



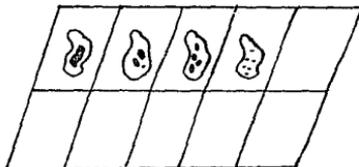
- 2).- Adicionar 1 gota del antígeno a probar



- 3).- Mezclar con asa



- 4.- Leer la reacción



bar a 37°C por 24 horas, no debe haber crecimiento, de lo contrario se deja inactivar otras 24 horas a 4°C.

Cuando todos los cultivos den prueba de esterilidad negativa preparar la mezcla antigénica con cantidades iguales de los 8 cultivos (14).

- 1.3.- Inmunización.- Seleccionar 5 conejos cuyo peso fluctuó entre - - 2.5 - 4 kg y fueron inmunizados de acuerdo al siguiente esquema - de inmunización.

Calendario de Inmunización

Día	Vía de inoculación	Volúmen de inoculación	Sangría
1	Intra venosa	0.5 ml	-
5	Intra venosa	1.0 ml	-
9	Intra venosa	2.0 ml	-
13	Intra venosa	3.0 ml	-
17	Intra venosa	4.0 ml	-
20		-	Sangría de prueba
21	Intra venosa	4.0 ml	-
28		-	Sangría total

Después de la quinta inoculación realizar una sangría de prueba y determinar el título de anticuerpos homólogos en el suero para cada uno de - los antígenos, y en cada uno de los conejos inmunizados. Utilizando la técnica de aglutinación en placa descrita en el párrafo 1.1.c.

Si el título es menor de 1:4 es necesario, administrar una sexta inoculación aumentando al doble la cantidad de antígeno de la especie de salmonela que se encuentre baja en título. Sangrar los conejos 7 días después de la última inmunización (14).

- 1.4.- Evaluación del suero.- Preparar los antígenos de evaluación de - la misma forma como se describe en el párrafo 1.1.c. con la colección de cepas proporcionadas por el Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales.
- Realizar diluciones del suero hiperinmune en solución salina fisiológica estéril (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64).
- En una placa para titulación colocar una gota del antígeno de evaluación y una gota de cada dilución del suero, mezclar con asa de platino.
- Agitar las placas durante 30 a 60 segundos y observar si existe - aglutinación. Determinar el título del antisuero en la dilución - más alta en la cual el suero presenta una fuerte reacción con el - antígeno de 3 a 3+) (14,34,35).
- 11.- Purificación de Gamma Globulinas con Sulfato de Amonio.- La precipitación de la gamma globulina por este método se debe al fenómeno de "salting out", el cual consiste en que las moléculas de agua - que solvatan a la molécula de anticuerpo son desplazadas por los - iones sulfato y amonio, que además neutralizan los grupos cargados de la proteína, la cual llega a su punto isoeléctrico y precipita
- Reactivos:
- 1).- Sulfato de Amonio saturado (SAS)
 - a).- Disolver por calentamiento 54g de sulfato de amonio en 100 ml de agua destilada.
 - b).- En el momento de ser utilizada esta solución ajustar a pH - 7.0 con Hidróxido de amonio 1N
 - 2).- Solución salina 0.85%
 - a).- Disolver 8.5g de cloruro de sodio en un litro de agua destilada.
 - b).- Ajustar a pH 7.-
 - 3).- Solución salina amortiguada de Forfatos pH 7.0 (PBS).

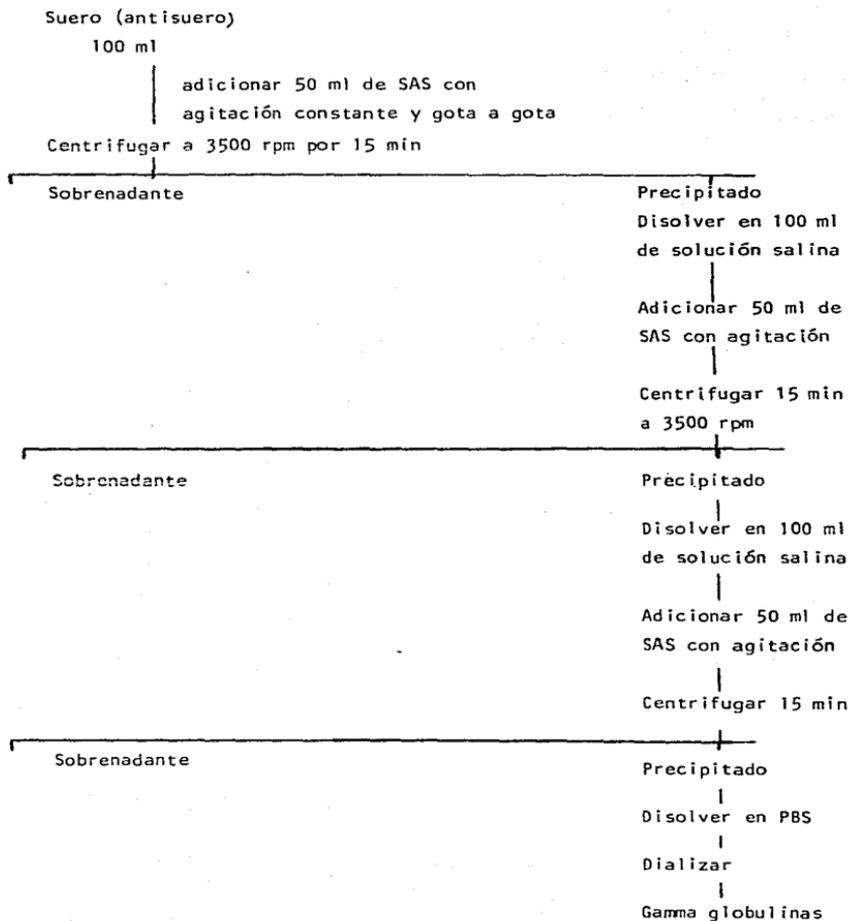
- a).- Disolver 1.4g de Na_2HPO_4 en 100 ml. de agua destilada
- b).- Disolver 1.4g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100 ml. de agua destilada.
- c).- Adicionar a la solución (a) la cantidad suficiente de (b) para alcanzar el pH 7.0 adicionar 8.5g de cloruro de sodio y -
aforar a 1 litro.

- 4).- Cloruro de Bario al 5%
Disolver 5g de cloruro de bario en 100 ml de agua destilada.

Metodología:

- 1.- Ajustar a pH 7.0 el suero antes de adicionar SAS
- 2.- A 20 ml de suero hiperimmune agregar, 100 ml de SAS gota a gota y con agitación constante.
- 3.- Dejar en agitación constante durante 15 minutos.
- 4.- Centrifugar a 3,000 rpm durante 20 minutos.
- 5.- Decantar el sobrenadante y disolver el precipitado en 200 ml. de solución saturada de sulfato de amonio.
- 6.- Repetir los pasos 1, 2, 3, 4, y 5 en dos ocasiones más
- 7.- Disolver el último precipitado en 20 ml de solución salina pH 7.0
- 8.- Colocar esta solución en un tubo de diálisis
- 9.- Dializar en un buffer de fosfatos pH 7.0 a 4°C, cambiando el buffer frecuentemente. (figura No. 5)
- 10.- En cada cambio de buffer determinar si el dializado contiene sulfatos por medio de la adición de una solución de cloruro de bario al 5% al dializado. Si aparece un precipitado blanco continuar - dializando.

Figura No. 5
Fraccionamiento del Suero



- 11.- Si no aparece el precipitado, retirar la globulina del tubo de dialisis y centrifugar a 7,000 rpm durante 15 minutos y desechar el sedimento.
- 12.- Determinar la cantidad de proteínas por el método de Biuret y realizar inmunolectroforesis para verificar la pureza de la fracción obtenida (19,27).

11.2. Determinación de proteínas por el método de Biuret.

La reacción de Biuret se basa en que al reaccionar un reactivo alcalino de cobre con una sustancia que contiene dos o más enlaces peptídicos, se produce color azul violeta debido al complejo que se forma entre el ion cúprico y dos enlaces peptídicos adyacentes.

Reactivos:

Tratado de sodio y potasio	- - - - -	9g
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- - - - -	3g
KI	- - - - -	5g
NaOH 0.2N libre de carbonatos		

Disolver el tratado en 400 ml de NaOH y aquí disolver el $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pulverizado) ya disuelto adicionar KI y llevarlo a 1 lt. con NaOH 0.2N libre de carbonatos.

Preparar la curva patrón se procedió de la manera siguiente:

- 1.- Disponer de una solución patrón que contenga 10 mg/ml de albúmina.
- 2.- Preparar una serie de tubos que contengan cantidades crecientes de solución patrón de albumina, como se muestra en el cuadro siguiente además de un tubo blanco que contiene todos los reactivos menos la proteína.
- 3.- Debe ser respetado el orden de adición de los reactivos
- 4.- Mezclar y calentar a 50°C por 15 minutos para desarrollar el color.
- 5.- Leer las absorbancias del tubo 2 al 7 contra el blanco a 540 nm.

6. Se traza la curva patrón con la densidad óptica (D.0) vs concentración de la muestra.
- 7.- A 1 ml de la muestra adicionar 2.5 ml de NaCl 0.9% y 1.5 ml de reactivo de Biuret, leer e interpolar en la curva para conocer la concentración (1).

Curva Patrón

Reactivos	Num. de Tubos						
	1	2	3	4	5	6	7
ml de muestra	-	-	-	-	-	-	-
Albúmina 10 mg/ml	-	0.1	0.2	0.5	1.0	1.4	
NaCl al 0.9% ml	3.5	3.4	3.3	3.0	2.5	2.1	2.5
Reactivo de Biuret	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

11.3.- Inmunolectroforesis.

Los diversos componentes electroforéticos de una mezcla de proteínas, como el suero, son separados primero mediante su carga eléctrica y difunden a distintas velocidades formando diferentes bandas en el gel que al ser enfrentadas con el antisuero este se difunde a través del gel y aparecen líneas de precipitación como en la placa de Ouchterlony, en los puntos donde se encuentra la proteína antigénica

Material:

Agarosa

Buffer de Barbituratos

Solución salina al 0.85%

Glicerina

Merthiolate

Colorante Rojo de Ponceau

Portaobjetos 26 x 76 mm y 1.1 a 2 mm de espesor

Cámara de electroforesis

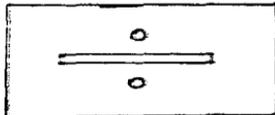
Metodología:

Disolver por medio de calentamiento 1.6g de agarosa en 100 ml de Buffer de Barbituratos diluida 1:5 en agua destilada.

Agregar tres gotas de glicerina y una gota de merthiolate en una dilución final de 1:10000.

Colocar los portaobjetos con agarosa en una cámara húmeda hasta el momento de utilizarlas.

Hacer las perforaciones en las placas como lo indica la siguiente figura y colocar 20 μ l de la solución de globulinas obtenida en los orificios laterales.



Colocar las placas en la cámara electroforesis que contiene Buffer de barbituratos.

Aplicar 40 volts por placa durante 45 minutos.

Posteriormente al corrimiento llenar el orificio central de la placa con suero Anti conejo, y colocar la placa en una cámara húmeda por 24 horas.

Lavar la placa con solución salina durante dos días y un día con agua destilada.

Dejar secar al aire la placa hasta que la agarosa se deshidrate.

Teñir las placas introduciéndolas al colorante Rojo de Ponceau durante 15 minutos.

Lavar con ácido acético al 5% para eliminar el exceso de colorante. Dejar secar al aire y observar (27,36).

III.- Conjugación.

Reactivos:

Buffer de Carbonatos

Solución A: Na_2CO_3	- - - - -	5.3g
H_2O	- - - - -	100 ml
Solución B: NaHCO_3	- - - - -	4.2g
H_2O	- - - - -	100 .-

Adicionar la solución A a la solución B hasta alcanzar el pH de 9.0 a 9.5

Metodología:

Diluir la solución de globulinas con solución salina al 0.85% hasta obtener una concentración final de 2 a 3% de proteínas.

En este trabajo se tomaron 16.8 ml de la solución de globulinas obtenidas y fueron diluidas a un volumen final de 30 ml.

Ajustar el pH de la solución de globulinas de 9.0 a 9.5 con Buffer de Carbonato-Bicarbonato 0.5M pH 9.0

Colocar la solución de globulinas en un vaso de precipitados y agitar suave y continuamente a 4°C (figura No. 6).

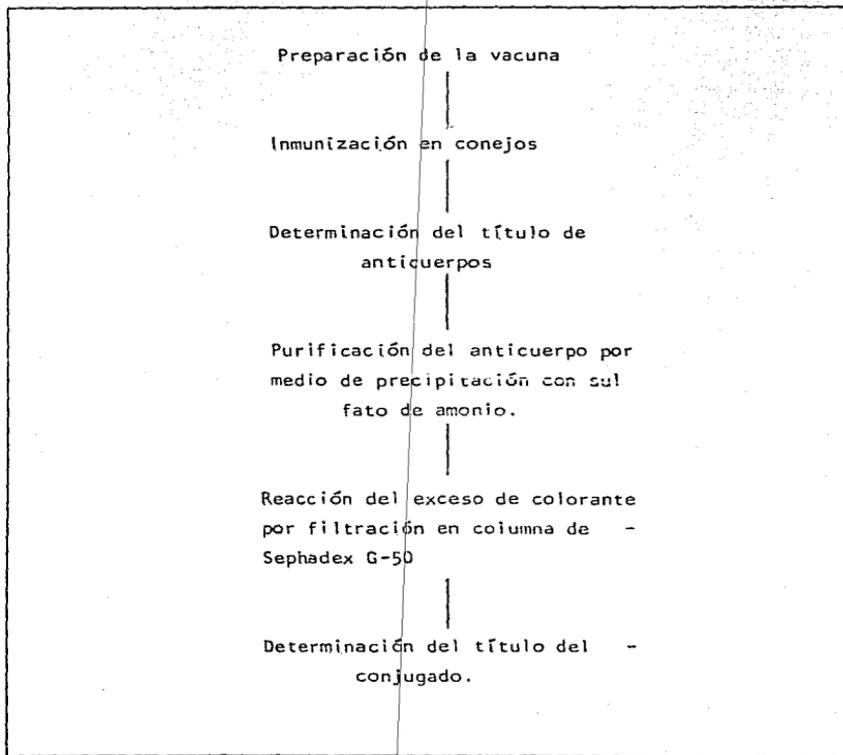
Eliminar el exceso de fluoresceína en una columna de Sephadex G - 50 (19,22,27,32).

Preparación de la columna de Sephadex G-50.

Principio de la filtración en gel. El gel tiene poros cuyo tamaño dependerá del grado de entrecruzamiento del gel. Las moléculas que pueden penetrar en estos poros serán retenidas por el gel mientras que aquellas que sean demasiado grandes serán arrastradas a través de la columna por la fase móvil. La separación por lo tanto resulta dependiente del peso molecular de las sustancias contenidas en la mezcla.

Figura No. 6

Técnica de Anticuerpos Fluorescentes



Material:

- a).- Conjugado
- b).- Sephadex G-50
- c).- Buffer de fosfato pH 7.6 con Merthiolate a una concentración final de 1:10000

Metodología:

Pesar 120g de Sephadex G-50 seco y ponerlo en un vaso de precipitados.

Agregar 1 lit de Buffer de fosfato pH 7.6, mezclar y dejar sedimentar, decantar y descartar las partículas finas de Sephadex, repetir 3 a 4 veces, hasta que no haya partículas finas en suspensión (32).

El Sephadex ya lavado se deja hidratar de 3 a 4 días, se quita la mayor parte del sobrenadante y el gel está listo para montar la columna. No dejar secar el gel, vaciar el gel en la columna procurando que no se formen burbujas de aire y dejar que sedimente el Sephadex.

Lavar la columna haciendo pasar el doble de su volumen de Buffer de fosfato pH 7.6 ajustando al mismo tiempo el flujo de la columna. Para un lecho de 40 cm de altura por 1.25 cm de diámetro, el volumen del flujo de salida no debe de exceder de 3 ml por cada 5 minutos. Es posible pasar a través de ésta columna alrededor de 15 ml de conjugado cuya concentración de proteínas sea del 3 al 4% (32).

Aplicar cuidadosamente el conjugado con el fin de evitar que rebote el gel. Cuando todo el material ha penetrado en el Sephadex se comienza a eludir con buffer de fosfato pH 7.6

El material pasará por la columna separando en dos bandas de color amarillo la más rápida es la del conjugado.

Recoger el conjugado, tirando las primeras gotas, las cuales salen muy diluidas.

La segunda banda es fluoresceína no conjugada que puede eliminarse de la columna con lavados sucesivos con Buffer.

El volumen del conjugado polivalente obtenido después de eliminarse el exceso de isotiocianato de fluoresceína por el paso de la solución de

globulinas a través de la columna de Sephadex G-50 fue de 40 ml, el cual se distribuyó inmediatamente en alícuotas de 0.5 ml en viales para antibiótico de 5 ml de capacidad, se envasó y liofilizó obteniéndose finalmente 80 viales con 0.5 ml de cada uno (8,32).

III.1.- Titulación del conjugado.

Material:

Buffer de Fosfato pH 7.6

Solución fijadora:

Alcohol absoluto	- - - - -	60 ml
Cloroformo	- - - - -	30 ml
Formalina	- - - - -	10 ml

Mezclar y envasar esta solución.

Solución salina 0.85 %

Conjugado

Portaobjetos de 26 x 76 mm y 1.1 a 1.2 mm de espesor

Tubos con TSB

Glicerina tamponada:

Solución salina amortiguada de fosfatos pH 8.5

Solución A:

KHPO_4	- - - - -	24.25g
NaCl	- - - - -	8.5g
Agua destilada	- - - - -	c.b.p. 100 ml

Solución B:

KH_2PO_4	- - - - -	24.4g
NaCl	- - - - -	8.5g
Agua destilada	- - - - -	c.b.p. 100 ml.

Mezclar la solución A 100 ml. con 1 ml de solución B.
Tomar 1 ml de ésta solución y mezclar con 9 ml de glicerina grado reactivo, mezclar con movimientos suaves.

III.1.a).- Preparación de frotis utilizados en la prueba de Anticuerpos fluorescentes.- Inocular tubos que contengan 10 ml de TSB con cultivos lisos de S. paratyphi-A, S. paratyphi-B, S. thompson, S. newport, S. typhi, S. london, S. newington, y S. senften berg. (un caldo por cada cultivo), incubar a 37°C por 24 horas Posteriormente centrifugar todos los cultivos y hacer 3 lavados con solución salina al 0.85%. Resuspender finalmente en 0.5 ml de solución salina.

Preparar 6 frotis por cada serotipo utilizado y un portaobjetos para cada uno. Colocar una gota de cada suspensión y extenderla en la superficie del portaobjetos, dejar secar al aire (36).

Marcar con un lápiz diamante el contorno de la muestra (círculos de 2 cm de diámetro).

Fijar los frotis con la solución fijadora por 3 minutos y enjuagar con alcohol absoluto. Dejar secar al aire (4,35).

III.1.b).- Diluciones del conjugado,- hacer las siguientes diluciones del conjugado: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 con PBS pH - 7.6

III.1.c).- Tinción del frotis.- Por cada dilución del conjugado teñir una serie de laminillas que incluya cada uno de los diferentes serotipos de Salmonella.

Colocar una gota del conjugado en la superficie de cada frotis .

Incubar en cámara húmeda a 37°C por 15 minutos.

Lavar los frotis durante 5 minutos con PBS pH 7.6 en agitación en una caja de coloración y posteriormente 5 minutos en agua destilada también en agitación, secar al aire los frotis ya teñidos. Colocar a cada uno una gota de glicerina - tamponada, colocar un cubreobjetos y observar al microscopio de fluorescencia (18, 36).

III.1.d).- Observar al microscopio de fluorescencia.- Registrar los grados de fluorescencia de la forma siguiente:

4+ = Muy brillante amarillo - verde

3+ = Brillante amarillo - verde

2+ = Fluorescencia visible pero muy poca brillantes.

1+ = Apenas visible la fluorescencia

- = No fluorescencia

Se considera el título del conjugado la última dilución que de una fluorescencia de 3+ (19,36).

IV. _ EVALUACION DEL CONJUGADO FLUORESCENTE

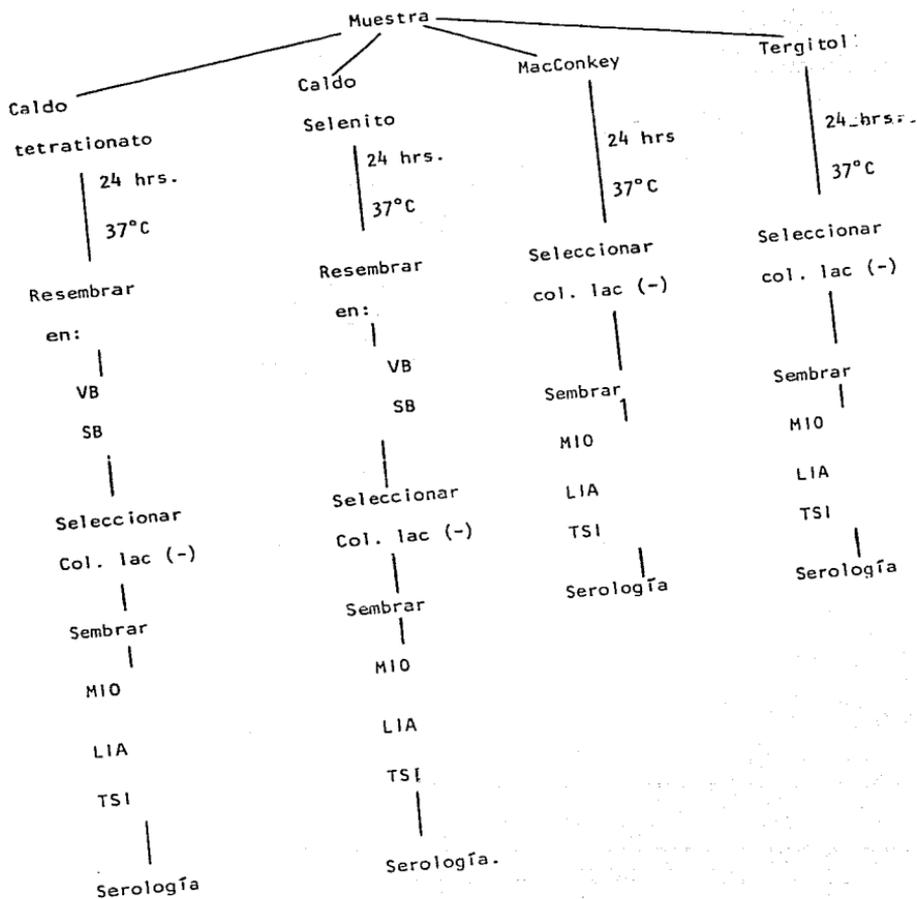
Se analizaron un total de 38 muestras de heces provenientes de niños cuyas edades varían entre 8 meses y 5 años que asisten a la guardería Margarita Salazar Erro. De estas 38 muestras se contaminaron - 16 con Salmonella en el laboratorio, posteriormente, todas estas - muestras se analizaron en forma ciega por la técnica de anticuerpos fluorescentes para detectar Salmonella.

Procedimiento:

- a).- Se colocó una serie de 38 tubos de ensaye de 13 x 100 con 1 ml de solución salina en cada tubo.
- b).- En cada uno de los tubos se colocó una asada de la muestra de heces y se homogenizó.
- c).- Se centrifugó a 1,500 rpm 1 minuto
- d).- Se tomó una gota de sobrenadante y colocó en la superficie de un portaobjetos, extendiéndola y dejando secar al aire.
- e).- Cubrir cada frotis con el conjugado fluorescente diluido 1:8 siguiendo la técnica descrita en III.1.c. y se observó al - microscopio de fluorescencia.

- f).- Registrar la presencia de bacterias fluorescentes, considerando muestras positivas los frotis que muestren a partir de dos bacterias fluorescentes por campo de inmersión y negativas - cuando exista uno o ninguna bacteria fluorescente (19).
- Por otro lado se analizaron otras 16 muestras de heces para la búsqueda de Salmonella utilizando la técnica de coprocultivo y la técnica de anticuerpos fluorescentes simultáneamente y en forma ciega con el fin de determinar si el conjugado es capaz de detectar la cantidad normal de Salmonella que se encuentra presente en heces en una infección por Salmonella.

En el caso del coprocultivo se utilizó el siguiente porcedimiento.



R E S U L T A D O S

El volúmen del suero polivalente contra Salmonella que se obtuvo al sangrar a los 5 conejos fue 200 ml, el cual al ser titulado aglutinó con las salmonelas pertenecientes a los grupos A al E, además se observó aglutinación con salmonelas pertenecientes a los grupos F, H, J, L, O y R a un título muy bajo, como puede ser apreciado en la tabla No. 3

Al ser fraccionado el suero con sulfato de amonio se obtuvieron 60 ml de globulinas cuya concentración proteica fue 71.25 mg/ml.

Al ser titulada la solución de globulinas por la técnica de aglutinación en placa se observó que mientras algunos grupos de Salmonella aumentaron en título algunos con el C₁ se mantuvieron con el mismo, además se aglutinó con salmonella pertenecientes a los grupos G, L, M, N y S con los cuales se obtuvo una reacción en títulos bajos, esto es debido a que los anticuerpos se concentraron y la reacción con su antígeno homólogo es más evidente, pues no sufren el efecto de dilución causado por los otros componentes del suero (tabla No. 4).

Para hacer el conjugado fluorescente solo se tomaron 16.8 ml de la solución de globulinas y la solución restante fue almacenada a 4°C, con merthiolate en una concentración final de 1:10000 que podrá ser utilizada como suero, suero polivalente en la identificación de Salmonella a una dilución 1:3 por la técnica de aglutinación en placa.

De los 80 viales obtenidos del anticuerpo fluorescente fueron utilizados algunos para titular dicho conjugado con las salmonelas pertenecientes a los grupos A al E se encuentran enlistados en la tabla No. 5, en la cual se puede apreciar que en la dilución 1:8 está el título del conjugado, pues en esta dilución la mayoría de los grupos presentan una fluorescencia de 2 a 3+, excepto con salmonelas pertenecientes a los grupos E₂ que presentó una fluorescencia de 1+ a esta dilución.

El conjugado fluorescente se tituló también con otras enterobacterias como Shigella, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Klebsiella, Citrobacter y Arizona con el objetivo de determinar reacciones cruzadas, los resultados obtenidos se enlistan en la tabla No. 6 en donde como se puede observar que Escherichia coli, Klebsiella y Citrobacter presentaron fluorescencia de 1+ en una dilución 1:4, sin embargo Arizona dió una fluorescencia

de 1+ hasta la dilución 1:8.

Cuando se realizó la evaluación del conjugado con las 38 muestras de heces, de las cuales se inocularon 16 con diferentes grupos de Salmonella se observó que este fue capaz de detectar las muestras de heces, que contenían salmonela independientemente de la gran cantidad de bacterias presentadas en estas muestras (tabla No. 7). En esta tabla se puede observar que del total de las 38 muestras analizadas se obtuvieron 4 falsas positivas (muestras de heces que no fueron contaminadas y presentaron fluorescencia) es decir que existieron reacciones cruzadas con otras enterobacterias y una falsa negativa (muestra de heces que fue contaminada y no presentó fluorescencia), del total de las muestras analizadas se identificaron correctamente 33 muestras es decir se obtuvo una correlación del 86%.

En la tabla No. 8 se encuentran reportadas los resultados obtenidos en el estudio de las 16 muestras de heces las cuales fueron analizadas con el fin de determinar la presencia de Salmonella en el transcurso de una infección por esta, en los cuales puede apreciarse que de las 16 muestras 8 fueron positivas por la técnica de Anticuerpos fluorescentes y 4 por coprocultivo obteniendo una correlación del 75%.

Tabla No. 3
 Titulación del suero polivalente
 A-E por la técnica de Aglutinación

Antígenos	Grupo	Diluciones					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
S. parathohi-A	A	+	tr	-	-	-	-
S. schleissheim	B	3+	2+	+	-	-	-
S. Thompson	C ₁	4+	4+	3+	2+	+	tr
S. virginia	C ₂	3+	+	-	-	-	-
S. gallinarum	D ₁	3+	+	-	-	-	-
S. orion	E ₁	3+	2+	+	tr	-	-
S. newington	E ₂	3+	3+	2+	tr	-	-
S. minneapolis	E ₃	4+	3+	2+	+	-	-
S. senterberg	E ₄	4+	3+	2+	+	-	-
S. aberdeen	F	+	tr	-	-	-	-
S. poona	G ₁	-	-	-	-	-	-
S. worthington	G ₂	-	-	-	-	-	-
S. carrau	H	2+	+	+	tr	tr	-
S. florida	H	+	+	tr	-	-	-
S. gaminara	I	-	-	-	-	-	-
S. Kirkee	J	-	-	-	-	-	-
S. cerro	K	tr	-	-	-	-	-
S. minnesota	L	tr	-	-	-	-	-
S. michi SB522	M	-	-	-	-	-	-
S. urbana	N	-	-	-	-	-	-
S. monschau	O	tr	-	-	-	-	-
S. inverness	P	-	-	-	-	-	-
S. champaign	Q	-	-	-	-	-	-
S. riogrande	R	2+	tr	-	-	-	-
S. bulawayo	R	+	tr	-	-	-	-
S. waycross	S	-	-	-	-	-	-
S. weslaco	T	-	-	-	-	-	-
S. berkeley	U	-	-	-	-	-	-
S. niarembe	V	-	-	-	-	-	-
S. deversoir	W	-	-	-	-	-	-
s. dugbre	W	-	-	-	-	-	-
S. bergern	X	-	-	-	-	-	-
S. dahlem	Y	-	-	-	-	-	-

Tabla No. 4
 Titulación de la solución de Gammas A-E
 por la técnica de Aglutinación

Antígenos	Grupo	Diluciones					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
S. paratyphi-A	A	4+	2+	+	tr	-	-
S. scheleisshem	B	4+	3+	+	tr	-	-
S. thompson	C ₁	4+	4+	3+	2+	+	tr
S. virginia	C ₂	4+	4+	3+	2+	+	-
S. gallinarum	D ₁	4+	2+	+	tr	-	-
S. orion	E ₁	4+	2+	+	-	-	-
S. newington	E ₂	4+	4+	4+	3+	3+	2+
S. minneapolis	E ₃	4+	4+	3+	2+	+	-
S. senftenberg	E ₄	4+	3+	2+	2+	+	tr
S. aberdeen	F	+	tr	-	-	-	-
S. poona	G ₁	-	-	-	-	-	-
S. worthington	G ₂	-	-	-	-	-	-
S. carrau	H	2+	2+	+	tr	-	-
S. florida	H	2+	2+	+	tr	-	-
S. gaminara	I	2+	+	+	tr	-	-
S. kirkee	J	2+	+	+	tr	-	-
S. cerro	K	3+	3+	2+	-	-	-
S. minnesota	L	4+	3+	2+	2+	-	-
S. michi SB522	M	3+	2+	+	tr	-	-
S. urbana	N	+	tr	-	-	-	-
S. monchaui	O	-	-	-	-	-	-
S. invernees	P	-	-	-	-	-	-
S. champaogn	Q	-	-	-	-	-	-
S. riogrande	R	3+	2+	+	-	-	-
S. bulawayo	R	3+	+	tr	-	-	-
S. waycross	S	2+	+	-	-	-	-
S. weslaco	T	-	-	-	-	-	-
S. berkeley	U	-	-	-	-	-	-
S. niarembre	V	-	-	-	-	-	-
S. deversoir	W	-	-	-	-	-	-
S. dugbe	W	-	-	-	-	-	-
S. bergen	X	-	-	-	-	-	-
S. dahlem	Y	-	-	-	-	-	-

Tabla No. 5
 Titulación del conjugado polivalente con
 Salmonelas pertenecientes a los grupos A al G
 por la técnica de anticuerpos fluorescentes .

Grupo de Salmonella	Diluciones					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
A	4+	4+	3+	2+	+	-
B	4+	4+	3+	2+	2+	-
C ₁	4+	3+	3+	2+	+	-
D	4+	4+	3+	2+	+	-
E ₁	4+	4+	2+	+	+	-
E ₂	4+	3+	+	+	-	-
E ₃	4+	4+	2+	2+	+	-
G	4+	4+	3+	2+	+	-

Tabla No. 6

Titulación del conjugado polivalente A-E
con otras bacterias por la técnica de
Anticuerpos fluorescentes

Bacterias	Diluciones					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
<u>Escherichia coli</u>	+	-	-	-	-	-
Shigella	-	-	-	-	-	-
<u>Proteus vulgaris</u>	2+	+	-	-	-	-
<u>Klebsiella pneumonie</u>	+	-	-	-	-	-
Citrobacter	+	-	-	-	-	-
Arizona	2+	2+	+	tr	-	-

Tabla No. 7

Determinación de Salmonella en muestras
de heces por Anticuerpos Fluorescentes

No. de muestra	Grupo de Salmonella Inoculado	Reacción	No. de muestra	Grupo de Salmonella Inoculado	Reacción
1	-	-	20	-	-
2	D	+	22	-	-
3	E ₃	+	22	-	+
4	C ₂	+	23	C ₁	+
5	B	+	24	B	+
6	-	-	25	A	+
7	D	+	26	-	+
8	S. typhi	+	27	E ₁	+
9	C	+	28	-	-
10	B	+	29	-	-
11	-	-	30	-	-
12	-	-	31	-	-
13	A	+	32	-	-
14	-	-	33	A	+
15	-	+	34	-	-
16	-	-	35	-	-
17	-	-	36	-	-
18	S. typhi	+	37	-	+
19	D	+	38	-	-

Tabla No. 8

Determinación de Salmonella en heces
por las técnicas de Anticuerpo fluo-
rescentes y Coprocultivo.

No. de muestra	AF	Coprocultivo
1	+	-
2	+	+
3	-	-
4	+	+
5	+	+
6	-	-
7	-	-
3	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	+	-
13	-	-
14	+	+
15	+	-
16	+	-

D I S C U S I O N

El método de anticuerpos fluorescentes ha tenido gran aplicación para la identificación de bacterias, virus, protozoarios helmintos y hongos. En ésta técnica se combina, la especificidad de la inmunología con la precisión de la microscopía.

Sin embargo, no debemos perder de vista que es una técnica complementaria a los métodos tradicionales y en ocasiones da información que difícilmente podría descubrirse en otra forma.

como se pudo observar el fraccionamiento del suero con sulfato de amonio es uno de los pasos de gran importancia para la elaboración del conjugado, pues de esta manera son eliminadas porciones del suero como es la albúmina que podría causar coloración inespecífica y además concentra la solución de globulinas que es la porción en donde se encuentran las anticuerpos pudiendo en algunas ocasiones aumentar el título de estas al aglutinar con sus antígenos homólogos, en el presente trabajo se observó aumento del título principalmente con los grupos A, C₁ y C₂ los cuales se encontraban bajos en el suero.

Una de las características de la técnica de anticuerpos fluorescentes es la especificidad del suero empleado. En ocasiones algunos de los antígenos somáticos de las salmonelas son encontrados en otras enterobacterias pudiendo también producir falsos positivos en la técnica de anticuerpos fluorescentes las cuales pueden ser eliminadas con el uso de anticuerpos de título alto o bien realizando adsorciones. Algunas de las reacciones más importantes ocurren con microorganismos de los géneros Arizona y Proteus.

La amplia capacidad de las globulinas purificadas de reconocer a los antígenos presentes en los grupos A al E de Salmonella presenta el problema de que en algunos casos otra enterobacteria posea algunos de estos antígenos pudiendo también producir falsos positivos lo cual puede ser eliminado en cierta forma con el uso de anticuerpos específicos para cada grupo y con título alto.

Otras reacciones falsas positivas pueden ser ocasionadas como lo demostró Tharrington y colaboradores cuando en un estudio realizado por ellos aislaron lactobacillus de una muestra de pasta que fluorescía brillantemente

con el conjugado de Salmonella, ellos sugirieron que la reacción fue análo
ga a la afinidad no específica de un componente de la proteína A de - -
Staphylococcus aureus por la porción Fc de la molécula de IgG.

Frecuentemente este tipo de reacciones falsas positivas ocurren con bac-
terias que contienen proteína A (5).

La coloración no específica es un problema asociado a la técnica de anti-
cuerpos fluorescentes que depende de algunos factores como son la calidad
del antisuero, la calidad del colorante fluorescente, el método de conju-
gación y el título del conjugado.

Los efectos de los diferentes compuestos del suero en la coloración ines-
pecífica es otro problema que se presenta en la técnica de anticuerpos -
fluorescentes, el fraccionamiento con sulfato de amonio es el proceso - -
comúnmente empleado para la purificación del antisuero antes de la conju-
gación con isotiocianato de fluoresceína, el fraccionamiento del suero de
conejo por esta técnica produce un producto que contiene 64% de gamma glo-
bulinas, 35% de otras globulinas y 1% de albúmina.

Algunos autores reportan que la purificación del suero por la aplicación
de técnicas tales como cromatografía en DEAE-celulosa, Cromatografía en -
columna con DEAE-Sephadex y Centrifugación zonal para aislar IgG reduce -
significativamente la fluorescencia no específica sin ningún cambio en -
la intensidad de coloración específica (8,16,20).

Se han propuesto varias alternativas para reducir el cruzamiento bacteria
no al usar la técnica de anticuerpos fluorescentes como son:

- 1).- Adsorción del suero utilizado para la elaboración del conjugado -
con cepas de los géneros bacterianos como son Echerichia coli, - -
Arizona y Citrobacter que presentan mayor cruzamiento con Salmone-
lla, lo cual sin embargo, traería como consecuencia la pérdida de
sensibilidad del mismo aunque aumentaría la especificidad.
- 2).- La utilización de un conjugado con un título alto, con lo cual se
evitaran muchas de las reacciones menores, sin embargo hay reaccio-
nes importantes que pueden evitarse de este modo.

- 3).- La adsorción de aglutininas inespecíficas presentes en el conjugado mediante la acción de extractos celulares, como polvo de hígado de ratón o rata.
- 4).- La adición de rodamina al conjugado, como colorante de contraste, - con lo cual se eliminaría alguna fluorescencia inespecífica de partículas de material extraño, proveniente de la muestra, así como - aquellas causadas por la proteína A del Staphylococcus aureus, que - presenta afinidad por la fracción Fc de la IgG, tiñiéndose de este modo los cocos tan intensamente como las salmonelas; además permite un mejor contraste de fondo, que facilita la identificación de los microorganismos fluorescentes (33).

Tal vez, la alternativa más viable para reducir las reacciones cruzadas de Salmonella con las enterobacterias, es la utilización de - un conjugado hecho a base de IgG, la cual, reduce significativamente las reacciones cruzadas, logrando así un grado de correlación ma - yor que el obtenido al utilizar cualquiera de los conjugados poliva - lentes comerciales.

Tomando en cuenta que el conjugado presenta un gran número de reacciones cruzadas menores como los antígenos bacterianos anteriormente mencionados se decidió considerar a una muestra positiva solo - cuando se observan bacterias con morfología característica y con una fluorescencia de 3+.

Debido a estas reacciones cruzadas la prueba de anticuerpos fluores - centes debe ser usada como una prueba de diagnóstico presuntivo y todos los resultados positivos deben ser confirmados por el método convencional de cultivo y procedimientos serológicos como son - - ELISA, Hemaglutinación pasiva y la reacción de Widal. Aunque se - sabe que no todos los resultados positivos de Anticuerpos fluores - centes que proporcionan cultivos negativos son reacciones falsas - positivas, pues, hay fracasos también en el método convencional de cultivo, esto ha sido demostrado por Goepfert y colaboradores, - al efectuar cultivos repetidos a partir de caldos de enriquecimiento - to de aquellas muestras que en primer instancia resultaron negati - vas de Salmonella por cultivo y en las que se había diagnosticado

presuntivamente su presencia por la técnica de anticuerpos fluorescentes encontraron que alguna de ellas contenían en realidad Salmonella, es decir que se redujo notablemente el número de muestras positivas falsas - por la técnica de anticuerpos fluorescentes al efectuarse cultivos repetidos de las mismas, este hecho determina la posibilidad de que la técnica de anticuerpos fluorescentes sea más sensible que el método rutinario de cultivo tal como se usa normalmente (6,21).

Además la técnica de cultivo requiere para su identificación de una población de Salmonella a partir de un caldo de enriquecimiento del 1×10^7 - bacterias/ml, la identificación de la salmonela por anticuerpos fluorescentes puede efectuarse con una cantidad mínima de 1×10^4 ó 1×10^5 bacterias/ml para observar una salmonela por campo, bajo el objetivo de inmersión al utilizar la técnica de anticuerpos fluorescentes.

Además en la práctica es muy frecuente que los pacientes hayan recibido - tratamiento antimicrobiano, lo que reduce la posibilidad de cultivar la salmonela. El coprocultivo es técnicamente complicado ya que requiere la siembra en por lo menos tres medios selectivos, y la realización de reacciones bioquímicas y serológicas con anticuerpos específicos, el tiempo requerido para obtener el informe es de por lo menos 48 horas y el costo lo hace inasequible en la mayoría de los enfermos (25).

La limitación más importante del coprocultivo es la necesidad de partir de bacterias viables y cuyo crecimiento no sea interferido por la flora comensal presente. La presencia de bacterias muertas y de antígenos derivados de estructuras bacterianas no se descubre por el cultivo de heces fecales.

Sería muy importante valorar el conjugado polivalente con muestras de heces que se han sembrado en caldos selectivos de enriquecimiento, para poder observar si de esta manera son disminuidos los falsos positivos (25).

Además sería importante determinar la utilidad de este conjugado en el diagnóstico de Salmonella en muestras de alimentos de diferentes origen - como son los productos cárnicos y los productos de la leche, así como la correlación que existe entre la técnica de muestras de alimentos, como la manera ideal de procesar las muestras de alimentos para elaborar frotis - utilizados en la técnica de anticuerpos fluorescentes.

C O N C L U S I O N E S

- El suero polivalente obtenido no solo fue eficaz para detectar salmonelas pertenecientes a los grupos A al E sino que además fue capaz de detectar a salmonelas pertenecientes a los grupos F, H, J, K, L, O y R las cuales no son patógenas al humano.
- Además al purificar las γ globulinas la reacción de aglutinación con estos grupos fue más evidente y rápida por lo que es recomendable que en lugar de usar sueros completos para la técnica de aglutinación en placa, se recomienda utilizar γ globulinas.
- El conjugado polivalente obtenido en el presente trabajo demostró ser eficaz para el diagnóstico presuntivo de Salmonella en muestras de heces.
 - Se demostró que la técnica de anticuerpos fluorescentes es un método útil para el diagnóstico presuntivo de Salmonella a partir de muestras de heces, teniéndose como principales ventajas:
 - a).- Detectar un número relativamente pequeño de microorganismos del género Salmonella.
 - b).- El diagnóstico puede ser completado más rápidamente (en 1 ó 2 horas) en comparación con el coprocultivo.
 - c).- Además permite rastrear una posible Salmonelosis y posteriormente solo los casos positivos someterlos a pruebas definitivas como cultivo bacteriológico y pruebas serológicas como son: La reacción de Widal, Hemaglutinación pasiva, la prueba de fijación de superficie y ELISA.
 - La principal limitación que presenta la técnica de Anticuerpos Fluorescentes es que requiere de confirmación por métodos serológicos o Cultivo, y la utilización de un microscopio de fluorescencia el cual tiene un costo elevado, así como de personal entrenado en la observación de este tipo de tinción.

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

- 1.- Albert H Coons, Hugh J Creech and R Norman Jones. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Exp. Biol Med; 1941; 97; 200-202.
- 2.- Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología en escuelas de Medicina A.C. Microbiología Médica. Edit. Francisco Méndez Oteo. México, D.F. 1981; tomo 1 cap; Salmonelas pag; 498-510.
- 3.- Berenice M Thomason. Evaluation of frozen fixed smears for use in fluorescent antibody studies of Salmonellae. Applied Microbiology 1974; 27: 418-419.
- 4.- Berenice M Thomason, Current status of immunofluorescent methodology for Salmonella. J. Food Protection; 1981; 44; 381-84
- 5.- Berenice M Thomason and Ann Hebert. Evaluation of commercial - - conjugates for fluorescent antibody detection of Salmonellae. Applied Microbiology; 1974; 27; 862-869.
- 6.- B. Swaminathan; J.C. Aires and Williams. Control of nonspecific - staining in the fluorescent antibody techniques for the detection of Salmonellae in foods. Applied and Environmental Microbiology; May; 1978; 911-919.
- 7.- Bernard D. Davis, Renato Dulbecco M.D. Tratado de Microbiología, Salvat Editores S.A. Barcelona España; 1975; 772-98.
- 8.- By P. Andrews. Estimation of the molecular weight of protein by Sephadex gel - filtration. Biochem J; 1964; 91; 222-33
- 9.- Celso S.H. Brandao. Reacción de fijación en superficie como método diagnóstico de la fiebre tifoidea. Bol. Med. Hosp. Infant. 1972; 29; 4; 413; 420.

- 10.- Carla R. Clausen. Detection of bacterial pathogens in purulent - clinical specimens by immunofluorescence technique. J. Clinical Microbiology; - 1981; 13; 6; 1119-1121.
- 11.- Charles E. Stager, Eric Erikson and James Davis. Rapid method for detection, identification, and susceptibility testing of enteric pathogens. J. Clinical Microbiology; 1983; 17; 1; 79-84.
- 12.- Chistoper J. Papasian; Willian Bartholomew; Erwin Neter and Daniel Amsterdam. Recovery of Salmonella group B from Blood and Salmonella group C₂ from feces and serological evidence of dual infection in one patient. J. Clinical Microbiology; 1984; 20; 3; 584-585.
- 13.- Ernest Jawers, Joseph L. Melnick, Edward A. Adelberg. Microbiología Médica. Edit. El Manual Moderno. México, D.F. 1983 10a. edición pág: 239-242.
- 14.- Edwards P.R; Ewing W.H. Identificación de Enterobacterias 3a edición Minneapolis, Burgess Publishing Co. 1986.
- 15.- Emma Galindo; Eloy Méndez-Tema; Salvador Alvarado; Luis Velázquez. Frecuencia de microorganismos enteropatógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1985; 42; 6; 354-359.
- 16.- E.H. Beutner; E.D. Holborow and D. Johnson. Quantitative studies of immunofluorescent staining. Immunology; 1967; 12; 327-337.
- 17.- Felix Borek and Artur M. Silvertstein. A new fluorescent label for - antibody proteins. Arch. Biochem. and Biophysics; 1960 87; 293-297.
- 18.- F. Herzog; B. Albine and G. Wick. Comparison of filters in immunofluorescent staining procedures with fluorescein isothiocyanate - (FITC) conjugates. J. Immunological Methods; 1973 3; 211-220.

- 19.- G. Ann Hebert, Bertie Pittman and William B. Cherry. Factors affecting degree of nonspecific staining given by fluorescent isothiocyanate labeled globulins. J. Immunology. 1967 98; 6; 1204-1212.
- 20.- G.D. Johnndon. Simplified procedure for removing non-specific staining components from fluorescent-labelled conjugates. Nature; 1961; 191; 60-61.
- 21.- H.J. Mohr; H.L. Tenk; M. Yelerian. Comparison of fluorescent antibody methods and enrichment serology for the detection of Salmonellae. Applied Microbiology; 1974; 27; 324-328.
- 22.- John D. Marshall Warren, C. Eveland and Chauncey W Smith. Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent-antibody technic with a modification of first application. Exp. Biol. Med. 1958; 98; 898-900.
- 23.- Jorge Olarte. Eriopatogenia de la diarrea infecciosa. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1985; 42; 66-72
- 24.- Jesus Kumate, Alejandro Llausas; Luis Rodríguez y Armando Isibasi. La serología en el diagnóstico de la fiebre tifoidea y sus complicaciones en la edad pediátrica. Bol. Med. Hosp. Infant. 1972; 29; 4; 405-412.
- 25.- Jesús Kumate; Judith Villarreal; Julio Carrillo; Armando Isibasi. Eliminación fecal de antígenos de Salmonella en la fiebre tifoidea I. Encuesta epidemiológica. Arch. Invest. Med. 1983; 14; 51-57.
- 26.- J.C. Elliot; J.A. Carpenter and M.K. Hamdy. Notes. Technique for preparing high-quality microphotographs by fluorescent microscopy. Applied Microbiology; 1974; 28; 6; 1063-1065.
- 27.- Leo Kaufman and William B. Cherry. Technical factors affecting the preparation of fluorescent antibody reagent, J. Immunol 1961; 87; 72-79

- 19.- G. Ann Hebert, Bertie Pittman and William B. Cherry. Factors affecting degree of nonspecific staining given by fluorescent isothiocyanate labeled globulins. J. Immunology. 1967 98; 6; 1204-1212.
- 20.- G.D. Johnson. Simplified procedure for removing non-specific staining components from fluorescent - labelled conjugates. Nature; 1961; 191; 60-61.
- 21.- H.J. Mohr; H.L. Tenk; M. Yeterian. Comparison of fluorescent antibody methods and enrichments serology for the detection of Salmonellae. Applied Microbiology; 1974; 27; 324-328.
- 22.- John D. Marshall Warren, C. Eveland and Chauncey W Smith. Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent-antibody technic with a modification of first application. Exp. Biol. Med. 1958; 98; 898-900.
- 23.- Jorge Olarte. Etiopatogenia de la diarrea infecciosa. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1985; 42; 66-72
- 24.- Jesus Kumate, Alejandro Llausas; Luis Rodríguez y Armando Isibasi. La serología en el diagnóstico de la fiebre tifoidea y sus complicaciones en la edad pediátrica. Bol. Med. Hosp. Infant. 1972; 29; 4; 405-412.
- 25.- Jesús Kumate; Judith Villarreal; Julio Carrillo; Armando Isibasi. Eliminación fecal de antígenos de Salmonella en la fiebre tifoidea I. Encuesta epidemiológica. Arch. Invest. Med. 1983; 14; 51-57.
- 26.- J.C. Elliot; J.A. Carpenter and M.K. Hamdy. Notes. Technique for preparing high - quality microphotographs by fluorescent microcopy. Applied Microbiology; 1974; 28; 6; 1063-1065.
- 27.- Leo Kaufman and William B. Cherry. Technical factors affecting the preparation of fluorescent antibody reagent, J. Immunol 1961; 87; 72-79

- 28.- N.F. Insalato C.W. Rapid direct fluorescent - antibody metod for the detection of Salmonellae in food and feeds. Applied Microbiology 1972; 24; 645-649.
- 29.- Onofre Muños Hernández; Rafael Hernández; Gloria Garduño; Silvia González y Gonzalo Gutiérrez. Contrainmunolectroforesis para la identificación de anticuerpos contra antígenos O de Salmonella - typhi III. Evaluation en enfermos de fiebre tifoidea y población sana. Arch. Invest. Med. 1979. 10; 33; 33-38.
- 30.- Onofre Muños; Rosa E. REyes; Gonzalo Gutiérrez. Encuenta serológica en niños de la ciudad de México. Bol. Med. Hosp. Infant. 1973. - 30; 1; 51-57.
- 31.- Rafael Hernández; Onofre Muños; Gloria Garduño; Silvia González; Gonzalo Gutiérrez. Contrainmunolectroforesis para la identificación de anticuerpos contra antígenos O de Salmonella Typhi I. - Descripción de la técnica. Arch. Invest. Med. 1979; 10; 23; - 23-31.
- 32.- Roger M. McKinney; Janet T. Spillane and George W. Pearce. Factors affectinf the rate of reaction of fluorescent isocianate whit serum protein J. Immunology; 1964; 93; 232-242.
- 33.- Walter R. Sowdle and P. Arne Manser. Labeling of antibodies with - fluorescent azo dyes. J. Bact. 1959; 77; 669-670.
- 34.- William B Cherry, Ph. D and Berenice M Thomason. Fluorescent anti body technique for Salmonella and other enteric pathogens. Public Health Reports. 1969; 84; 10; 887-898.
- 35.- Department of Health Education and Welfare, Public Health Service Center for Disease. Control 1975; Specifications and Evaluation Methods for Immunological & Microbiological Reagents. Volumen I.
- 36.- Akiyoshi Kawamura, Jr. Fluorescent Antibody Techniques and their applications. University of Tokio Press. 1969.