

11262
1 ej 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina



\$24510

ENDOTOXEMIA DE SALMONELAS EN GASTROENTERITIS
EN LA EDAD PEDIATRICA

\$300 131

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
PEDIATRIA (INFECTOLOGIA)

Director de la Tesis:
Dr. Jesús Kumate Rodríguez

Presenta el Médico Cirujano:
José de Jesús Goyo Rivas

\$650 GASTROENTERITIS

México, D. F., 1981.

FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

	Pág.
I - INTRODUCCION	1
II - MATERIAL Y METODOS	13
1. <u>Estudio en Humanos</u>	
1.1. Investigación del polisacárido 9,12 (heterólogo) y 1, 4, 5, 12 (homólogo) en sangre, orina, materia fecal de niños con gastroenteritis por salmonelas B y D, durante la etapa aguda de la enfermedad, a siete y catorce días de convalecencia.	
1.1.1 Investigación del polisacárido 9, 12 (heterólogo).	13
1.1.2 Investigación del polisacárido 1, 4, 5, 12 (homólogo).....	14
1.2 Investigación del polisacárido 1, 4, 5, 12 en suero de niños con hepatitis en la etapa aguda de la enfermedad y tres meses después de la misma.....	15
1.3 Investigación del polisacárido 1, 4, 5, 12 en suero de sangre portal y periférica de diez niños sometidos a laparotomía por patología no infecciosa.....	15
1.4 Investigación del polisacárido 1, 4, 5, 12 en suero de diez niños sometidos a esterilización de colon prequirúrgica.....	15
1.5 Investigación del polisacárido 9, 12 en sangre, orina y materia fecal de familiares de pacientes con fiebre tifoidea.....	16

2.	<u>Estudio en animales</u>	
2.1.	Estudio experiemental en conejos.....	16
2.1.a	Construcción del asa de Thiry-Vella.....	17
2.2	Estudio en embriones de pollo.....	19
2.2.a	Técnica de inoculación	22
3.	<u>Preparación de antígenos</u>	
3.1	Cepas utilizadas.....	24
4.	<u>Métodos químicos</u>	
4.1.	Extracción del polisacárido.....	26
4.2.	Tiraminación del polisacárido.....	30
4.3.	Yodación del polisacárido.....	33
5.	<u>Protocolo de inmunización</u>	
5.1	Primera inmunización.....	34
5.2	Segunda inmunización.....	35
5.3	Determinación de la concentración de IgG en los sueros de conejo inmunizados.....	35
6.	<u>Métodos inmunoquímicos</u>	
6.1.	Curva de precipitación del polisacárido de <u>Salmonella typhimurium</u>	36
6.2	Determinación de la concentración máxima de antígeno y anticuerpo precipitado en la zona de equi valencia	38
6.3	Curva de precipitación utilizando como antígeno una proteína.....	39

7.	<u>Radioinmunoensayo</u>	
7.1	Sensibilidad del método	42
7.2	Exactitud del método.....	48
7.3	Protocolo del radioinmunoensayo.....	48
III -	RESULTADO	52
IV -	DISCUSION	105
V -	RESUMEN Y CONCLUSIONES	122
VI -	BIBLIOGRAFIA	125

I. INTRODUCCION.

Los niños con gastroenteritis por salmonelas no typhi en su cuadro clínico muestran manifestaciones de tipo general tales como: fiebre, estado de choque (sin o poca relación con la deshidratación), leucocitosis y alteraciones de la coagulación que sugieren que la bacteria no permanece únicamente en la luz del tubo digestivo sino que produce episodios bacteriémicos con mayor frecuencia de lo hasta ahora aceptado.

Evidentemente las manifestaciones clínicas, al igual que en todas las enfermedades infecciosas, son la resultante de cuatro factores interrelacionados, i.e.: la magnitud del inóculo, la clase de salmonela, la resistencia del huésped y la ruta de inoculación. Así el cuadro clínico exhibe un espectro que va desde el portador asintomático y las formas subclínicas hasta las septicemias fulminantes. Desde 1943 Seligman y col. (1), describieron las cuatro variedades clínicas que adopta una salmonelosis: 1) gastroenteritis, 2) bacteriemia septicemia con o sin localizaciones focales, 3) cuadro tifoídico y 4) estado de portadores convalescientes o sanos. Estos cuatro síndromes descritos pueden ocurrir en forma individual, consecutiva y algunos casos, simultánea. Aunque algunas especies muestran tendencia clara para expresar preferentemente algunas de las formas sindrómicas, con mucho predominan las manifestaciones gastrointestinales (2,3,4); - - 81% en encuesta de Safra y Winter (5), la que también reporta bacteriemia y septicemias con localizaciones variables de porcentaje cercano a 4%, Cherubin (6) en 2,120 episodios de gastroenteritis por salmonelas para el serotipo typhimurium reporta gastroenteritis en 80.8% y

localizaciones extraintestinales en 2.7%.

Los cuadros bacterémicos y septicémicos durante la evolución de cuadros enterales por salmonelas, son eventos frecuentes en la evolución clínica. Kumate y col. (7) en 1965, informan de un caso de hepatitis consecutiva a gastroenteritis y septicemia por Salmonella typhimurium, Kumate y Takane (8), en una revisión de 254 niños internados en el Hospital Infantil de México, entre 1953 y 1960, en los que se cultivó alguna especie de salmonela en las heces fecales; encontraron una elevada incidencia de bronconeumonía, colestasis y faringoamigdalitis como complicación del episodio de gastroenteritis. Se infiere que durante el curso de una gastroenteritis por salmonela no typhi, hay invasión a la sangre y eliminación probablemente por la orina de material antigénico de estas salmonelas.

Kumate y col. a principios de los 70 (9), mediante prueba de inhibición de hemaglutinación, observaron en pacientes con fiebre tifoidea la excreción por materia fecal de antígeno de Salmonella typhi durante un lapso de 15 días. El mismo grupo en 1979, refieren que después de administrar la vacuna oral de Salmonella typhi se puede demostrar que el lipopolisacárido (LPS) 9,12 se elimina tanto con la materia fecal como por la orina y hay respuesta humoral específica, lo que indica que parte de este antígeno es absorbido a través del tubo digestivo, que luego pasa a la circulación y que una parte de él es eliminada por el riñón (10). A finales de 1978 con una prueba mucho más específica y sensible (radioinmunoensayo) investigaron el nivel de polisacárido 9,12 en sangre, orina y materia fecal de pacientes con fiebre tifoidea, pacientes vacunados con gérmenes muertos y neonatos, ratificando las observaciones anteriores y encontrando que

en personas sanas y en la sangre de las madres y del cordón umbilical de los hijos es posible detectar niveles muy bajos de material antigénico que cruza con los antígenos 9,12 (11).

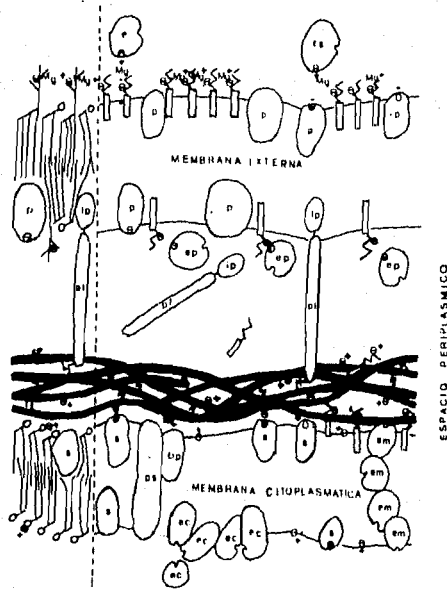
CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS DE LAS SALMONELAS.

Las bacterias del género salmonelas son quizás los gérmenes patógenos más ubicuos en la naturaleza, forman una de las seis divisiones principales (tribus) de la familia Enterobacteriaceae y son clasificadas en tres especies primarias: Salmonella choleraesuis, Salmonella typhi y Salmonella enteritidis. Salmonella choleraesuis y Salmonella typhi constituyen cada una un serotipo único. En contraste con Salmonella enteritidis donde se han descrito 2000 serotipos antigénicamente distintos (4). Desde el punto de vista clínico se manejan prácticas clasificaciones de las salmonelas de acuerdo a las preferencias de éstas por un huésped determinado y adaptaciones al mismo (2,3,12), pero en términos generales se habla de salmonelas con gran capacidad invasora i.e. Salmonella typhi y salmonelas poco invasoras, que usualmente producen gastroenteritis aguda, autolimitante e infrecuentemente invaden el torrente sanguíneo i.e. Salmonella typhimurium, Salmonella anatum.

PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

El polisacárido de las enterobacterias se encuentra localizado en la pared celular (13,14), ésta se encuentra constituida por tres capas distintas. La figura 1 muestra una representación de la pared celular.

FIGURA No. 1



Representación esquemática de la pared celular de las bacterias gram negativas

1.2. MEMBRANA CITOPLASMÁTICA.

Es una doble capa de fosfolípidos orientados con regiones polares hacia el exterior y apolares hacia el interior, asociándose a ellos proteínas por medio de interacciones físico-químicas (hidrofóbicas, cargas parciales) con pequeñas cantidades de carbohidratos unidos a lípidos y proteínas.

Las proteínas están situadas en la superficie, en su parte media o en su interior y están constituidas esencialmente por proteínas estructurales y de transporte. En la membrana se realiza la biosíntesis de los diferentes constituyentes de la pared celular incluyendo el polisacárido (15).

1.2. ESPACIO PERIPLÁSMICO.

Contiene peptidoglicano responsable de la rigidez de la pared celular (16). La peptidoglicano está unida a la capa externa a través de la lipoproteína de Braun (17).

1.3. LA CAPA EXTERNA.

Tiene un espesor de 75 a 85 nm, está constituida de fosfolípidos (principalmente de fosfatidilcolina) (18) proteínas específicas y cantidades variables de lipopolisacárido que le dan la especificidad a la bacteria gram negativa y que reciben el nombre de factor "O". La presencia de estos factores permitió a Kauffman y White a través de aglutinación con bacterias homólogas y heterólogas clasificarlas en serogrupos (19). Tabla Nº 1.

LIPOPOLISACARIDO.

Los antígenos somáticos O son parte de una estructura macromolecular que forma la porción externa de la pared celular de las salmonellas.

T A B L A No. 1

CLASIFICACION SEROLOGICA Y COMPOSICION DE AZUCARES DE
ALGUNOS ANTIGENOS DE SALMONELAS (según Kauffman-White)

Serotipo	Grupo	Factores O	Azucares
<u>S. paratyphi A</u>	A	1,2,12	Man Rha Par
<u>S. paratyphi A</u> var. durazo		2,12	Man Rha Par
<u>S. abortus equi</u>	B	4,12	Man Rha Abe
<u>S. paratyphi B</u>		1,4,5,12	Man Rha Abe
<u>S. typhimurium</u>		1,4,5,12	Man Rha Abe
<u>S. typhimurium</u> (mutante)		1,4,12	Man Rha Abe
<u>S. bredeney</u>		1,4,12,27	Man Rha Abe
<u>S. paratyphi C</u>	C1	6,7	Man
<u>S. cholerasuis</u>		6,7	Man
<u>S. newport</u>	C.2	6,8	Man Rha Abe
<u>S. typhi</u>	D.	9,12	Man Rha Tyv
<u>S. sendai</u>		1,9,12	Man Rha Tyv
<u>S. enteritidis</u>		1,9,12	Man Rha Tyv

las y en general de todas las Enterobacteriaceas. Este complejo es llamado ENDOTOXINA O LIPOPOLISACARIDO (LPS) y está constituido de tres regiones distintas: Lípido "A" (20), Núcleo Basal (21) y cadena específica (22). En la figura 2 se muestra un diagrama esquemático de la pared celular de la salmonela y otras Enterobacteriaceas.

En la actualidad, como lo apunta McCabe (23), el nombre de endotoxinas no es enteramente exacto ya que originalmente fue utilizado para designar un componente el cual permanecía como parte integral de la bacteria, a diferencia de la exotoxina la cual era liberada de la bacteria durante el crecimiento. Estudios recientes han demostrado que -- aunque constituye una parte importante de la pared celular gram negativas, cantidades sustanciales son liberadas en el medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano (24). Una variedad de términos se han usado de manera intercambiable con endotoxinas, aunque para algunos autores debe limitarse a una molécula constituida por lipopolisacárido y proteína, pero dado que los efectos biológicos son reproducidos por -- partes de la molécula, se usa indistintamente, aunque no lo es desde -- el punto de vista químico, los nombres de: lipopolisacárido (LPS), antígeno "O", pirógenos bacterianos y glicolípidos (para endotoxinas de mutantes rugosas).

La molécula de lipopolisacárido o endotoxina se encuentra presente en todas las bacterias gram negativas y parece ser único de tales -- organismos Figura Nº 3.

LIPIDO "A".

El lípido "A" constituye la región III descrita por Luderitz y -- Westphal en la estructura de la molécula del LPS. Forma el esqueleto -- al cual la porción más interna al núcleo basal (KDO y porciones de hep

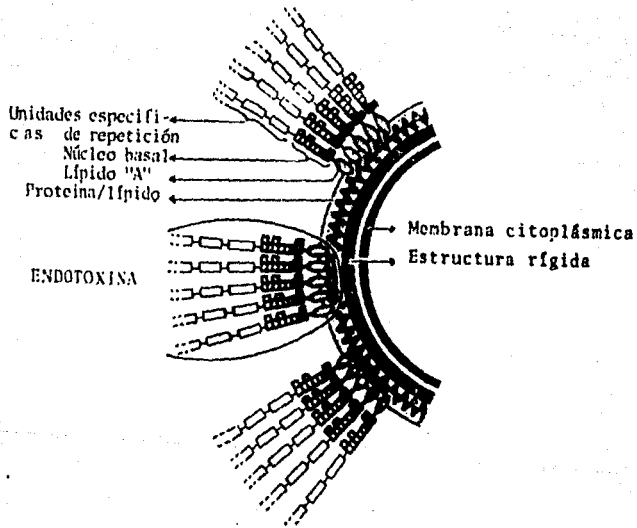


Figura 2: Diagrama esquemático de la pared celular de las Salmonellas y otras Enterobacteriaceas (tomado de O. Westphal: Bacterial Endotoxins, Int. Archs. Allergy y appl. Immun. 49: 1 - 43, 1975).

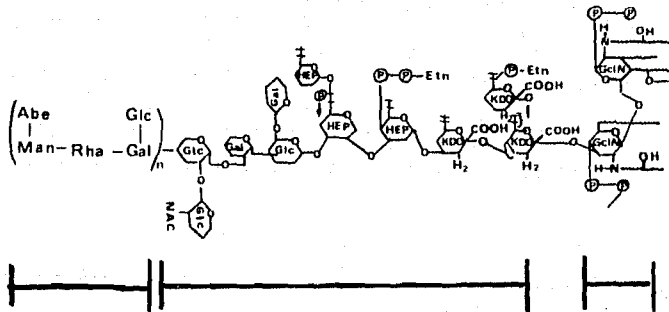


Figura 3: Representación esquemática de las tres regiones del polisacárido (tomado de Luderitz, O. y colaboradores: Lipid A: Chemical Structure and Biological Activity, *J. Infect. Dis.*, 128: 17, 1973).

tosas) están unidas; por otra parte constituye la porción del LPS a través del cual se une a las proteínas de membranas, la naturaleza -- de esta unión no ha sido definitivamente establecida, parece ser de -- tipo covalente probablemente por una unión n-glucosídica (20).

En la salmonela el Lípido "A" contiene glucosamina, fosfatos y largas cadenas de ácidos grasos. También contiene etanol-amina, pero su sitio de unión es aún desconocido (20). Los ácidos grasos en salmonelas son: laúrico (C12), mirfístico (C14), palmítico (C16) y B-hidroximirfístico, este ácido es característico de la molécula de Lípido -- "A". La presencia de estos ácidos le confieren las propiedades lipofílicas a esta porción del LPS.

Desde el punto de vista biológico existen evidencias de que no sólo la cantidad de estos ácidos, sino también su naturaleza son capaces de modificar el grado de actividad endotóxica del LPS (20).

Ultimamente, ha sido establecido que la actividad biológica y la toxicidad de la endotoxina reside en la porción del Lípido "A" del LPS. Tabla N° 2.

2. NUCLEO BASAL.

La región del núcleo basal en salmonela está constituido por galactosa, glucosa, glucosamina, heptosa y KDO (2 ceto, 3 deoxi-octonato), en una proporción 2:2:1:3:3 (15).

El núcleo basal se encuentra situado entre el lípido "A" y la cadena específica y está constituida por dos regiones:

La interna formada por un tri-KDO (2 ceto, 3 deoxi-octonato), unido a una triheptosa, y la externa por un oligosacárido constituido esencialmente de galactosa, glucosa y N-acetil-glucosamina (15-21).

T A B L A N° 2

EFFECTOS DE LAS ENDOTOXINAS

- ***Pirogenicidad***
 - ***Choque***
 - ***Reacción de Shwartzman***
 - a. ***Generalizada***
 - b. ***Local***
 - c. ***Aumento de la reactividad dérmica a la epinefrina***
 - ***Activación del sistema de coagulación (factor Hageman)***
 - ***Generación de Kininas***
 - ***Activación del complemento***
 - ***Hiperglicemia seguida de hipoglicemia***
 - ***Inducción de interferón***
 - ***Inducción de prostaglandinas***
 - ***Aumento no específico de la resistencia***
 - ***Necrosis hemorrágica de tumores***
 - ***Reactividad inmunológica***
 - ***Tolerancia***
 - ***Otros***
-

3. CADENAS ESPECIFICAS

Estas corresponden a la región externa del lipolisacárido, están constituidas por la polimerización de un oligosacárido de base con uniones glicosídicas propias para cada cepa (unidades de repetición) (22).

OBJETIVOS DEL TRABAJO

En el presente trabajo se cuantifica por radioinmunoensayo el polisacárido 9,12 y 1,4,5,12 en sangre, orina y materia fecal de niños con gastroenteritis por salmonelas B y/o D, con la finalidad de conocer si durante el episodio agudo de una gastroenteritis por salmonela no typhi hay paso a la sangre y eliminación por la orina del material antigénico que cruza con éstos antígenos somáticos.

También se midió los niveles de antígenos circulantes pre y post hepáticos en humanos y en animales de experimentación en condiciones fisiológicas y patológicas.

II MATERIAL Y METODOS.

1. ESTUDIO EN HUMANOS.

1.1 Investigación del polisacárido 9,12 (heterólogo) y 1,4,5, 12 (homólogo) en sangre, orina y materia fecal de niños - con gastroenteritis por Salmonella B y/o D , durante la etapa aguda de la enfermedad y a los 7 y 14 días de convalescencia.

1.1.1 INVESTIGACION DEL POLISACARIDO 9,12 (HETEROLOGO).

Se estudiaron 27 pacientes, 13 de sexo masculino y 14 -- de sexo femenino, con edades comprendidas entre recién nacidos y escolares, vistos en el Hospital Infantil de México, entre los meses de mayo y diciembre de 1978, con cuadro clínico de gastroenteritis, a -- quienes se les aisló salmonelas grupo B y/o D en materia fecal y/o -- sangre. De estos 27 pacientes sólo 2 no fueron internados porque sus condiciones clínicas no lo exigían y la toma de la muestra era factible como externos, 3 requirieron hospitalización para la toma de muestras, 14 adquirieron la infección intrahospitalaria y en el resto las complicaciones hicieron necesario su ingreso.

A 19 de los 27 pacientes se les tomaron 3 series de muestras de sangre, orina y materia fecal, con intervalos de 7 días, a 4 sólo dos series, uno de los cuales fue por muerte antes de completar el estudio, los otros tres no asistieron a la cita concertada. Finalmente 4 pacientes tienen una muestra de sangre, orina y materia fecal, uno -- por muerte y 3 por inasistencia.

En esta prueba, el grupo experimental fue integrado por 27 pacientes con cuadro clínico de gastroenteritis, en quienes se aisló -- salmonelas "B" y/o "D" en materia fecal y un grupo testigo constituf-

do por 20 niños, en edades comprendidas entre lactantes y escolares, - procedentes de la Casa Cuna de Coyoacán, D.F., sin sintomatología alguna y considerados normales previo examen médico pediátrico.

La secuencia del estudio incluyó: 1, muestra de 2 ml de sangre mediante punción venosa en condiciones asépticas en tubo libre de nitrógenos (previamente calentados a 180°C por 3 horas). 2. colección de 3 tomas de orina y materia fecal de 24 horas, con intervalos de 7 días.

1.1.2 INVESTIGACION DE POLISACARIDO 1,4,5,12 (HOMOLOGO).

1.1.2.A. Los sueros de los 27 pacientes estudiados en el grupo 1.1.1 fueron guardados a -70°C e investigados 10 meses después el nivel de polisacárido 1,4,5,12 (homólogo). Dado que la cantidad de suero en todos los casos no fue suficiente la muestra quedó integrada así: de los 19 pacientes con 3 muestras de suero, sólo en 11 se pudo trabajar las tres muestras y en 6, dos muestras, siendo insuficiente en tres. En los cuatro pacientes con dos muestras, fue suficiente en dos. Por lo que en total en este grupo se midió el nivel de polisacárido 1,4,5,12 en 11 pacientes 3 muestras, en 10 pacientes 2 muestras y 2 pacientes una muestra.

1.1.2.B. INVESTIGACION DEL POLISACARIDO 1,4,5,12 (HOMOLOGO) EN SANGRE, ORINA Y MATERIA FECAL DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS POR SALMONELLA B Y/O D.

Este grupo lo constituyen 19 pacientes, 14 de sexo masculino y 5 de sexo femenino, con edades comprendidas entre recién nacidos y preescolares, vistos en el Hospital Infantil de México, entre los meses de marzo de 1979 a enero de 1980, con cuadro clínico de gastroenteritis, a quienes se les aisló salmonelas B y/o D en materia fecal. Todos estuvieron internados bien porque las condiciones clínicas así lo exigían y en 6 por necesidades del estudio.

A 9 de los 19 pacientes se les tomó tres series de muestras de sangre, orina y materia fecal, con intervalos de 7 días, a tres sólo dos muestras, uno por muerte y otro por alta voluntaria y el tercero no asistió a la cita. Por último, 7 pacientes tienen una muestra de sangre, orina y materia fecal, uno por muerte y 6 por inasistencia.

1.2 INVESTIGACION DEL POLISACARIDO 1,4,5,12 EN SUERO DE NIÑOS CON HEPATITIS EN LA ETAPA AGUDA DE LA ENFERMEDAD Y TRES MESES DESPUES DE LA MISMA.

Se estudiaron 15 pacientes, 6 masculinos y 9 femeninos en edades comprendidas entre preescolares y escolares, vistos en el Hospital Infantil de México, entre marzo de 1979 y agosto de 1980, con cuadro clínico y de laboratorio de hepatitis infecciosa. A todos se les tomó sangre en la etapa aguda de la enfermedad y tres meses después, en ausencia de signos clínicos de enfermedad.

1.3 INVESTIGACION DEL POLISACARIDO 1,4,5,12 EN SUERO DE SANGRE PORTAL Y PERIFERICA DE 10 NIÑOS SOMETIDOS A LA LAPAROTOMIA POR PATOLOGIA NO INFECCIOSA.

Esta muestra está integrada por 10 pacientes, con edades comprendidas entre 2 y 8 años, 6 de sexo femenino y 4 de sexo masculino, quienes fueron sometidos a laparotomía exploradora por problema oncológico y durante el acto operatorio se tomó simultáneamente una muestra de sangre mesentérica y otra de sangre periférica.

1.4 INVESTIGACION DEL POLISACARIDO 1,4,5,12 EN SUERO DE 10 NIÑOS SOMETIDOS A ESTERILIZACION PREQUIRURGICA DE COLON.

Se estudiaron 10 pacientes, internados en la sala de cirugía, 6 de sexo masculino y 4 de sexo femenino, con edades comprendidas entre

2 y 6 años de edad, a quienes se les dió tratamiento a base de neomicina (80 mg X Kg-día) más eritromicina (50 mg X Kg-día) para esterilización de colon pre-quirúrgica, 24 horas antes de la intervención. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas 2 a 4 horas antes de iniciar el tratamiento, 24 horas con tratamiento y 3 días después de la última dosis. Los medicamentos fueron administrados 24 horas antes de la intervención.

1.5 INVESTIGACION DEL POLISACARIDO 9,12 EN SANGRE, ORINA Y MATERIA FECAL DE FAMILIARES DE PACIENTES CON FIEBRE TIFOIDEA.

La muestra la constituyen 77 personas de diferentes edades, desde lactantes hasta 50 años de edad, quienes conviven con el niño caso índice, internado en el Servicio de Contagiosos IV, con cuadro clínico y cultivo en sangre y/o heces positivo a Salmonella typhi. A estas personas (familiares) se les tomó coprocultivo y una muestra de sangre, orina y materia fecal, investigándose en ellos los niveles de polisacárido 9,12. El grupo control estuvo integrado por 20 pacientes con fiebre tifoidea (control positivo) y 10 personas adultas sanas (control negativo).

2. ESTUDIO EN ANIMALES

2.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CONEJOS.

Se utilizaron 10 conejos, de sexo masculino, raza Nueva Zelandia, con 2.500 grs. de peso y edad entre 4 y 6 meses. Bajo anestesia general con ketamina intravenosa (3 mg X kg-dosis) se llevó a cabo la construcción de un asa de Thiry-Vella de 25 cm de longitud (25), la cual consiste en la desfuncionalización de un segmen

to intestinal que conserva su vascularización intacta, cuyos segmentos proximal y distal son abocados a la pared abdominal por medio de yeyunostomías. La continuidad del resto del intestino se mantiene mediante entero-enteroanastomosis término-terminal (figura 4).

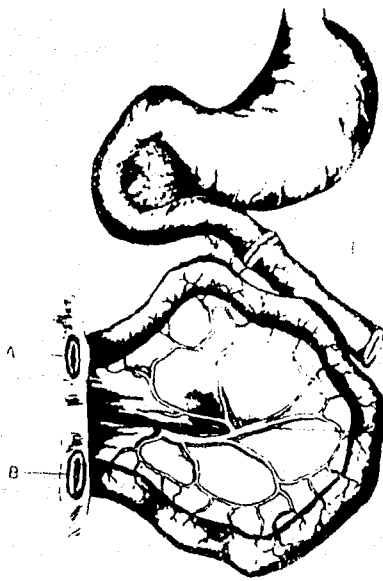
Durante los tres primeros días post-operatorios los conejos recibieron alimentación elemental (Vivonex de Norwich Pharmacal Co de México) y los siguientes 5 días fueron alimentados con conejina (Purina, S.A. de México). Se mantenían vivos durante 8 días practicándoseles lavados 3 veces al día, con solución fisiológica, a través de las bocas de yeyunostomias con sonda Fowley Nº 12.

Al octavo día, eran sacrificados, obteniéndose sangre simultáneamente de vasos del asa intestinal desfuncionalizada, san gue portal, mesentérica y periférica (vena marginal de la oreja).

2.1.a. Construcción de asa de Thiry-Vella.

Inicialmente se aplican 2 mg de Ketamina en la vena marginal de la oreja del conejo en estudio, con la finalidad de anestesiarlo y facilitar su manejo. Seguidamente se practica lavado en la región abdominal con abundante agua y jabón y se rasu ra un área de 7 x 5 cm. Una vez rasurado y practicada la asepsia de la región, se fija cada miembro mediante un cordel a los extremos de una tabla de 70 cm de largo por 30 cm de ancho. Se canaliza la vena marginal de la oreja con una mariposa-25 -- (aguja No.25, de Abbott Laboratories de México, S.A.) y se le pa sa durante el acto operatorio 100 cc de solución glucosada al 5% a goteo lento, en 2 horas. Esta vía, también se usa para adminis trarle 1 mg de ketamina cada 25 minutos.

FIGURA N° 4



Asa de Thiry-Vella. A.Yeyunostomía proximal.B.Yeyunostomía distal.C. Asa intestinal aislada.D.Anastomosis intestinal.

En condiciones asépticas y bajo anestesia general se practica laparotomía media y localización de un segmento de yeyuno y aislamiento de un asa de 25 cm de longitud, conservándose la irrigación mesentérica; ambos extremos del asa intestinal aislada se exteriorizan a la pared abdominal en forma de yeyunostomía tipo Witzel; la continuidad del tracto intestinal se restablece mediante enteroanastomosis término-terminal en dos planos de sutura empleando catgut simple 4-0. Cierre de la brecha mesentérica utilizando puntos separados de seda 4-0. Cierre de la pared abdominal en un plano de sutura mediante surgete continuo empleando seda 3-0. Las fotografías 1 y 2 muestran aspectos de la técnica descrita.

2.2 ESTUDIO EN EMBRIONES DE POLLO.

Cálculo de la LD₅₀ en embriones de pollo inoculados con suero de pacientes con fiebre tifoidea y gastroenteritis por salmonelas B y/o D.

Se usaron huevos embrionados obtenidos de la granja Huefer*. Los huevos fueron incubados en una incubadora humidificada marca BG-Mex., manteniéndose regulada la temperatura entre 37 y 38°C.

Después de 11 días de incubación fueron inoculados por vía intravenosa, según técnica descrita en el inciso 2.2.A

La cobertura de la membrana se observó innecesaria, la mortalidad de los embriones inoculados con solución fisiológica después de 6 meses de entrenamiento fue de 0 a 1%. Se practicó estudio bacteriológico de rutina del material inyectado y de los embriones en el momento de su sacrificio,

* : Granja Huefer, Av. los Maestros No.137, Colonia Santo Tomás, México 17, D.F., México.

**FOTOGRAFIA 1: TECNICA DE CONSTRUCCION
DE ASA DE THIRY - VELLA**

**FOTOGRAFIA 2: TECNICA DE CONSTRUCCION
DE ASA DE THIRY - VELLA**

incluyendo frotis y cultivo en placas de agar sangre y tioglicolato. Todo el material utilizado en la inoculación (agujas, jeringas, pipetas, tuvos de en sayo) fueron previamente esterilizados y librados de pirógenos sometiéndolos a temperaturas de 180°C por tres horas.

La LD₅₀ fué calculada por el método de Reed-Muench (27). Previamente se calculó la LD₅₀ usando el polisacárido de Salmonella typhi (Difco) y una vez con certeza de dominar la prueba se prepararon diluciones seriadas 1:10, -- 1:100, 1:1000 y 1:10000 con sueros de pacientes con fiebre tifoidea, sue ro de pacientes con salmonelas B y/o D más solución salina esteril libre de pirógenos. A estos sueros previamente se les había determinado por radioinmunoensayo el nivel de polisacárido, habían permanecido congelados a -70°C, al momento de practicar la dilución una alícuota de los mismos fue cultivada para asegurarnos que no estaban contaminados.

El grupo control estuvo integrado por suero de 5 pacientes considerados sanos. El criterio de sano aplicado en estos pacientes incluye: sin signos, ni síntomas de enfermedad al momento de la prueba, sin antecedentes de problemas infecciosos o de ingesta de medicamentos un mes antes de la obtención de la muestra.

2.2.A TECNICA DE INOCULACION

Embriones de 11 días de edad fueron inoculados por vía intravenosa, según técnica descrita por Finkelstein (26); que consiste en: el día del experimento los huevos son observados a través de un ovoscopio, dentro de un cuarto oscuro, se localiza y se marca con un lápiz de grafito un tra yecto venoso prominente, en donde previa asepsia con solución yodada 10%; se abre, usando una sierra eléctrica de dentista, una ventana de 4 x 8 mm.

dejando al descubierto la membrana corioalantoidea la cual se aclara con aceite mineral estéril para visualizar adecuadamente la vena donde se procederá a realizar la inoculación. Una vez realizada ésta, se regresan los embriones a la incubadora y son sacrificados 24 horas después rompiéndolos en una caja de Petri y determinando su muerte.

Las ventanas fueron abiertas 60 a 90 minutos antes de la inoculación, la cual se practicó usando jeringas de insulina cortas con aguja calibre 27 mm.

Ocasionalmente se observó, sangrado importante post-inoculación, siendo estos embriones descartados previamente de la prueba.

M E T O D O S .

3. Preparación de los antígenos:

3.1. Cepas Utilizadas.

Salmonella typhimurium: Con los determinantes antigénicos 1,4,5,12 obtenida de la colección del Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México.

Salmonella typhi Ty2: Con los determinantes antigénicos 9,12 de acuerdo a la clasificación de Kauffman y White (22) de la colección del Laboratorio de Inmunología del Hospital Infantil de México.

Estas bacterias fueron cultivadas en el siguiente medio sólido:

Extracto de corazón de buey.....	500 g.
Peptona.....	10 g.
Cloruro de Sodio.....	5 g.
Agar.....	25 g.

Se reconstituyó el medio en agua destilada, en una proporción de 40 g/litro colocándose en tubos de ensayo; se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos y fué colocado en forma inclinada para solidificarlo. El cultivo de las bacterias en éste medio permitió su identificación como colonias de aspecto liso.

A) PREPARACION DEL INOCULO: Se tomó una asada de varias colonias cultivadas en el medio anterior y se suspendieron en un medio de cultivo líquido con:

Extracto de cerebro.....	200 g.
Extracto de corazón de buey.....	200 g.
Peptona.....	10 g.
Cloruro de Sodio.....	5 g.
Fosfato disódico.....	2.5g.
Glucosa.....	2.0g.

Este medio fué reconstituido con agua destilada, en una proporción de 37 g/litro, se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Se dejó 48 hs. en incubación comprobándose su esterilidad. Una vez finalizado el tiempo de incubación de este cultivo se utilizó para inocular botellas de Roux.

Se utilizó el medio de cultivo anterior adicionado de agar al 1% para permitir su solidificación.

El medio reconstituido en agua destilada, se colocó en cantidades aproximadas de 100 ml. en cada botella, éstas fueron esterilizadas; se les dejó solidificar y se colocaron en la estufa a 37°C. durante 48 hs. para asegurar su esterilidad.

En estas condiciones se inocularon varios lotes de botellas (2 ml. de cultivo por botella) hasta completar 200; después de 18 hs. de incubación a 37°C. se cosechó el crecimiento obtenido en solución salina isotónica.

Cosecha: Una vez retirado el tapón de las botellas en condiciones asépticas, se introdujeron 25 ml. de solución salina isotónica, se movilizó hasta desprender todas las colonias y se vació en matraz estéril; el lavado se repitió en dos ocasiones.

Concentración e inactivación de las bacterias: Se centrifugó la suspensión de bacterias a 12,100 x g/10 min. a 4°C el sedimento fué lavado tres veces con solución salina isotónica hasta obtener bacterias libres de medio de cultivo. Para inactivarlas, se empleó acetona volumen a volumen. La suspensión de bacterias muertas en acetona fue centrifugada, se eliminó el sobrante y el sedimento resuspendido en acetona volumen a volumen; se repitió el proceso anterior tres veces y el sedimento obtenido en la última centrifugación fue colocado en cajas de Petri y secado a 37°C.

4. Métodos Químicos

4.1. Extracción del Polisacárido

La extracción del polisacárido se realizó siguiendo la técnica en Freeman y Staub (28, 29). Esta técnica se basa en la extracción del polisacárido mediante hidrólisis acética 0.1N a 100°C - 1 hora. Una vez extraído el polisacárido, la precipitación del mismo se realizó con alcohol etílico a uno y cinco volúmenes intercalando entre éstas una precipitación con ácido acético glacial a concentraciones variables de acuerdo al género de Salmone~~lla~~lla, que van de 95 a 98%. Una vez finalizado el proceso anterior, se dializó el polisacárido contra agua destilada y se liofilizó.

Se pesaron 15 gramos de gérmenes secos de los 50 -- gramos obtenidos de los cultivos de las botellas de Roux, se suspendieron en 90 ml. de agua destilada y se adicionaron 10 ml. de ácido acético 1N. Esta suspensión se colocó en agua a 100°C durante 90 mn. Una vez fría la suspensión se centrifugó a 12,100 x g. durante 10 mn., obteniéndose un precipitado que llamamos "A" y

un sobrenadante "A". El precipitado se resuspendió en 90 ml. de agua destilada y se le adicionaron 10 ml. de ácido acético 1N.

2da. hidrólisis acética en las mismas condiciones anteriores:

Centrifugación a 12.100 x g/10 min.

Precipitado "B"

Sobrenadante "B"

Resuspensión en 90 ml. de agua destilada, adicionar 10 ml. de ácido acético - 1N.

3ra. hidrólisis en las mismas condiciones anteriores:

Centrifugación a 12.100 x g/10 min.

Precipitado "C"

Sobrenadante "C"

Concentración: Se reunieron los sobrenadantes A, B y C, y se evaporaron durante 30 minutos en un rotavapor. El sedimento seco quedó adherido a las paredes del matraz, se disolvió en 25 ml. de agua destilada, se centrifugó a 12.100 x g/10 min., el sedimento se descartó y se utilizó el sobrenadante en las siguientes precipitaciones alcohólicas:

1ra. precipitación con 1 Vol. de alcohol etílico:

El sobrenadante anterior se llevó a 25 ml. de agua destilada, se adicionó el mismo volumen de alcohol etílico y se le dejó reposar durante la noche.

Centrifugación a 12.100 x g/10 min.

Precipitado "A"	Sobrenadante "B"
Se disolvió en 25 ml. de agua destilada.	(50 ml.)

1ra. precipitación con 5 Vol. de alcohol etílico:

Al precipitado disuelto se llamó "A" y se le adiciona ron 125 ml. de alcohol etí lico.	Al sobrenadante se le lla mó "B" y se le adicionaron 225 ml. de alcohol etílico.
---	--

Reposo durante 10 hrs.

Centrifugación a 12.100 x g/10 min.

Precipitado "A"	Sobrenadante "A"	Precipitado "B"	Sobrenadante "B"
Se disolvió en 50 ml. de agua destilada	(se descartó)	Se disolvió en 50 ml. de agua destilada	(se descartó)

Reposo 20 hrs. a 40°C

2da. precipitación a 1 Vol. de alcohol:

Centrifugación a 12.100 x g/10 min.

Precipitado "A"	Sobrenadante "A"	Precipitado "B"	Sobrenadante "B"
Se disolvió en 20 ml. de agua destilada	(se obtuvieron 100 ml.)	Se disolvió en 20 ml. de agua destilada	(se obtuvieron 100 ml.)

Unión de precipitados:

"A" y "B" = "C"

Unión de sobrenadantes:

"A" y "B" = "D"

2da. precipitación con 5 Vol. de alcohol:

A los precipitados disueltos "C" se adicionaron 200 ml. de alcohol etílico.

A los sobrenadantes "D" se adicionaron 900 ml. de alcohol etílico.

Reposo 24 hrs.

Centrifugación 12.100 x g/10 min.

Los sobrenadantes y precipitados fueron tratados en la misma forma hasta tener 5 precipitaciones con 1 Vol. de alcohol y 5 precipitaciones con cinco volúmenes de alcohol, después de la última precipitación 5 volúmenes de alcohol, se procedió a las precipitaciones acéticas.

1ra. precipitación acética:

Los precipitados provenientes de "C" se disolvieron en 80 ml. de agua destilada.

Los precipitados provenientes de "D" se disolvieron en 60 ml. de agua destilada.

Los sobrenadantes "C" y "D" fueron descartados

Ambos se precipitaron con ácido acético al 97%

Sol "C" (80 ml.)

Sol "D" (60 ml.)

A esta solución se adicionaron 1,252 ml. de ácido acético concentrado.

A esta solución se adicionaron 939 ml. de ácido acético concentrado.

Centrifugación a 12.100 x g/10 min.

Precipitado "C" Sobrenadante "C"

Precipitado "D" Sobrenadante "D"

(Se disolvió en 44.7 ml. de agua destilada).

(Se descartó)

(Se disolvió en 25 ml. de agua destilada)

(Se descartó)

2da. precipitación con ácido acético al 98% :

A la solución de precipitado "A" A la solución de precipitado se le adicionaron 699 ml. de ácido acético concentrado. "B" se le adicionaron 391 ml. de ácido acético concentrado.

Centrifugación a 12.100 x g/10 min.

Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante
(Se disolvió en 50 ml. de agua destilada)	(Se descartó)	(Se disolvió en 30 ml. de agua destilada)	(Se descartó)

Los precipitados disueltos en agua destilada se utilizaron para llevar a cabo 3 series de precipitaciones alcohólicas con 1 volumen y con 5 volúmenes de alcohol etílico, siguiendo el protocolo antes descrito.

Al finalizar la última precipitación con 5 volúmenes de alcohol, los precipitados obtenidos fueron disueltos en agua destilada, se dializaron contra agua destilada durante 8 recambios sucesivos cada 8 horas, para finalmente liofilizarlo y obtener el polisacárido puro.

4.2 Tiramización del Polisacárido

La técnica seguida fue la propuesta por Mitchell (30).- La reacción comprende dos fases: la primera consiste en la activación del polisacárido, mediante la adición de bromuro de cianógeno en un medio fuertemente alcalino. En esta reacción se forman dos compuestos intermedios:

- A) Imido carbonato inerte, y
- B) Imido carbonato activo.

La segunda fase de la reacción es el acoplamiento del imido carbonato activo y clorhidrato de tiramina, obteniéndose tres compuestos:

- A) Derivado de isourea;
- B) Carbonato sustituido; y
- C) Imido carbonato sustituido (las fórmulas se presentan en la figura 5.)

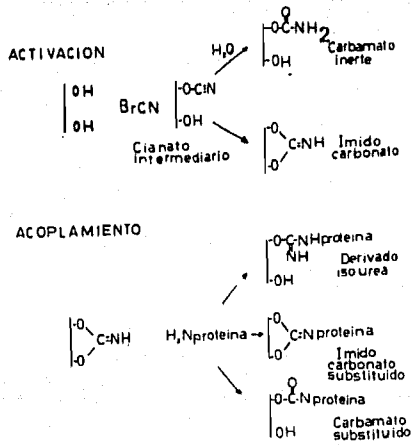
PROCEDIMIENTO :

- A 2 ml. de una solución de polisacárido con 15 mg/ml. se le adicionaron 0,4 ml. de una solución de bromuro de cianógeno a una concentración de 25 mg/ml. durante 6 minutos, se llevó a cabo la - reacción manteniéndose el pH entre 9-10 con hidróxido de sodio - 0.1N (primera fase de la reacción). A esta mezcla se le agregó 0,35 ml. de bicarbonato de sodio 1M que contenía 8 a 10 mg. de tiramina; se dejó a temperatura ambiente durante dos horas (segunda fase de la reacción).

- Una vez finalizado este tiempo de la reacción, se dializó durante 14 horas contra una solución salina amortiguadora de fosfatos.

La concentración del polisacárido se determinó mediante una curva de calibración. El método que se empleó para realizarla fue: de una solución patrón compuesta de 4 mg. de galactosa, 4 mg. de manosa y 12 mg. de glucosa disueltos en 10 ml. de agua destilada, se hicieron varias diluciones hasta obtener concentraciones desde 2 a 30 μ g/ml. A cada una de ellas se les agregó antrona al 2%, se colocaron a 100°C durante 8 min., se enfriaron y se leyeron en espectofotómetro a 625 nm.

FIGURA N° 5



Reacción de acoplamiento de un polisacárido a una proteína.

4.3 Yodación del Polisacárido.

El polisacárido tiraminado fué yodado por el método de Greenwood y Hunter (31), el cual se basa en el empleo de la cloramina "T" como agente oxidante; en nuestro caso se utilizó el isótopo ^{125}I (obtenido de: The Radiochemical Centre Amersham) en forma de yoduro de potasio, la reacción se detuvo con metabisulfito de Na.

PROCEDIMIENTO:

A 0,1 ml. de polisacárido tiraminado, con una concentración de 5 mg/0,1 ml., se le adicionó 0,1 ml. de solución amortiguadora de fosfatos 1/15M pH 7,5 (11).

A esta solución se le agregó 0,3 ml. de cloramina "T" a una concentración de 2,4 mg/ml y finalmente se añadió un micro Curie de ^{125}I en 0,1 ml.

La solución anterior se dejó en reposo durante 6 minutos; la reacción se detuvo con 0,2 mg/ml de Metabisulfito de sodio en solución amortiguadora de fosfatos y se añadió 0,1 ml. de yoduro de potasio (10 mg/ml) en solución amortiguadora de fosfatos, dejándose reposar 6 minutos.

Finalmente se le adicionó 0,1 ml. de gelatina en solución amortiguadora de fosfatos a una concentración de 10 mg/ml. Se le dializó contra solución amortiguadora de boratos salino en una proporción 1:6000, se hicieron recambios hasta que el líquido de diálisis se encontró con una radioactividad mínima constante.

5. Protocolo de Inmunización.

5.1. 1ra. Inmunización

Se utilizaron conejos de la raza Rex de cuatro meses de edad, cuyo peso promedio fue de 2.500 g. La inmunización se llevó a cabo inoculando Salmonella typhimurium obtenida del medio sólido.

Las bacterias fueron lavadas en solución salina isotónica 3 veces, el sedimento se resuspendió en la misma solución y se midió la concentración a través de turbidez (32). Una vez obtenida la concentración de 2×10^9 gérmenes por ml., éstos fueron colocados en ampolletas estériles, se cerraron y se calentaron a 100°C durante dos horas: tabla No. 3a.

T A B L A No. 3a.

Protocolo de Inmunización

Día	ml. de gérmenes inoculados (2×10^9)	Vía de inoculación
1er.	0,5	Intravenosa
3er.	1,0	"
5o.	1,0	"
7o.	1,0	"
9o.	1,0	"
11o.	1,0	"
13o.	PUNCION CARDIACA	

De la sangre obtenida se separa el suero al cual se le determinaron los anticuerpos respectivos mediante una curva de precipitación cuantitativa, los conejos se dejaron en reposo un mes.

5.2. Segunda Inmunización.

Los animales se sometieron a una segunda inmunización con las mismas bacterias antes descritas siguiendo el protocolo que se describe en la tabla # 3b.

TABLA # 3b.
Protocolo de la 2a. Inmunización.

Día	ml. de gérmenes inoculados (2×10^9 / ml.)	Vía de inoculación.
1er.	0.5	Subcutánea
2do.	mañana 0.5	"
	tarde 0.5	"
6to.	1.0	Intravenosa
8avo.	1.0	"
10mo.	1.0	"
12avo.	1.0	"
13avo.	PUNCION CARDIACA.	

Como en el caso anterior se centrifugó la sangre para obtener el suero que nos sirve de nuevo para hacer la curva de precipitación y observar el incremento en la concentración de anticuerpos.

5.3. Determinación de la concentración de IgG en los anticuerpos.

Utilizando una curva de calibración llevada a cabo con IgG de conejo utilizando concentraciones de 25 a 200 μ g. de IgG disueltas en 0.2 ml. de NaOH 0.1N y en ese volumen se llevó a cabo la técnica de Lowry (32).

En la mayoría de los casos las lecturas de las curvas de precipitación cuantitativa (anticuerpos) se hicieron por el método de Lowry.

Con este procedimiento no es posible calcular en forma directa el nitrógeno protéico; por lo que fué necesario mediante la curva de referencia previamente descrita extrapolar los datos obtenidos con las curvas de precipitación, y así, obtener la concentración de IgG en los anticuerpos.

6. Métodos Inmunoquímicos.

6.1. El método experimental de Heidelberg (33) y Kendall utiliza un volumen constante de suero y cantidades crecientes de antígeno. Cuando la reacción finaliza el precipitado es determinado cuantitativamente, utilizando cualquier método para cuantificar proteínas (280 nm ó Lowry). Se estudia el sobrenadante obtenido después de separar el precipitado:

Sobrenadante + antígeno = Precipitación
Exceso de anticuerpo

Sobrenadante + antígeno = Negativo
Equivalencia

Sobrenadante + anticuerpo = Precipitación
Exceso de antígeno

6.1.1 Para llevar a cabo la curva de precipitación, utilizando el antígeno homólogo, se elaboró el siguiente protocolo:

T A B L A No. 4

PROTOCOLO DE LA CURVA DE PRECIPITACION CON POLISACARIDO HOMOLOGO

Suero de conejo (en ml.)	Polisacárido de <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> 10 µg/ml. (ml.)	Polisacárido de <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> 100 µg/ml. (ml.)	Solución Salina Isotónica (ml.)	Concentración polisacárido (µg/ml.)
0,1	0,1	---	0,4	1,0
0,1	0,2	---	0,3	2,0
0,1	0,5	---	---	5,0
0,1	---	0,1	0,4	10,0
0,1	---	0,2	0,3	20,0
0,1	---	0,5	---	50,0
0,1	---	---	0,5	0,0

Los tubos se dejaron a 4°C durante dos días, se les centrifugó a 3.000 rpm a 4°C y el precipitado formado se disolvió con 0,2 ml. de NaOH 0,1N; se determinó la cantidad de proteínas por el método de Lowry (32b.)

6.2 Determinación de la concentración máxima de Antígeno y Anticuerpos Precipitado en la zona de Equivalencia

Se llevó a cabo utilizando los valores de D.O. obtenida por el método de Lowry en las curvas de precipitación extrapolando los valores obtenidos a una curva de calibración utilizando el mismo volumen que el obtenido en la curva de precipitación cuantitativa.

Con los valores de nitrógeno en los anticuerpos y la concentración de antígeno se obtiene una recta con la siguiente fórmula (34):

$$\frac{N}{Ag} = a - bx \quad (1)$$

en la cual:

a = la intersección de la recta con el eje de las ordenadas

b = la pendiente

x = la abscisa (Ag)

Para obtener la cantidad de anticuerpo precipitado, se rearregla la fórmula (1):

$$N \quad Ac = a (Ag) - b (Ag)^2 \quad (2)$$

Y para obtener la máxima cantidad de antígeno precipi-

tada, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Ag (max).} = \frac{a}{2b} \quad (3)$$

6.2.1 Estos cálculos se llevaron a cabo para el polisacárido homólogo y heterólogo.

6.3 Curva de Precipitación utilizando como Antígeno una Proteína: (Suero de conejo anti Salmonella typhimurium)

Precipitado de complejos solubles (segundo anticuerpo).

Para llevar a cabo esta curva de precipitación, se empleó como antígeno el suero de conejo anti Salmonella typhimurium y como anticuerpo el suero de cabra anti IgG de conejo (35). En la competencia que se establece por el sitio activo del anticuerpo entre el antígeno se forman complejos solubles que por su naturaleza y de acuerdo a la teoría de Marrack no precipitan quedando en solución. Los complejos solubles formados con el antígeno, si queremos determinar toda la concentración de antígeno presente en la reacción, será necesario llevar a cabo una reprecipitación utilizando otros métodos como son precipitación con sulfato de amonio, o utilizando un segundo anticuerpo; para ello, fué necesario determinar cuál es la concentración de este segundo anticuerpo necesaria para precipitar toda la proteína presente en el anticuerpo anti Salmonella typhimurium y el anticuerpo la IgG de cabra - obtenida.

Cuando se lleva a cabo el radioinmunoensayo de acuerdo a la

concentración de Nitrógeno en los anticuerpos adicionados, deberá agregarse el 2do. anticuerpo en una concentración que fue determinada por la curva de precipitación cuando ésta se llevó a cabo utilizando como antígeno una proteína. La inmunoglobulina de cabra anti IgG de conejo precipita las IgG de conejo por el fragmento Fc.

Para la purificación de la inmunoglobulina del suero de cabra anti IgG de conejo se hizo previamente una precipitación con sulfato de amonio saturado (32c), el precipitado disuelto en solución salina insotónica se pasó a través de una columna de DEAE celulosa, se tomaron fracciones de 2 ml. y se leyeron a 280 nm. Aquellas fracciones que tuvieron mayor cantidad de proteínas se concentraron y se les practicó una inmunoelectroforesis (32d) para determinar la clase de inmunoglobulina.

Una vez obtenidas las IgG de cabra anti IgG de conejo, se hizo la curva de precipitación, utilizando como antígeno el suero de conejo anti Salmonella typhimurium, de acuerdo al protocolo siguiente: (Tabla No. 5)

Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora, después de este tiempo se dejaron reposar dos días; se centrifugaron, lavándose el precipitado con solución salina tres veces y este se disolvió con NaOH 0,1N para después leerlo a 280 nm.

Las lecturas obtenidas nos indican la concentración proteica (inmunoglobulina) pero en forma indirecta; para poder obtener la cantidad de nitrógeno proteico extrapolamos los resultados obtenidos a, el dato experimental que nos señala que a una lectura de 0,8 de D.O. a 280 nm. equivale a 1 mg/ml.

T A B L A No. 5

CURVA DE PRECIPITACION UTILIZANDO COMO ANTIGENO UNA PROTEINA

Tubo	IgG de cabra anti IgG de conejo	Suero de conejo anti <u>Salmonella typhimurium</u> a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. de N (ml.)	Suero de conejo anti <u>Salmonella typhimurium</u> a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$. N (ml.)	Solución amortiguadora de fosfato 1/15M pH 7,5 (en ml.)	Concentración $\mu\text{g/ml}$. de N en el antígeno (Suero de conejo anti <u>Salmonella typhimurium</u>)
1	0,1	0,1	---	0,4	10,0
2	0,1	0,2	---	0,3	20,0
3	0,1	0,5	---	---	50,0
4	0,1	---	0,1	0,4	100,0
5	0,1	---	0,15	0,35	150,0
6	0,1	---	0,2	0,30	200,0
7	0,1	---	0,25	0,25	250,0
8	0,1	---	0,35	0,15	350,0
9	0,1	---	0,45	0,05	450,0

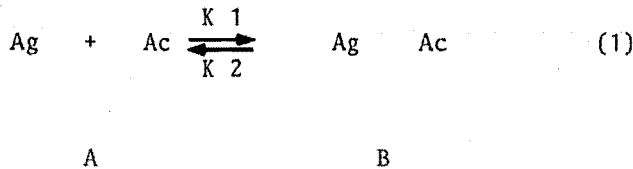
Para los cálculos de cantidad máxima de antígeno y anticuerpo en el precipitado, se empleó el mismo procedimiento que en el inciso 6.2 .

7. Radioinmunoensayo

7.1 El radioinmunoensayo se basa en la competencia que se establece entre dos antígenos de la misma naturaleza; una en concentración desconocida (no marcada) y otra en concentración conocida radioactiva.

Ambos antígenos compiten por el sitio activo del anticuerpo, formándose dos tipos de compuestos: complejos radioactivos, a los que se les designa con letra (B) y antígeno libre que recibe el nombre de radioactividad libre (F).

De acuerdo a la ley de acción de masas, la reacción antígeno-anticuerpo está dada por dos constantes de velocidad:



Cuya relación de constantes está representada por la fórmula siguiente:

$$K = \frac{K 1}{K 2} \quad (2)$$

A la concentración total del anticuerpo se le conoce por --
Ac° se considera que ésta es igual a la cantidad de anticuer-

po que se unió al complejo más una cantidad de anticuerpo libre, cuando éste se encuentra en exceso.

$$Ac^{\circ} = Ac + Ag \quad Ac \quad (3)$$

La relación de radioactividad unida con respecto a la libre está determinada por la concentración total del anticuerpo menos una cantidad de complejos radioactivos; es decir, radioactividad unida o B. Ambos miembros están afectados por una constante K.

$$\frac{B}{F} = (K \quad Ac^{\circ} \quad -B) \quad (4)$$

Si la radioactividad unida tiene un valor muy pequeño con respecto a la concentración total del anticuerpo, la relación de radioactividad se verá poco modificada, cuando se introduzca un antígeno no marcado. La solución para este problema consiste en disminuir la concentración total del anticuerpo. Así cualquier modificación en la radioactividad unida (b) por la introducción de antígeno no marcado, va a ser fácilmente detectable por la relación de radioactividades.

Se postula que la concentración total del anticuerpo está en relación directa con la sensibilidad del método, es decir, con la mínima concentración de antígeno que se desee determinar.

$$Ac^{\circ} = H \quad (5)$$

Se considera que la situación ideal para llevar a cabo un radioinmunoensayo se obtiene cuando la relación de radioactividades

es igual a 1, es decir, que el 50% de la radioactividad se encuentra en forma unida (B) mientras que el otro 50% se encuentra en forma libre (F); cualquier desplazamiento de la radioactividad por introducción de un antígeno no marcado, va a ser fácilmente visible.

$$\frac{B}{F} = 1 \quad (6)$$

Así, pues, se postula que para llevar a cabo un radioinmunoensayo, si la relación de radioactividades es igual a 1, esto deberá ser igual o menor que la concentración total del Ac y la concentración total del anticuerpo deberá ser igual o menor a la mínima concentración del antígeno que se desee determinar.

$$1 = K \quad Ac^{\circ} = KH \quad (7)$$

Por lo que la constante de velocidad es mayor, cuando la relación de radioactividades es igual a 1 e inversamente proporcional a la mínima concentración que se desee determinar.

$$K = 1/H \quad (8)$$

Estas fórmulas están representadas en la Figura No. 9

7.1.1 La sensibilidad del método puede ser definida como la cantidad mínima del polisacárido que puede ser determinada por esta técnica; existe relación directa entre concentración total de los anticuerpos y la sensibilidad del método; por lo que fue necesario llevar a cabo diferentes diluciones del suero hasta obtener

la sensibilidad deseada siguiendo este protocolo.

PROCEDIMIENTO:

Se siguió el protocolo que se describe en la Tabla No. 6.

Todos estos volúmenes fueron completados con solución salina isotónica (0,6 ml.), y se dejaron incubar durante 1 hora a 37°C y se les dejó reposar dos días a 4°C.

Después de este tiempo, se les centrifugó y separó el sobrenadante del precipitado, se determinó la radioactividad de ambos y se obtuvo la relación de radioactividad, unidad y libre. Lo anterior se repitió, haciendo sólo cambios en las diluciones del suero siendo de 10^{-2} a 10^{-5} / ml.

Se obtuvo la representación gráfica de relación de radioactividad y la curva obtenida en % de radioactividad unida (b) a una sola concentración del polisacárido, la primera y a diferentes concentraciones la segunda.

7.1.2 La sensibilidad del método también se ve afectada por la concentración del polisacárido marcado. Para determinar la concentración adecuada, se llevó a cabo la metodología descrita en el inciso 7.1.1. El suero de conejo se utilizó a una concentración de 16 Ug/ml. que corresponde a una dilución de 1:80.000 y las variaciones en la concentración del polisacárido fueron de 5×10^{-10} a 5×10^{-11} g/ml.

T A B L A No. 6

PROTOCOLO PARA LLEVAR A CABO EL RADIOINMUNOENSAYO CON DIFERENTES DILUCIONES DE SUERO

Tubo	Suero de conejo diluido a 1×10^{-2} (ml)	Polisacárido a concentración 1×10^{-11} g/ml (ml)	Polisacárido a concentración 1×10^{-10} g/ml (ml)	Polisacárido a concentración 5.5×10^{-11} g/ml (ml)	IgG de cabra concentración 160 Ug/ml (ml)	Concentración del polisacárido en $1(10^{-12})$ g/ml (ml)
1	0,1	0,1	---	0,1	0,1	1,0
2	0,1	0,2	---	0,1	0,1	2,0
3	0,1	0,5	---	0,1	0,1	5,0
4	0,1	---	0,1	0,1	0,1	10,0
5	0,1	---	0,2	0,1	0,1	20,0
6	0,1	---	0,5	0,1	0,1	50,0
7	0,1	---	---	0,1	0,1	---

T A B L A No. 7

PROTOCOLO PARA LA TECNICA DE RADIOINMUNOENSAYO

Tubo	Suero de conejo anti-S. tiphy dilución 1:80,000 (ml)	Polisacárido de S. ty-phi concentración de 1×10^{-11} g/ml (ml)	Polisacárido de S. ty-phi concentración de 1×10^{-10} g/ml (ml)	Polisacárido de S. Ty-phi radioactivo concentración 5.5×10^{-12} g/ml (ml)	IgG de cabra concentración de 16 Ug/ml	Concentración de I polisacárido S.Ty phi $(\times 10^{-12}$ gml)
1	0,1	0,1	---	0,1	0,1	1,0
2	0,1	0,2	---	0,1	0,1	2,0
3	0,1	0,5	---	0,1	0,1	5,0
4	0,1	---	0,1	0,1	0,1	10,0
5	0,1	---	0,2	0,1	0,1	20,0
6	0,1	---	0,5	0,1	0,1	50,0
7	0,1	---	---	0,1	0,1	---

Todos los volúmenes fueron completados con solución salina isotónica (0,6 ml.) se dejaron incubar 1 hora a 37°C y se les dejó reposar dos días a 4°C.

Se centrifugó a 3.000 rpm y se determinó radioactividad en un contador de rayos gamma los cálculos se llevaron a cabo relacionando la radioactividad de B Bo x 100.

T A B L A No. 7

PROTOCOLO PARA LA TECNICA DE RADIOINMUNOENSAYO

Tubo	Suero de conejo anti-S. typhi dilución 1:80,000 (ml)	Polisacárido de S. typhi concentración de 1×10^{-11} g/ml (ml)	Polisacárido de S. typhi concentración de 1×10^{-10} g/ml (ml)	Polisacárido de S. Typhi radioactivo concentración 5.5×10^{-12} g/ml (ml)	IgG de cabra concentración de 16 Ug/ml	Concentración del polisacárido S.Typhi ($\times 10^{-12}$ g/ml)
1	0,1	0,1	---	0,1	0,1	1,0
2	0,1	0,2	---	0,1	0,1	2,0
3	0,1	0,5	---	0,1	0,1	5,0
4	0,1	---	0,1	0,1	0,1	10,0
5	0,1	---	0,2	0,1	0,1	20,0
6	0,1	---	0,5	0,1	0,1	50,0
7	0,1	---	---	0,1	0,1	---

Todos los volúmenes fueron completados con solución salina isotónica (0,6 ml.) se dejaron incubar 1 hora a 37°C y se les dejó reposar dos días a 4°C.

Se centrifugó a 3.000 rpm y se determinó radioactividad en un contador de rayos gamma los cálculos se llevaron a cabo relacionando la radioactividad de B Bo x 100.

7.2 La reproducibilidad del método fue comprobada cuando los resultados obtenidos se repitieron con mínimas variaciones en todas las experiencias que se practicaron.

7.3 La especificidad del método quedó demostrada cuando se hicieron las curvas de precipitación utilizando el suero de conejo anti Salmonella typhimurium y los polisacáridos derivados de otras salmonelas que comparten algunos determinantes antigénicos con Salmonella typhimurium.

7.4 La exactitud del método se estimó trazando los valores obtenidos de radioactividad en los precipitados B/Bo sobre papel milimétrico y logit-log colocándose en las ordenadas el valor obtenido B/bo y en las abscisas la concentración del polisacárido. Los datos obtenidos por radioinmunoensayo serán significativos cuando los valores experimentales se encuentren en la gráfica dentro de los límites de la pendiente mayor.

7.5 Las condiciones de concentración de polisacárido así como diluciones de suero, se describen en el siguiente protocolo, tabla Nº 7, el cual fué seguido para investigar el polisacárido de Salmonella en líquidos biológicos.

8. Tratamiento de las Muestras

La sangre fue centrifugada a 3.000 rpm durante 5 mn. y en suero se investigó la presencia de polisacáridos de Salmonella typhi (9, 12) y de Salmonella typhimurium (1, 4, 5, 12), que cruzan con

salmonelas de los grupos B y D, mediante radio-inmunoensayo.

El suero estudiado fue tratado de la siguiente manera:

a) Hidrólisis:

0,1 ml. de suero sanguíneo

0,8 ml. de solución salina isotónica

0,1 ml. de ácido acético IN

Esta mezcla fue colocada en ampollita de vidrio, las cuales fueron cerradas al calor y se mantuvieron en baño de maría a 100° C durante una hora y media una vez terminada la hidrólisis.

b) Diálisis:

El producto fue dializado contra la solución salina isotónica durante 24 horas a 4° C.

c) Evaporación:

La solución dializada fue colocada en tubos de ensayo en campana de vidrio al vacío y en presencia de pentóxido de fósforo, hasta obtener el material completamente seco, éste se disolvió en 1,0 ml. de solución salina isotónica.

A las muestras anteriores se les practicó el radioinmunoensayo colocando en cada tubo y por duplicado 0,1 ml. de ella, más 0,1 ml. de antisuero de conejo antipolisacárido de Salmonella typhimurium en la dilución utilizada para la curva de referencia, así como la cantidad de polisacárido radioactivo y del segundo anticuerpo.

La orina fue tratada en forma semejante a las muestras de suero, la presencia de cristales fue eliminada por centrifugación, - la técnica seguida fue la misma que para el suero.

Se pesó 1 g. de materia fecal la cual fue suspendida en 2,7 ml. de solución salina después de adicionar 0,3 ml. de ácido acético 1N y se procedió a extraer el polisacárido mediante:

a) Hidrólisis:

Esta solución se colocó en ampolletas de vidrio y se cerró al calor, se sometió a baño de maría a 100°C durante una y media horas.

b) Diálisis:

El producto fue dializado contra la solución salina isotónica durante 24 horas a 4°. Esta solución fue centrifugada a 10.000 rpm durante 10 mn.

c) Evaporación:

El sobrenadante colocado en ampolleta de vidrio al vacío en presencia de pentóxido de fósforo hasta obtener la muestra seca.

Se recuperó el sedimento con 1 ml. de solución salina y con esta solución se llevó a cabo la técnica de radio-inmunoensayo como en el caso de suero y orina.

Simultáneamente, se corrió por duplicado una curva de referencia de acuerdo a protocolo anexo, con los resultados obtenidos de radioactividad unida (B) y radio-actividad inicial (Bo); se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{B}{B_0} \times 100$$

Con estos datos se hizo una gráfica, para poder extrapolar -
los resultados de nuestros problemas.



RESULTADOS:

1. Cepas bacterianas utilizadas

Se obtuvieron 50 g. (peso seco) de bacterias muertas provenientes del cultivo de Salmonella typhimurium en 200 botellas de Roux.

El polisacárido de Salmonella typhi Ty2 utilizado, fué obsequiado por la Dra. Enedina Jiménez (Laboratorio de Inmunología del Hospital Infantil de México), obtenido con idéntica metodología a la usada en la obtención del polisacárido de Salmonella typhimurium.

Por el método de Freeman-Staub, de 50 g. de bacterias (peso seco), se obtuvieron 116,7 mg. de polisacárido (lío-filizado) que representa un rendimiento de 0,23 %.

2. Tiraminación del polisacárido

Se demostró que todo el polisacárido presentaba moléculas de tiramina, ya que al pasarlo por la columna de Sephadex G100, se encontró radioactividad en las tres fracciones concentradas, además de presentar ésta actividad biológica. La lectura de la D.O., después de dializarlo, fué de 0,944 a 280 nm.

3. Yodación del polisacárido

La yodación del polisacárido dió una lectura de 7.500 cpm. en una concentración de $110,40 \times 10^{-9}$ de polisacárido, de donde se obtuvo la radioactividad específica de $0,06 \mu\text{Ci}/\text{ug}$.

4. Inmunización a conejos

Con la inmunización a conejos, se obtuvieron anticuerpos anti Salmonella typhimurium; con el suero obtenido se procedió a llevar a cabo curvas de precipitación con el polisacárido. En las cinco inmunizaciones se obtuvo una curva de precipitación, con el método de Lowry, que nos dió 1.047 mg de N de proteína/ml. de suero.

5. Curvas de precipitación utilizando como antígeno una proteína (segundo anticuerpo)

Se usó suero de cabra, con él se llevó a cabo una curva de precipitación cuantitativa utilizando como antígeno el suero de conejo anti Salmonella typhimurium y como anticuerpo las IgG de cabra; los resultados de la precipitación permitieron calcular la cantidad de 2do. anticuerpo que debía agregarse; de acuerdo a la cantidad de proteína calculada por la Gráfica No.1, se necesitaron 400 μ g de Ab (suero de cabra) para precipitar 333 μ g de Ag (suero de conejo).

6. Radioinmunoensayo

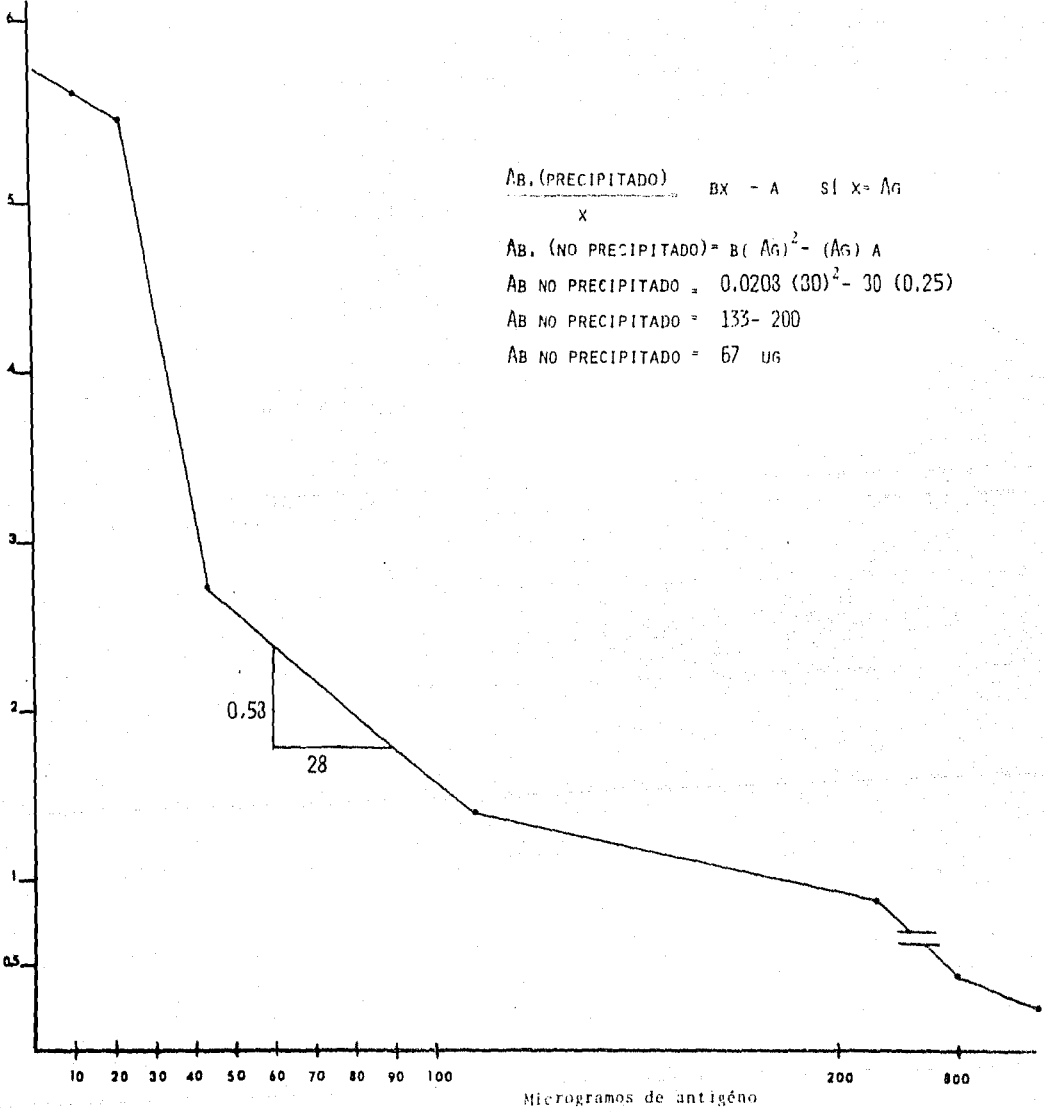
A una cantidad constante de antígeno radioactivo de Salmonella typhimurium se le adicionó suero de conejo anti Salmonella typhimurium a diferentes diluciones y cantidades crecientes de antígeno (polisacárido de Salmonella typhimurium) de acuerdo a la metodología descrita en Material y Métodos (Gráfica No.2).

Se relacionó el valor encontrado de radioactividad unida (B) cpm con respecto a la radioactividad libre (F) en cpm, la rela-

GRAFICA N° 1

RELACION ENTRE CANTIDAD DE PROTEINA DEL ANTICUERPO Y EL ANTIGENO.

Ab/Ag



$$\frac{AB. (PRECIPITADO)}{X} = Bx - A \quad \text{si } x = Ag$$

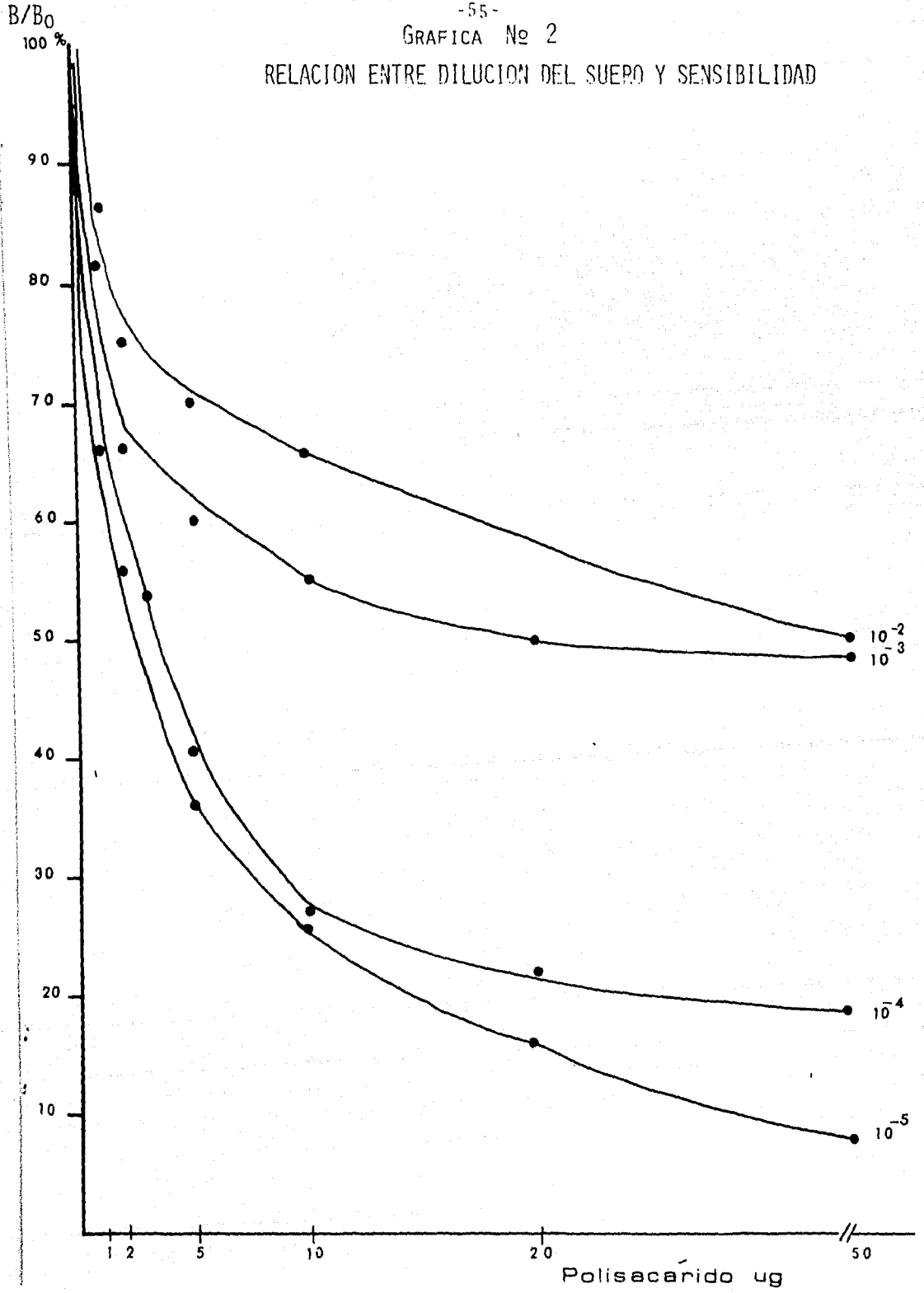
$$AB. (NO PRECIPITADO) = B(Ag)^2 - (Ag) A$$

$$AB \text{ NO PRECIPITADO} = 0.0203 (30)^2 - 30 (0.25)$$

$$AB \text{ NO PRECIPITADO} = 133 - 200$$

$$AB \text{ NO PRECIPITADO} = 67 \text{ ug}$$

RELACION ENTRE DILUCION DEL SUERO Y SENSIBILIDAD



ción B/F fué dispuesta gráficamente colocando en las ordenadas esta relación y en las abscisas las diluciones del suero que se emplearon (Gráfica No. 5).

En la dilución de 10^{-5} de suero del conejo, la relación B/F es muy cercana a 1, lo que permite inferir de acuerdo a la teoría del radioinmunoensayo que la dilución de 10^{-5} es la mejor para obtener una sensibilidad óptima (Gráficas Nos. 4 y 5).

7. Estudio Biológico

7.1 Estudio en Humanos:

7.1.1 Investigación del polisacárido 9, 12 y 1, 4, 5 y 12, en sangre, orina y materia fecal de niños con gastroenteritis por salmonelas ByD.

7.1.1a. Polisacárido 9,12 (heterólogo) en sangre, orina y materia fecal de niños con gastroenteritis por salmonelas By/o D.

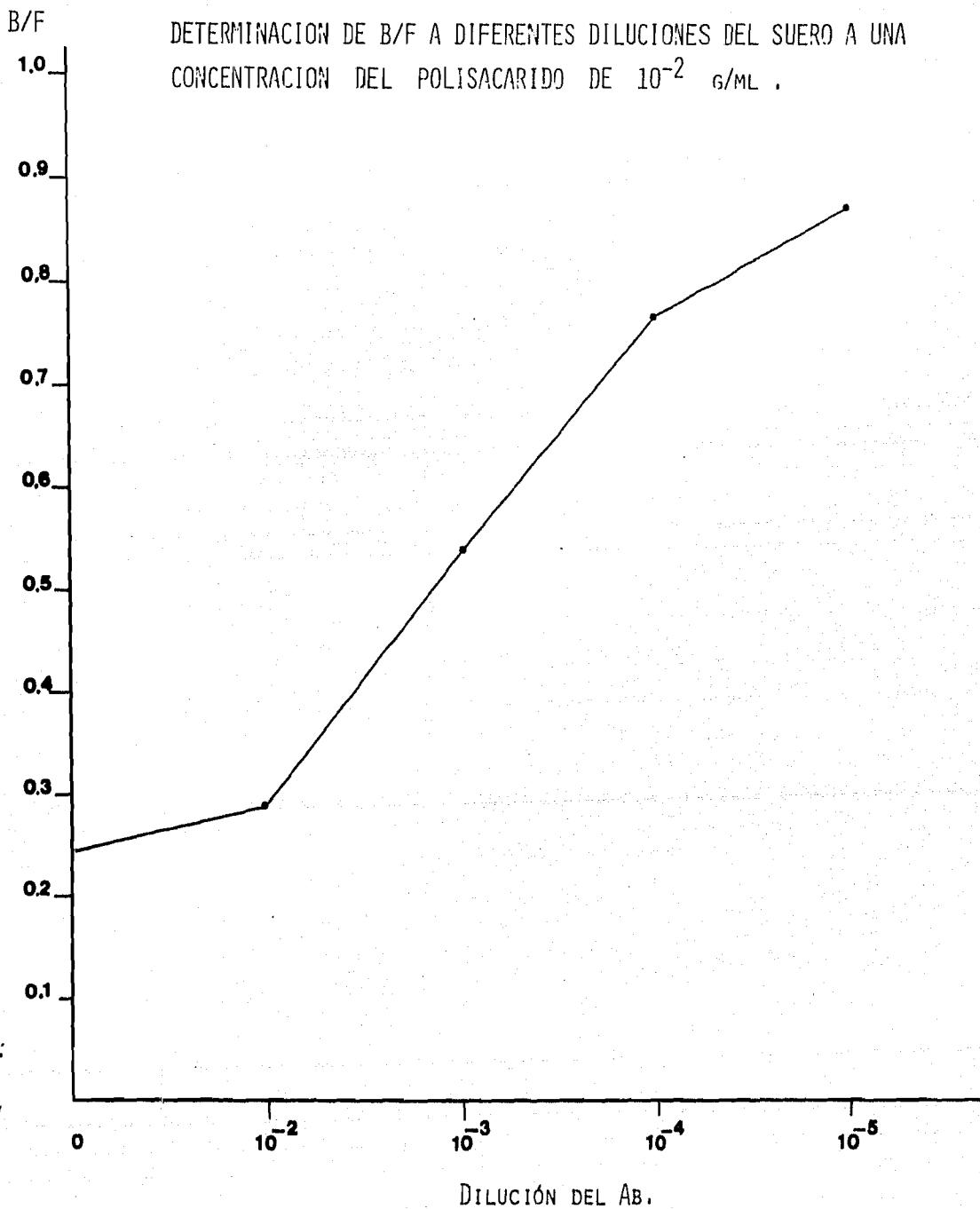
Se estudiaron 27 pacientes a quienes se aisló salmonelas B y/o D en materia fecal y/o sangre; en la tipificación de éstas salmonelas se encontraron 23 del serotipo S. typhimurium. cuatro S derby y en tres de los pacientes con Salmonella typhimurium, se aisló conjuntamente salmonela D, una de las cuales correspondió a Salmonella typhi y dos a Salmonellas enteritidis no tipificadas. Estos resultados se resumen en el Cuadro No.1.

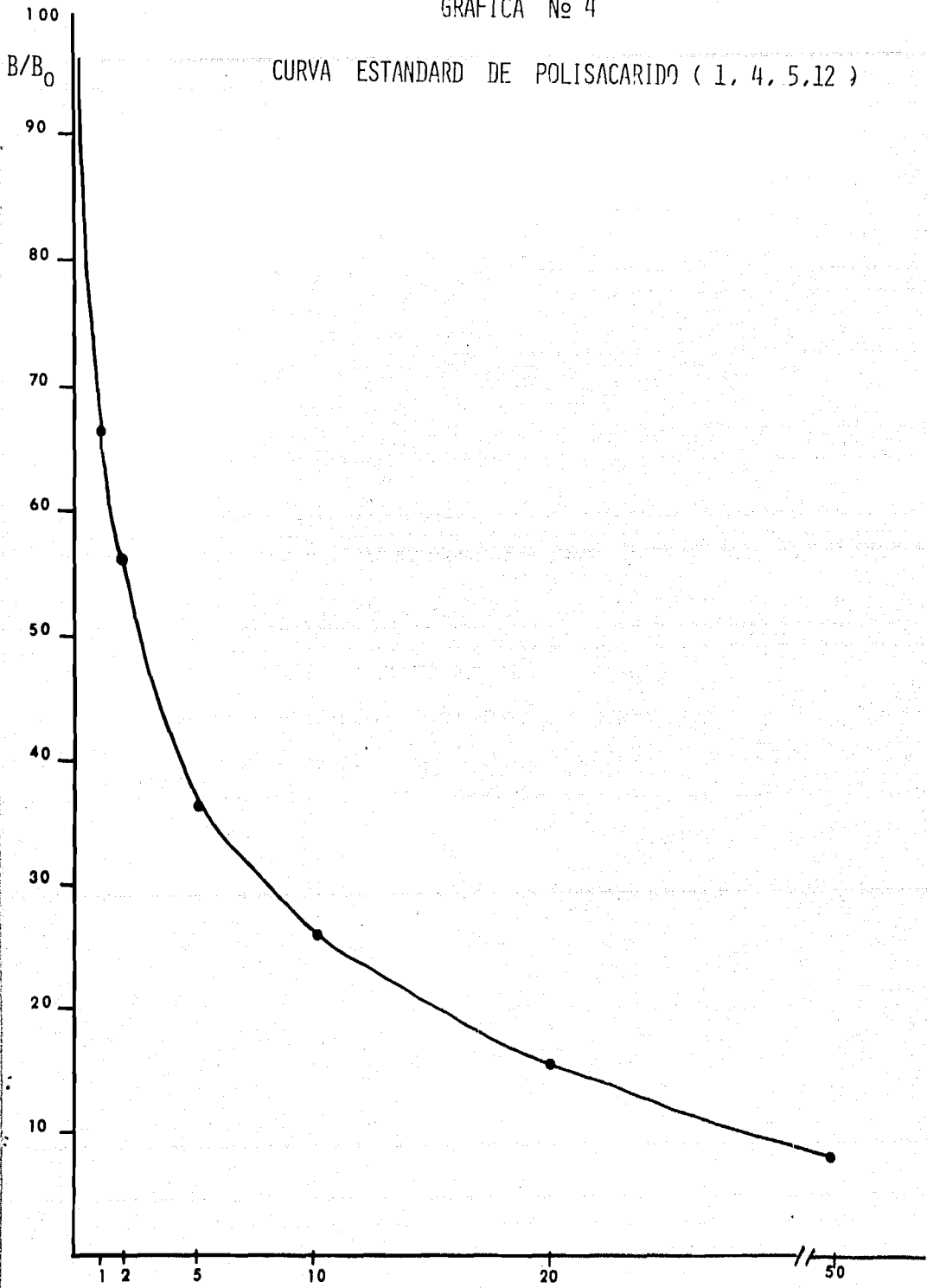
I. - Niveles de polisacárido

Las cantidades encontradas de polisacárido 9,12 en san

GRAFICA No 3

DETERMINACION DE B/F A DIFERENTES DILUCIONES DEL SUERO A UNA
CONCENTRACION DEL POLISACARIDO DE 10^{-2} G/ML .





(x 10⁻⁹ G/ML)

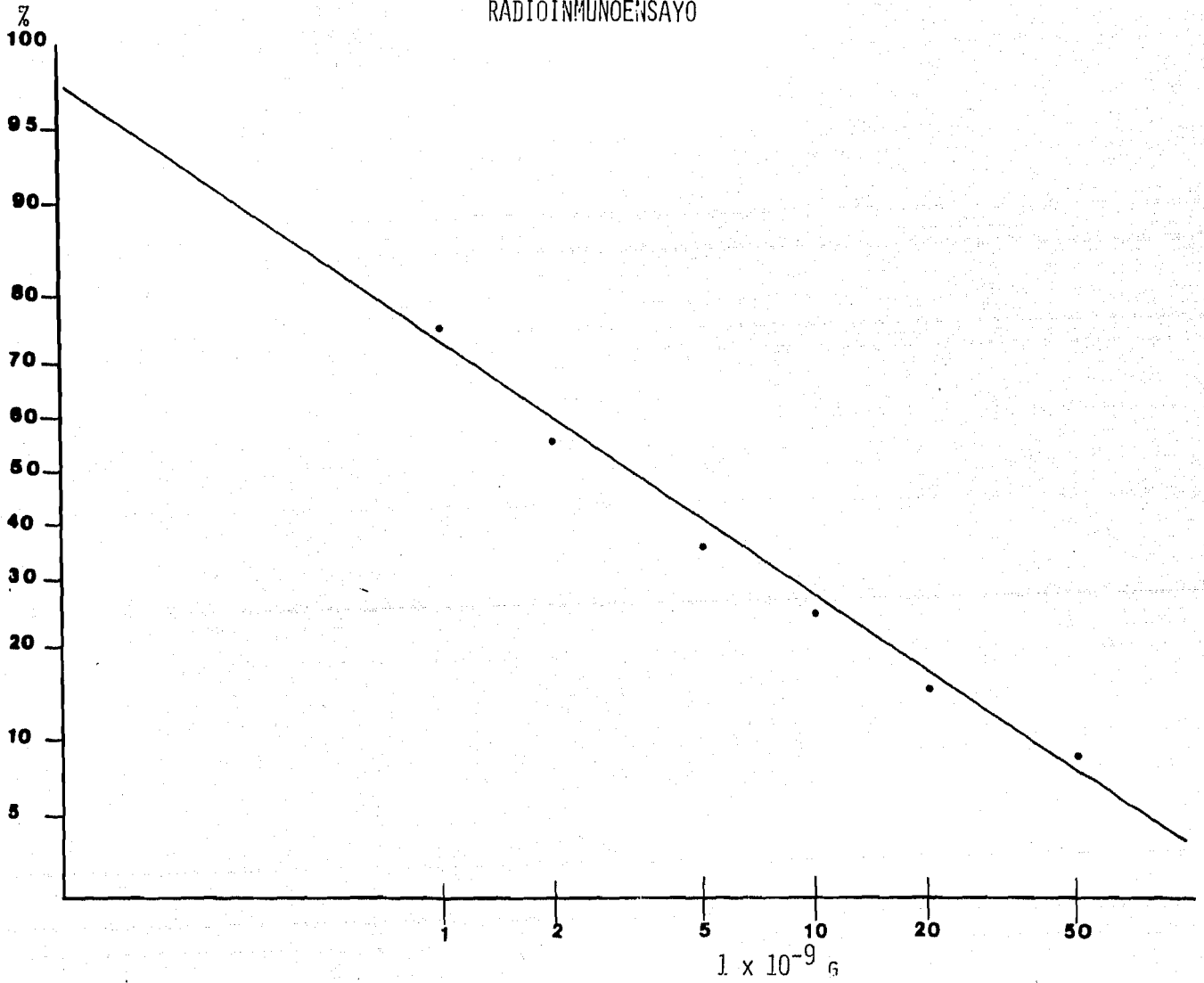
GRAFICA Nº 5

RADIOINMUNOENSAYO EN PAPEL LOGIT-LOG

EXPRESIÓN DE UNA RECTA POR LA EXTRAPOLACIÓN
DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CURVA DE
LA GRÁFICA Nº 5.

GRAFICA Nº 5

RADIOINMUNOENSAYO



CUADRO No. 1
SEROTIPOS DE LAS SALMONELAS B y D AISLADAS

SEROTIPO	NUMERO	PORCENTAJE
S. typhimurium	23 *	85,1
S. derby	4	14,8
S. Thyphi	1	3,7

* En tres de los pacientes con *Salmonella typhimurium* se aisló *Salmonella D* tipificada una como *S. typhi* las otras dos no fueron tipificadas.

gre, orina y materia fecal de estos niños en etapa aguda de la enfermedad, a los 7 y 14 días (convalecencia), se encuentran en las Gráficas Nos. 6, 7 y 8.

En estas mismas gráficas se representa el promedio \pm 2DE de los valores obtenidos en el grupo testigo constituido por 20 niños sanos cuyas edades se presentan con la del grupo experimental en el Cuadro 2. También se representan en estas gráficas el promedio de los niveles de polisacáridos obtenidos en 20 pacientes con fiebre tifoidea comprobada por clínica y hemocultivo positivo.

Las tablas 8, 9 y 10 muestran el análisis estadístico de los niveles de polisacárido encontrado en estos pacientes.

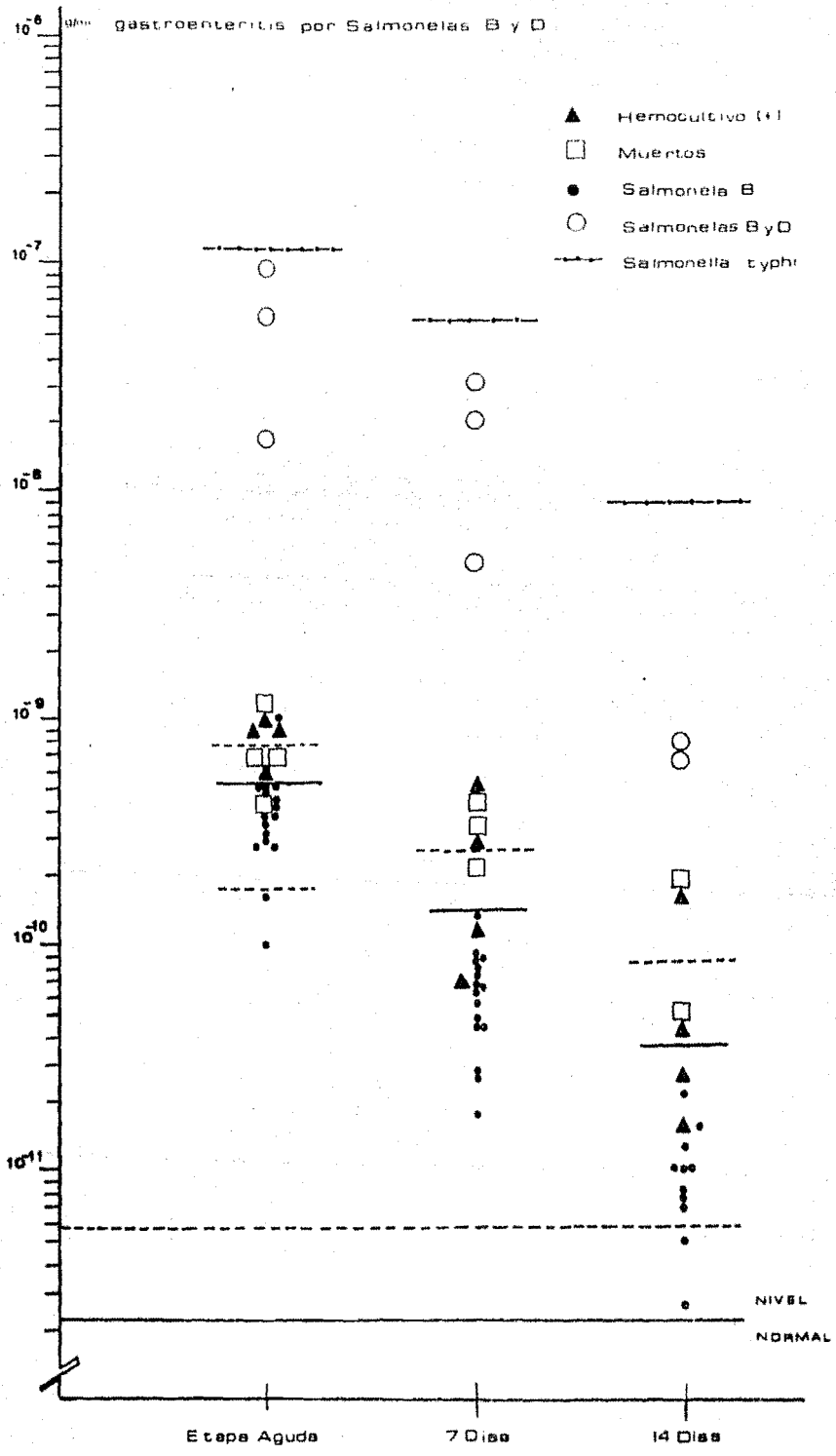
II. - Mortalidad

Hubo cuatro defunciones, en un caso hubo patología de fondo que pudo ocasionar por sí sola la muerte (meningitis por Klebsiella-Aerobacter y datos clínicos de coagulación intravascular diseminada). Por lo que la mortalidad depurada resulta 11,1% (3/27) porcentaje relativamente alto en relación a otras series, quizás imputable al hecho de que el 51% de los pacientes incluidos en el estudio adquirieron la infección intrahospitalaria. En el Cuadro No. 3 se presentan estos resultados.

III. - Edad

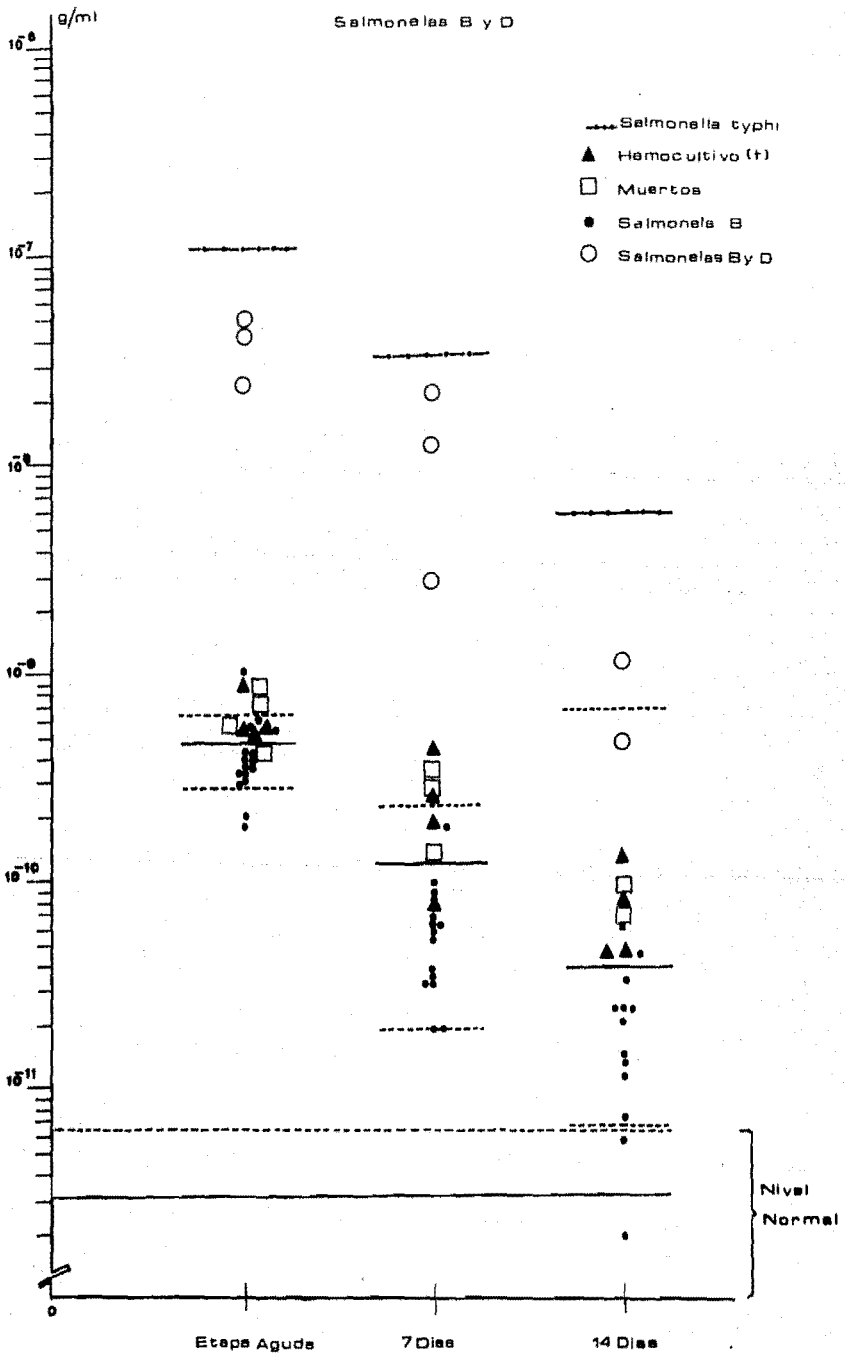
En el Cuadro No. 2 se presenta la distribución por edad, coincidiendo con lo descrito en los trabajos clásicos, mayor incidencia en el grupo de lactantes (36).

Polisacacido 9,12 en sangre de niños con gastroenteritis por Salmonelas B y D



GRAFICA No. 7

Polisacárido 9,12 en orina de niños con gastroenteritis por Salmonelas B y D



Polisacarido 9,12 en materia fecal de niños con
Gastroenteritis por Salmonelas B y D

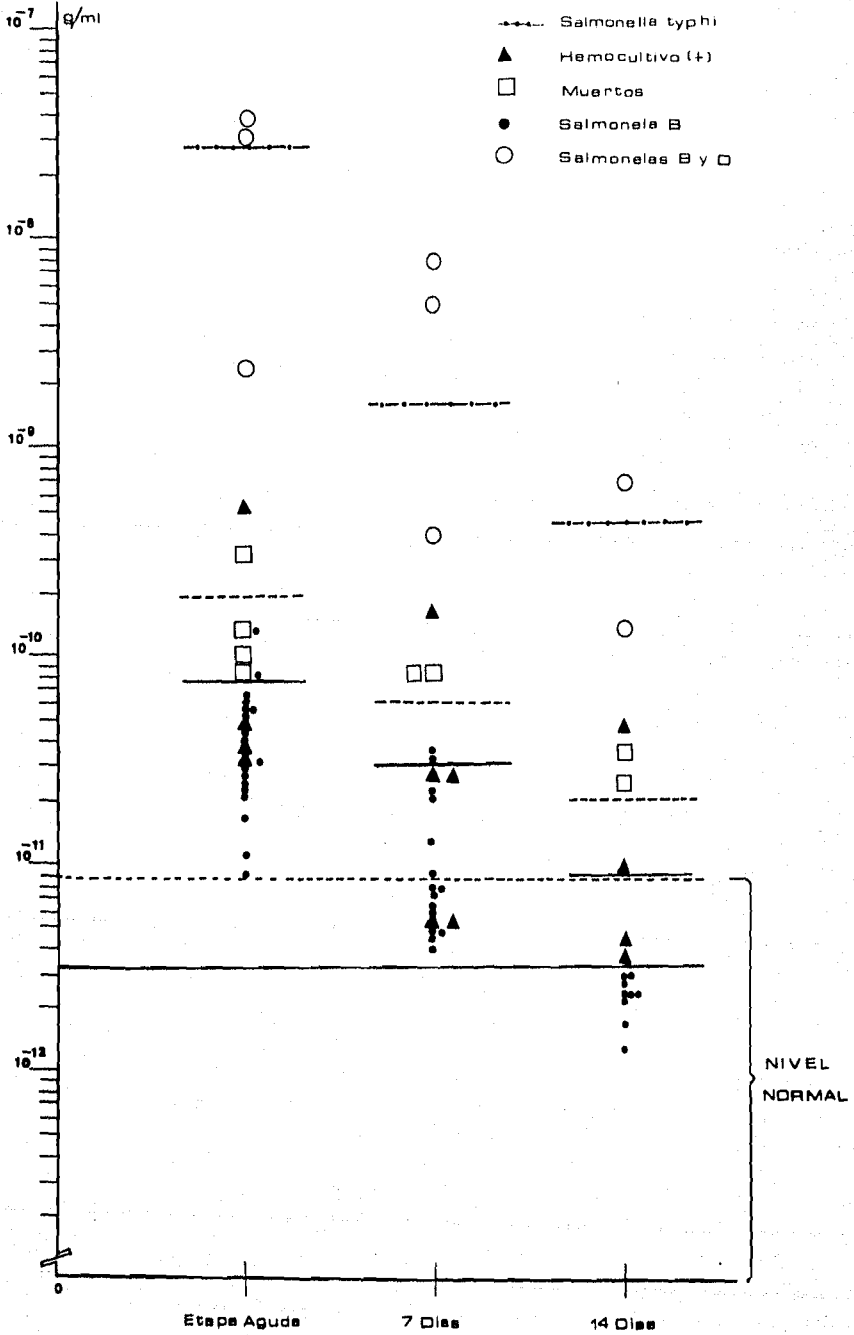


TABLA No 8
 POLISACARIDO 9,12 EN SANGRE DE PACIENTES CON GASTROENTERITIS
 POR SALMONELAS B. Y D.

	1ra. muestra					2da muestra					3ra muestra				
DIAGNOSTICOS	Nº	M	\bar{G}	t	P	Nº	M	\bar{G}	t	P	Nº	M	\bar{G}	t	P
GASTROENTERITIS	24	5.2×10^{-10} g	2.47×10^{-10} g	9.85	<0.001	20	1.32×10^{-10}	1.35×10^{-10}	3.53	<0.005	13	3.5×10^{-11}	0.53×10^{-10}	0.91	0.3
TESTIGOS	20	2.223×10^{-11}	12.1×10^{-12}			20	2.223×10^{-11}	12.1×10^{-12}			20	2.223×10^{-11}	12.1×10^{-12}		

TABLA No 9

POLISACARIDO 9,12 EN ORINA DE PACIENTES CON GASTROENTERITIS
POR SALMONELAS B Y/O D.

DIAGNOSTICOS	1ra. muestra					2da. muestra					3ra. muestra				
	No	M	\bar{X}	t	p	No	M	\bar{X}	t	p	No	M	\bar{X}	t	p
GASTROENTERITIS	24	30×10^{-10}	18×10^{-10}	12.1	<<0.001	20	12.4×10^{-11}	10.6×10^{-11}	308	0.001	17	3.8×10^{-11}	3.1×10^{-11}	0.89	>0.3
TESTIGOS	20	3.0×10^{-11}	1.75×10^{-11}			20	3.0×10^{-11}	1.75×10^{-11}			20	3.0×10^{-11}	1.75×10^{-11}		

TABLA No 10

POLISACARIDO 9,12 EN MATERIA FECAL DE PACIENTES CON GASTROENTERITIS
POR SALMONELAS B Y/O D.

	1ra. muestra					2da. muestra					3ra. muestra				
DIAGNOSTICOS	No	M	\bar{G}	t	p	No	M	\bar{G}	t	p	No	M	\bar{G}	t	p
GASTROENTERITIS	24	$8,4 \times 10^{-11}$	$1,1 \times 10^{-11}$	2,04	<0,05	19	$2,9 \times 10^{-11}$	$4,2 \times 10^{-11}$	0,79	0,4	16	$0,9 \times 10^{-11}$	$1,2 \times 10^{-11}$	2,16	0,001
TESTIGOS	20	$3,6 \times 10^{-11}$	$2,6 \times 10^{-11}$			20	$3,6 \times 10^{-11}$	$2,6 \times 10^{-11}$			20	$3,6 \times 10^{-11}$	$2,6 \times 10^{-11}$		

CUADRO No. 2
DISTRIBUCION POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO,
DE 20 NIÑOS SANOS Y 27 CON GASTROENTERITIS
POR SALMONELAS B y D

GRUPOS	RELACION NIÑOS/NINAS (niños enfermos)	RELACION NIÑOS/NINAS (niños sanos)
Recién nacidos	4/2	
Lactantes	7/11	3/6
Preescolares	2/0	4/7
Escolares	0/1	
TOTAL	13/14	7/13

CUADRO No. 3
MORTALIDAD EN 27 NIÑOS ESTUDIADOS CON
GASTROENTERITIS POR SALMONELAS B y D

VIVOS	o/o	MUERTOS	o/o	TOTAL
23	85,1	4	14,8	27

IV. - Estado de Nutrición

En el Cuadro No.4 se muestra la distribución del grupo problema y testigo en relación al estado nutricional, según criterio de Gómez (37), valores de acuerdo a la tabla de peso y talla de Ramos Galván (38). Los resultados presentados en dicho cuadro no difieren a los descritos en los trabajos clásicos sobre salmonelosis (6, 7, 36).

V. - Manifestaciones Clínicas

Correspondieron a las descritas clásicamente en los episodios de gastroenteritis, ie: diarrea, fiebre, vómitos, deshidratación. En el Cuadro No.5 se presenta la frecuencia porcentual de los síntomas observados. Similar a la serie de Kumate y Takane (8), se encuentra una elevada frecuencia de sangre en las evacuaciones (33,3%) y mucosanguinolentas (33,3%).

VI. - Complicaciones:

Durante el curso de la evolución de la gastroenteritis se encontró faringoamigdalitis 9/27, hepatomegalia 7/27, septicemia 5/27, peritonitis 4/27, bronconeumonía 4/27. Estos datos se presentan en el Cuadro No.6. La bronconeumonía fué diagnosticada en base clínica y radiológica. La ictericia sólo por clínica, la peritonitis en base a datos clínicos y radiológicos y la septicemia por hemocultivo positivo.

La etiología salmonelósica en esas localizaciones, no se probó en todos los casos, se sugiere la participación de las salmonelas en base a que otras etiologías fueron razonablemente descartadas.

CUADRO No. 4

**ESTADO NUTRICIONAL DE 27 NIÑOS ESTUDIADOS CON
GASTROENTERITIS POR SALMONELAS B y D**

GRUPO	No. de casos	o/o	GRUPO CONTROL	
			No. de casos	o/o
Eutróficos	8	30,0	13	65
Desnutridos	19	70,0	7	35
1er. grado	6	22,0	6	30
2do. grado	8	29,6	1	5
3er. grado	5	18,5	0	0

CUADRO No. 5
SINTOMAS MAS FRECUENTES EN 27 NIÑOS CON
GASTROENTERITIS POR SALMONELAS B y D

SINTOMAS	No. de casos	o/o
Fiebre	22	81,4
Diarrea	26	96,2
Moco en heces	23	85,1
Sangre en heces	9	33,3
Moco y sangre en heces	9	33,3
Vómitos	17	62,9
Dolor abdominal	1	3,7

CUADRO No. 6

COMPLICACIONES OBSERVADAS EN LA EVOLUCION
DE GASTROENTERITIS POR SALMONELAS B y D.
(27 niños)

COMPLICACION	No. DE CASOS	PORCENTAJE
Ictericia ¹	1	3,7
Bronconeumonía ²	4	14,8
Faringoamigdalitis	9	33,3
Hepatomegalia	7	25,9
Moniliasis bucal	3	11,1
Esplenomegalia	1	3,7
Peritonitis ³	4	14,8
Septicemia ⁴	5	18,5
Coagulación intravascular diseminada ⁵	2	7,4
Perforación gástrica	1	3,7
Infección urinaria	2	7,4
Vulvo-vaginitis	1	3,7

Diagnósticos hechos por:

1. *Clínica*
2. *Clínica y radiológica*
3. *Clínica y radiológica*
4. *Clínica y Hemocultivo positivo*
5. *Clínica*

7.1.1.b. Polisacárido 1, 4, 5, 12 (homólogo) en sangre, orina y materia fecal de niños con gastroenteritis por salmonelas B y/o D.

Los niveles de polisacáridos 1, 4, 5, 12 en sangre de 23 de los 27 pacientes del grupo 7.1.1.a. y en sangre de 19 pacientes estudiados posteriormente, se presentan en la Gráfica - No.9, y su análisis estadístico en las tablas 11 y 12. Todas las salmonelas B de este último grupo, correspondieron al serotipo typhimurium, en tres pacientes; además, se aisló una salmonela del grupo D no typhi.

Hubo dos defunciones y en tres pacientes se aisló la salmonela B en sangre. De los 19 pacientes, 14 eran del sexo masculino y 5 del sexo femenino, tres recién nacidos, 14 lactantes y dos preescolares.

Los niveles de polisacáridos 1,4,5,12 en orina y materia fecal de este grupo de 19 pacientes, se muestran en las Gráficas 10 y 11; su análisis estadístico se presenta en las tablas 13 y 14.

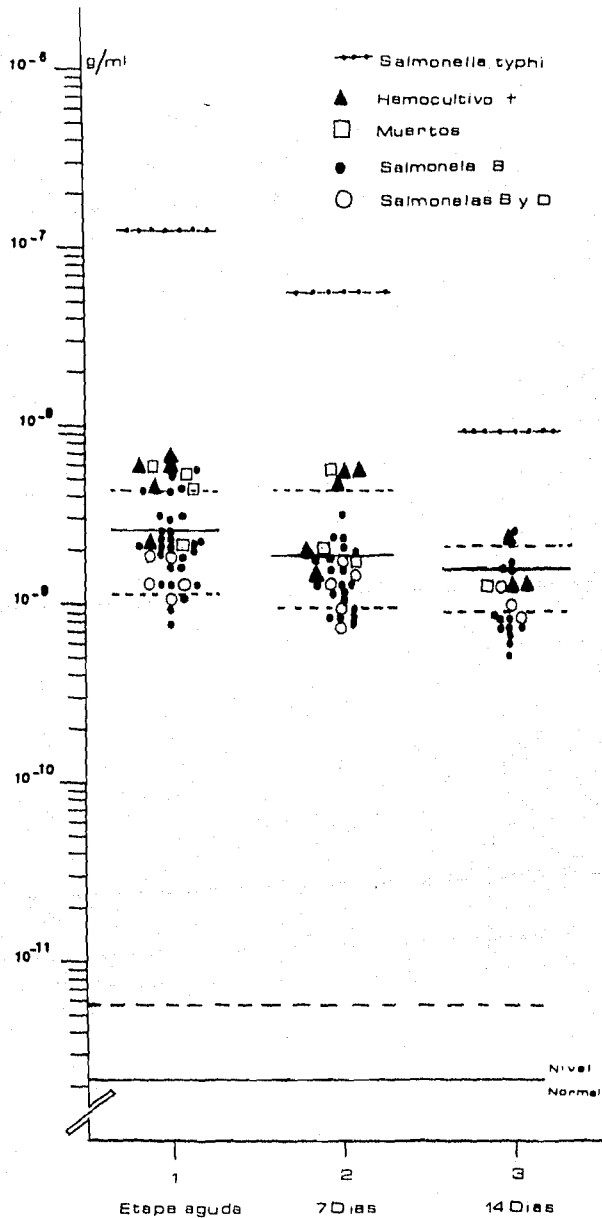
7.2 Polisacárido 1, 4, 5, 12 en suero de niños con hepatitis en la etapa aguda de la enfermedad y tres meses después de la misma.

Existen evidencias que sugieren que la endotoxina es absorbida continuamente del tracto intestinal (39 y 40), que la cantidad absorbida de la misma varía con el tamaño de la población de bacterias gram negativas en el intestino (41) y que la endotoxemia

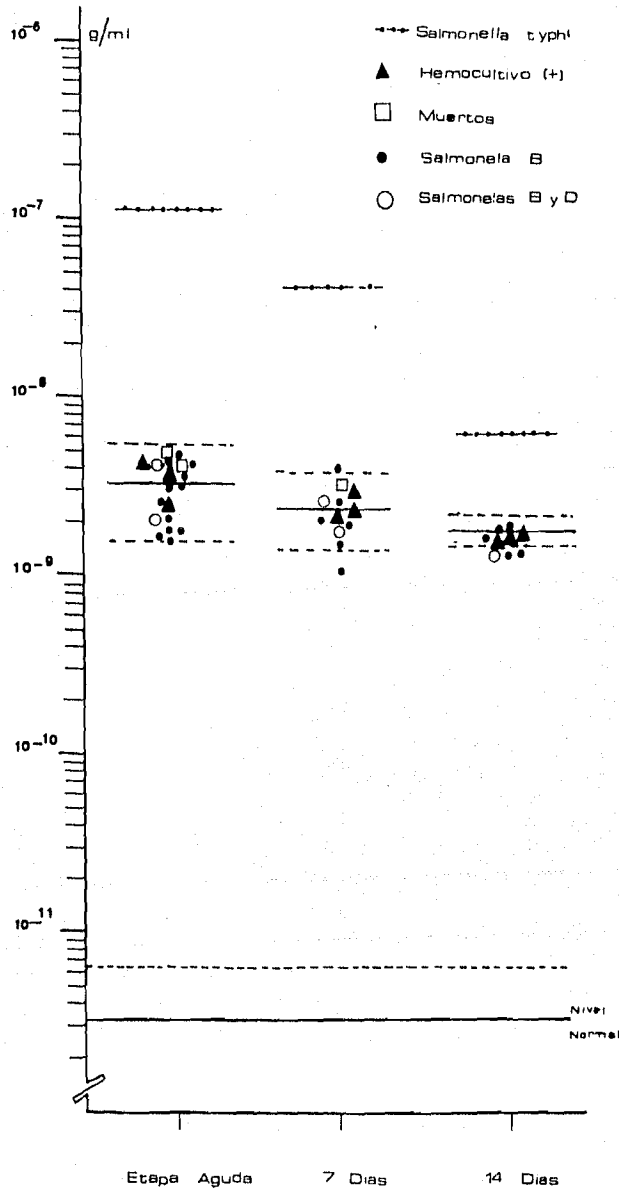
GRÁFICA No. 3

HOMOLOGOS

Investigación del Polisacárido 1,4,5,12 en
 sangre de niños con gastroenteritis por
 Salmonelas B y D



Polisacárido 1,4,5,12 en orina de niños
con gastroenteritis por Salmonelas B y D



ESTÁ TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Polisacárido 14,5,12 en materia fecal de niños con gastroenteritis por Salmonelas

B y D

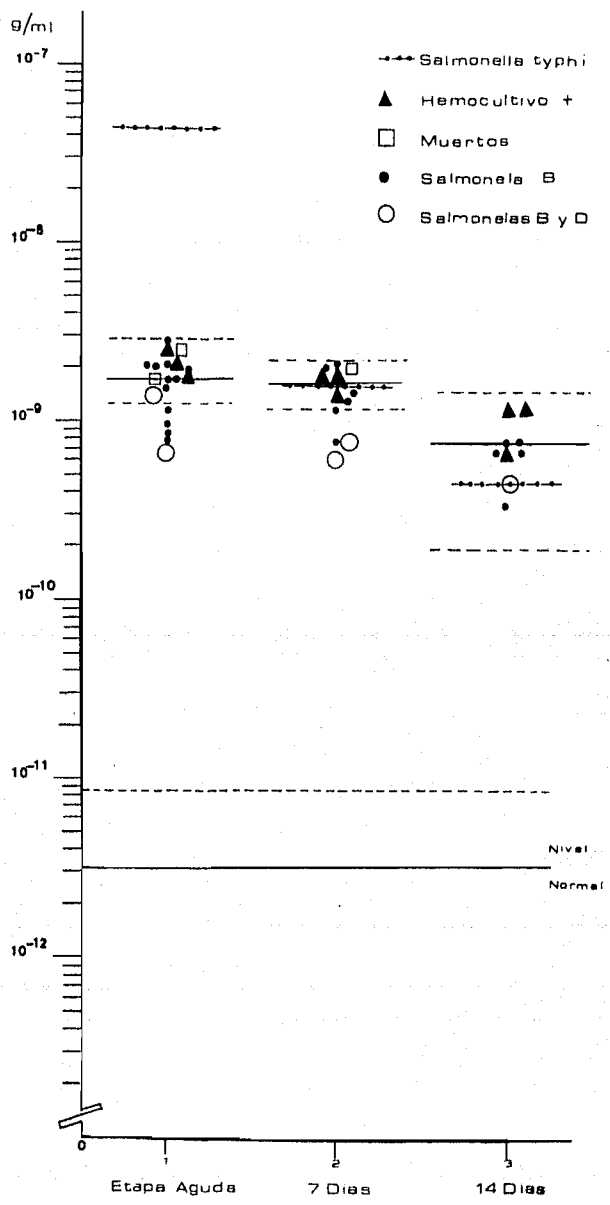


TABLA N° 12

POLISACARIDO 1,4,5,12 EN ORINA DE NIÑOS CON
GASTROENTERITIS POR SALMONELAS "B" Y "D"

Diagnosticos	Etapa Aguda					7 Dias					14 Dias				
	Nº	M	σ	t	P	Nº	M	σ	t	P	Nº	M	σ	t	P
Gastroente- ritis	19	$3,03 \times 10^{-8}$	$1,01 \times 10^{-8}$	12,694	< 0,01	12	$2,26 \times 10^{-8}$	$7,49 \times 10^{-9}$	10,017	< 0,01	9	$1,56 \times 10^{-8}$	$3,2 \times 10^{-9}$	13,840	< 0,01
Testigos	20	$3,0 \times 10^{-11}$	$1,75 \times 10^{-11}$			20	$3,0 \times 10^{-11}$	$1,75 \times 10^{-11}$			20	$3,0 \times 10^{-11}$	$1,75 \times 10^{-11}$		

TABLA Nº 13
 POLISACARIDO 1,4,5,12 EN MATERIA FECAL DE NIÑOS CON
 GASTROENTERITIS POR SALMONELAS "B" Y "D" .

Diagnosticos	Etapa Aguda					7 Dias					14 Dias				
	N ₀	M	σ	t	P	N ₀	M	σ	t	P	N ₀	M	σ	t	P
Gastroenteritis	19	1.79×10^{-8}	6.22×10^{-9}	12.204	< 0.01	12	1.48×10^{-8}	4.79×10^{-9}	10.206	< 0.01	9	8.38×10^{-9}	3.09×10^{-9}	7.6	< 0.01
Testigos	20	3.6×10^{-11}	2.6×10^{-11}			20	3.6×10^{-11}	2.6×10^{-11}			20	3.6×10^{-11}	2.6×10^{-11}		

TABLA N° 14

POLISACARIDO 1,4,5,12 EN SANGRE, ORINA Y MATERIA FECAL DE
 NIÑOS CON GASTROENTERITIS POR SALMONELAS "B" Y "D"

GASTROENTERITIS	S A N G R E					O R I N A					M A T E R I A F E C A L				
	Nº	M	σ	F	P	Nº	M	σ	F	P	Nº	M	σ	F	P
ETAPA AGUDA	42	2.68×10^{-8}	1.48×10^{-8}			19	3.03×10^{-8}	9.99×10^{-8}			19	1.79×10^{-8}	6.22×10^{-9}		
7 D I A S	33	1.89×10^{-8}	1.22×10^{-8}	13.622	< 0.01	12	2.26×10^{-8}	7.49×10^{-9}	4.968	< 0.1	12	1.48×10^{-8}	4.79×10^{-9}	9.620	< 0.01
14 D I A S	20	1.12×10^{-8}	5.37×10^{-9}			9	1.56×10^{-8}	3.2×10^{-9}			9	8.38×10^{-9}	3.09×10^{-9}		

dentro de la circulación portal es destoxificada por el hígado - normal (42, 43). Cuando se reduce la capacidad de extracción por daño hepático, la endotoxina de la circulación venosa portal atrviesa el hígado y entra a la circulación general; ello nos indujo a medir el nivel de polisacárido en pacientes con cuadro agudo de hepatitis infecciosa y tres meses después, en la convalecencia, sin datos clínicos ni de laboratorio compatibles con alteración hepatocelular. Los resultados se presentan en la Gráfica No. 12 y su análisis estadístico en la tabla 15.

7.3 Investigación del polisacárido 1, 4, 5, 12, en sangre portal y periférica de 10 niños sometidos a laparatomía por problema no infeccioso.

Se estudiaron diez niños sometidos a laparatomía, 8 con diagnóstico de probable linfoma, 1 por probable tumor de Wilms y otro por probable tumor suprarenal, 6 del sexo femenino y 4 del sexo masculino, con edades entre 2 y 8 años, a quienes durante el acto operatorio se les tomó simultáneamente una muestra de sangre portal y otra de sangre periférica. Los resultados se presentan en la Gráfica No.13 y su análisis estadístico en la tabla 16.

7.4 Polisacárido 1,4,5,12 en suero de 10 niños sometidos a esterilización prequirúrgica de colon.

Se estudiaron 10 niños, 6 del sexo masculino y 4 del sexo femenino, 8 entre 2 y 3 años, 1 de 5 y otro de 6 años, quienes recibieron tratamiento a base de neomicina (80 mg/kg/día) y eritro micina (50 mg/kg/día) por vía oral para esterilización prequirú

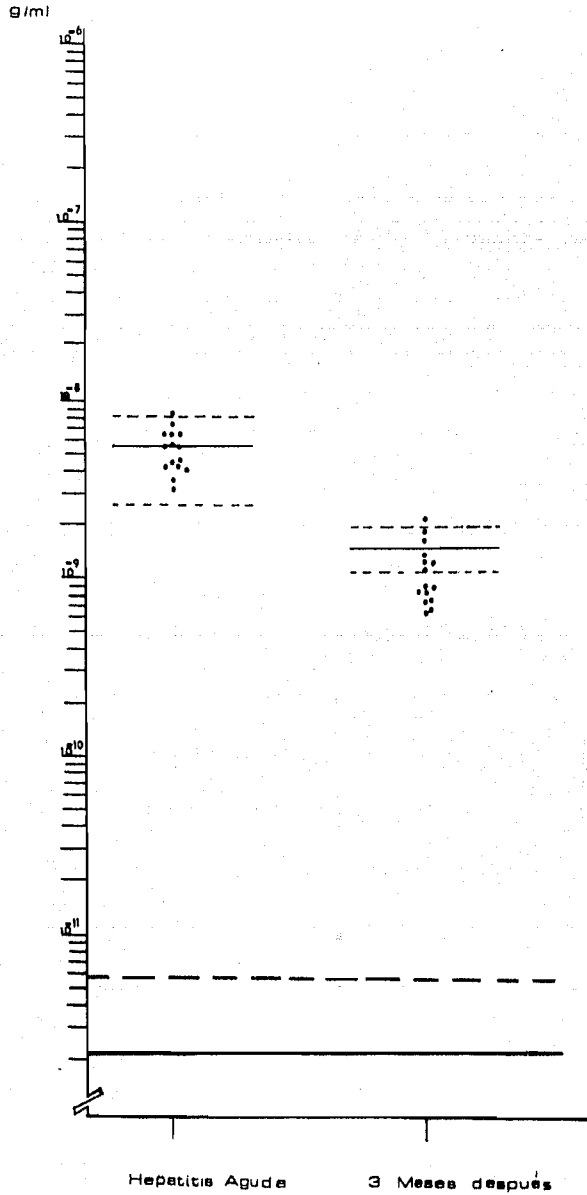
TABLA N° 15

POLISACARIDO 1,4,5,12 EN SUERO DE PACIENTES CON HEPATITIS EN ETAPA AGUDA Y 3 MESES DESPUES.

HEPATITIS	NE DE PACIENTES	M	σ	t	P
AGUDA	15	5.37×10^{-8}	1.34×10^{-8}	15.52	< 0.01
3 MESES DESPUES	15	1.10×10^{-9}	0.42×10^{-9}		

GRÁFICA N.º 11

Polisacárido 1,4,5,12 en suero de pacientes con hepatitis en etapa aguda y 3 meses después.



GRAFICA Nº 13

Polisacarido 1,4,5,12 en sangre portal y
periferica de 10 pacientes no infectados
sometidos a laparotomia

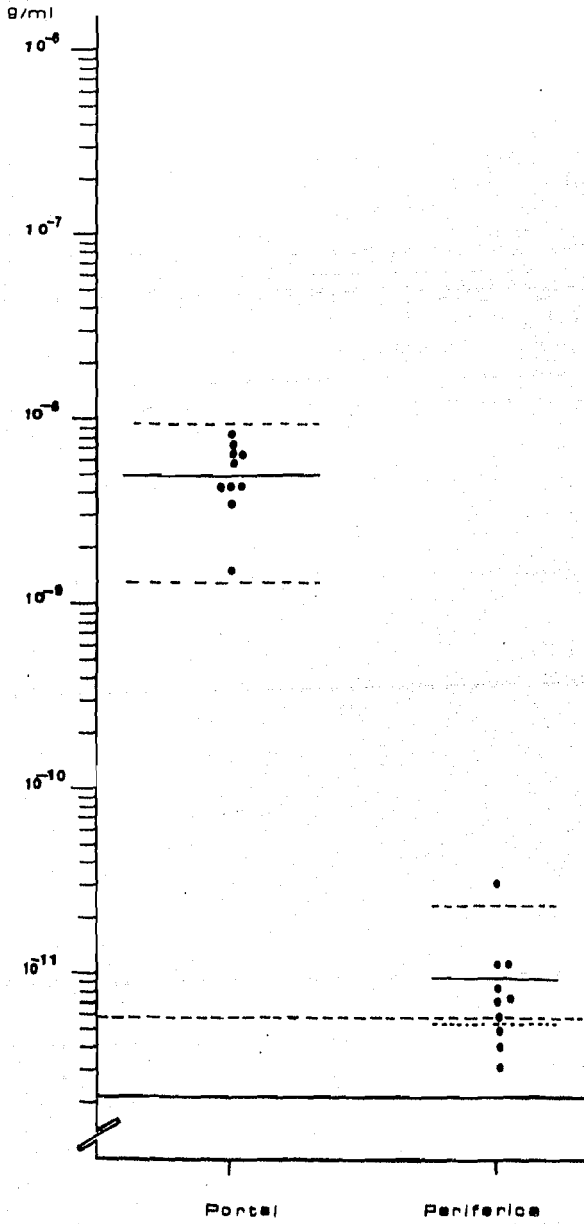


TABLA N° 16

Polisacárido 1,4,5,12 en sangre portal y
Periferica de 10 pacientes no infectados
sometidos a laparotomia

SANGRE	NE DE PACIENTES	M	σ	t	P
PORTAL	10	5.302×10^{-8}	2.2×10^{-8}	8.036	< 001
PERIFERICA	10	0.965×10^{-11}	0.81×10^{-11}		

gica de colon. Se les tomó una muestra de sangre periférica antes de recibir antibióticos, a las 24 horas con antibióticos y tres días después de recibir la última dosis de antibióticos; las gráficas N° 14 y 15 muestran los resultados. Se aplicó análisis de varianza (44) entre grupos obteniéndose un valor de F de 8.057 para un valor de $p < 0,01$ (tabla 16); de la misma manera se realizaron comparaciones entre grupos, aplicándose prueba de t para muestras pareadas, cuyos resultados se presentan en la tabla 17.

7.5 Polisacárido 9,12 en sangre, orina y materia fecal de familiares de pacientes con fiebre tifoidea.

Se estudió el grupo familiar de 15 pacientes internados en la sala de Contagiosos IV del Hospital Infantil de México, de marzo de 1979 a agosto de 1980, con diagnóstico de fiebre tifoidea comprobada por clínica y hemocultivo positivo.

Las 15 familias las constituyen un total de 77 personas, en promedio 5,2 personas por familia. A estas personas se les practicó coprocultivo e investigación del polisacárido 9,12 en sangre, orina y materia fecal.

En dos de las 77 personas, el coprocultivo fué positivo a Salmonella typhi, correspondiendo a dos niños de 3 y 4 años de edad, pertenecientes a un grupo familiar de 10 personas, de las cuales 4 habían padecido la enfermedad, incluidos ellos. A éste grupo familiar se le practicó prueba de coagulación con an-

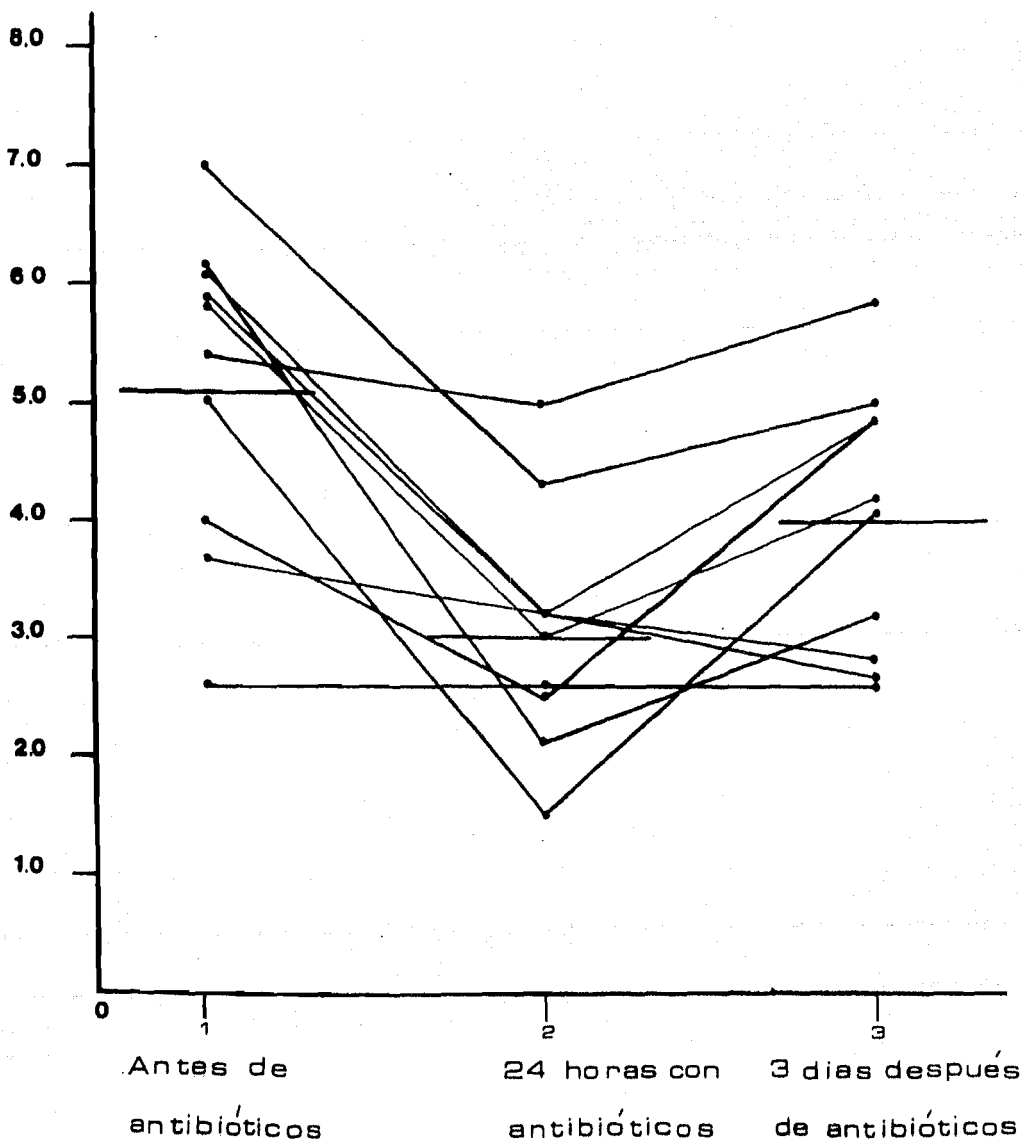
TABLA N° 17

POLISACARIDO 1,4,5,12 EN SUERO DE 10 NIÑOS
SOMETIDOS A ESTERILIZACION DE COLON PREQUIRURGICA.

Diagnósticos	Nº	M (10 ¹²)	σ (10 ¹²)	F	p
Antes de Antibióticos	10	51.5	12.71	8.057	< 0.01
24 horas con antibióticos	10	30.6	9.61		
3 Dias después	10	40	10.6		

Polisacárido 1,4,5,12 en suero de 10 niños sometidos a esterilización^x de colon pre-quirúrgica

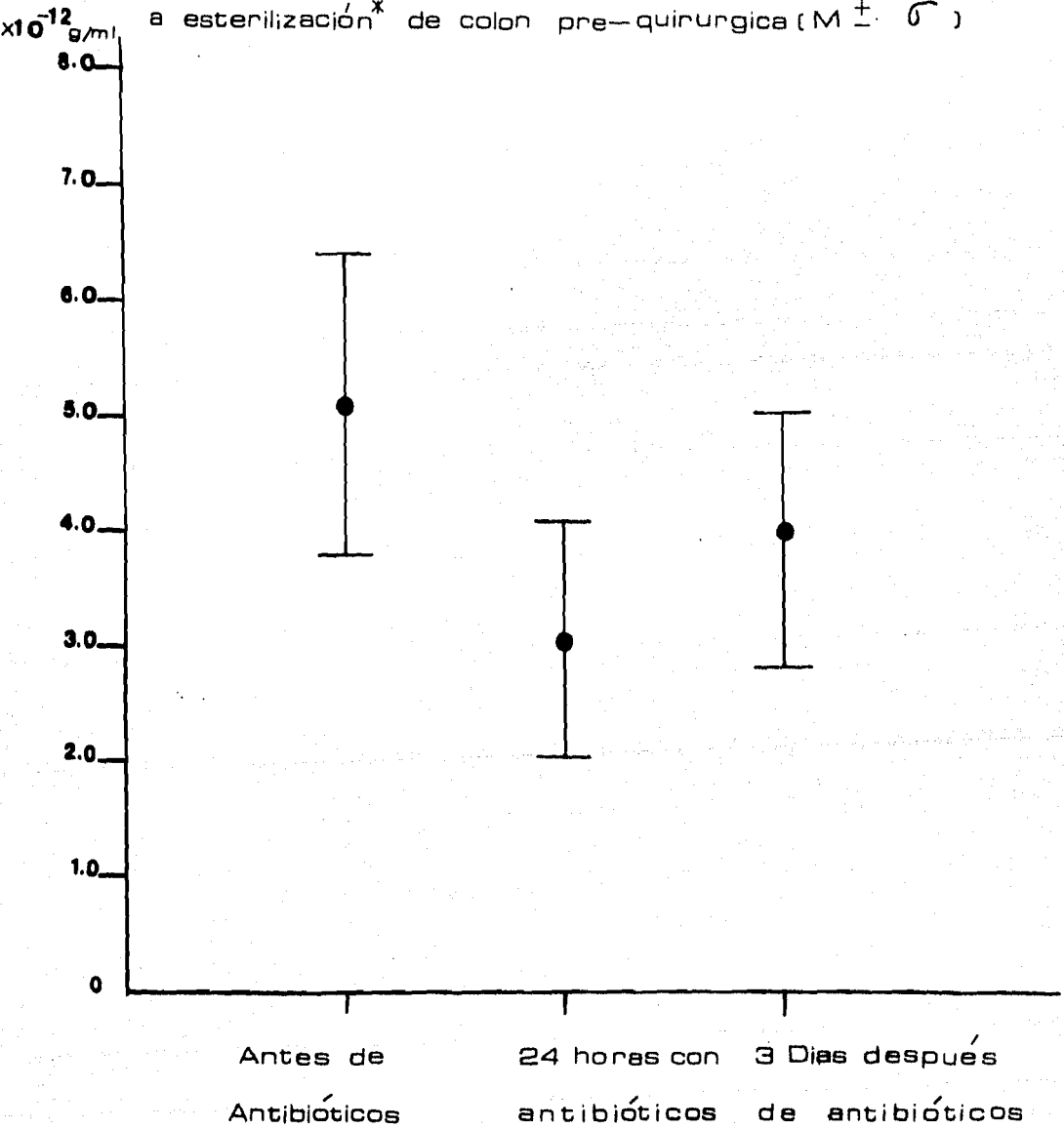
1×10^{-12} g/ml



^x Neomicina + Eritromicina

GRAFICA N° 15

Polisacárido 1,4,5,12 en suero de 10 niños sometidos a esterilización* de colon pre-quirúrgica (M ± σ)



* Neomicina + Eritromicina

tígenos 9, 12 (45), reportándose positiva en los dos pacientes - con cultivo positivo y negativa en el resto. A la semana se les repitió la prueba (coprocultivo y coaglutinación), siendo negativas.

Los niveles de polisacárido 9, 12 en este grupo, los representamos en las Gráficas Nos. 16, 17 y 18; en ellas también representamos el nivel obtenido en pacientes con fiebre tifoidea en niños y adultos sanos. El grupo experimental se dividió en tres subgrupos de acuerdo a la edad: 0-4 años, 5-14 años y más de 15 años. - Los resultados se compararon por prueba de t para muestras no apareadas y se presentan en la tabla 18.

8. Estudio en animales

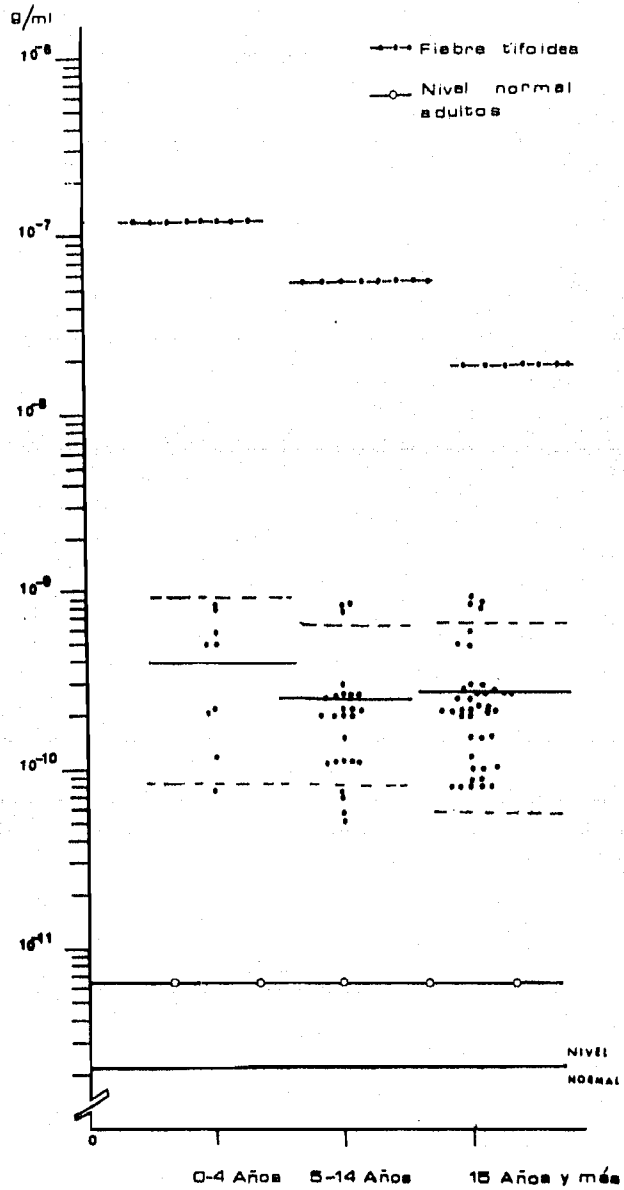
8.1 Estudio en conejos

A 10 conejos se les practicó asa de Thiry-Vella según técnica descrita en el inciso 2.1.a, practicándosele lavado diario con solución fisiológica del asa aislada y sacrificándolos a los 8 días, se obtuvo simultaneamente sangre periférica (vena marginal de la oreja), sangre de una vena del asa intestinal aislada, sangre portal y mesentérica. En estos sueros se investigó el nivel de polisacárido 1, 4, 5, 12; los resultados se presentan en la Gráfica No.19.

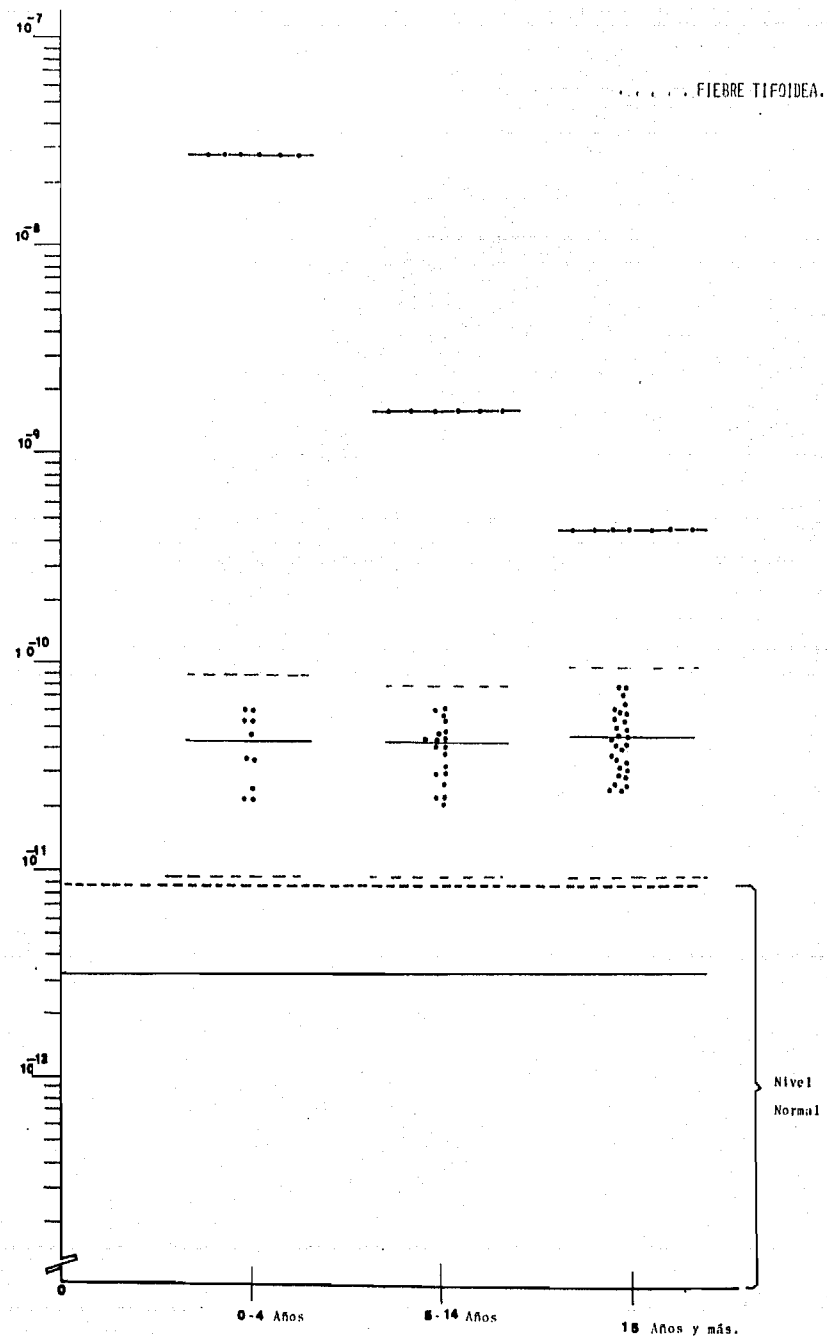
Las diferencias entre grupos son altamente significativas, con un valor de $F_{70,02}$ y $p < 0,01$. Las diferencias entre los valores obtenidos en suero de asa intestinal aislada vs sangre portal, sangre de asa vs sangre mesentérica, asa vs sangre periférica, portal vs periférica, son significativas; en las ta

GRÁFICO 10

Investigación del polisacárido 9,12 en
sangre de familiares de pacientes con
fiebre tifoidea



POLISACARIDO 9,12 EN MATERIA FECAL DE FAMILIARES
DE PACIENTES CON FIEBRE TIFOIDEA.



T A B L A No. 18

**POLISACARIDO 9, 12 EN SANGRE, ORINA Y MATERIA FECAL DE FAMILIARES DE PACIENTES
CON FIEBRE TIFOIDEA, COMPARACION POR GRUPOS DE EDAD**

Muestras	Sangre		Orina		Materia fecal	
	t**	P	t	P	t	P
A* vs B	1.485	< 0.2	0.5	< 0.6	0.125	< 0.9
A vs C	1.336	< 0.2	0.7	< 0.9	0.008	< 1
B vs C	0.379	< 0.8	1.3	< 0.9	0.342	< 1

* A = 0-4 años

B = 5-14 años

C = Mayores de 15 años

** Prueba de t para muestras no pareadas

GRAFICA N° 19

Polisacárido 1,4,5,12 en sangres de asa
intestinal aislada, periférica, portal y
mesenterica. (10 conejos)

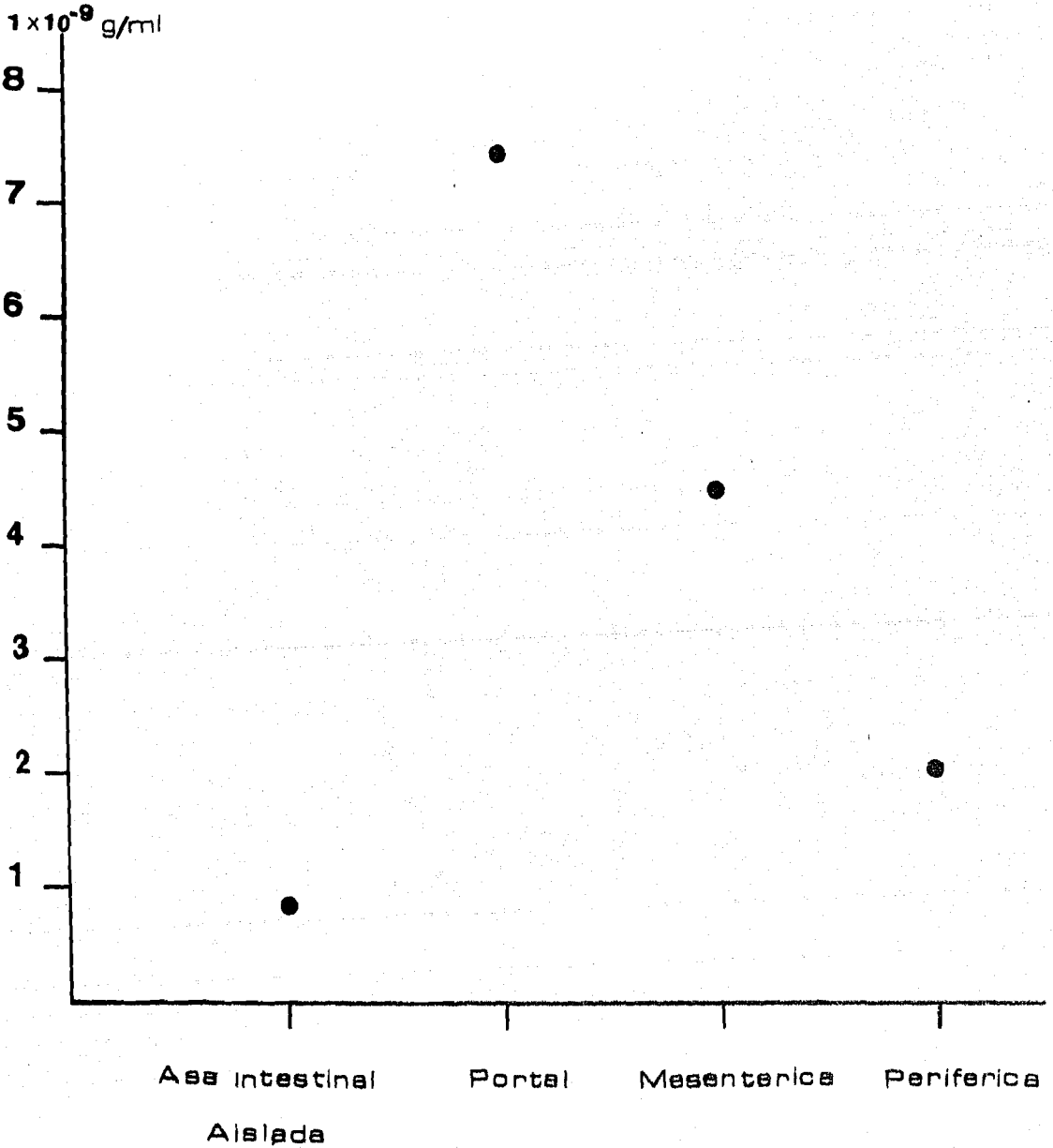


TABLA N° 19

POLISACARIDO 1,4,5,12 EN SANGRES DE ASA INTESTINAL AISLADA, PERIFERICA, PORTAL Y MESENTERICA. (10 CONEJOS)

Sangre	Nº	M	σ	F	P
Asa intestinal aislada	10	0.83×10^{-9}	0.38×10^{-9}	70.02	< 0.01
Portal	10	7.41×10^{-9}	1.56×10^{-9}		
Mesenterica	10	4.5×10^{-9}	1.17×10^{-9}		
Periferica	10	2.14×10^{-9}	0.55×10^{-9}		

TABLA No. 20
POLISACARIDO 1, 4, 5, 12 EN SUERO DE SANGRE DE ASA
AISLADA, PORTAL, MESENTERICA Y PERIFERICA
(10 conejos)

MUESTRAS	t *	p
<i>Asa aislada</i> vs. <i>Portal</i>	13,334	< 0,001
<i>Asa aislada</i> vs. <i>Mesentérica</i>	11,069	< 0,001
<i>Asa aislada</i> vs. <i>Periférica</i>	11,642	< 0,001
<i>Portal</i> vs. <i>Mesentérica</i>	5,975	< 0,001
<i>Portal</i> vs. <i>Periférica</i>	9,444	< 0,001
<i>Mesentérica</i> vs. <i>Periférica</i>	6,685	< 0,001

* Prueba de t para muestras pareadas.

blas 19 y 20 se presentan estos resultados.

8.2 Cálculo de la LD₅₀ en embriones de pollo inoculados con suero de pacientes con fiebre tifoidea y de pacientes con gastroenteritis por salmonelas B y D.

Dado que el radioinmunoensayo reconoce la porción polisacárida de la molécula de endotoxina, quisimos averiguar si los sueros estudiados tenían actividad endotóxica que correlacionara con los niveles de polisacárido cuantificados por radioinmunoensayo. Se usaron 6 sueros de pacientes con fiebre tifoidea (comprobada por clínica y hemocultivo positivo), 10 sueros de pacientes con gastroenteritis por salmonelas B y/o D a los cuales previamente se les había cuantificado el polisacárido 9, 12 y 1, 4, 5, 12 y un grupo testigo constituido por suero de 5 personas consideradas sanas previo exámen médico general y que reunían las características expuestas en el inciso 2.2. Las tablas 21, 22 se resumen los resultados de mortalidad, sobrevivencia, concentración del polisacárido y LD₅₀ de las muestras de suero de estos pacientes.

La inoculación practicada en embriones de pollo de 11 días de edad, con suero a diferentes diluciones: 1:10, 1:100, 1:100, 1:10.000 de personas sanas dió como resultado sobrevivencia de todos los embriones, excepto uno que murió a la concentración del suero 1:10 de un niño de 10 años sin patología aparente.

Cinco de los sueros de los seis pacientes con fiebre tifoidea mostraron actividad endotóxica; usando papel probits presen

T A B L A No. 21

**LETALIDAD (LD₅₀) EN EMBRIONES DE POLLO* INOCULADOS CON
SUEROS DE PACIENTES CON FIEBRE TIFOIDEA**

Pacientes con fiebre tifoidea	1:10		1:100		1:1000		1:10000		Concentración del Polisacárido	LD ₅₀ Reed-Muench
	vivos	muertos	vivos	muertos	vivos	muertos	vivos	muertos		
1	2	3	3	2	5	0	4	1	0.104×10^{-6}	1:3.830
2	1	4	2	3	4	1	---	---	0.045×10^{-6}	1:59,85
3	1	4	4	1	3	2	4	1	0.060×10^{-6}	1:1.000
4	0	5	3	2	4	1	5	0	0.120×10^{-6}	1:1.584
5	3	2	4	1	4	1	4	1	0.120×10^{-6}	1:1.588
6	3	2	4	1	4	1	5	0	0.038×10^{-9}	---

* 11 días de edad

T A B L A No. 22

LETALIDAD (LD₅₀) EN EMBRIONES DE POLLO* INOCULADOS CON
SUEROS DE PACIENTES CON SALMONELOSIS

Gastroenteritis	1:10		1:100		1:1000		1:10000		Concentración del Polisacárido	LD ₅₀ Reed-Muench
	vivos	muertos	vivos	muertos	vivos	muertos	vivos	muertos		
B (1)	2	3	4	1	3	2	5	0	52.5x10 ⁻⁹	1:3828
B y D (1)	3	2	4	1	3	2	5	0	50.0x10 ⁻⁹	1:10.000
B (1)	4	1	5	0	5	0	5	0	0.01x10 ⁻⁹	---
B (3)	5	0	4	1	5	0	5	0	12.5x10 ⁻⁹	---
B (1)	3	2	5	0	5	0	5	0	9.8x10 ⁻⁹	---
B (3)	4	1	5	0	5	0	5	0	12.5x10 ⁻⁹	---
B (1)	4	1	4	1	5	0	5	0	40.0x10 ⁻⁹	---
B (3)	5	0	4	1	4	1	5	0	25.0x10 ⁻⁹	---
B (2)	4	1	4	1	5	0	5	0	6.50x10 ⁻⁹	---
B (3)	2	3	4	1	5	0			8.0x10 ⁻⁹	---

* 11 días de edad

() Número de la muestra

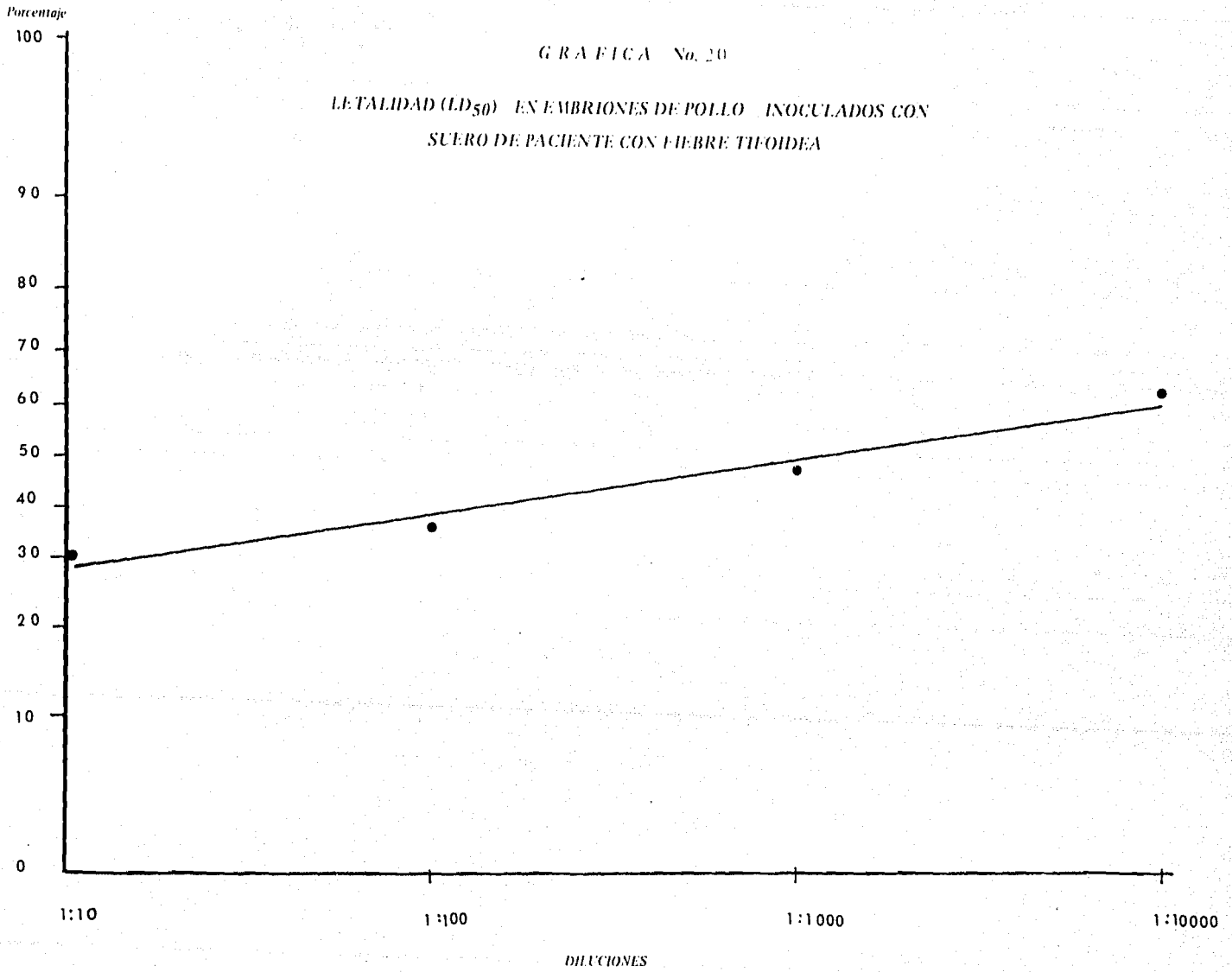
CUADRO No. 7

**LETALIDAD (LD₅₀) EN EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS CON
SUERO DE PACIENTE CON FIEBRE TIFOIDEA**

a Grado de dilucion del suero	b Vivieron	c Fallecieron	Por agregación total		Mortalidad %
			d Vivos	e Muertos	
1:10	0	5	12	5	30
1:100	3	2	12	7	37
1:1.000	4	1	9	8	47
1:10.000	5	0	5	8	62

GRAFICA No. 20

LETALIDAD (LD₅₀) EN EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS CON
SUERO DE PACIENTE CON FIEBRE TIFOIDEA



tamos en la Gráfica No.20 la representación de la actividad endotóxica del suero del paciente 3, cuyos datos se resumen en el Cuadro No.7. En dos de los sueros de pacientes con gastroenteritis por salmonelas B y D, se encontró actividad endotóxica, en el paciente 1; la muestra correspondía a la etapa aguda de la enfermedad y en él se había cultivado en sangre Salmonella B; el paciente 2, se le había cultivado Salmonellas B y D en coprocultivo; la muestra correspondía a la etapa aguda. Los pacientes 3,5 y 7 la muestra correspondía a la etapa aguda de la enfermedad. - Existe un porcentaje de mortalidad variable a las diferentes diluciones, pero no se puede calcular la LD₅₀. El paciente 9 la muestra de sangre corresponde a los 7 días (2da. muestra) y en los pacientes 4, 6, 8 y 10, la muestra es de los 14 días (3ra. muestra); en ellos no fué posible calcular la LD₅₀ a las diluciones usadas.

DISCUSION

1. Polisacárido homólogo (1, 4, 5, 12) y heterólogo (9, 12) en sangre, orina y materia fecal de niños con gastroenteritis por salmonelas B y D.

Las salmonelas forman el grupo más ubicuo de microorganismos causantes de diarrea bacteriana. Aunque se han descrito más de 2000 serotipos distintos, son menos de 40 los serotipos que causan el 95 a 98 % de enfermedad en el hombre (14).

Desde 1943 Seligman y col. (1) describieron las cuatro variedades clínicas que adopta una salmonelosis: 1) gastroenteritis; 2) bacteremias y septicemias (síndromes tifoidicos); 3) localizaciones consecutivas al estado bacteriémico o septicémico; y 4) portadores convalescientes o sanos. La gastroenteritis es la expresión clínica más común de la infección por salmonelas (3, 4, 36), constituye 2/3 de todas las formas de enfermedad causada por salmonelas (2).

Los diferentes serotipos de salmonelas muestran tendencia variable en la producción de uno u otro tipo de síndromes clínicos vistos en pacientes infectados por salmonelas i.e. S. anatum produce fundamentalmente infección asintomática o enfermedad diarreica y raramente penetra el intestino o causa bacteremia (2). En contraste, ciertos serotipos de salmonelas tales como Salmonella typhimurium y S. para typhi A y C, regularmente penetran la pared intestinal y producen cuadro clínico de fiebre enteral. Otras -

salmonelas como S. newport y S. enteritidis son agentes etiológicos que producen fundamentalmente gastroenteritis, S. typhimurium es la especie de salmonela más comunmente asociada con gastroenteritis y frecuentemente es causa de bacteremia e infección local. Las características del organismo que influncian el tipo de enfermedad no han sido descritas. En el caso de Salmonella typhimurium el análisis de los cuadros clínicos asociados revela que 80% adopta la forma de gastroenteritis, 4% la septicémica o tifóidica y - 15% la asintomática. En ocasiones es difícil la separación clara de las variedades clínicas, pero la baja incidencia de cuadros septicémicos en las infecciones por S. typhimurium ha sido confirmada por la encuesta del Centro de Salmonelas de Nueva York; en efecto, Saphra y Winter (5) durante una revisión de 9.284 salmonelas aisladas de 7.779 infecciones humanas, encontraron que 2.385 (30,7%) fueron S. typhimurium y solamente 97 de las 2.385 cuadros clínicos asociados (4,1%) fueron síndromes sépticos con hemocultivo positivo. en nuestro medio, Olarte y col (46) en una encuesta de 4.000 niños con padecimientos febriles a los que se les practicó hemocultivo, resultaron 478 salmonelas de las cuales 6 fueron S. thyphimurium.

En general, se han descrito tres tipos de interacciones entre las bacterias capaces de producir diarrea aguda y la mucosa intestinal (47): 1) multiplicación en el intestino delgado, sin invasión de la mucosa intestinal i.e. Vibrio cholerae; 2) invasión y destrucción de la mucosa intestinal, i.e. Shigella; 3) penetración al tejido submucoso, incluyéndose en este grupo a las salmonelas, que invaden el epitelio sin destruirlo y penetran hasta la

lamina propia en donde se reproducen e inducen respuesta inflamatoria. Ultraestructuralmente, el proceso de penetración de la salmonela ha sido descrito desde 1967 por Takeuchi (48): las bacterias al acercarse a una distancia de 350 A nm producen degeneración de las microvellosidades del borde en cepillo del epitelio intestinal. La naturaleza de esta interacción no ha sido definida, hay evidencias que sugieren que la composición química de la unidad repetidora de el lipopolisacárido puede tener alguna importancia en el proceso de penetración (49), aunque estudios en ratones gnotobióticos establecen que pueden ser importantes pero no esenciales en la invasión de la mucosa ileal (50). Las bacterias pasan a través de las células del epitelio intestinal, transportadas por vacuolas, hasta la lamina propia; la célula epitelial regenera las microvellosidades degeneradas y en general permanecen bien conservadas durante este proceso de penetración. Las bacterias pueden también penetrar a través de las uniones entre las células epiteliales adyacentes, pero no son transportadas por células fagocíticas como inicialmente había propuesto Florey (51). Al llegar a la lamina propia, las bacterias se observan dentro de las células fagocíticas y se multiplican dentro de ellas; esta multiplicación es esencial, la penetración no es suficiente para producir enfermedad (52).

Las salmonelas no typhi inducen una respuesta inflamatoria polinuclear, la respuesta inflamatoria estimula la liberación de prostaglandinas (53), principalmente E_1 , E_2 , E_2^α , que incrementan la concentración intracelular de AMP_c (47) y como efecto final se inhibe la absorción de sodio e incrementa la secreción

de cloruros, bicarbonato, potasio y agua hacia la luz del intestino, sin alteraciones histopatológicas de la mucosa intestinal, estas alteraciones aunadas a alteraciones a nivel del colon (54) ha inducido a algunos autores a proponer que probablemente la diarrea resulta de la incapacidad del colon alterado de reabsorber la carga de líquidos producidas a nivel del ileon por un mecanismo -secretor.

Estos son los aspectos fisiopatogénicos conocidos hasta ahora en relación a la gastroenteritis por salmonelas no typhi, no obstante aunado a la diarrea como manifestación cadinal, los niños - en su cuadro clínico muestran manifestaciones de tipo general, tales como: fiebre, estado de choque (sin o poca relación con la -deshidratación), leucocitosis y alteraciones de la coagulación que sugieren que la bacteria o su endotoxina no permanecen únicamente en la luz del tubo digestivo sino que produce episodios de endotoxemia con mayor frecuencia de lo hasta ahora aceptado. La concentración del polisacárido 9, 12 y 1, 4, 5, 12 en sangre, orina y -materia fecal de pacientes con gastroenteritis por salmonelas B y D, revelan que las mismas aumentan en el curso de gastroenteritis por dichos gérmenes y que hay eliminación por la orina de material antigénico.

Con antisueros 9, 12 (heterólogos), los valores encontrados en sangre se distribuyen en su mayoría alrededor del promedio más o menos una desviación standard; los valores más altos se encontraron con la asociación de salmonelas B y D, los valores encontrados en la segunda y tercera muestra presentan una clara tenden

cia a disminuir y una mayor dispersión. El que los valores más altos encontrados con antisueros heterólogos correspondan a pacientes con salmonelas B y D, habla de una mayor facilidad para descubrir esos determinantes antigénicos con antisueros 9, 12; pudiera pensarse que se trata de un mayor poder de invasión de las Salmonellas D, pero los mismos sueros analizados con antisueros 1, 4, 5, 12 no muestran igual fenómeno.

Por otra parte, las concentraciones encontradas para los casos más graves (fallecidos y septicemias) presentan valores del polisacárido por arriba del promedio en sangre, orina y material fecal, lo que nos sugiere una relación directa entre la severidad del cuadro clínico y los niveles de antígenos de salmonelas.

Los hallazgos de valores detectables de antígenos en niños sanos, sugieren que la misma cruza la barrera intestinal en condiciones normales. Evidencias previas apoyan que las endotoxinas son absorbidas continuamente del tracto intestinal en condiciones normales (38, 42, 55, 56), aunque no podemos descartar que parte de estos valores, por la naturaleza del polisacárido, sea la cuantificación de sustancias de grupo que comparten estructuras químicas semejantes (57, 58).

Los niveles de polisacárido detectados con anticuerpos homólogos (1, 4, 5, 12) son unas 50 veces más altos que los encontrados con los anticuerpos heterólogos (9, 12) lo que habla de una mayor especificidad de los anticuerpos homólogos. La mayor parte de los casos se agrupan alrededor del promedio, los valores encontrados

para la asociación de salmonelas B y D con anticuerpos homólogos se encuentran por debajo del promedio pero dentro del valor normal, lo cual establece que los valores más altos encontrados para esta asociación con anticuerpos heterólogos, no se deben al mayor poder de invasión de estas salmonelas sino a la mayor especificidad del suero con el cual se investigó.

Las concentraciones encontradas en los casos más graves (septicemias y fallecidos) presentan los valores más altos compatibles con nuestra hipótesis de que la gravedad está relacionada con la magnitud de la endotoxemia.

La cinética de desaparición del polisacárido detectado con anticuerpos homólogos de manera secuencial a los 7 y 14 días muestra una clara tendencia a disminuir, aunque no en la cuantía a lo observado con el sistema heterólogo (9, 12), que pudiera estar en relación con la más lenta degradación de la molécula y por ende eliminación retardada.

El análisis estadístico por análisis de varianza demuestra que los valores obtenidos en la etapa aguda, 7 y 14 días con anticuerpos homólogos, muestran diferencias significativas ($F=13,62$) para un valor de $p < 0,01$

Se utilizó la prueba de t de Student (59) para evaluar los valores de las diferencias encontradas en la gastroenteritis por salmonelas B y D y en los testigos; en las muestras de sangre con antisueros heterólogos, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la primera y segunda muestras, como puede ob-

servarse en la tabla No. 8 . Sin embargo, en la tercera muestra de sangre los valores tienden a normalizarse, ya que el valor de t da un valor de $p > 0,5$.

Al comparar los valores obtenidos con antisueros homólogos en la muestra de sangre de niños con gastroenteritis por salmonelas B y D y los testigos se encontraron por prueba de t diferencias significativas en la primera, segunda y tercera muestras.

El análisis estadístico de las muestras obtenidas en la orina reveló resultados semejantes; nuevamente encontramos con antisueros heterólogos, que en la tercera muestra de orina, las concentraciones encontradas tienen a dar valores semejantes a los normales obteniendo un valor de $p > 0,3$; pero con antisueros homólogos en las tres muestras las diferencias son significativas con $p < 0,01$.

En relación a los valores encontrados en materia fecal, el análisis estadístico de los valores obtenidos con sueros heterólogos de la primera muestra con respecto al grupo testigo, muestra que hay una diferencia estadísticamente significativa, con un valor de $p < 0,05$. En la segunda y tercera muestra, los valores no son significativos con respecto al testigo, ya que el valor de p para la segunda muestra es $> 0,4$ y para la tercera muestra encontramos valores más altos en el grupo testigo que en los pacientes; lo que pudiera estar en relación a que la mayoría de éstos pacientes estuvieron tratados con antibióticos, probablemente esto permitió una disminución en la flora intestinal y

consecuentemente una disminución de endotoxinas detectables; con antisueros homólogos; en las tres muestras las diferencias son significativas, con un valor de $p < 0,01$.

2. Polisacárido 1, 4, 5, 12 en sangre de niños con hepatitis, etapa aguda y tres meses después.

Dado que el hígado está colocado entre el intestino y la circulación general como un filtro de bacterias y sus productos cabe esperar que un defecto en la función de esta barrera en enfermedad hepática aguda i.e. hepatitis infecciosa aguda, o crónica i.e. cirrosis permita la entrada de esas sustancias a la circulación sistémica.

Los fagocitos hepáticos (células de Kupffer) constituyen el sitio principal de depuración de partículas en la sangre portal esto ha sido demostrado experimentalmente usando bacterias (60), emulsión de lípidos (61), carbón coloidal (62) y glóbulos rojos extraños (63). Estas células constituyen 15% de la población total de células hepáticas (64).

La captación de partículas por el hígado se ve afectada por varios factores (42) que incluyen: 1) flujo sanguíneo a través de los sinusoides hepáticos; 2) dosis, tamaño y grado de extrañeza de las partículas; 3) factores séricos (opsoninas) tales como inmunoglobulinas y complemento; 4) estado funcional de las células de Kupffer; y 5) el número de las células de Kupffer.

Se ha visto que existe una relación entre endotoxinas entéricas e insuficiencia hepática, y se ha implicado la endotoxemia - sistémica como probable responsable de las complicaciones hemodinámicas, hematológicas y neurológicas observadas en pacientes con insuficiencia hepática; esto ha sido un tema controversial por las limitaciones que presentan los métodos para la detección y cuantificación de endotoxinas circulantes. Por una parte, endotoxemia sin bacteremia ha sido informada en insuficiencia hepática aguda y crónica: Cooperstock y col. (65) encontraron endotoxemia en 11 de 12 pacientes con síndrome de Reye, 9 de los cuales estaban comatosos; Triger y Alp (66) informan de títulos anticuerpos a E. coli en pacientes con hepatitis viral aguda, hepatitis crónica y cirróticos significativamente mayor que en los testigos sanos. Protell y col. (67) observaron aglutininas a salmonelas en 28% de pacientes con hepatitis crónica activa, sin evidencia de infección concomitante con salmonela. Por otra, recientemente, Fulenwider y cols. (68) informan la no detección de endotoxemia en pacientes cirróticos y sugieren que probablemente, dada la ubicuidad de las endotoxinas, pudiera tratarse de contaminación de las muestras, la alta prevalencia de positividad reportada por otros autores - previamente.

Nuestros hallazgos informan de un valor de endotoxemia del orden $5,37 \times 10^{-8}$ mg/ml. en hepatitis infecciosa aguda benigna y $1,10 \times 10^{-9}$ mg/ml. 3 meses después (durante la convalecencia). - El cálculo del valor de t 15,52 excede el 0,001 el nivel de significancia. Estos valores de endotoxemia mayores a los encontrados en los niños sanos pueden ser secundarios a la fuga de sangre por

tal en presencia de células de Kupffer insuficientes.

Estos hallazgos revisten importantes implicaciones terapéuticas por cuanto las endotoxinas que escapan a la barrera que representa el hígado, juegan un papel importante en las manifestaciones hepáticas y extra-hepáticas de las enfermedades del hígado (69, 73).

Por otra parte, constituye ésta la primera medición cuantitativa de los niveles de endotoxinas en sangre periférica, la evaluación de endotoxemia en estudios previos se ha hecho por métodos indirectos, tradicionalmente midiendo sus efectos biológicos (74) marcando la endotoxina con radioisotopos (75, 76) y más recientemente por la prueba del lisado del Limulus polyphemus (77), cuya inespecificidad deja mucho que desear (78, 79).

3. Polisacárido 1, 4, 5, 12 en sangre portal y periférica de 10 niños sometidos a laparotomía por patología no infecciosa.

La endotoxemia portal a diferencia de la endotoxemia general no ha sido establecida como una entidad patológica en el hombre.

La absorción intestinal de endotoxinas y subsiguiente presencia en sangre portal es un hecho (42) que señala una vía normal de liberación de endotoxinas al hígado para su destoxificación.

La cuantificación de los niveles de endotoxinas en sangre portal y periférica, demuestra que los niveles de endotoxinas en san

gre portal son 100 veces mayores a los encontrados en sangre periférica tomada simultaneamente, cuyos valores caen dentro de los límites de variación normal.

Estos hallazgos apoyan las evidencias de que las endotoxinas son continuamente absorbidas del tracto intestinal (38, 39, 80, 81, 82) y crean un estado de endotoxemia portal "fisiológica". - La disminución de los niveles de endotoxinas encontrados en sangre periférica indican que la endotoxina es depurada por el hígado.

La endotoxina determinada por este método (radioinmunoensayo) puede representar endotoxina liberada de bacterias muertas o liberadas durante el crecimiento bacteriano (24) en el lumen intestinal y nó necesariamente la bacteria viva.

4. Polisacárido 1, 4, 5, 12 en sangre de 10 niños sometidos a esterilización de colon pre-quirúrgica.

Existen considerables evidencias de que la endotoxina es absorbida continuamente del tracto intestinal (38, 42, 55) y que la cantidad de endotoxina absorbida varía con el tamaño de la población de flora por gran-negativos en el intestino (40). El concepto de que la administración de antimicrobianos orales reduce la micro-flora colónica fué inicialmente propuesto en 1942 y se demostró que el succinilsulfatiazol disminuye la cantidad de coliformes fecales (83). Desde entonces, por muchos años se usaron sulfas no absorbibles como método principal para la preparación

de intestino. Más recientemente, se han usado aminoglucósidos y tetraciclinas con el inconveniente de ser inútiles para aerobios principalmente y de permitir el sobrecrecimiento de gérmenes no deseables (Staphylococcus aureus) así como la aparición de cepas resistentes (84).

La combinación de eritromicina más neomicina es ampliamente usada y resulta útil en la reducción de especies aeróbicas y anaeróbicas intestinales (85).

Nuestros resultados de la cuantificación del polisacárido 1, 4, 5, 12 (endotoxina) en niños sometidos a esterilización de colon pre-quirúrgica, demuestran que los niveles de endotoxinas antes de administrar antibióticos, 24 horas con antibióticos y 3 días después muestran diferencias que sometidas a un análisis de varianza son significativas, con un valor de $p < 0,1$. La aplicación de la prueba de t para comparar los valores obtenidos antes de administrar antibióticos vs 24 horas con antibióticos, muestran diferencias significativas, con un valor de t de 4.952, el valor de $p < 0,001$.

La comparación de los valores antes de administrar antibióticos vs 3 días después de antibióticos, también es significativa, el valor de t es de 4.483, $p < 0,01$; igualmente las diferencias de los valores obtenidos 24 horas con antibióticos vs 3 días después, muestra diferencias significativas, el valor de t es de 4,48 para un valor de $p < 0,01$. Las diferencias observadas antes de recibir antibióticos vs 24 horas con antibióticos apoyan las

evidencias de que este régimen de antibióticos disminuye de manera efectiva la cantidad de endotoxinas absorbidas (85) al disminuir la flora intestinal, principalmente por gram-negativos, y de que la cantidad de endotoxinas absorbidas a nivel intestinal guarda relación con la población de gram negativos existentes a ese nivel. Las diferencias demostradas 24 horas con antibióticos vs 3 días después, hablan de la reposición de la flora intestinal una vez que se ha retirado el antibiótico, esa reposición no es completa como lo demuestra las diferencias observadas antes de recibir antibióticos vs 3 días después de la última dosis de antibióticos.

Estos hallazgos apoyan las evidencias de que la cantidad de endotoxina absorbidas varían con el tamaño de la población de flora por gram-negativos existente en el lumen intestinal (40), que las endotoxinas se absorben continuamente del tracto intestinal (38) y que la administración del régimen de neomicina mas eritromicina es efectivo y disminuye la cantidad de endotoxina absorbida.

Estos conceptos tienen importantes implicaciones clínicas relacionadas con el papel de las endotoxinas en la patogénesis del estado de choque (42, 86, 88) y con la efectividad de la utilización de antibióticos profilácticos en cirugía electiva de colon (85).

5. Polisacárido 9, 12 en familiares de pacientes con fiebre tifoidea.

El estudio de contactos intrafamiliares de pacientes con fie-

bre tifoidea normalmente se hace en casos de epidemias. Kumate y cols. en 1974 (9) practicaron estudios bacteriológicos, serológicos (Widal) e inmunoquímicos (reacción de inhibición de hemaglutinación) en 85 contactos familiares sin síntomas de enfermedad encontrando 86,9 % con coprocultivo positivo a S. typhi y reacción de hemaglutinación positiva en materia fecal, de lo que se infiere que estas personas tenían o tuvieron el bacilo sin padecer la enfermedad.

Nosotros estudiamos 15 familias, en total 77 contactos intrafamiliares de pacientes con fiebre tifoidea, encontrando en promedio $2,55 \times 10^{-10}$ g/ml. de polisacárido en sangre, al dividirlos por grupos de edad el promedio mayor se encontró en el grupo de 0 a 4 años ($2,78 \times 10^{-10}$ g/ml.); estos valores no diferían significativamente de los encontrados en los grupos 5 a 14 años, el valor de t es de 1.485 para un valor de $p < 0,2$, y de los valores encontrados en el grupo mayor de 15 años, el valor de t es de 1.336 para un valor de $p < 0,2$. Los valores encontrados en el grupo de 5 a 14 años y mayores de 15 años, no diferían significativamente, t es de 0,379 para un valor de $p < 0,8$; que el promedio mayor se haya encontrado en el grupo de 0 a 4 años probablemente se encuentra en relación con el hecho de que fué en este grupo donde se pudo detectar 2/10 pacientes con coprocultivo positivo a Salmonella thypi.

La concentración de polisacárido encontrada en orina y materia fecal de familiares de pacientes con fiebre tifoidea al dividirlos por grupos de edad no muestran diferencias significativas.

Las diferencias encontradas en sangre de familiares de pacientes con fiebre tifoidea por grupos de edad, puede estar en relación con más lenta velocidad de degradación y eliminación de la molécula una vez que ha alcanzado el torrente circulatorio.

La presencia de componentes bacterianos en sangre y su eliminación por orina durante semanas y meses sin organismos viables detectables ha sido reportada en meningitis bacteriana - por Hemophilus influenzae (89). Estos informes proveen de un importante ejemplo de circulación en sangre de componentes bacterianos (antígeno capsular de Hemophilus influenzae) una vez terminada la etapa aguda de la enfermedad

6. Polisacárido 1, 4, 5, 12 en sangres de asa intestinal aislada, portal mesentérica y periférica de conejos.

El modelo experimental usado en conejos (construcción del asa de Thiry-Vella) nos permitió cuantificar el nivel de polisacárido en región pre y post hepática, modificando la carga bacte

riana mediante métodos mecánicos (lavado del asa intestinal aislada).

Los resultados demuestran que la comparación de los valores obtenidos en las diferentes regiones por análisis de varianza son significativos, con un valor de F de 70.2, para valor de "p" $<$ 0.01. La comparación por prueba de "t" de los niveles de endotoxinas en asa aislada vs sangre portal, asa aislada vs sangre mesentérica, asa aislada vs sangre periférica, sangre portal vs sangre mesentérica, sangre portal vs sangre periférica y sangre mesentérica vs sangre periférica muestran diferencias significativas -- (tabla N° 20).

Estos hallazgos confirman los resultados obtenidos en nuestros estudios en humanos y permiten apoyar los siguientes conceptos:

1. Las endotoxinas o fragmentos de antígenos somáticos de enterobacteriaceas son continuamente absorbidas del tracto intestinal.
2. Los valores más altos encontrados en sangre portal y mesentérica señalan una vía normal de liberación de endotóxicas al hígado para su destoxificación.
3. La disminución de los niveles de endotóxicas en sangre periférica indican que la endotóxina es depurada por el hígado.
4. Los niveles bajos de endotoxinas encontrados en sangre de asa intestinal aislada , apoyan las evidencias de que la cantidad de endotoxina absorbida varía con el tamaño de la población de la flora por gran negativos.

5. Parte de los niveles de endotoxinas detectables en sangre periférica en condiciones normales, pueden representar reacción cruzada con otros determinantes antigénicos 0 (22, 90).

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. Se investigó la presencia de material antigénico que cruza con los determinantes antigénicos 9,12 y 1,4,5,12 en sangre, orina y material fecal, de 46 niños con gastroenteritis por salmonelas B y/o D.
2. Estos valores fueron comparados estadísticamente con niños considerados sanos previo examen médico pediátrico.
3. Los valores obtenidos en los casos de gastroenteritis más graves (fallecidos y septicemia), presentaron valores por arriba del promedio en sangre, orina y materia fecal.
4. Los valores del material antigénico encontrados tienden a normalizarse en la tercera muestra de sangre, orina y materia fecal, es decir, aproximadamente en el período de convalecencia.
5. Por las investigaciones realizadas anteriormente y por los resultados de este estudio, este trabajo representa una fuerte evidencia de que la endotoxina bacteriana de salmonela tipo B si cruza la barrera intestinal y produce endotoxemia con mayor frecuencia de lo hasta ahora aceptado.
6. Se cuantificó el material antigénico que cruza con los determinantes 1,4,5,12, en sangre periférica de 15 niños con hepatitis, durante la etapa aguda de la enfermedad y 3 meses después.
7. Los valores obtenidos expresan que en la hepatitis viral aguda la capacidad de destoxicación del hígado del material antigénico que cruza con los determinantes antigénicos 1,4,5,12 se encuentra disminuída.

8. Se midió el nivel de polisacárido en sangre portal y periférica de 10 niños sometidos a laparotomía por patología no infecciosa.
9. Los valores encontrados determinan que existe un estado de endotoxemia portal "fisiológica" y que el hígado constituye un órgano principal de depuración de las endotoxinas de origen intestinal.
10. Se investigó el nivel de polisacárido 9,12 en sangre, orina y heces de 20 niños sanos previo examen médico pediátrico.
11. La presencia de niveles detectables de material antigénico que cruza con los antígenos 9,12 en niños sanos, establece que en condiciones normales, éstos antígenos atraviesan la barrera intestinal.
12. No podemos descartar que parte de éstos valores, por la naturaleza del polisacárido sea la cuantificación de sustancias de grupo que comparten estructura química semejante.
13. Se investigó el nivel de polisacárido 1,4,5,12 en sangre periférica de 10 niños sometidos a esterilización colon pre-quirúrgica.
14. Los niveles detectados antes de administrar antibióticos, con antibióticos y 3 días después establecen que la cantidad de endotoxina absorbida varía con el tamaño de la populacion de la flora por gran negativos en el lumen intestinal.
15. Se investigó el nivel de polisacárido 9,12 en 77 personas, (15 familias) familiares de pacientes con fiebre tifoidea.

16. Los niveles encontrados son más altos tanto en niños como en adultos que los, encontrados en personas sanas no emparentadas con enfermos de tifoidea, pero no hay diferencias significativas.
17. Se investigó el nivel de polisacárido 1,4,5,12 en sangres de asaislada (asa de Thiry-Vella), portal, mesentérica y periférica de 10 conejos.
18. Los resultados confirman que existe un estado de endotoxemia portal fisiológica, que guarda relación con la población de flora gran negativa en el lumen intestinal.
19. Se determinó la LD_{50} en embriones de pollo inoculados con sueros de pacientes con fiebre tifoidea (6), salmonelosis (10) y personas sanas (5).
20. Los resultados establecen que la mortalidad guarda relación con los niveles de polisacárido detectados por radioinmunoensayo y nos permite asegurar que parte del material detectado por éste método corresponde a la endotoxina.

BIBLIOGRAFIA .-

- 1.- Seligmann, E., Saphra, I. y Wassermann, M.: Salmonella infections in man: analysis of 1,000 cases bacteriologically identified by New York Salmonella Center. Am. J. Hyg. 58:226-249, 1945.
- 2.- Rubin, R.H. y Weinstein, L.: Salmonellosis: microbiologic, pathologic and clinical features. New York, Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, 1977.
- 3.- Black, P.H., Kunz, L.J. y Swartz, M.N.: Salmonellosis: a review of some unusual aspects. New Eng. J. Med. 262: 811-817, 1960.
- 4.- Grady, G. F. y Keusch, G.T.: Pathogenesis of Bacterial Diarrheas. New Eng. J. Med. 285:831-841, 1971.
- 5.- Saphra, I. y Winter, J.W.: Clinical manifestations of salmonellosis in man. An evaluation of 7,779 human infections identified at the New York, Salmonella Center. New Eng. J. Med. 256:1128-1134, 1957.
- 6.- Cherubin, Ch. E., Fodor, T., Denmark, L., Master, C. y Fuerst, H.T.: The epidemiology of salmonellosis in New York City. Am. J. Epidemiol. 90: 112-125, 1969.
- 7.- Kumate, J., Troncoso, P., Benavides, L. y Tena, E. M.: Hepatitis consecutiva a gastroenteritis y Septicemia por Salmonella Typhimurium, Bol. Med. Hosp. Infant (Méx) 22:811-815, 1965.
- 8.- Kumate, J. y Takane, J.: Gastroenteritis por Salomelas, Cuadro Clínico y complicaciones frecuentes, Bol. Méd. Hosp. Infant. (Méx) 26:57-78, 1969.
- 9.- Villarreal, M. J. y Kumate, J.: Excreción de antígenos Somaticos de Salmonella Typhi en materia fecal y su participación en la infección tifoídica humana. Tesis de Grado. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 1974.

- 10.- Villalobos, R.A., Rodríguez, E.G., García, T. F. y Kumate, J.: Metabolismo de los antígenos de *Salmonella Typhi* administrados por vía oral. *Invest. Clin.* 20(3): 127-146, 1979.
- 11.- Jiménez, E. C.: Radioinmunoensayo y estudio farmacocinético del polisacárido Freeman de *Salmonella typhi*. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México, D.F. 1978.
- 12.- Foote, S.C. y Hook, E.W.: *Salmonella* Species (including Typhoid Fever). En: Mandell, G., Douglas, G. y Bennet, J.: Principles and practice of Infections Diseases. New York. John Wiley-Sons, 1979, p. 1931.
- 13.- Costerton, J.W. y Ingram, J.M.: Structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria. *Bacteriol. Revs.* 28:87-110, 1971.
- 14.- Westphal, O.: Bacterial Endotoxins. En: 10th Symp. Copenhagen, Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 49:1-15, 1975.
- 15.- Rogers, H.L., Perkins, H.R. y Ward, J.B.: Microbial Cell Walls and membranes. London, Chapman and Hall Ltd., 1980, p. 407.
- 16.- Davis, B.D. y Dulbecco, R.: Salmonellas. En: Tratado de microbiología. Barcelona (España) Salvat Editores, 1977, p. 785.
- 17.- Braun, V.: Chemical characterization spatial distribution and function of Lipoprotein (Murein Lipoprotein) of the *E. coli* Cell Wall. *Eur. J. Biochem.* 10:426-458, 1969.
- 18.- Singer, O. J.: The molecular organization of membranes. *Ann. Review Biochemistry.* 45:805-835, 1974.
- 19.- Kauffman, K.: A typhoid variant and a serological variation in the salmonella group. *J. Bact.* 41:127-140, 1941.
- 20.- Lüderitz, O., Galanos, C. y Lehman, Y.: Lipid A: chemical structure and biological activity. *J. Infect. Dis.* 128: 17-28, 1975.

- 21.- Osborn, M.J.: Biosynthesis and structure of core regions of the Lipopolisaccharides S. Typhimurium. Comunicacion No. 49 del Joan Lester Avnet of Institute of Molecular Biology. 375-383, 1967.
- 22.- Ikderitz, O., Staub, A.M. y Westphal, O: Immunochemistry of O and R antigen of Salmonella and related Enterobacteriaceae. Bacteriol. Rev. 30:192-255, 1966.
- 23.- McCabe, N.: Endotoxin.: Microbiological, Chemical, pathophysiologic and clinical correlations. En: Weinstein, L. (Ed.): Seminars in Infections Disease. New York. Thieme-stratton Inc., 1980, p. 38.
- 24.- Devoe, I.W., Gilchrist, J.E.: Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of Neisseria Meningitidis. J. Exp. Med. 138:1156-1167, 1973.
- 25.- Alberú, G.J., Dib-kiri, A. y Aznar, J.: Transplante de intestino delgado en el perro: Nuevo enfoque del problema inmunológico. Rev. Gastroent. Mex. 38:279-287, 1973.
- 26.- Finkelstein, R. A.: Observations on mode of action of endotoxin in Chick Embryos. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115:702-707, 1964.
- 27.- Batson, H.C.: An introduction to statistics in the Medical Sciences. Minneapolis. Burgess Publishing Co., 1956, p. 62.
- 28.- Freeman, G.: The preparation and properties of a specific polysaccharides from Bact. Typhosum TYZ. Biochem. J. 36: 340-346, 1942.
- 29.- Staub, A.M.: La precipitation quantitative en: Cours d' Immunologic Generale et serologic de L'Institute Pasteur C.D.U. Jese. Ed.: II, 1966, p. 1-45.
- 30.- Mitchel, F.: Chemical Coupling of polisaccharides by means of cyanogen Halides. Eur. Immunol. 2:460-468, 1972.
- 31.- Greenwood, F. C. y Hunter, W.: The preparation of ¹³¹I Labeled human growth hormone of high specif radioactivity Biochem. J. 89:114-121, 1963,

- 32.- Campbell, D: En: Immunology. Nueva York. W.A. Benjamin, Inc. 2da. Edición, 1970, p. 435.
- 32a.- Ibid. p. 434
- 32b.- Ibid. p. 434
- 32c.- Ibid. p. 189
- 32d.- Ibid. p. 260
- 33.- Heidelberg, M.: Quantitative studies on the Precipitin reaction the determination of small amounts of a specific polysaccharide. J. Exp. Med. 55:555-561, 1932.
- 34.- Kabat, E. y Meyer. E: Precise measurement of antigen antibody interaction. En: Structural concepts in the Immunology and Immunochemistry. Nueva York. Holt Rinehatt and Winston Inc., 1975, p. 55-60.
- 35.- Staub, A.M.: La precipitation Quantitative. En: Cours d' Immunologic Generale et serologic de L'Institute Pasteur. C.D.U. Seme Ed. II, 1966, P-45.
- 36.- Kumate, J.: Salmonelosis. En: Enfermedades Diarreicas en el niño. México. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 1976, p.93.
- 37.- Gómez, F.: Desnutrición. Bol. Méd. Hosp. Inf. (Méx) 3: 543, 1943.
- 38.- Ramos Galvan, R.: Somatometría Pediátrica. Arch. Invest. Med., (Suppl 6) 2, 1975.
- 39.- Greene, R., Wiznitzer, T., Rutemburg, S., Frank, E. y Fine, J.: Hepatic clearance of endotoxin absorbed from the intestine. Prog. Soc. Exp. Biol. and Med. 108:300-303, 1961.
- 40.- Ravin, H.A., Rowley, D., Jenkins, C. y Fine C.: On the absorption of bacterial endotoxin from the gastrointestinal tract of the normal and shocked animal. J. Exp. Med. 112: 783-792, 1960.

- 51.- Florey, H.N.: Observations on the functions of mucus and the early stage of bacterial invasion of the intestinal mucosa. *J. Path. Bact.* 57:283-289, 1955.
- 52.- Formal, S.B., Labrec, E.H., Kent, T.H. y Falkon, S.: Abortive, intestinal infection with and Escherichia Coli - Shigella Flexneri hybrid strain, *J. Bacteriol.* 89:1374-1382, 1965.
- 53.- Gianella, R.A., Gots, R.E., Charney, A.N., Greenough, W.B. y Formal, S.B.: Pathogenesis of salmonella Mediated intestinal fluid secretion activation of adenylate cyclase and inhibition by indomethacin. *Gastroenterology.* 69:1238-1245, 1975.
- 54.- Rout, W.R., Formal, S.B., Danning, J. y Gianella, R.A. Pathophysiology of salmonella diarrhea in the rhesus monkey: Intestinal transport, morphological and bacteriological studies. *Gastroenterology.* 67:59-70, 1974.
- 55.- Wardle, E.N.: A review of endotoxin and its absorption from the gut. En: Hemmings, W.A.: Antigen absorption by the gut. Baltimore. University Park Press, 1978, p. 183.
- 56.- Nolan, J.P.: The role of endotoxins from the gastrointestinal tract in the liver disease. en: Le benthal, E. (Ed): Digestive disease in children. New York. Grune y Stratton, 1978, p. 651.
- 57.- Springer, G.F. y Hurton, R.E.: Blood group Isoantibody stimulation in man by feeding blood group active bacteria. *J. Clin. Invest.* 48:1280-1291, 1969.
- 58.- Drach, G.W., Reed, W.P. y Williams, R.C.: Antigens common to human and bacterial cell. II. E. coli. 014, the common enterobacteriaceae antigen, blood groups A and B, and E. Coli 086. *J. Lab. Clin. Med.* 79:38-46, 1972.
- 59.- Pascua, M.: Metodología Bioestadística. Madrid. Edit. Paz Montalvo, 1965, p. 346.

- 41.- Wiznitzer, T., Schweinburg, F.B., Atkin, N., y Fine, J.: On the relation of the size of the intrainestinal pool of endotoxin to the development of irreversibility in hemorrhagic shock. *J. Exp. Med.* 112:1167-1171, 1960.
- 42.- Jacob, A.I., Goldberg, P.K., Bloom, N., Degenshein, G.A. y Kozinn, P.S.: Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 72:1268-1270, 1977.
- 43.- Bradfield, J.W.B.: Control of Spillover. The importance of kupffer cell function in clinical medicine. *Lancet* 2:883-885, 1974.
- 44.- Batson, H.C.: An introduction to statistics in the medical sciences. Minneapolis. Burgess Publishing Co., 1956, p.22.
- 45.- Kumate, J. y Carrillo, J.: Coagulación en orina y materia fecal en el diagnóstico de fiebre tifoidea (Por publicar).
- 46.- Olarte, J. y Joachin, A.: Salmonella Typhi and other organisms encountered in routine blood cultures at the Hospital of Mexico City. *Pub. Health Lab.* 16:56-60, 1958.
- 47.- Onofre Muñoz, H.: Etiopatogenia de la gastroenteritis aguda. En: Mizrahi, M.: Infecciones entéricas. México. Edit. Manual Moderno, S.A., 1980, p-1-6.
- 48.- Takeuchi, A.: Electron microscope studies of experimental salmonella infection. *Am. J. Pathol.* 50:109-119, 1967.
- 49.- Gemski, P., Sheahan, D.G., Washington, O. y Formal, S.B.: Virulence of Shigella flexneri hybrids expressing Escherichia coli somatic antigens. *Infect. Immun.* 6:104-111, 1972.
- 50.- Tannock, G.W., Blumershine, R.V., Savage, D.C.: Association of Salmonella typhimurium with and Its Invasion of the Ileal mucosa in Mice. *Infection and Immunity.* 11:365-370, 1975.

- 60.- Stiffel, C., Mouton, D., Biozzi, G: En mononuclear phagocytes. (Editado por R. Van Furth), Oxford, 1970. p-335.
- 61.- Sony, H.S. y Kappas, A.: Hormones and hepatic fuction. En:Schiff, F: Diseases of the Liver. Philadelphia. J. B, Lippincott Company. 1975, p. 163.
- 62.- Biozzi, G., Stiffel, C.: En Progress in Liver Diseases (Editado por H. Popper y Schaffner. F) Londres, 1965, p-166.
- 63.- Souhami, R.L.: The effect of colloidal carbon on the organ distribution of sheep red cells and the immune response. Immunology. 22:685-694, 1972.
- 64.- Gates, G.A., Henley, K.S., Pollard, H.M., Schmidt, E, Schmidt, F.W.: The cell population of human liver. J. Lab. Clin. Med. 57:182-184, 1961.
- 65.- Coopertock, M.S., Tucker, R.P. y Baublijs, J.V.: Posible pathogenic Role of endotoxin in Reye's Sindrome. Lancet 1:1272-1273, 1975.
- 66.- Trigger, D.R. y Alp, M.H.: Bacterial and Dietary Antibodies in Liver Disease. Lancet 1:60-63, 1972.
- 67.- Protell, R.L., Soloway, R.D., Martin, W.J., Schoenfield, J.L., Summerkill, W.H.: Anti-salmonella agglutinins in chronic active liver disease. Lancet 2:330-331, 1971.
- 68.- Fulenwider, J.T., Sibley, C., Stein, S.F., Evatt, B., Bernard, M. y Ivey, G.L.: Endotoxemia of cirrhosis: An observation not substantiated. Gastroenterology 78:1001-1004, 1980.
- 69.- Levin, J.: Endotoxin and Endotoxemia. N. Engl. J. Med. 288-1297-1298, 1973.
- 70.- Wilkinson, S.P., Moodie, H., Stamatakis, J., Kakkar, V. y Williams, R: Endotoxemia and renal failure in cirrhosis and obstructive Jaundice. B. Medical. J. 2:1415-1418, 1976.

- 71.- Jacobson, E.D.: The role of the gut in endotoxin shock: some recent developments. *Gastroenterology* 50:286-288, 1966.
- 72.- Nolan, J.P. y Leibowitz, A.I.: Endotoxins in Liver Disease. *Gastroenterology* 75:765-766, 1978.
- 73.- Nolan, J.P.: The role of endotoxin in Liver Injury. *Gastroenterology* 69:1346-1356, 1975.
- 74.- Mc Gill, M.W., Porter, P.J. y Kass, E.H.: The use of a bioassay for endotoxin in clinical infections. *J. Infect. Dis.* 121:105-112, 1970.
- 75.- Chedid, J., Skarnes, R.C. y Parant, M.: Characterization of a Cr⁵¹ Labelled endotoxin and its parenteral administration. *J. Exp. Med.* 117:561-571, 1963.
- 76.- Braude, A.I., Carey, F.J. y Sutherland, D: Studies with radioactive endotoxin. I. The use of Cr⁵¹ to Label endotoxin of Escherichia coli. *J. Clin. Invest.* 34:850-857, 1955.
- 77.- Levin J, poure TE, Youny N.S., y Cois: Gran-negative sepsis: Detection of endotoxemia with the limulus test. *Ann Intern Med.* 76: 1-7, 1972.
- 78.- Elin, R.J. Wolff, S.M.: Nonspecificity of the Limulus amebocyte Lysate Test: Positive reaction with polynucleotides and proteins. *J. Infect. Dis.* 128:349-352, 1973.
- 79.- Elin, R.J., Robinson, R.A., Levine, A.S. y Wolff, S.M.: Lack of clinical usefulness of the Limulus test in the diagnosis of endotoxemia. *N. Engl. J. Med.* 293:521-524, 1975.
- 80.- Caridis, D.T., Reinhold, R.B., Woodruff, P.W. y Fine, J.: Endotoxemia in man. *Lancet* 2:1381-1388, 1972.
- 81.- Nolan, J.P., Daphne, K.H., McDevith, J.J. y Vilayat A.: In vitro studies of intestinal endotoxin absorption. I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 72:434-439, 1977.

- 82.- Gans, H. y Matsumoto, K.: The escape of endotoxin from the intestine. Surg. Gynecol. Obstet. 139:395-405, 1974.
- 83.- Poth, E.J. y Knotts, F.L.: Clinical use of Succinyl-sulfathiazole. Arch. of Surgery 44:208-222, 1942.
- 84.- Loh, W.P., Bakee, J.: Fecal flora of man after oral administration of chlortetracycline or oxytetracycline. Arch. Int. Med. 95:74-82, 1954.
- 85.- Bartlett, J.G.: Prophylactic antimicrobials in elective colon surgery. En: Watts, P. (Ed.): Infection in surgery. Edinburg H. Churchill. Livingstone, 1981. p.233.
- 86.- Schweinbury, F.B. y Fine, J.: Evidence for a lethal endotoxemia as the fundamental feature of irreversibility in three types of traumatic shock. J. Exp. Med. 112: 793-800, 1960.
- 87.- Fine, J.: Current status of the problem of traumatic shock. Surgery Ginecol. Obstetrics. 120:537-544, 1965.
- 88.- Gilbert, R.P.: Mechanisms of the hemodynamic effects of endotoxin. Physiological Rev. 40:245-260, 1960.
- 89.- Feigin, R.D., Wong, M., Schekelford, P.B., y Kaplan, S.: Countercurrent immunoelectrophoresis of orine as well as of CFS and blood for diagnosis of bacterial meningitis. J. Pediatrics 89:773-775, 1976.
- 90.- Luderitz, O.: Endotoxins and other cell wall components of gran-negative bacteria and their biological activities En: Schlessinger (Ed.): Microbiology. Washington. American Society of Microbiology, 1977, p.239.
- 91.- Noyes, H., McInturf, C., Blahota, G.: Studies on distribution of Escherichia coli endotoxin in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:65-68, 1959.
- 92.- Skarnes, R. C.: Host defense against bacterial endotoxemia Mechanisms in normal animal. J. Exp. Med. 132:311-316, 1970.

- 93.- Landy, M., Skarnes, R.C. y Rosen, F.S.: Inactivation of biologically active (endotoxic) polysaccharides by Fresh human serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:744-747, 1957.
- 94._ Wiznitzer, T., Better, N., Rachlin, W., Atkins, N., Frank, E. y Fine, D.: In vivo detoxification of endotoxin by the Reticulo. endothelial System. J. Exp. Med. 112:1157-1165, 1960.