

51
28j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"APLICACION DE LA REACCION DE COAGLUTINACION
PARA EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS EN EL SER HUMANO."**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A

JOSE LUIS MONDRAGON JARAMILLO

MEXICO, D.F.

1988.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Cápítulo.	Página.
I.- INTRODUCCION.	
1.1 <u>Staphylococcus aureus</u> rico en proteína A.....	1
1.2 Caracterización bioquímica de la proteína A.....	3
1.3 Reactividad de la proteína A con las inmunoglobulinas.....	5
1.4 Correlación entre la producción de proteína A y la patogenicidad del <u>Staphylococcus aureus</u>	8
II.- OBJETIVOS.....	10
III.- GENERALIDADES.	
3.1 Reacción de Coaglutinación.....	11
3.2 Preparación de la proteína A.....	12
3.2.1 Prueba control de la presencia de proteína A en el <u>Staphylococcus</u>	15
3.3 Recubrimiento del <u>Staphylococcus aureus</u> con anticuerpos	16
3.4 Preparación de virus, bacterias y protozoarios como antígenos.....	16
3.5 Procedimiento de la reacción de coaglutinación.....	17
3.6 Pruebas Control.....	17
3.6.1 Control positivo.....	18
3.6.2 Controles negativos.....	18
3.7 Interpretación de la reacción de coaglutinación.....	18

III.- GENERALIDADES.

3.8	Modificaciones a la técnica de coagulación.....	19
-----	---	----

IV.- APLICACIONES DE LA REACCION DE COAGLUTINACION.

4.1	Infecciones Virales.....	22
4.1.1	Identificación Serológica de Anticuerpos contra <u>Alfavirus</u> <u>rus</u>	22
4.1.1.1	Diagnóstico de <u>Alfavirus</u>	23
4.1.2	Identificación Serológica de Antígenos y Anticuerpos de Hepatitis del tipo B.....	25
4.1.2.1	Diagnóstico de la Hepatitis del tipo B.....	27
4.1.3	Identificación Serológica del virus de Herpes simple..	29
4.1.3.1	Diagnóstico de Herpes simple.....	31
4.1.4	Identificación Serológica del virus de la Rubéola.....	33
4.1.4.1	Diagnóstico de Rubéola.....	34
4.2	Infecciones Bacterianas.....	37
4.2.1	Identificación Serológica de <u>Campylobacterias</u>	37
4.2.2	Serotipificación de <u>Escherichia coli</u>	38
4.2.3	Detección de Enterotoxina Termolábil de <u>E. coli</u>	40
4.2.4	Identificación de <u>Haemophilus influenzae</u> tipo b en fluidos corporales.....	41
4.2.5	Serotipificación de <u>Mycobacterium sp.</u>	42
4.2.5.1	Diagnóstico de <u>Mycobacterium sp.</u>	43

IV.- APLICACIONES DE LA REACCION DE COAGLUTINACION.

4.2.6	Detección de anticuerpos contra <u>Mycoplasma pneumoniae</u>	45
4.2.6.1	Diagnóstico de <u>Mycoplasma pneumoniae</u>	46
4.2.7	Identificación Serológica de <u>Neisseria gonorrhoeae</u> ...	48
4.2.8	Identificación Serológica de <u>Neisseria meningitidis</u> ..	51
4.2.9	Serotipificación de <u>Salmonella sp.</u>	52
4.2.10	Identificación Serológica de <u>Shigella sp.</u>	54
4.2.10.1	Diagnóstico de <u>Shigella sp.</u>	55
4.2.11	Identificación de diferentes serogrupos de Streptococcus β hemolíticos.....	57
4.2.12	Identificación Serológica de <u>Streptococcus pneumoniae</u>	60
4.3	Infecciones por Protozoarios.....	61
4.3.1	Identificación de tres amibas patógenas para el hom- bre.....	61
4.3.1.1	Amibiasis.....	61
4.3.1.2	Amibiasis Intestinales.....	62
4.3.1.3	Diagnóstico de Amibiasis.....	63
4.3.1.4	Localizaciones Amibianas Extraintestinales.....	64
4.3.1.5	Meningoencefalitis Amibiana.....	66
4.3.1.6	Diagnóstico de Amibiasis y Meningoencefalitis Amibia- na por el Método de Coaglutinación.....	69
4.3.1.7	Métodos de cultivo de la amibas patógenas.....	71
4.3.1.8	Obtención del suero antiamibiano.....	72

Capítulo.	Página.
IV.- APLICACIONES DE LA REACCION DE COAGLUTINACION.	
4.3.1.9 Preparación de la suspensión de Staphylococcus con colorantes.....	72
4.3.2 Detección del Factor Exógeno Secretado por <u>Leishmania sp.</u>	73
4.3.2.1 Diagnóstico de Leishmaniasis.....	75
V.- CONCLUSIONES.....	78
VI.- BIBLIOGRAFIA.....	81

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Staphylococcus aureus RICO EN PROTEINA A.

Verwey en 1940, fué el primero en describir la proteína A, como una proteína antigénica presente en los Staphylococcus aureus patógenos del tipo A. Grov propuso la designación de proteína A para evitar confusiones con el polisacárido A que también es antigénico. (34,38,82)

En 1966, Forsgren y Sjonquist demostraron la capacidad de la mayoría de los sueros humanos de aglutinar frente a Staphylococcus aureus, lo que se atribuyó a la presencia de los llamados anticuerpos naturales, sin embargo, actualmente se conoce que en realidad este fenómeno no representa una reacción inmune. (38,62) Se ha demostrado que principalmente en los fragmentos Fc y Fc' de la molécula de IgG reside la capacidad de unirse a la proteína A, ya que cuando se obtienen diferentes porciones de la IgG por reducción con β mercaptoetanol e hidrólisis con papaína y se ponen en contacto en un gel de agar con la proteína A se obtienen los siguientes resultados:

- a) Cuando se hace reaccionar la proteína A con la IgG tratada con β mercaptoetanol, solo se observa una fuerte precipitación con las cadenas H y no con las cadenas L.
- b) La hidrólisis de la IgG con papaína produce residuos Fc, Fc' y Fab los que al reaccionar con la proteína A, solo presentan precipitación los fragmentos Fc y Fc'. Las pruebas se llevaron a cabo con sueros normales y con IgG de mielomas, obteniéndose los mismos re

sultados, con un registro de precipitación más fuerte con la IgG de mieloma, debido a que se encuentra en una mayor cantidad. (34) Con estos datos podemos decir que la reacción se lleva a cabo mediante la unión de la proteína A a la fracción Fc de la IgG por lo que no es una reacción inmune, ya que el fragmento Fab de la inmunoglobulina queda libre para enlazarse con su antígeno específico. (62,82)

La proteína A del *Staphylococcus* fue localizada recubriendo la pared celular de aproximadamente el 90 al 96% de las cepas aisladas de *S. aureus* estudiadas. (82) La especie Cowan I sintetiza gran cantidad de proteína A, (36,82, 112) y se ha demostrado que contiene el 1.7% de la proteína A, esto en peso seco total de células liofilizadas y el 6.7% del peso seco de paredes celulares aisladas. (96) El 90% de la proteína A en la bacteria se encuentra en la pared celular y el 10% está libre en el citoplasma. (75)

Las moléculas de proteína A están densamente distribuidas en la superficie de la bacteria con aproximadamente 80 000 moléculas por célula. (82) Durante el crecimiento celular la proteína A además se libera hacia el medio de cultivo, que comprende aproximadamente un tercio de la proteína A que es producida por la bacteria. Además hay cepas de *Staphylococcus aureus* que son incapaces de incorporar la proteína A a la pared celular y por lo tanto se libera al medio. (75) Esto se determinó por técnicas indirectas tales como aglutinación de la bacteria con γ globulina y/o por el estudio de la adhesión de la γ globulina a la pared celular bajo un microscopio electrónico. (96,115)

El prerrequisito para estudios de la estructura y actividad biológica de la proteína A, es que la proteína pueda ser separada de la bacteria con un alto rendimiento y en estado puro. (97)

El papel biológico de la proteína A no está bien definido, la ventaja potencial de la bacteria es la inmovilización de anticuerpos, por la unión a la porción Fc. (82) Estas "son algunas" razones de interés de el uso de la proteína A, además de ayudar a determinar ciertas actividades biológicas asociadas con la porción Fc. (97)

1.2 CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA PROTEINA A.

La proteína A del Staphylococcus aureus es muy estable, es una proteína que retiene su actividad después de ser expuesta a soluciones concentradas de urea, tiocianato, clorhidróxido de guanidina o a pH y temperaturas extremas. También retiene su actividad después de ser conjugada con algunas moléculas como: eritrocitos, fluoresceína, ferritina, oro, yodo (125) (^{125}I), tritio (^3H) y algunas enzimas como la invertasa, glucosa oxidasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina y biotina. (13,14,49,71,80,82)

La proteína A está unida covalentemente al péptidoglucano de la pared celular, él que fué obtenido por la digestión de las células con lisostafina. (45,75,96) La proteína A aislada después de la digestión tiene un peso molecular de 42 000 y su forma es marcadamente extendida, más que de forma globular, esto se determinó por el cociente fraccional de 2.1 a 2.2, su viscosidad es de 29 ml/g y su punto isoeléctrico es de 5.1. (7,45,69,75,82,97) La estruc

tura secundaria de la protefna A en soluci3n se ha estudiado recientemente y revel3 una α h3lice que comprende alrededor del 50% de la mol3cula. (22,69)

El an3lisis de digestiones tripticas revela que la protefna A se encuentra compuesta por diferentes amino3cidos dispuestos en m3ltiplos de cuatro, lo que indica la presencia de cuatro regiones altamente hom3logas con secuencias repetidas de amino3cidos; cada una consiste de una secuencia casi id3ntica de aproximadamente 60 amino3cidos. La parte N-terminal consiste de cuatro unidades arregladas consecutivamente, altamente hom3logas con una masa molecular de aproximadamente 7 000. La parte C-terminal de la protefna comprende una masa molecular de 15 000; est3 unida covalentemente al p3ptidoglucano de la pared celular de la bacteria, contiene 150 amino3cidos no asociados con la secuencia repetitiva de las uniones Fc, es una regi3n de forma extendida sin la capacidad de enlazarse a la porci3n Fc. (82)

La interacci3n entre la parte Fc de la IgG humana y una unidad de enlace Fc de la protefna A ha sido estudiada por cristalograf3a de rayos X. (22) El sitio de uni3n de la protefna A a la parte Fc fue localizado en el dominio CH₂ y CH₃; de esta manera la estructura tridimensional de la unidad de enlace Fc se estableci3. (22,82)

El n3mero de amino3cidos calculados en base a su composici3n es de 378, con un error estimado de \pm 6 amino3cidos, lo que da un peso molecular de 41 494. (Tabla 1.1) Este peso molecular obtenido experimentalmente es acorde con el peso molecular de 42 000 establecido anteriormente.

La presencia de éstos múltiples sitios de unión permite que la proteína A sea iodada sin la pérdida total de la capacidad de unirse a la inmunoglobulina; la nitración de todos los residuos tirosil con tetranitrometano suprime la unión con la parte Fc, el tetranitrometano convierte la tirosina en 3-trinitrotirosina. (82,94) La pérdida de la reactividad de la proteína A después de la iodación es directamente proporcional al número de residuos tirosil que fueron iodados. (82)

Se puede suponer que al tener la proteína A cuatro regiones homólogas, tiene la capacidad de enlazar cuatro inmunoglobulinas. Sin embargo, al realizar una curva cuantitativa de precipitación entre la proteína A y la IgG humana se encuentra que el complejo precipita en la región de exceso de IgG. Conocidos estos datos se calcula la relación molar que existe entre la IgG y la proteína A, la cual es de 2.1:1, lo que nos muestra que una mol de proteína A reacciona con dos moles de inmunoglobulina. (67,70,97) La relación molar que se presenta es debida probablemente a un impedimento estérico que no permite la unión de las cuatro inmunoglobulinas a la proteína A. (69) Este cálculo está basado en el peso molecular de 42 000 de la proteína A. (67,70,97)

1.3 REACTIVIDAD DE LA PROTEINA A CON LAS INMUNOGLOBULINAS.

La proteína A se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas contenidas en el suero de casi todas las especies de mamíferos, entre las cuales se pueden citar, en orden decreciente en su capacidad de enlace: humano, perro, cuy, burro, caballo, conejo, ratón, hámster, rata, cabra, oveja y pollo. (83) Efectuando ensayos cualitativos de la proteína A con el suero, se mostró esencialmente que no reacciona con el suero de peces, anfibios, reptiles y aves.

Aminoácidos	No. de Residuos
Lisina	52
Histidina	04
Arginina	04
Acido Aspártico	80
Treonina	06
Serina	14
Acido Glutámico	60
Prolina	28
Glicina	28
Alanina	36
Valina	08
Metionina	03
Isoleucina	11
Leucina	28
Tirosina	04
Fenilalanina	12
TOTAL	378

Tabla 1.1 Composición de aminoácidos de la proteína A hidrolizada con HCl 6N. (45,97)

Dentro de la clase IgG humana, sólo tienen reactividad las subclases IgG₁, IgG₂ e IgG₄. La subclase IgG₃ no presenta reactividad, ésto se atribuye a su secuencia de aminoácidos en la cadena H, es decir, la IgG₃ no comparte la misma secuencia con las otras subclases, la cantidad de IgG₃ comprende del 1 al 3%

del total de las inmunoglobulinas humanas. La IgA_2 y la IgM , también se unen bien a la proteína A, aunque en menor proporción. Estas determinaciones se han hecho por examen de suero completo y un control de proteínas producidas en mieloma. (61,63)

La IgE se enlaza en pequeñas cantidades a la proteína A, pero probablemente de diferente manera a las otras inmunoglobulinas. Estas moléculas de IgE se unen aparentemente por la porción Fab, más que por la porción Fc. (82) En forma general, la IgG_2a , IgG_2b e IgG_3 de ratón se unen bien a la proteína A, mientras que la IgG_1 se une en menor proporción; la mayoría de la IgA e IgM no se unen a la proteína A. (63)

Ya que la proteína A se une a la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina (34,62), una consecuencia práctica importante de este sitio de enlace es que no interfiere en la unión con el antígeno por la parte Fab. Por el contrario, probablemente la unión con el antígeno no induce un cambio conformacional en la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina y de éste modo no aparece una modificación en la unión con la proteína A; además, pueden formarse complejos que son generados con antígenos diferentes. (55) La constante de equilibrio para la reacción entre la proteína A y dos proteínas humanas de mieloma es de $4 * 10^{-7} \text{ mol}^{-1}$. (54,82)

La proteína A de Staphylococcus aureus, debido a su gran afinidad por la porción Fc de la IgG , se ha empleado para varias finalidades entre las cuales podemos citar:

- a) Purificación y concentración de las IgG's de sueros inmunes o de cultivos de hibridomas por cromatografía de afinidad.
- b) Separación por cromatografía de afinidad de los fragmentos Fab o $F(ab')_2$, de los fragmentos Fc o de moléculas completas de inmunoglobulinas.
- c) Detección por inmunoensayos indirectos de antígenos o anticuerpos específicos usando una fase líquida, sólida o técnicas de ensayos citológicos. (82)

1.4 CORRELACION ENTRE LA PRODUCCION DE PROTEINA A Y LA PATOGENICIDAD DEL Staphylococcus aureus.

Ciertas especies de Staphylococcus aislados recientemente en hospitales de varios tipos, fueron divididos dentro de dos grupos; manitol positivos (90 especies) y manitol negativos (10 especies). Su habilidad para producir proteína A fué correlacionada con la presencia de otras características metabólicas y enzimáticas típicas de Staphylococcus aureus.

Los resultados muestran que una identificación satisfactoria de Staphylococcus aureus en la practica clínica requiere una valoración de otros caracteres específicos de la especie, en suma, la comparación con la utilización de manitol, aunque es útil, lo es solo como una medida preliminar a manera de eliminación.

La evaluación de la producción de la proteína A puede parecer buena o incluso mejor que la evaluación de la coagulasa para éste proposito. (51)

Se ha sabido por largo tiempo que los productos de Staphylococcus aureus inducen inflamación si son inoculados en humanos. Al ser inoculada la proteína A unida a la γ globulina humana se produce un efecto similar a la reacción de Arthus, que consiste en una lesión en la piel. (38,39)

Estas reacciones de hipersensibilidad en humanos se producen cuando la proteína A reacciona con la γ globulina, actuando como una reacción antígeno-anticuerpo, activando el sistema del complemento y de este modo induce la formación de mediadores leucocitáticos. (66,85,95,104)

El grado de inflamación está asociado a un incremento en la necrosis, presentando hipersensibilidad; éstos signos están asociados con niveles altos de anticuerpos circulantes. (66,85,95,104)

La reacción con la proteína A inoculada intradérmicamente en humanos depende de la dosis y hay variaciones individuales en personas saludables. (56) La respuesta inmediata de enrojecimiento y eritema es similar a la respuesta de la histamina aplicada por vía intradérmica en sujetos normales y a la respuesta en individuos atópicos después de la aplicación del antígeno. La proteína A es un mitógeno y además causa la liberación de la histamina de los leucocitos humanos. (111)

CAPITULO II

OBJETIVOS

La técnica de coagulación, utilizando la proteína A contenida en el Staphylococcus aureus, puede aplicarse en el diagnóstico de enfermedades infecciosas que afectan al ser humano, y se ha observado que es de gran importancia, por los excelentes resultados que se obtienen. El presente trabajo plantea un panorama general del uso de la técnica de coagulación en la detección de antígenos ó anticuerpos específicos para diferentes agentes infecciosos, además se propone una alternativa para el diagnóstico de rutina en la detección de enfermedades infecciosas, también se plantea cuales podrían ser las principales ventajas y desventajas que ofrece la técnica de coagulación sobre otras técnicas de uso común en el laboratorio clínico.

CAPTULO III

GENERALIDADES

3.1. REACCION DE COAGLUTINACION.

Se llama reacción de coaglutinación a la reacción pseudoimmune, (34,62) en la que interviene una bacteria (Staphylococcus aureus), la cual es tomada como soporte sólido (41) para unir la parte Fc de la molécula de γ globulina y dejar libre el fragmento Fab para que reaccione con su antígeno específico, y se lleve a cabo una reacción antígeno anticuerpo. A esta reacción antígeno anticuerpo adherido a una fase sólida, se le denomina reacción de coaglutinación, (5,9,23,33,50,60,62,64,77,101,106,110) y se detecta por una aglutinación macros cópica.

Los principales factores que intervienen en la reacción de coaglutinación son:

- a) La proteína A, que está contenida en el Staphylococcus aureus.
- b) Moléculas de inmunoglobulina que principalmente es del tipo IgG (34,63,70) y en menor cantidad otros tipos de inmunoglobulinas como la IgM e IgA (1,10,15,43,49), éstas inmunoglobulinas deben de ser específicas contra un determinado antígeno y, por último;
- c) El antígeno a identificar.

Al llevarse a cabo ésta reacción pseudoimmune la inmunoglobulina especifi

ca queda unida por su porción Fc a la célula del Staphylococcus aureus, quedando expuesta la fracción Fab de la molécula de inmunoglobulina o sea, que sobre la pared celular del Staphylococcus productor de proteína A, queda pegada la inmunoglobulina quedando la célula bacteriana forrada de moléculas de inmunoglobulina con la capacidad de reaccionar frente a un antígeno específico contra la cuál está dirigida la porción Fab. (Fig. 3.1)

La reacción de coaglutinación puede llevarse a cabo con antígenos solubles (16,53,106), antígenos de membrana (53,55), antígenos de superficie (10), antígenos de lisados celulares (54), antígenos particulados (53), antígenos de extractos bacterianos (10) y antígenos virales. (43,74,80,107)

3.2 PREPARACION DE LA PROTEINA A.

En la producción de proteína A se observa su máximo rendimiento en la cepa de Staphylococcus aureus Cowan I, ya que tiene como característica, además de producirla en gran escala, el que la fija a su pared celular. (36,75,82,112)

El Staphylococcus aureus cepa Cowan I se siembra en tubos de ensaye que contienen caldo soya tripticasa y se incuban durante 24 horas a 37 °C, con el fin de obtener un crecimiento para semilla.

De esta suspensión semilla se siembran matraces Erlenmeyer que contienen caldo C.C.Y. (Casein Casein Yeast). Pueden utilizarse otros medios de cultivo para la producción de proteína A, como Caldo Soya Tripticasa o Medio de Extrac

to de Carne. (16,31,40,43)

El medio de cultivo ya estéril se inocula con la semilla de *Staphylococcus* desarrollada en el Caldo Soya Trypticasa. Se incuba por 24 horas a 37 °C con agitación constante, con el fin de obtener una oxigenación homogénea en todo el medio de cultivo.

La suspensión bacteriana se transfiere a un tubo de centrifuga, se centrifuga a 800 g y se lava tres veces con Solución Salina Amortiguada de Fosfatos (SSAFa) pH= 7.2 adicionada de azida de sodio al 1%.

Después de los lavados, se suspende el paquete celular en el mismo amortiguador con 0.5% de formaldehído, ajustando la concentración de la suspensión al 10% (v/v), se incuba durante tres horas a temperatura ambiente con agitación ocasional, e inmediatamente se lava nuevamente tres veces con (SSAFa) para eliminar el formaldehído y se resuspende nuevamente al 10% (v/v) con el mismo amortiguador. La suspensión formalinizada se trata con calor, sumergiendo la suspensión en un baño de agua a 80 °C y dejandola expuesta a esta temperatura de 5 a 10 minutos con agitación constante. Se retira la suspensión del calor y se enfría rápidamente en un baño de agua que tenga una temperatura de 2 a 4 °C y se mantiene así hasta que la suspensión bacteriana alcance la misma temperatura.

Una vez tratada la suspensión bacteriana con calor y formaldehído se le

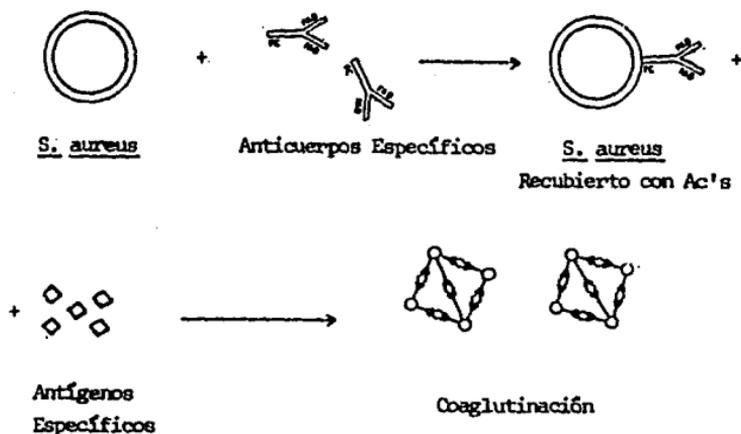


Fig. 3.1 Representación esquemática del principio de la técnica de coaglutinación. El sistema se ilustra en forma general para cualquier reacción antígeno anticuerpo utilizando S. aureus cepa Cowan I (ATCC 12598, NCTC 8530) productor de proteína A, como soporte sólido. (9,23)

hacen de 2 a 3 lavados adicionales. El paquete celular se ajusta a que tenga una concentración final del 10% (v/v) en SSAFa, con azida de sodio.

La suspensión de Staphylococcus aureus se guarda en refrigeración a 4°C hasta su uso, en estas condiciones su potencia se conserva durante tres meses.

Se recomienda guardarla en suspensión y no en paquete ya que de esta manera su potencia baja más rápidamente. (9,12,19,23,24,26,48,50,53,54,60,74)

3.2.1 PRUEBA CONTROL DE LA PRESENCIA DE PROTEINA A EN EL Staphylococcus.

La presencia de la proteína A en las células de Staphylococcus aureus se comprueba mediante una prueba que consiste en:

Adicionar 0.1 ml de γ globulina humana normal, sobre 1 ml de la suspensión al 10% (v/v) de Staphylococcus aureus cepa Cowan I, mezclar la suspensión, y colocarla a temperatura ambiente durante tres horas con agitación ocasional. Posteriormente, lavar dos veces con Solución Salina Amortiguada de Fosfatos (SSAFa) y resuspender al 1% en el mismo amortiguador con azida de sodio. Esta suspensión es el Staphylococcus aureus forrado con γ globulina humana normal y puede mantenerse a 4 °C hasta su uso.

Para observar si la γ globulina humana normal ha sido adsorbida sobre la pared del Staphylococcus por la porción Fc, la suspensión final se pone en contacto con suero de Coombs, esta prueba se lleva a cabo junto con un control negativo, el cual consiste en que la suspensión de Staphylococcus aureus se pone en contacto con Solución Salina Isotónica en lugar de γ globulina humana normal. Los resultados que se esperan son que el Staphylococcus aureus cepa Cowan I recubierto con γ globulina humana normal adicionada con suero de Coombs presente una aglutinación macroscópica a los 15 segundos, por el contrario, la suspensión adicionada de la Solución Salina Isotónica debe de encontrarse en una forma homogénea a los tres minutos.

Esta reacción es con el fin de observar la actividad de la proteína A con

tenida en el Staphylococcus aureus preparado. (40,96,115)

La presencia de la proteína A en el Staphylococcus aureus se determina también por su capacidad de aglutinar globulos rojos de carnero sensibilizados con su antígeno específico, y haciendo la titulación de estos. (36)

3.3 RECUBRIMIENTO DEL Staphylococcus aureus CON ANTICUERPOS.

Para este fin, la suspensión de Staphylococcus aureus al 10%, se pone en contacto con sueros inmunes que contienen anticuerpos específicos a la enfermedad infecciosa por identificar, el procedimiento es el siguiente:

A un mililitro de la suspensión al 10% de Staphylococcus aureus se le agrega 0.1 ml del suero que contenga anticuerpos específicos a la enfermedad infecciosa por identificar, se incuba durante tres horas a temperatura ambiente agitando ocasionalmente, se lava tres veces con (SSAFa), se resuspende al 1% (v/v) en el mismo amortiguador y se refrigera a 4 °C para ser usada posteriormente. De esta manera se obtienen las suspensiones de Staphylococcus aureus recubiertos con anticuerpos. (40,74)

3.4 PREPARACION DE VIRUS, BACTERIAS Y PROTOZOARIOS COMO ANTIGENOS.

Los microorganismos que se utilizan como antígenos se desarrollan en medios de cultivo (líquidos o sólidos) o bien en animales de laboratorio, estos

microorganismos se suspenden en Solución Salina Amortiguada de Fosfatos (SSAFa) y se diluyen a tener una suspensión al 1% (p/v). (20,59,87)

Esta suspensión es el antígeno listo para reaccionar con el S. aureus recubierto con el anticuerpo específico.

3.5 PROCEDIMIENTO DE LA REACCIÓN DE COAGULACIÓN.

Se coloca una gota del reactivo de Staphylococcus aureus recubierto con anticuerpos específicos sobre un portaobjetos. Se deja caer junto a la gota del reactivo una gota de la muestra del antígeno problema. Se mezclan las dos gotas con un palillo de madera y se le da movimientos de rotación suaves al portaobjetos para homogenizar la suspensión.

Los resultados se leen en un tiempo de 2 a 3 minutos con iluminación lateral sobre un fondo oscuro. Se debe tener especial cuidado en leer las reacciones antes de que ocurra la desecación de las gotas, ya que de lo contrario puede darse una falsa interpretación positiva. (19,59,87)

3.6 PRUEBAS CONTROL.

Se pueden correr paralelamente a la reacción, controles positivos y negativos para tener puntos de comparación en la lectura.

3.6.1 CONTROL POSITIVO.

El Staphylococcus aureus en el cual se ha "acoplado" los anticuerpos, se pone en contacto con un antígeno específico. (23,24,42,91,118)

3.6.2 CONTROLES NEGATIVOS.

Se prueba la muestra problema con una gota de la suspensión de S. aureus al 1%.

- a) Sin recubrir con anticuerpos. (23)
- b) Recubriendolo con suero normal de conejo. (91,106,118)
- c) Utilizando (SSAFa) en el lugar del anticuerpo. (5,18,23,118)

3.7 INTERPRETACION DE LA REACCION DE COAGLUTINACION.

Se puede hacer la interpretación de los resultados de dos maneras:

- a) De tal forma que solo se observe o no la aglutinación a simple vista.
- b) Por medio de signos positivos (+) o negativos (-) según sea el caso, mientras más intensa sea la reacción se le darán mayor cantidad de signos positivos, si no se presenta la reacción será negativo (-).
(Tabla 3.1)

La interpretación que se hace en el primer caso es:

En las reacciones positivas se observará que la mezcla originalmente homogénea, presenta acúmulos gruesos de bacterias suspendidas en el líquido claro

lo que indica la presencia de antígenos y anticuerpos correspondientes.

El control positivo se deberá observar con aglutinación franca, no así el control negativo. (23,33,57,64,91,102,103,116)

Medida	Intensidad	Apariencia
+++	Fuerte o muy fuerte.	Masas irregulares en parte fusionadas en una rejilla simple.
++	Moderadamente fuerte.	Granulos pequeños y grandes mezclados, se forma rápidamente una rejilla.
+	Reacción débil.	Formación de granulos finos abundantes.
±	Reacción negativa.	Formación de granulos finos escasos.
-	Reacción negativa.	No se forman granulos.

Tabla 3.1 Las reacciones 2+ y 3+ usualmente empiezan a aparecer al primer minuto y gradualmente se presentan con más fuerza a partir del siguiente minuto, las reacciones 1+ usualmente tardan 2 minutos en aparecer. (5,18,19,20,33,48,59,87,88,106,110)

3.8 MODIFICACIONES A LA TECNICA DE COAGLUTINACION.

La modificación a la técnica de coaglutinación se lleva a cabo cuando se

presenta una reacción no interpretable o pseudocoagulación, esto es, cuando la reacción de coagulación se presenta en el reactivo control negativo y en la prueba positiva. (42,91)

Las modificaciones propuestas consisten en:

- a) La adición de tripsina al medio de cultivo donde esté contenido el organismo que se utiliza como antígeno. La adición de tripsina se hace después de haber tomado unas colonias de la placa con el aislamiento primario y resembrarlas en 0,5 ml de un medio de cultivo apropiado al organismo, incubándolo por 2.5 horas, observando el desarrollo, si se presenta un crecimiento granular se le agrega una pequeña cantidad de tripsina en polvo, incubándolo nuevamente por 30 minutos. Después de transcurrido éste lapso de tiempo se realiza nuevamente la prueba en la placa para observar si se presenta la coagulación. (Fig. 3.2) (2,42,91)

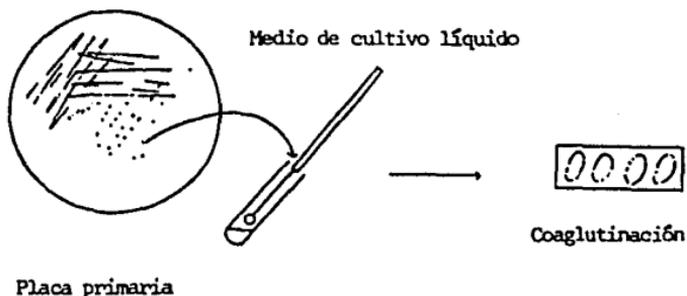


Fig. 3.2 Representación esquemática de la modificación a la técnica de coagulación. (2)

- b) También es recomendado, a la suspensión acuosa de varias colonias del cultivo, calentarlas en un baño de agua a 80 °C por 20 minutos o a 100 °C por 10 minutos, después enfriandolas para volver a realizar la prueba de coaglutinación. (2,91)

Otro tipo de variante a la técnica de coaglutinación es el llamado Método Indirecto, en el cual el antígeno se pone en contacto con su anticuerpo específico, después de incubar y lavar esta suspensión, se pone en contacto con el Staphylococcus aureus sin recubrir con el anticuerpo, presentandose la reacción de coaglutinación. (74)

CAPITULO IV

APLICACIONES DE LA REACCION DE COAGLUTINACION

4.1 INFECCIONES VIRALES.

4.1.1 IDENTIFICACION SEROLOGICA DE ANTICUERPOS CONTRA ALFAVIRUS.

El género *Alfavirus* es uno de los cuatro generos que comprenden la familia *Togaviridae*. (86) Entre los principales *Alfavirus* patógenos para el hombre se encuentran los virus que producen encefalitis graves, y especialmente los virus de la Encefalitis Equina Occidental (EEW), Encefalitis Equina Oriental (EEO) y Encefalitis Equina de Venezuela (EEV). (21,86)

Los *Alfavirus* se multiplican en una amplia variedad de vertebrados y de artrópodos. Los ratones recién nacidos constituyen el animal de laboratorio de elección para su propagación. Los huevos de gallina fecundados constituyen huéspedes sensibles y son adecuados para realizar muchos estudios. (21,86)

Los virus EEO, EEW y EEV en los humanos dan lugar a una fase sistémica de la enfermedad (con escalofríos, fiebre y dolor), que se debe a una viremia, y a la que sigue una fase encefalítica después de un período de tiempo variable.

Los virus EEO dan generalmente lugar a un proceso grave, de elevada mortalidad, y que produce lesiones neurológicas residuales graves en los supervivientes. En cambio, los virus EEW originan procesos menos graves, de los que la ma

yoría de los pacientes curan sin secuelas; generalmente afecta a los niños y a lactantes. Los virus EEV infectan principalmente a los caballos; su transmisión al hombre provoca un proceso leve con síntomas sistémicos variables, dando rara vez lugar a una encefalitis grave. Las infecciones graves afectan las vísceras, así como el cerebro y la médula espinal.

4.1.1.1 DIAGNOSTICO DE ALFAVIRUS.

Las infecciones causadas por Alfavirus se diagnostican mediante el aislamiento del virus o por métodos serológicos. Para el aislamiento del virus en el caso de un paciente fallecido a causa de una encefalitis, se inoculan emulsiones de cerebro y médula espinal a ratones recién nacidos o en cultivos celulares. (21,86)

Los virus recién aislados son identificados mediante titulaciones de inhibición de la hemaglutinación (IH), para determinar el grupo serológico a que pertenece el virus y titulaciones de neutralización (Nt) para determinar su especie. (21,86)

El diagnóstico serológico se establece con sueros del paciente, extraídos durante el período agudo de la enfermedad y durante la fase de convalecencia. (86)

Entre los métodos serológicos, se ha descrito un radioinmunoensayo para medir anticuerpos de Alfavirus en sueros humanos y de otros mamíferos. El exá

men emplea proteína A como una fase sólida en la inmunoadsorción para que el ^3H marque complejos virales con la inmunoglobulina G. (50)

Los antígenos se obtienen de cultivos de células infectadas, o de cerebros de ratones recién nacidos infectados, extrayéndolos con acetona. (21)

La proteína A formalinizada se usa adsorviéndola como una fase sólida en el radioinmunoensayo; se utiliza la centrifugación a baja velocidad para separar el complejo virus anticuerpo del virus radiomarcado no unido. En este estudio el procedimiento del radioinmunoensayo es descrito para medir el anticuerpo antiviral específico contra los virus EEV, EEO y EEW en sueros humanos. El ensayo ofrece varias ventajas con respecto a la técnica del anticuerpo secundario, como lo son: como la proteína A se combina con la mayoría de las moléculas de IgG de mamíferos, no es necesario preparar anticuerpos anti-IgG individuales para cada especie examinada.

La reacción entre la IgG y la proteína A es muy rápida; de 1 a 10 minutos de incubación es suficiente. La ventaja principal es que el examen total se lleva a cabo en por lo menos dos horas. Los resultados son reproducibles; los títulos obtenidos en exámenes reproducidos raramente varían por mucho en una o el doble de la dilución. El examen es económico; la proteína A es preparada fácilmente y el virus radiomarcado puede ser diluido de 50 a 100 veces. Lo más importante es que el examen es sensible y específico. (86)

El examen diferencia claramente los anticuerpos de tres Alfavirus (EEV),

(EEO) y (EEW) en sueros humanos. (50)

En conclusión, la proteína A como mediadora en el radioinmunoensayo es una herramienta serológica rápida, sensible y específica para la medición de anticuerpos de Alfvirus de una gran variedad de sueros de mamíferos. (50)

4.1.2 IDENTIFICACION SEROLOGICA DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS DE HEPATITIS DEL TIPO B.

La hepatitis sigue siendo una de las pocas enfermedades víricas humanas conocidas cuyo agente causal no se ha transmitido a animales de laboratorio ni se ha cultivado de manera sistemática en cultivos celulares. La enfermedad puede transmitirse de dos formas: Por vía intestinal-oral (hepatitis infecciosa) o por inyección de sangre infectada o sus derivados (hepatitis sérica). (21)

Los agentes que causan la hepatitis infecciosa se transmiten fácilmente a voluntarios humanos, tanto por vía oral como parenteral, y aparecen en la sangre y en las heces. En cambio, el agente causal de la hepatitis sérica se transmite normalmente por la inoculación parenteral, aunque existen datos epidemiológicos que sugieren que puede producirse también una diseminación por contactos personales, la ingestión de plasma infectado puede también producir hepatitis.

Los virus son considerados lo bastante distintos como para recibir nombres distintos HI (o A) y HS (o B) en referencia al virus de la hepatitis infecciosa

y el virus de la hepatitis sérica respectivamente. (21)

En favor de la existencia de los virus distintos de la hepatitis se encuentra el descubrimiento del antígeno asociado a la hepatitis (AAH), que también recibe el nombre de antígeno Australia, HS o HB (hepatitis B), ya que aparece tan sólo en pacientes afectados de hepatitis sérica.

El descubrimiento de este antígeno ha permitido la identificación diagnóstica de la hepatitis sérica (B). (21)

La respuesta en el hombre a la infección por el virus de la hepatitis es variable y oscila desde la infección benigna y la hepatitis no icterica, hasta la ictericia grave, la degeneración hepática y la muerte; la enfermedad manifiesta es a menudo debilitante y de larga convalecencia. Aunque se han descrito algunas diferencias clínicas entre la hepatitis infecciosa (A) y la hepatitis sérica (B), la distinción entre ambas debe basarse en la actualidad en:

- a) La duración del período de incubación, que es de 15 a 40 días en el caso de la hepatitis infecciosa y de 60 a 160 días en la hepatitis sérica.
- b) La presencia de AAH en la sangre y en las células de los pacientes afectados a la hepatitis sérica (B).

El virus de la hepatitis infecciosa (A), puede detectarse en el contenido

duodenal y en las heces, así como en la sangre y en la orina, durante la fase preictérica y principio de la fase ictérica y persistir en la sangre por espacio de muchos meses.

En la hepatitis sérica (B) el virus se encuentra generalmente en el torrente sanguíneo durante la fase preictérica, la fase ictérica, y también durante meses e incluso años después de la enfermedad.

Ambas infecciones afectan, en primer lugar, al hígado, lo cual da los signos y síntomas observados. La ictérica suele ir precedida de anorexia, malestar, náuseas, diarrea, molestias abdominales, fiebre y escalofríos.

La hepatitis sérica suele ser una enfermedad más grave, llegando en ocasiones el índice de mortalidad hasta el 50%, mientras que la hepatitis infecciosa raras veces supera el 1% (aún cuando la convalecencia es a menudo prolongada). (21)

4.1.2.1 DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS DEL TIPO B.

Un radioinmunoensayo rápido para la medición de antígenos y anticuerpos de la hepatitis del tipo B se ha descrito, en el cual la proteína A que contiene el Staphylococcus aureus es utilizada como soporte.

El principio de competencia es utilizado para realizar la prueba con el antígeno, mientras que el anticuerpo es medido por enlace directo con el anti

geno de la hepatitis B radiomarcado. (31)

La separación de antígenos radiomarcados unidos a sus anticuerpos homólogos y antígenos radiomarcados no unidos, es de gran importancia en todos los inmunoensayos. En la prueba presentada aquí, la proteína A que contiene el Staphylococcus aureus se usa para este propósito.

Este inmunoensayo en fase sólida tiene varias ventajas como lo son:

- a) La reacción entre la proteína A y el sitio de combinación en la molécula de IgG es casi instantánea.
- b) Parece no haber diferencia en las propiedades de combinación entre la proteína A y la IgG libre y unida al antígeno.
- c) El antígeno marcado radioactivamente que haya reaccionado con su anticuerpo específico desarrolla, con la proteína A, una fase sólida la cual es muy fácilmente sedimentada por centrifugación a baja velocidad. No siendo necesario antes del conteo lavar el sedimento después que el sobrenadante que contiene el antígeno marcado no ha sido eliminado.

Estas propiedades y el corto período de incubación necesario para que la reacción se complete entre el antígeno y el anticuerpo, permite un ensayo rápido.

En la prueba de adición del antígeno marcado a la mezcla de reacción des

pués de la incubación primaria del suero desconocido y su volumen equivalente de antisuero, aumenta la sensibilidad en diez veces, comparando con la obtención con la mezcla simultánea de todos los componentes.

Esta técnica es altamente específica no requiriendo exámenes de neutralización para especificidad. La prueba con Staphylococcus para el anticuerpo de la hepatitis B tiene más o menos la misma sensibilidad que la prueba de hemaglutinación pasiva, además de ser altamente específica.

Las pruebas son utilizadas en casos de donadores de sangre y pacientes convalecientes a la enfermedad. (31)

En este inmunoensayo el antígeno se obtiene a partir de suero humano, en el cual no son detectados anticuerpos contra el virus de la hepatitis del tipo B. El antígeno es separado y purificado por medio de un gradiente de concentración de cloruro de cesio. (31)

El antisuero se obtiene a partir de pacientes que presenten una cirrosis hepática y de pacientes convalecientes después de haber sufrido la infección. (31)

4.1.3 IDENTIFICACION SEROLOGICA DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLE.

El Herpes simple pertenece a la familia de los Herpes virus, a la cual pertenecen también virus como el de la Varicela zoster y los Citomegalovirus,

ya que poseen características físicas, químicas y biológicas semejantes entre si.

El Herpes simple permanece, a menudo, en la fase de latencia tras producirse la infección primaria, habitualmente en edad infantil, y puede activarse repetidamente por estímulos posteriores. (21)

Mediante titulaciones de neutralización, pueden distinguirse dos variantes inmunológicas que se denominan tipos 1 y 2 que presentan un elevado nivel de reactividad cruzada entre ambos. (21)

El hombre es el huésped natural del Herpes simple, (63) pero también son sensibles un número relativamente importante de animales, entre ellos, los ratones lactantes o adultos, cobayos, hámsters y conejos.

La infección inicial se produce a través de una erosión de las mucosas (de ojos, boca, faringe y genitales) o de la piel, donde se produce la multiplicación del virus. Desde este punto, el virus se difunde a los ganglios linfáticos regionales, donde se lleva a cabo la multiplicación secundaria. En ocasiones, los virus se diseminan sin límite, por carencia de anticuerpos, a través de la sangre y alcanzan órganos distantes.

Las lesiones se presentan en regiones como lo son: ventanas nasales, genitales, uretra, córnea y zonas traumatizadas. Entre las complicaciones más graves se incluye la meningoencefalitis o una infección generalizada de la piel. (21,74)

Las diferencias existentes en la capacidad patógena de los tipos 1 y 2 del virus del Herpes simple son importantes. Los virus del tipo 1 producen principalmente lesiones bucales y oculares, y se transmiten a través de las secreciones respiratoria y oral, mientras que los virus del tipo 2 se aíslan principalmente de lesiones anales y genitales, y se transmiten mediante contactos genitales. Las madres que presentan lesiones genitales constituyen la fuente principal de la infección de los recién nacidos con el virus del tipo 2, infecciones que a menudo son graves y pueden provocar la muerte.

4.1.3.1 DIAGNOSTICO DE HERPES SIMPLE.

Las técnicas de laboratorio se utilizan "ocasionalmente" para confirmar el diagnóstico clínico y ayudar al diagnóstico diferencial, son:

- a) La prueba de diagnóstico más rápida, sencilla y económica, consiste en la demostración, en extensiones obtenidas de la base de las vesículas, de la existencia de células gigantes multinucleadas características (eosinofilos intranucleares). (21)
- b) Detección de antígenos específicos en las células de la lesión por medio de inmunofluorescencia. (21)
- c) Aislando los virus, inoculando el material de las lesiones (líquido vesicular) en los cultivos celulares sensibles, en ratones recién nacidos o bien en la membrana corioalantoidea de huevos fecundados.
- d) Por medio de técnicas de neutralización o fijación del complemento (sólo infecciones primarias), cuando el título de anticuerpos es elevado. (21)

El descubrimiento de Staphylococcus aureus rico en proteína A en su superficie, y los estudios de sus propiedades, han dado lugar al desarrollo de varios métodos inmunológicos y serológicos que se han adicionado como una nueva opción en el diagnóstico virológico.

El Staphylococcus productor de proteína A se recubre con el anticuerpo específico en contra de los virus de Herpes simple tipo 1 y tipo 2 obtenidos en conejos, de esta manera queda preparado para que en el momento en que se ponga en contacto con su antígeno homólogo se lleve a cabo la reacción de coagulación. (17,74)

El antígeno se obtiene a partir de un cultivo celular infectado con el virus de Herpes simple. (17,74)

La reacción de coagulación se lleva a cabo al ponerse en contacto una gota de la suspensión de Staphylococcus aureus recubierto con anticuerpos y una gota del cultivo celular que esté infectado con el virus de Herpes simple, ya sea del tipo 1 o del tipo 2. (74)

El método de coagulación, para la detección de células infectadas por el virus de Herpes simple, puede ser realizado fácilmente, siendo éste específico y reproducible. (74)

4.1.4 IDENTIFICACION SEROLOGICA DEL VIRUS DE LA RUBEOLA.

La Rubéola es una enfermedad viral que desde hace años ha ocasionado grandes epidemias, las cuales traen como una de las consecuencias más importantes, problemas teratogénicos para los niños cuyas madres contrajeron la Rubéola durante el embarazo. (73,109)

El virus fué aislado por primera vez en 1962, en un cultivo celular, por dos grupos de investigadores simultaneamente. Este descubrimiento condujo a una rápida evolución en los métodos serológicos y virológicos para el estudio de la infección. Desde entonces el virus se ha podido replicar en diferentes medios de cultivo celulares: Vero, RK13, HB21, etc. El efecto citopático que produce el virus no es muy marcado por lo que también se utiliza el método de interferencia para su detección. (21,58)

El hombre es el único huésped natural del virus de la Rubéola. Se han tratado de infectar experimentalmente otros animales, pero estos estudios no han progresado satisfactoriamente, por lo que no se practica para una propagación viral, sin embargo, algunos primates se han usado extensamente para la posible diseminación de cepas vacunales. (58)

La Rubéola es una infección viral exantemática con un cuadro clínico leve. (29) El exantema aparece entre los 14 y 25 días después de la infección con el virus de la Rubéola.

Los virus pueden ser aislados a partir de secreciones nasofaringeas (y, en algunos casos, de las heces y de la orina) desde 7 días antes de la aparición del exantema hasta 7 días después. Es probable que las secreciones respiratorias constituyan el vehículo principal de la transmisión del virus. (21)

La respuesta inmune produce diferentes tipos de anticuerpos, detectados por técnicas como lo son: Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), Imunofluorescencia (IF), Fijación del Complemento (FC'), etc. (46)

Los anticuerpos IgM en la Rubéola así como en cualquier proceso de respuesta inmune son los primeros en aparecer; posteriormente, la respuesta inmune reside en los anticuerpos IgG. Sin embargo, en el síndrome de la Rubéola congénita los anticuerpos que se encuentran presentes son del tipo IgM, los que se debían haber sintetizado por el feto, ya que éstos son incapaces de cruzar la placenta. Un alto título de anticuerpos anti-rubéola del tipo IgM al nacer, es diagnóstico seguro de la Rubéola congénita. (46)

4.1.4.1 DIAGNOSTICO DE RUBEOLO.

El diagnóstico de laboratorio se logra mediante métodos directos e indirectos. En los primeros se detecta el virus y en los segundos se detectan los anticuerpos anti-rubéola producidos por el organismo infectado.

Entre los métodos directos se pueden citar: Identificación del virus al aislarlo de las secreciones de nasofaringe y orofaringe, inoculando en líneas

celulares como lo son las Vero, por interferencia de otros virus como lo son los ECHO o, por Inmunofluorescencia. (89)

Entre los métodos indirectos están la Neutralización (Nt), la Fijación del Complemento (FC'), Inmunofluorescencia Indirecta (IF), Inhibición de la Hemaglutinación Viral (HAI), Hemaglutinación Indirecta (HI), Aglutinación en Látex (LA), Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) y el Radio Inmunoanálisis (RIA). (1,30,43,89,98)

Para detectar la Rubéola congénita o una infección reciente, se detecta la IgM. Los anticuerpos IgM se miden por técnicas como lo son:

- a) Reducción de IgM con 2 mercaptoetanol, reducción de IgG con ditiotriol, remoción de la IgA e IgG con proteína A, adsorción o inmunoprecipitación con anti IgA y anti IgG. (1,19,30,98)
- b) Separación de IgM por centrifugación en gradiente de densidad o por métodos cromatográficos. (1,19,30)
- c) Inmunoadsorción de anticuerpos del suero mediante antígenos fijados a una fase sólida e identificándola con una anti IgM. (1,30,98)

El método de coaglutinación se ha descrito para hacer el diagnóstico de Rubéola. La técnica a realizar se efectúa con una cepa de Staphylococcus aureus, rico en proteína A.

El Staphylococcus aureus formalinado, se recubre con anticuerpos contenidos en sueros de origen humano, estos anticuerpos son específicos contra el

virus de la Rubéola. De preferencia se utilizan aquellos sueros que presenten títulos de anticuerpos elevados. Esta suspensión se pone en contacto con su antígeno homólogo (en éste caso son células infectadas con el virus de la Rubéola), presentandose la reacción de coaglutinación, identificandose de ésta manera los antígenos virales.

Se utilizan como controles:

- a) Células infectadas más Staphylococcus aureus proteína A negativo.
(Cepa Wood 46).
- b) Células no infectadas más Staphylococcus aureus proteína A positivo. (Cepa Cowan I).

En los cuales no se presenta la reacción de coaglutinación.

El método de coaglutinación es muy sensible, esto se comprueba recubriendo el Staphylococcus con diferentes diluciones del suero inmune, con estas suspensiones se realiza la prueba de coaglutinación, resultando positiva hasta diluciones altas del suero, o sea que con una cantidad mínima de anticuerpos, la reacción de coaglutinación sigue identificando antígenos virales.

Es altamente específica ya que el Staphylococcus no se adhiere a el antígeno; solamente se adhiere si las células presentan antígenos virales y si el Staphylococcus esta recubierto con anticuerpos homólogos.

Los resultados que se obtienen indican que los antígenos virales en la superficie de la célula pueden ser detectados fácilmente mediante el método de coaglutinación, ya que presenta una alta especificidad y sensibilidad, además de ser económica ya que no requiere de material y equipo costoso. (1,43)

4.2 INFECCIONES BACTERIANAS.

4.2.1 IDENTIFICACION SEROLOGICA DE CAMPYLOBACTERIAS.

Las Campylobacterias, originalmente clasificadas como Vibrios, son un grupo heterogéneo de organismos.

Las especies Campylobacter fetus ss fetus (originalmente llamado Vibrio fetus) y Campylobacter fetus ss intestinalis ambos se han asociado con infecciones que producen aborto e infertilidad en el ganado vacuno, ovejas y cabras, mientras que Campylobacter fetus ss jejuni se ha asociado con infecciones en el humano. (21,59,60)

Los habitats normales de dos de las especies anteriores son en los tractos genital e intestinal del ganado vacuno y las ovejas y, el C. fetus ss jejuni en el tracto intestinal de varios animales incluyendo los pájaros. Las propiedades termófilas de esta última especie es una característica importante para diferenciarla de otras Campylobacterias patógenas. (59) Las llamadas Campylobacterias relacionadas son morfológicamente parecidas entre sí, pero serológicamente diferentes. (21,59)

El descubrimiento de Campylobacter fetus ss jejuni como agente causal de enteritis en el hombre, ha incrementado el interés en este género y la necesidad de mejorar la clasificación se ha hecho evidente. (59)

Las infecciones producidas en humanos por Campylobacter fetus ss jejuni

desconocidas hasta el año de 1947, se observan cada vez con mayor frecuencia en niños, en mujeres embarazadas y, en personas de edad. En la mayoría de los casos, éste microorganismo aparece en el torrente sanguíneo, aunque se ha identificado también en la placenta, en el líquido sinovial y en el líquido cefalorraquídeo. (21)

Las infecciones en humanos causadas por Campylobacter fetus ss jejuni han mostrado complejidad y heterogeneidad antigénica; esto se ha comprobado por estudios detectando los anticuerpos en pacientes con enteritis y, en conejos inmunizados con Campylobacterias. (60)

La coaglutinación se ha empleado para tipificar Campylobacterias, en este estudio se usa la diferenciación serológica de las especies de Campylobacterias haciendo énfasis en las especies que afectan al ser humano. (59,60)

Los antisueros contra las especies de Campylobacterias se obtienen en conejos inmunizados con la bacteria. Se utiliza el Staphylococcus aureus que contiene proteína A forrado con anticuerpos específicos. Usando extractos que se obtienen por calentamiento de suspensiones bacterianas, se pueden detectar más de 50 especies antigenicamente diferentes. (60)

4.2.2 SEROTIPIFICACION DE Escherichia coli.

Escherichia coli es un organismo de los más abundantes, está como flora normal del tracto gastro intestinal, pudiendo pasar a vías urinarias, por lo

que también Escherichia coli es frecuentemente el organismo responsable de infecciones en el tracto urinario de humanos, (por su reintroducción a partir de residuos fecales o por el desplazamiento por vía hematogéna o linfática a partir del conducto intestinal hasta llegar al tracto urinario y a los riñones). (48)

Las colonias típicas de Escherichia coli pueden ser reconocidas generalmente a través de su aspecto característico en ciertos medios de cultivo diferenciales, estos organismos utilizan la lactosa rápidamente, en agar azul de metileno y agar Endo presentan reflejos metálicos característicos; son bacilos Gram negativos. Para las reacciones bioquímicas se requieren de 24 a 48 horas para su identificación, de ahí que se recurra a otros tipos de exámenes también. (21)

El conocimiento de los serogrupos es requerido por razones epidemiológicas para la diferenciación de nuevas especies que infectan al hombre. Las células de Staphylococcus aureus que son forradas con el anticuerpo contra E. coli, reaccionan con el extracto soluble de Escherichia coli. (48)

La reacción de coaglutinación se lleva a cabo en presencia de controles establecidos, preparando Staphylococcus aureus con Solución Salina Amortiguada de Fosfatos (SSAFa) en el lugar del anticuerpo y con la cepa de S. aureus Wood 46 (deficiente de proteína A), tratada con el anticuerpo contra E. coli, las cuales no reaccionan con ninguno de los organismos. (48)

De los trece serogrupos de Escherichia coli reportados por Orskov, F. en 1978, que son asociados con infecciones del tracto urinario; un antisuero no presenta reacción de coagulación positiva, ya que éste contiene en pocas cantidades o ninguna IgG. El uso del Staphylococcus aureus recubierto con el anticuerpo, es un método práctico para la serotipificación de los grupos de E. coli causante de infecciones en el tracto urinario, y comparandolo con métodos como la hemaglutinación y la aglutinación bacteriana, resulta más fácil de realizar y en menor tiempo, teniendo la misma especificidad. (48)

4.2.3 DETECCIÓN DE ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE Escherichia coli.

Escherichia coli enteropatógena (ECEP) se ha detectado como el agente causal de cuadros diarreicos en personas de todas las edades. (9) La enterotoxina termolábil comparte actividad biológica con la toxina producida por V. cholerae, la cual es purificada para la inmunización de conejos, de los cuales se obtiene el antisuero específico. (9) El antisuero obtenido se enlaza por la parte Fc de la IgG, a la proteína A contenida en el Staphylococcus aureus, quedando libres las porciones Fab. Cuando se mezclan con su antígeno homólogo, en éste caso la enterotoxina termolábil, se presenta la reacción de coagulación, la cual se identifica por la formación de acúmulos visibles. (9) En éste estudio la suspensión de Staphylococcus aureus recubierto con la fracción de IgG antitoxina, unida adecuadamente da sensibilidad y diferencia, para identificar organismos tóxicos de no tóxicos. (9)

4.2.4 IDENTIFICACION DE Haemophilus influenzae tipo b EN FLUIDOS CORPORALES.

La forma capsulada de Haemophilus influenzae tipo b, es responsable del 95% de las enfermedades causadas por ésta especie, pudiéndose mencionar entre las más importantes; la neumonía, epiglotitis, celulitis, artritis séptica, osteomielitis, sinusitis, otitis media, pericarditis y principalmente la meningitis, de hecho, en nuestro medio, éste organismo y Streptococcus pneumoniae, son los dos agentes etiológicos más frecuentes de meningitis bacteriana, la cuál afecta, sobre todo, a los niños menores de 6 años. (44,106,113)

El Staphylococcus aureus que contiene proteína A, es forrado con el anti suero de Haemophilus influenzae tipo b, que aglutina específicamente con la célula bacteriana homóloga o con fluidos sobrenadantes libres, del cultivo del organismo.

El fluido cerebroespinal en el caso de meningitis causada por H. influenzae del tipo b, muestra positiva la reacción de coagulación en 86% de pacientes antes de iniciar la terapia. Los antígenos pueden detectarse en los fluidos corporales obtenidos entre el primer y el décimo día después de iniciada la terapia, ya no detectándose más tarde. El antígeno soluble puede detectarse en el suero en 58% de los casos y en especímenes de orina en 67% de los pacientes con septicemia causada por Haemophilus influenzae tipo b, cuando tales especímenes fueron examinados dentro de los 10 días a partir del primer ataque de la enfermedad. La prueba de coagulación es positiva en un 57% de todos los fluidos

corporales examinados. (101,113)

Los controles se preparan con el suero o la orina infectados por otro organismo diferente a Haemophilus influenzae tipo b, estos organismos pueden ser: Escherichia coli o Klebsiella pneumoniae, o bien se puede usar el fluido corporal estéril. (101) Pero en el caso de que se presenten reacciones falsas positivas o inespecíficas se adsorbe el fluido cerebroespinal con una solución pura de proteína A, y si aún se presentan las reacciones inespecíficas, se calienta a 100 °C por 1 ó 2 minutos, el fluido cerebroespinal antes del examen. (24)

4.2.5 SEROTIPIFICACION DE Mycobacterium sp.

Las Mycobacterias se han definido en relación con su propiedad tinte característica, que depende de la riqueza en lípidos de sus paredes celulares: son relativamente impermeables a varios colorantes persistentemente. Resisten la decoloración con disolventes orgánicos acidificados, por lo cual se han denominado ácidosresistentes. Las Mycobacterias incluyen desde saprófitos inocuos del suelo y las aguas, hasta organismos que son responsables de dos enfermedades humanas devastadoras: la tuberculosis y la lepra. Ambas se caracterizan por su cronicidad, y causan lesiones granulomatosas de evolución lenta, que originan grandes destrucciones de los tejidos. La lepra afecta fundamentalmente a la piel, y puede causar grandes desfiguraciones, mientras que la tuberculosis se localiza habitualmente en los órganos internos. (21)

4.2.5.1 DIAGNOSTICO DE Mycobacterium sp.

El bacilo de la lepra, se ha propagado en el armadillo y no ha podido cultivarse en medios artificiales. Por el contrario, el agente causal de la tuberculosis humana (M. tuberculosis y su variedad M. bovis, estrechamente relacionada con él) pueden cultivarse fácilmente en un medio de cultivo simple y son patógenos para varios animales inferiores también. (21)

Habitualmente puede establecerse un diagnóstico provisional de tuberculosis por la demostración de bacilos ácidosresistentes en extensiones teñidas de esputos o jugo gástrico (que contenga esputos digeridos). Para mayor fluidez en el estudio de extensiones, ciertos laboratorios utilizan microscopía de fluorescencia después de teñir las muestras con una mezcla de colorantes fluorescentes: rodamina y auramina. (21)

Sea positiva o no la extensión, el material debe cultivarse (en el caso de Mycobacterium tuberculosis) debido a que:

- a) La extensión puede detectar pocos organismos.
- b) Las características del cultivo permiten distinguir entre el bacilo tuberculoso humano y otros bacilos ácidosresistentes.
- c) Deben realizarse los cultivos para estudiar la sensibilidad a los medicamentos antes de iniciar la quimioterapia. (21)

La tipificación serológica de Mycobacterium en trabajos de rutina, se ha

ce usualmente por una técnica de aglutinación propuesta por Schafer. (52)

En el método de coaglutinación, el suero que contiene anticuerpos anti-Mycobacterium se adiciona a una suspensión de S. aureus cepa Cowan I.

Las suspensiones de Staphylococcus aureus forrados con diferentes tipos de anticuerpos anti-Mycobacterium, se prueban contra el tipo de cepas de Mycobacterium: se utilizan tres gotas de la suspensión de Staphylococcus y tres gotas de la suspensión de Mycobacterium que se mezclan en los posos de una placa de plástico. Las placas se incuban a 37 °C y las aglutinaciones se registran cada 30 minutos, por 24 horas, se tiene como control de aglutinación espontánea una suspensión de Mycobacterium en Solución Salina Isotónica. Los resultados obtenidos por los dos métodos concuerdan y se evalúan de la siguiente manera:

Algunas cepas de Mycobacterium que tienden a dar aglutinación espontánea, y que pudieron previamente ser identificadas con gran dificultad, se tipifican fácilmente por el método de coaglutinación. (52)

Los métodos por los cuales se inactivan Staphylococcus y Mycobacterium, no afectan los resultados.

La cantidad del suero que se necesita para una prueba de aglutinación en tubo por el método de Schafer, puede usarse para más de 10 tipificaciones por el método de coaglutinación. (52)

4.2.6 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA Mycoplasma pneumoniae.

Los Mycoplasmas son los microorganismos de menor tamaño que se conocen, y se diferencian de las bacterias en que carecen de pared celular.

Los Mycoplasmas patógenos son altamente específicos para ciertos órganos y tejidos en los animales infectados, produciendo lesiones de forma selectiva en el Sistema Nervioso Central, en las articulaciones, en la pleura, el peritoneo y los pulmones. (21)

En el hombre, los Mycoplasmas producen una neumonía atípica primaria, y las cepas T (que producen colonias de muy pequeño tamaño) pueden producir una uretritis no gonocócica.

La neumonía atípica primaria cuyo agente causal es Mycoplasma pneumoniae se caracteriza por la presencia de fiebre, tos no productiva (a menudo, intensa), cefalea y postración.

La mayoría de los casos de neumonía producida por Mycoplasma aparecen en los niños aunque también puede afectar a individuos de cualquier edad.

Los estudios serológicos realizados indican que tan solo una pequeña proporción de los individuos afectados con Mycoplasma pneumoniae presentan una neumonía, ya que la mayoría de ellos sólo sufren síntomas respiratorios de las vías respiratorias altas, o no presentan ningún signo de la enfermedad. (21)

4.2.6.1 DIAGNOSTICO DE Mycoplasma pneumoniae.

Mycoplasma pneumoniae puede cultivarse a partir del esputo o de una muestra de exudado faríngeo tomada con escobillón por siembra directa en medios de cultivo líquidos o sólidos conteniendo suero y extracto de levadura, así como penicilina y acetato de talio, para inhibir el desarrollo de bacterias contaminantes. En el caldo aparecen, tras una semana o más de incubación, colonias libres, flotantes que se tiñen intensamente con rojo neutro o tetrazoilo que se observan a través del microscopio. Las colonias en agar se tiñen habitualmente con azul de metileno o azul II, pero no son detectables hasta entre el sexto y el vigésimo día de incubación. El organismo puede identificarse presuntivamente por su capacidad para producir hemadsorción o hemólisis β de los eritrocitos de cobayo en el medio de cultivo, y puede identificarse de modo definitivo por la coloración de sus colonias, mediante anticuerpos homólogos marcados con fluoresceína.

La respuesta de anticuerpos en la neumonía micoplásmica puede demostrarse por pruebas de fijación de complemento en sueros de enfermos en fase aguda y convalecientes. (21)

Varios métodos entre los cuales se incluyen la fijación del complemento, inhibición del metabolismo, hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia, prueba micoplásmica y exámenes de radioinmunoprecipitación han sido utilizados para la detección de anticuerpos para Mycoplasma pneumoniae.

En la detección de anticuerpos contra Mycoplasma pneumoniae en sueros humanos se ha demostrado que el radioinmunoensayo utilizando Staphylococcus es al menos tan sensible como la técnica de inmunoprecipitación. (11)

El examen es muy sensible y específico, la especificidad y la sensibilidad depende de la calidad del antisuero contra la inmunoglobulina. (11)

Los Mycoplasmas que se utilizan como antígenos son marcados por la adición de ácido oleico y ácido palmítico adicionados de ^{14}C a el medio de cultivo poco antes de la inoculación de los organismos. Se incuban a 37°C hasta que el medio de cultivo empieza a cambiar de color.

El ^{14}C unido al Mycoplasma pneumoniae se cultiva por raspado de las células desarrolladas en el medio de cultivo, adicionándole amortiguador Veronal pH= 7.4, después se decanta del medio de cultivo, lavando las células con el mismo amortiguador. Esta suspensión se centrifuga a 36 000 g por 30 minutos a 4°C . El sedimento resultante se lava nuevamente 2 veces con el mismo amortiguador. Los antígenos son guardados en refrigeración hasta su uso. (11)

Los sueros empleados se obtienen de personas con neumonía atípica primaria o sueros obtenidos de hámsters y conejos infectados experimentalmente con Mycoplasma pneumoniae. Todos los sueros se calientan a 56°C por 30 minutos antes de su uso. (11)

La reactividad entre ciertas especies de Staphylococcus aureus y las inmu

noglobulinas, especialmente la IgG, no es una reacción específica en el sentido usual de una reacción antígeno anticuerpo, sino la afinidad no inmunológica entre las células bacterianas y el fragmento Fc de las inmunoglobulinas. (11)

Se ha demostrado que el método tiene una alta especificidad y sensibilidad. Esta técnica adaptada para la detección de anticuerpos de Mycoplasmas, es considerablemente más sensible que los métodos convencionales y escasamente más sensible que el examen de radioinmunoprecipitación (RIP) para la detección de anticuerpos de Mycoplasma.

Este incremento en la sensibilidad no va acompañado de una aparente pérdida en la especificidad. El radioinmunoensayo utilizando la proteína A ofrece un número de ventajas sobre el procedimiento del RIP; porque la reacción entre la proteína A y la IgG es muy rápida y puede ser desarrollada en menor tiempo que el RIP. (11)

4.2.7 IDENTIFICACION SEROLOGICA DE Neisseria gonorrhoeae.

En la enfermedad gonocócica aguda deben tenerse extensiones obtenidas a partir de exudados recientes, que a menudo pueden demostrar la presencia de diplococos Gram negativos intracelulares. Estos datos junto con una historia clínica evidente, pueden permitir establecer un diagnóstico provisional de gonorrea aguda e instaurar la terapéutica específica. (21)

El diagnóstico de Neisseria gonorrhoeae se basa principalmente en su aisl

miento e identificación. La diferenciación de Neisseria gonorrhoeae de otras especies de Neisseria, se lleva a cabo tradicionalmente por exámenes de utilización de azúcares, en combinación con, la reacción de oxidasa, tinción de Gram (21,29) desarrollo en medios de cultivo selectivos, características morfológicas de las colonias, prueba de inmunofluorescencia (19,87), inmunoelectroforesis (20) y hemaglutinación. (5,88)

El método de coaglutinación es rápido y fácilmente reproducible en el cual los anticuerpos antigonococo son obtenidos en conejos hiperimmunizados, estos anticuerpos se enlazan por las porciones Fc a la proteína A, contenida en el Staphylococcus aureus, reaccionando con el gonococo, produciéndose una aglutinación fuerte y fácilmente visible. Esta reacción se compara con un control en el cual los anticuerpos específicos no van unidos al Staphylococcus. Se debe hacer énfasis en eliminar la reacción cruzada con Neisseria meningitidis, algunas especies de Moraxella y en algunos casos Haemophilus influenzae y P. auruginosa adsorbiendo el antisuero antes de usarlo para unirlo a la proteína A. (5,42,77) Esto nos permite una rápida identificación de N. gonorrhoeae dentro de 18 a 24 horas a partir de que se toma el espécimen. La técnica es sencilla, interpretándola de la siguiente manera: una reacción de coaglutinación positiva, se identifica cuando hay desarrollo de partículas finas en forma polvosa. Una reacción de coaglutinación negativa, es en la cuál no hay formación de partículas. (91) Un resultado no interpretable es cuando la coaglutinación es evidente en la prueba positiva y en el control; en éste caso se lleva a cabo una tripsinización, con la cuál se reducen considerablemente los resultados no interpretables o pseudocoaglutinaciones. (42,91)

También se recomienda hacer una suspensión de varias colonias, calentando las en un baño de agua a 80 °C por 20 minutos, enfriandolas a temperatura ambiente, una gota de la suspensión acuosa, se usa para hacer una nueva prueba. (91)

El 98% de las cepas identificadas como Neisseria gonorrhoeae aisladas en casos clínicos, dan reacciones positivas de coagulación para ésta especie. La reacción es poco específica para diferenciar las especies del género Neisseria. Neisseria meningitidis da la reacción positiva en un 75% y otras especies de Neisseria en un 40%. Aunque hay otros organismos que se desarrollan en los mismos medios selectivos para Neisseria, estos no dan reacciones de coagulación positivas. (5,42)

Recientemente se han utilizado anticuerpos monoclonales que reconocen una sola determinante antigénica, esto facilita la producción de un reactivo más específico. (116) Los resultados obtenidos con la reacción de coagulación para anticuerpos mono y policlonales en suspensiones de Neisseria, previamente calentados, nos ha mostrado una sensibilidad del 97.7% y una especificidad del 96.4% respectivamente para el reactivo monoclonal. Para el reactivo policlonal la sensibilidad fué del 100% y la especificidad del 94.6%. (116) En éste método no hay una diferencia muy marcada en la sensibilidad y en la especificidad entre los anticuerpos mono y policlonales para una identificación rutinaria de aislamientos clínicos de Neisseria gonorrhoeae. (116)

4.2.8 IDENTIFICACION SEROLOGICA DE Neisseria meningitidis.

Utilizando métodos serológicos de aglutinación, los meningococos se han dividido en los grupos A, B, C, D, X, Y y Z. En base a los antígenos de los grupos que son polisacáridos capsulares. (21)

Cuando se sospecha de un caso de enfermedad meningocócica se deben examinar muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo y secreciones nasofaríngeas para estudiar la presencia de Neisseria meningitidis.

En algunos casos este microorganismo puede manifestarse en extensiones realizadas a partir de lesiones petequiales cutáneas. (21)

Para clasificar el grupo serológico de Neisseria meningitidis se toman en cuenta los antígenos específicos contenidos en su polisacárido capsular, esto ha sido de gran ayuda para llevar a cabo estudios epidemiológicos de enfermedades causadas por meningococos. (18,106)

Las especies de Neisseria gonorrhoeae y Escherichia coli dan reacciones cruzadas con Neisseria meningitidis. Las cepas de Escherichia coli contienen un antígeno denominado K1 que da reacción cruzada con el meningococo del grupo B no reaccionando con otros grupos de Neisseria meningitidis. Sin embargo, si esta reacción cruzada se presenta como es de esperarse, ya que estos organismos comparten determinantes antigénicas, se recurre a una tinción de Gram y se observa la morfología colonial. (118)

Se ha demostrado que la coagulación para Neisseria meningitidis también puede hacerse directamente del desarrollo de colonias en placa (118) y con fluido cerebroespinal, ya que se liberan anticuerpos específicos durante la infección. (24,106) El antisuero se obtiene por la inmunización de conejos. (24) La proteína A contenida en el Staphylococcus aureus es forrada con el antisuero hiperinmune contra Neisseria meningitidis. El fluido cerebroespinal se calienta a 100 °C por 1 ó 2 minutos para evitar las reacciones no específicas. (24) La proteína A recubierta se mezcla con su antígeno específico (líquido cerebroespinal o suspensión de organismos), presentándose la reacción de coagulación que se observa inmediatamente. (24)

La reacción de coagulación es sencilla y rápida, utilizando el anticuerpo específico para llevarla a cabo, se compara con la técnica de inmunoelectroforesis y aglutinación en látex en lo que se refiere a sensibilidad. (18,106)

4.2.9 SEROTIPIFICACION DE Salmonella sp.

El género Salmonella comprende una gran variedad de "especies" patógenas para el hombre o animales y habitualmente para ambos. Para el aislamiento de las Salmonellas de las heces se utilizan medios de cultivo selectivos que contienen inhibidores químicos tales como verde brillante, selenito, tetratiónato, desoxicolato y citrato.

En el hombre se dan tres formas de Salmonelosis clínicamente diferentes: Fiebres entéricas, septicemias y gastroenteritis agudas. (21)

El método clásico de identificación de Salmonella se ha llevado a cabo por pruebas bioquímicas y de aglutinación, cuando se observa una colonia sospechosa en medios de cultivo selectivos o diferenciales.

La clasificación de Salmonella dentro de diferentes serogrupos se basa en la estructura de la cadena de polisacáridos (antígeno O) somático que está en el lipopolisacárido, que es el componente estructural de la membrana externa que envuelve la célula bacteriana.

La mayoría de las Salmonellas aisladas en, humanos, animales y alimentos pertenecen a los primeros serogrupos en el esquema de Kauffman-White, (A, B, C, D y E). (103)

En la reacción de coaglutinación, el Staphylococcus se recubre con moléculas de IgG específica para el serogrupo de Salmonella, de ésta manera la parte Fab queda libre y se combina con su antígeno homólogo.

La preparación del antisuero se lleva a cabo purificando el disacárido correspondiente a cada serogrupo (02, 04, 08 y 09) y unido a la albúmina sérica bovina, formándose así un complejo sintético disacárido-proteína que es inoculado a conejos. (102,103)

La coaglutinación resulta ser bastante específica para la detección de bacterias pertenecientes a los serogrupos A, B, C y D respectivamente.

La coagulación se lleva a cabo en presencia de un control que es el Staphylococcus aureus recubierto con suero normal de conejo. (84,102,103)

Los antígenos solubles se pueden detectar en orina, siendo la prueba de coagulación positiva en el 97% de los casos tipificados.

Los antígenos solubles D, Vi y d pueden identificarse en la etapa inicial de la infección. Para esto se pone en contacto con su anticuerpo específico, que está unido a la proteína A contenida en el Staphylococcus por lo que ésta prueba proporciona un alto grado de certeza. (84)

4.2.10 IDENTIFICACION SEROLOGICA DE Shigella sp.

Las Shigellas son gérmenes menos invasores que las Salmonellas, y difícilmente causan bacteremia, pero provocan una enfermedad natural en el hombre denominada disentería bacilar.

Las especies de Shigellas se diferencian del resto de las Enterobacterias mediante pruebas bioquímicas, y entre sí gracias a sus características bioquímicas y antigénicas. (21)

La totalidad de las especies incluidas en el género Shigella resultan patógenas para el hombre. Las lesiones producidas en el conducto gastrointestinal se limitan generalmente a la porción del ileon y del colon; estas lesiones son principalmente ulceraciones de la mucosa.

La disentería causada por Shigella se caracteriza por dolor abdominal, diarrea y fiebre, de aparición repentina tras un período de incubación de 1 a 4 días. Es corriente la presencia de sangre como de moco en las heces. Cuando la diarrea es grave, la pérdida de agua y sales puede causar deshidratación y desequilibrio electrolítico, particularmente en los niños. (21)

4.2.10.1 DIAGNOSTICO DE Shigella sp.

Aunque los bacilos desintéricos son organismos resistentes y se eliminan en gran número durante la fase activa de la enfermedad, sólo permanecen viables en las heces durante un corto período de tiempo, por lo cual deben cultivarse rápidamente. El mejor método para obtener las muestras para el cultivo es por medio de un escobillón rectal. (21)

Los cultivos deben realizarse en Agar Mac Conkey, Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) o en Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e identificar el microorganismo a partir de pruebas bioquímicas y de pruebas de aglutinación específica, que han sido los métodos clásicos para la identificación de Shigella, cuando se observa una colonia de bacterias sospechosas en un medio de cultivo diferencial o selectivo. (26)

La identificación de Shigella dysenteriae resulta especialmente importante, ya que éste microorganismo da lugar a una disentería especialmente grave, probablemente debida a la producción de exotoxinas. (21)

En la reacción de coagulación, el *Staphylococcus* se recubre con moléculas de IgG específicas para *Shigella*. El *Staphylococcus aureus* ya recubierto con anticuerpos específicos aglutina sólo con su antígeno homólogo, permitiendo por lo tanto la identificación específica de la especie y tipo bacteriano deseado.

Para la identificación de los organismos en forma directa en el medio de cultivo, se coloca un anillo de parafina alrededor de las colonias sospechosas, aislandas o del desarrollo bacteriano. Una gota del reactivo de *S. aureus* recubierto con el suero que contiene anticuerpos anti-*Shigella*, se adiciona dentro del anillo de parafina hecho alrededor de la colonia, se mezcla por rotación de 1 a 3 minutos, haciendo observaciones periódicas de la mezcla. La coagulación puede ser detectada visualmente al retener la placa contra un fondo oscuro con luz apropiada. Sin embargo, el uso de un microscopio se recomienda porque las reacciones débiles pueden no ser detectadas por observación directa. La reacción de coagulación puede ser detectada a los 15 segundos, pero para que se pueda identificar la coagulación con mayor seguridad se continúa rotando la mezcla hasta los tres minutos.

En un control de partículas no recubiertas del mismo lote de *Staphylococcus*, se coloca una colonia sospechosa para observar si aparece una reacción de coagulación inespecífica. El uso de *Staphylococcus* recubierto de anticuerpos en la identificación de otras Enterobacterias, dependerá básicamente de la eficacia, potencia y especificidad del antisuero con el que se recubra el *S. aureus*. (26)

4.2.11 IDENTIFICACION DE DIFERENTES SEROGRUPOS DE *Streptococcus* β hemolíticos.

A partir de los trabajos de Lancefield, en los primeros años de la década de 1930, los *Streptococcus* β hemolíticos fueron diferenciados en grupos inmunológicos, designados actualmente por las letras "A" hasta la "O".

La separación de los *Streptococcus* β hemolíticos en grupos inmunológicamente específicos (A a O), se basa en la presencia de carbohidratos antigénicos de grupo específicos (Carbohidrato "C"), que están presentes en sus paredes celulares. Estos carbohidratos "C" pueden extraerse por varias técnicas (21), entre las cuales podemos citar la hidrólisis ácida, sometiendo a las células a la autoclave durante 15 minutos a 121 °C, y a la extracción enzimática mediante la acción de una enzima hidrolítica de *Streptomyces albus* sola o combinada con lisozima. (12,33,57)

Los antígenos de grupo específicos reaccionan con los sueros hiperinmunes producidos en conejos inmunizados con *Streptococcus* hemolíticos del mismo grupo. Las reacciones de precipitación practicadas con sueros adecuados permiten la clasificación de las cepas desconocidas. Aunque la mayor parte de los *Streptococcus* hemolíticos que causan enfermedades en el hombre, están dentro del grupo "A", (*S. pyogenes*) que pueden ocasionar tanto enfermedades supurativas como secuelas no supurativas.

El primer grupo incluye la faringitis estreptocócica aguda (con o sin es

carlatina) y todas sus complicaciones supuradas incluyendo la adenitis cervical, la otitis media, la mastoiditis, los absesos peritonsilares, meningitis y neumonía. También incluye las infecciones uterinas estreptocócicas del puerperio (Sepsis puerperal), la celulitis estreptocócica y la erisipela. Las principales enfermedades no supurativas son la glomerulonefritis aguda, la fiebre reumática y el eritema nudoso. (21)

Los Streptococcus del grupo "B" se han implicado como agentes causales en una amplia variedad de infecciones humanas. Se incluyen la endocarditis, meningitis, neumonía, artritis, encefalitis, absesos, ostiomielitis, septicemia e infecciones en el tracto genitourinario. Las infecciones neonatales son en particular las concernientes por su alta incidencia y proporción de mortalidad. El diagnóstico precoz es imperativo en infecciones neonatales para asegurar y aplicar la terapia adecuada. (12,57,68,105,110)

Los Streptococcus β hemolíticos están entre las cepas bacterianas que se presentan más comúnmente en los laboratorios clínicos. Su identificación usualmente no da problemas, se observa su morfología microscópica y macroscópica, el tipo de hemólisis que produzcan o no en el agar sangre, la producción de enzimas (fibrinolisis), prueba de la bacitracina, hidrólisis del hipurato, prueba de CAMP, (2,38,57,68) que requieren de 24 a 48 horas para su identificación. Una de las pruebas que probablemente es una de las más ampliamente utilizadas, es la prueba de la bacitracina de Moxted, la cual diferencia el grupo "A" de otros grupos de Streptococcus en base a su sensibilidad a la bacitracina. (2,100)

Como una alternativa en el uso del examen de la bacitracina, una evaluación para identificar el grupo "A" del Streptococcus está la reacción de coaglutinación. (100)

El método de coaglutinación se ha descrito utilizando formaldehído y tratamiento con calor; el Staphylococcus aureus cepa Cowan I se forra con γ globulina de conejo específica para cada grupo de Streptococcus. (33,100) La serotipificación del grupo por este método es sensible, rápida y sencilla. En algunos casos elimina la necesidad del uso del examen de la bacitracina para la identificación del Streptococcus del grupo "A". (100)

El método de coaglutinación se ha descrito para la identificación de colonias de Streptococcus β hemolíticos directamente de las placas de agar sangre. Se colocan de tres a cinco colonias del Streptococcus β hemolíticos incubando las por 4 horas en un medio de cultivo líquido y examinando el medio en suspensión por medio de coaglutinación.

Siguiendo este método se ha podido agrupar un 92,6% de Streptococcus β hemolíticos de los grupos A, B, C, D, F y G, después de cuatro horas de incubación. (33,68,110)

La coaglutinación se ha descrito para la identificación de los diferentes serogrupos de Streptococcus β hemolíticos y se ha comparado con la prueba de anticuerpos fluorescentes (AF) y la técnica de contraelectroforesis (CIEF) en cuanto a sensibilidad, teniendo los dos últimos métodos la desventaja de que

mina Sérica Bovina. (23,24) En el caso de que se presenten reacciones cruzadas o inespecíficas, se adsorbe la muestra, si estas reacciones aún se presentan, los especímenes son calentados a 100 °C por 1 ó 2 minutos antes de realizar nuevamente la prueba. (24) La prueba de coagulación es positiva en un 75% de los exámenes realizados, siendo una de las técnicas más sensibles para la detección de polisacáridos de Streptococcus pneumoniae. (24)

4.3 INFECCIONES POR PROTOZOARIOS.

4.3.1 IDENTIFICACION DE TRES AMIBAS PATOGENAS PARA EL HOMBRE.

4.3.1.1 AMIBIASIS.

Presenta como sinonimia los siguientes terminos: Disentería amibiana, enteritis amibiana, colitis amibiana. (47)

La amibiasis es una infección del cólon causada por la amiba patógena Entamoeba histolytica, y caracterizada por fases crónicas o agudas, o por ambas, así como por un cuadro clínico variable. Los llamados portadores crónicos de quistes pueden presentar muy pocos síntomas o no tener ninguno de importancia. En otras ocasiones, la enfermedad puede caracterizarse por períodos intermitentes de estreñimiento y diarrea; algunas veces la diarrea puede ser muy intensa y las evacuaciones contener cantidades más o menos grandes de moco y sangre. (17,47,76,92,99)

Aún cuando ésta amiba vive en el intestino grueso del hombre, puede en de

terminadas ocasiones prosperar fuera en otros órganos, produciendo localizaciones extraintestinales, como lo son las amibiasis hepáticas, las pulmonares, las urinarias, etc. (99)

4.3.1.2 AMIBIASIS INTESTINALES.

Disentería amibiana o amibiasis aguda.

Por mucho tiempo las disenterías fueron consideradas como una entidad patológica definida. Después del descubrimiento de Entamoeba histolytica se supo que las disenterías pueden originarse tanto por amibas como por otros parásitos, incluso bacterias, por lo que ya se ha calificado como un síndrome, es decir un conjunto de síntomas constantes en padecimientos que pueden ser producidos por diferentes agentes etiológicos. (99)

Los síntomas cuando existen, son muy variados y muchos no pueden considerarse como respuestas específicas a la infección. Se sabe también que los individuos infectados pueden estar libres de síntomas por años para presentar una hepatitis repentina e incluso presentar absesos hepáticos. (47) Cuando el padecimiento ha avanzado además se presenta el tenesmo o pujo (falso deseo de evacuar) que en ocasiones se acompaña de fonemos de excitación del cuello de la vejiga, lo cual ocasiona micciones frecuentes y dolorosas.

La temperatura corporal rara vez se eleva a 37,5 ó 38 °C. Cuando la enfermedad declina, el estado espasmódico del cólon disminuye, los dolores disminuyen y las materias fecales evacuadas son pastosas y cubiertas de moco. (99)

4.3.1.3 DIAGNOSTICO DE AMIBIASIS.

El diagnóstico de amibiasis intestinal se basa en la demostración de Entamoeba histolytica en las heces de la persona infectada. (13,47,93,99) Cuando el individuo evacúa materia fecal formada, en general sólo se encuentran quistes. Sin embargo, en los raros casos en que la ulceración activa se encuentra limitada al recto, es posible encontrar trofozoítos en las estrias de moco sanguinoliento que se adhiere a la superficie de la muestra. Por otra parte, cuando hay diarrea activa o disentería aguda, sólo debe esperarse el hallazgo de trofozoítos. Estos no sobreviven mucho tiempo después de salir del cuerpo, especialmente cuando están expuestos al frío, pierden pronto su movilidad y los caracteres morfológicos normales sobre los cuales se basa la identificación. (Cuadro 4.3.1)

La muestra formada puede esperar antes de ser examinada, una muestra diarrea debe mantenerse caliente y estudiarse lo antes posible. (13,47)

El diagnóstico es difícil debido a que hay otros muchos parásitos que pueden producir el síndrome disenterico. Se confunde sobre todo con la disentería bacilar producida por bacilos del tipo Shiga, Flexner, Hiss, etc.

Algunos métodos para examinar las muestras son los siguientes:

Examen de muestras formadas: Ya sea con una solución yodada o sin ella. Se detecta la presencia de quistes tanto maduros como jóvenes o birucleados. (47)

Examen de muestras diarreicas: Se examina el moco sanguinoliento para en contrar trofozoitos. (47)

Examen proctoscópico: En los tipos clínicos de infección activa se obser van las lesiones características. El examen microscópico del material obtenido a través del proctoscópio revela la presencia de trofozoitos pero nunca de quis, tes. Los trofozoitos pueden identificarse fácilmente en preparaciones teñidas con hematoxilina eosina. (47)

Estudio radiológico: No es una ayuda importante para el diagnóstico porque las lesiones no son demostrables siempre con rayos X. Pero en los casos agudos se puede observar espasmo y ulceraciones. (47)

Fijación del complemento: Actualmente no se cuenta con una reacción de fi jación de complemento segura. Pero cuando se lleva a cabo bajo las mejores con, diciones puede ayudar en casos de amibiasis extraintestinal. (47)

Hemaglutinación: Puede ser de mucha utilidad en el diagnóstico de amibia sis intestinal y extraintestinal. Esta prueba requiere de una valoración ult, rior. (47)

4.3.1.4 LOCALIZACIONES AMIBIANAS EXTRAINTESTINALES.

Hepatitis amibiana: La hepatitis amibiana son complicaciones graves de la amibiasis intestinal. Esta se debe a la metástasis de la infección del olón

hacia el hígado a través de la circulación portal. El cuadro clínico es muy variable, en las formas leves y subagudas el signo más evidente puede ser la hepatomegalia ligera con poco dolor a la palpación. Por otra parte, la hepatitis amibiana aguda se caracteriza por un dolor intenso en la región hepática, toxemia, fiebre elevada y hepatomegalia dolorosa. La fiebre es casi siempre irregular e intermitente y alcanza hasta 39.5 a 40 °C. (47)

Abseso hepático amibiano: Durante los procesos amibianos intestinales, ya sean agudos o crónicos, pueden pasar las amibas, probablemente por vía sanguínea o linfática al hígado donde se localizan para producir procesos supurativos que se inician por una hepatitis con hipertrofia del órgano, el cual se hace doloroso localmente con irradiaciones hacia el hombro derecho.

Se inicia una alza en la temperatura, que suele sobrevenir con calosfríos cuando ya se inicia la supuración.

La supuración va progresando en el interior del hígado hasta que llega a formar un abseso, lleno de pus de color achocolatado característico. Este pus carece siempre de amibas, las cuales se encuentran más bien en las paredes del abseso mismo. (47,93,99)

El pronóstico es siempre grave y el diagnóstico suele ser difícil, sobre todo en los primeros tiempos y cuando el proceso está localizado en las cercanías del diafragma. El tratamiento es médico al principio y puramente quirúrgico cuando se ha formado la supuración. (93,99)

Ambiasis pulmonar: Estas localizaciones pueden ser originadas por parásitos que partan directamente del intestino o por procesos supurativos cercanos, como el absceso hepático por ejemplo.

No se producen en el pulmón focos de supuración, sino más bien lesiones broncopulmonares que se traducen por accesos de tos rebelde, diarrea, expectoración mucosanguinolenta y elevaciones térmicas que pueden llegar a 38 ó 39°C.

Ambiasis cerebral: Entamoeba histolytica causa hemorragia y licuefacción del tejido cerebral. Los síntomas varían con la localización, incluyen severos dolores de cabeza, convulsiones y delirio. (92)

Ambiasis cutánea: Las amibas causan una dolorosa ulceración de la piel que se extiende irregularmente. La base de la úlcera es tejido de granulación indoloro cubierto de residuos y coagulos sanguinolientos. (92)

Otras ambiasis: Se involucran practicamente todos los órganos viscerales, incluyendo riñones, bazo, utero, ovarios, testículos, etc. (94)

4.3.1.5 MENINGOENCEFALITIS AMIBIANA.

La familia Dinastigamoebidae, está formada por especies de vida libre que habitan suelo y agua. Son coprófilas y se encuentran principalmente en aguas estancadas, sistemas de drenaje y suelos contaminados.

A la infección causada por amibas de vida libre, se le llama meningoencefalitis amibiana, con este nombre se le conoce generalmente a ésta enfermedad, el organismo causal es Naegleria fowleri. Además existen informes de meningoencefalitis en el que las amibas identificadas pertenecen al género Acanthamoeba.

Las amibas del género Acanthamoeba generalmente viven en forma libre provocando enfermedades en animales, se les ha aislado a partir de nasofaringe de personas con infecciones en vías respiratorias altas. (6,47) Se conocen casos de ulceración de córnea ocasionada por Acanthamoeba, que producen ceguera; éste diagnóstico se apoya en la presencia de quistes en cortes histológicos. (6)

Se observan varias diferencias entre Naegleria y Acanthamoeba.

Naegleria fowleri no forma quistes en los tejidos, no responde al tratamiento con sulfadiazina, ni produce extensiones citoplásmicas semejantes a espinas; todas estas son características de Acanthamoeba.

El inmunodiagnóstico de Acanthamoeba es difícil, sin embargo, las pruebas de inmunofluorescencia y las inmunoenzimáticas han confirmado la presencia de Acanthamoeba en tejidos cerebrales de casos típicos. (6)

Los síntomas son los de una meningitis no bacteriana rápidamente progresiva (cefalalgia, letargia, convulsiones, etc.) (47)

De Naegleria fowleri, en infecciones humanas, solo se observan trofozoitos, ya que el quiste, con su núcleo único, solo está presente en la naturaleza.

	Forma	Donde se encuentran	Morfología
Excrementos líquidos	Trofozoitos	En el moco de las heces sanguinolientas	Movimiento progresivo; -- pseudopodos cristalinos: -- puede contener eritrocitos.
Excrementos formados	Quistes	En la masa fecal	Preparación salina; Cromatoides visibles, de extremos romos; núcleos no visibles, excepto después de fijarlos con formol. Preparación con yodo; 1-4-núcleos a diferentes niveles, los cromatoides no -- suelen ser visibles, excepto después de la fijación con formol.
Excrementos semiformados	Quistes Trofozoitos o ambos.	En la masa fecal	Lo mismo que arriba.

Cuadro 4.3.1 Caracteres diagnósticos de Entamoeba histolytica (47)

Se cree que la amiba ingresa al cuerpo a través de la mucosa nasal que reviste la placa cribiforme. La presentación usual de los síntomas ha sido la repentina aparición de cefalea y fiebre ligera, asociada en ocasiones a malestar en la garganta e infección nasal.

Los síntomas se acrecentan con rapidéz durante los tres días siguientes, aparecen rigidez en el cuello y vómitos. Antes de terminar una semana el paciente sufre desorientación e incluso entra en coma, lo que puede inducir a diagnositar en forma presuntiva una meningitis plogena aguda.

Los organismos se pueden cultivar en agar simple, sembrados en presencia de Escherichia coli a una temperatura de 37 °C.

La aplicación de serología puede ser de invaluable ayuda para realizar el diagnóstico de amibiasis y de meningocéfalitis amibiana.

La amibiasis invasiva provoca una respuesta humoral de anticuerpos que pueden ser detectados serológicamente. Los exámenes serológicos usuales para el diagnóstico de amibiasis han sido la hemaglutinación indirecta (IHA), la contra inmunoelectroforesis (CIEF), así como la inmunofluorescencia (IF) y pruebas inmunoenzimáticas para meningocéfalitis amibiana. (6,93)

4.3.1.6 DIAGNOSTICO DE AMIBIASIS Y MENINGOCÉFALITIS AMIBIANA POR EL ME TODO DE COAGLUTINACION.

Un método de diagnóstico es la coaglutinación, en el cual la proteína A

contenida en la pared celular de Staphylococcus aureus, es formalinizada y combinada con el anticuerpo específico contra el organismo por identificar. La coaglutinación se lleva a cabo sobre una porción de la superficie de la amiba, del trofozoíto vivo. (15)

Las reacciones inmunes se llevan a cabo entre antisueros específicos y la proteína A contenida en el Staphylococcus, formalinizada, teñida y tres trofozoítos vivos. Ya que esta interacción resulta en una adherencia visible microscópicamente de la bacteria a la amiba, se han diseñado métodos por medio de los cuales las amibas pueden ser identificadas y el anticuerpo anti-amibiano puede ser medido. (15)

La suspensión de Staphylococcus aureus recubierto con el anticuerpo específico a la amiba correspondiente (E. histolytica, N. fowleri y A. culbertsoni) se aplica a trofozoítos vivos obtenidos a partir de cultivos de amibas patógenas, presentándose una reacción de coaglutinación vigorosa. Viendo a través del microscopio, se observa que esta reacción se lleva a cabo sobre una porción de la amiba. (15)

Además también se observa que las amibas vivas podían ser tratadas con el antisuero, lavado y, subsecuentemente mezclado con el Staphylococcus que no ha sido previamente recubierto con anticuerpos específicos, produciéndose el mismo resultado. (Método Indirecto).

La reacción entre el Staphylococcus recubierto con anticuerpos y teñido

resulta en una reacción de coagulación fuerte, lo que indica que el uso de amibas vivas es un método sensible y confiable.

La adherencia bacteriana a la amiba, cuando se utiliza el *Staphylococcus* sin tefir, se ve a través del microscopio y se observa que la visibilidad no es buena para identificar la reacción de coagulación con precisión y facilidad. De ahí que se tiña el *Staphylococcus* por diferentes técnicas como lo son: con naranja de acridina que requiere el uso de microscopía fluorescente, y la otra es con azul de metileno el cual es más conveniente para los laboratorios que no cuentan con recursos, ya que, las observaciones se hacen a través de un microscopio de luz ordinaria. (15)

El método de coagulación es una técnica inmunológica útil para el estudio de amibas y posiblemente para otros protozoarios. (15)

4.3.1.7 METODOS DE CULTIVO DE LAS AMIBAS PATOGENAS.

La *Acanthamoeba culbertsoni* y la *Naegleria fowleri*, se mantienen, resemebrándolas semanalmente en tubos con medio de cultivo TSB (Caldo Soya Tripticasa) con o sin NaCl y suero de ternera, manteniéndola a 37 °C.

La *Entamoeba histolytica*, es mantenida, resemebrándola cada tres días en medio de cultivo TP-S-1 monofásico, manteniéndola a 37 °C. (15)

Para seleccionar el cultivo de amibas con desarrollo abundante, se observan

en la incubadora, se toma el tubo y se agita fuertemente para desalojar las amibas de la pared del tubo. Se abre el tubo y con una pipeta estéril se lavan las paredes de éste, con Solución Salina Amortiguada de Fosfatos (SSAFa), el contenido del tubo se centrifuga a alta velocidad durante 5 minutos, el cultivo de amibas se deja resuspendido en (SSAFa), congelando los tubos hasta su uso. (15)

4.3.1.8 OBTENCION DEL SUERO ANTIAMIBIANO.

El suero antiamibiano se obtiene en conejos, los cuales son inmunizados por vía intramuscular con las suspensiones de amibas (E. histolytica, N. fowleri y A. culbertsoni) descongeladas que deben de estar ajustadas a tener una concentración aproximada de 10^6 amibas/ml. Las inyecciones intramusculares suelen ser de un volumen 0.25 ml por inoculación a conejos, a éste volumen de antígeno se le adiciona un volumen igual de adyuvante completo de Freund.

El título de anticuerpos producidos se determina practicando una sangría de la oreja del conejo; el título optimo de anticuerpos es de 1:160 o por encima de éste. Generalmente se requieren alrededor de 60 días para la obtención del título adecuado de anticuerpos. (15)

4.3.1.9 PREPARACION DE LA SUSPENSION DE Staphylococcus CON COLORANTES.

A la suspensión de Staphylococcus aureus recubierta con el antisuero específico se lava con (SSAFa), se resuspende el sedimento en 1 ml del mismo amor

tiguador, adicionandole 0.050 ml de una solución de naranja de acridina al 1% ó 0.4 ml de azul de metileno al 2%, resuspendiendolo con (SSAfa) a completar 8 ml, manteniendo la suspensión a 4 °C hasta su uso, generalmente ésta suspensión es viable por tres semanas. (15)

Al realizar la prueba de coaglutinación se puede comprobar un alto grado de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para antígenos amibianos.

En las pruebas realizadas con las tres amibas patógenas no se presentan reacciones cruzadas, la prueba de coaglutinación se corrio conjuntamente con la prueba de inmunofluorescencia, presentando resultados casi identicos. (15)

El método de coaglutinación es un tanto más simple que el método de inmunofluorescencia, con una diferencia, que la coaglutinación se realiza con el trofozoíto vivo y no requiere ser fijado.

La coaglutinación puede ser útil con exudados nasales frescos, fluidos cerebrospinales y otros especímenes de enfermedades humanas y animales. (15)

4.3.2 DETECCION DEL FACTOR EXOGENO SECRETADO POR Leishmania sp.

Hasta fechas recientes ha sido casi imposible diferenciar las diversas especies de Leishmania que producen enfermedades en el ser humano. Por lo mismo, la especificidad se basó sobre todo en los aspectos clínicos, de donde se identificaron tres especies de leishmanias que corresponden a los tipos clínicos de leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. En los últimos años se han emplea

do otros criterios, tales como la densidad del DNA del cinétoplasto, patrones de isoenzimas y pruebas serológicas. (72)

Las diversas especies de Leishmania son transmitidas por insectos del género Phlebotomus. (72)

A la leishmaniasis cutánea también se le conoce como botón de oriente, originado por Leishmania tropica que produce una enfermedad crónica que, si no se trata, tiene una duración de un año o más; se caracteriza por lesiones secas que se ulceran hasta después de varios meses, suelen ser únicas y se presentan sobre todo en la cara, manos y lugares descubiertos. (72,99)

La leishmaniasis mucocutánea es causada por Leishmania braziliensis, el período de incubación es largo, de uno a tres meses. Después de él se presentan las primeras manifestaciones clínicas, consistentes en pequeñas máculas rojizas, pruriginosas, localizadas preferentemente en las piernas, cara, manos y demás regiones descubiertas. Las localizaciones en las mucosas son frecuentes, sobre todo en la nariz, boca y faringe, llegando a producir procesos destructivos muy extensos. A menos que se instituya un tratamiento eficaz, llegará a afectarse la mucosa nasal por completo y hasta los paladares duro y blando. Se destruye el tabique nasal pero a diferencia de las lesiones sifilíticas, los huesos quedan intactos. (72,99)

La leishmaniasis visceral, en todo el mundo se le conoce con el nombre Indio de Kala azar, es producido por Leishmania donovani. El inicio de la enfer-

medad es gradual después de un período de incubación que puede variar entre dos semanas y 18 meses. Los síntomas característicos del padecimiento son la fiebre, la anemia y la esplenomegalia. La fiebre aparece desde el principio y alcanza 39 ó 40 °C. Es irregular y remitente. La esplenomegalia aparece desde los primeros estados y se va acrecentando hasta hacer que el bazo invada la fosa ilíaca izquierda. A su vez el hígado puede crecer y es frecuente que haya derrame ascítico.

Leishmania donovani no produce lesiones cutáneas en la mayor parte de las regiones que ataca, sin embargo, en pocos pacientes se ha observado una pápula inicial. Las lesiones dérmicas pueden ser máculas eritematosas o incoloras, distribuidas en todo el cuerpo o en parches. Tiempo después las lesiones se vuelven nodulares, en ésta etapa pueden confundirse con nódulos leproso. (72)

4.3.2.1 DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS.

Leishmaniasis cutánea: El diagnóstico del botón de oriente suele hacerse por lo general, identificando los organismos de forma oval o redondeada y con la típica estructura del amastigote dentro de grandes monocitos obtenidos por aspiración del líquido que se encuentre debajo de la úlcera. Los cultivos en medio NNN del material obtenido por aspiración o biopsia pueden demostrar las formas del promastigote. La prueba de Montenegro, en la que se utiliza una inyección intradérmica de una suspensión de promastigotes muertos, es positiva en un alto porcentaje de pacientes con infección causada por Leishmania tropica. También se cuenta con pruebas de anticuerpos indirectos fluorescentes.

Leishmaniasis mucocutánea: Se confunde clínicamente con la sífilis y algunas micosis de la piel. El diagnóstico se hace de igual forma que el de la leishmaniasis cutánea. (99)

Leishmaniasis visceral: El diagnóstico definitivo se hace con la demostración de los parásitos. Esta investigación puede realizarse haciendo un frotis o gota gruesa con sangre periférica o bien con los productos extraídos por biopsia hepática, ganglios linfáticos superficiales o la médula ósea de esternón. La punción esplénica es un método eficaz aunque el procedimiento es sumamente riesgoso por las frecuentes rupturas que se producen en este órgano. La investigación de los parásitos se hace también por medio de hemocultivos, sembrando la sangre en el medio NNN. (72,99)

Las especies de Leishmania se desarrollan "in vitro" excretando una sustancia inmunológicamente activa llamada factor exógeno o excretado (FE), el cual reacciona con los anticuerpos producidos en conejos que se han inmunizado con el parásito completo. Se ha demostrado que el FE es producido por la forma amastigote intracelular del parásito. A diferencia de los antígenos somáticos, el FE es específico para cada grupo serológico de Leishmania, y por lo tanto puede ser una herramienta prometedora para la identificación del parásito por métodos serológicos. (25)

El método de coaglutinación es usado para detectar la producción del factor excretado (FE) inmunológicamente activo de Leishmania.

El Staphylococcus aureus rico en proteína A es recubierto con anticuerpos

específicos anti-leishmania, coaglutinan con una fracción del sobrenadante de los cultivos, de este modo permite hacer mediciones continuas de la excreción del (FE) por multiplicación de los parásitos. (25)

Como el FE es específico para cada grupo serológico de Leishmania, la coaglutinación ofrece la posibilidad de un diagnóstico rápido, fácil, sensible y específico, es una herramienta en la determinación de ambos, antígeno y anticuerpo en especímenes de casos sospechosos de Leishmaniasis. (25)

El reactivo de coaglutinación es preparado, con el S. aureus, cepa Cowan I rico en proteína A y anticuerpos específicos para Leishmania, producidos en conejos. Las reacciones de coaglutinación son presentadas en placas, mezclando una gota de la dilución del fluido sobrenadante del cultivo de L. tropica o L. donovani, el FE purificado o los promastigotes lavados, puestos en contacto con una gota del reactivo de Staphylococcus al 1%. Las suspensiones se mezclan cuidadosamente con un palillo aplicador y examinando la placa contra un fondo oscuro y una luz indirecta para observar la coaglutinación. Para los reactivos control, el Staphylococcus es tratado con suero normal de conejo, suero anti-E. coli, suero anti-S. typhi y suero anti Streptococcus hemolíticos del grupo A. Solo las reacciones de coaglutinación que ocurren dentro de los primeros cuatro minutos son consideradas como positivas. (25)

La detección por este método es simple y puede ser completado en poco tiempo relativamente, en contraste con los ensayos de inmunodifusión de uso corriente. (25)

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Ya que los avances recientes en inmunquímica han provisto de nuevas aproximaciones para la rápida identificación de agentes infecciosos, se realizó el presente trabajo, con la finalidad de establecer una nueva técnica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en el ser humano.

La técnica consiste en detectar antígenos solubles en fluidos corporales o en cultivos celulares infectados experimentalmente. Esto se pone de manifiesto por una reacción de aglutinación macroscópica en la cual el S. aureus (Cepa Cowan I productora de proteína A) se recubre con el anticuerpo específico contra el antígeno que se desea detectar.

La reacción de coaglutinación es una técnica inmunológica que nos ayuda en la identificación de organismos patógenos comúnmente encontrados en nuestro medio, como lo son los virus, bacterias y protozoarios.

La proteína A reacciona con el suero de los mamíferos y más específicamente con el fragmento Fc de la IgG. Por su gran afinidad con las inmunoglobulinas de múltiples especies animales se ha utilizado más frecuentemente como reactivo inmunquímico.

Dentro de la clase IgG humana, solo tienen reactividad las subclases IgG₁.

IgG₂ e IgG₄. La subclase IgG₃ no presenta reactividad, esto posiblemente sea debido a su secuencia de aminoácidos en la cadena H, esto comprende del 1 al 3% del total de las inmunoglobulinas humanas. La IgM e IgA producidas en mieloma reaccionan bien con la proteína A.

Entre las ventajas que presenta la técnica de coaglutinación podemos decir que:

La reacción entre la proteína A y el sitio de combinación de la molécula de IgG es casi instantánea por lo que la identificación puede hacerse rápidamente. Cuando los anticuerpos específicos se ponen en contacto con el antígeno correspondiente, la reacción nos da una aglutinación macroscópica la cual es fácilmente visible.

Es una técnica que tiene gran sensibilidad y especificidad además de ser rápida y sencilla en su realización, los reactivos son económicos, relativamente estables, no hay riesgo en ninguno de ellos al manejarlos y su lectura no requiere de personal entrenado ni de aparatos complicados y costosos.

La falta de reactividad de IgG₃ es uno de los inconvenientes que presenta la técnica de coaglutinación, aunque no influye mucho ya que la proporción de ésta subclase de IgG es pequeña.

Otro de los inconvenientes que se presentan al realizar las pruebas con la técnica de coaglutinación son, la aglutinación múltiple y las auto

aglutinaciones. Estos problemas son corregidos por observación de la reacción dentro de un período de tiempo corto (1 a 3 minutos), por tratamiento de la suspensión de organismos con tripsina, por el empleo de células libres tomadas del sobrenadante del medio de cultivo y por extracciones con soluciones de ácidos calientes o enzimáticas en el caso de *Streptococcus* β hemolíticos.

Quando se presentan reacciones cruzadas entre los organismos se adsorbe el antisuero antes de usarlo para unirlo a la proteína A. (5,42,77) También es recomendado hacer una suspensión de varias colonias, calentarlas en un baño de agua a 80 °C por 20 minutos y enfriarlas a temperatura ambiente para volver a realizar la prueba. (2,91)

Hay algunas variantes a la técnica de coaglutinación en las cuales el *S. aureus* no se utiliza completo sino que la proteína A es purificada y el antígeno o el anticuerpo es marcado con isotopos radioactivos o algunas enzimas. (82) Este tipo de inmunoensayos se han utilizado para detectar antígenos o anticuerpos como lo son los de Citomegalovirus, (71,114) Rabia, (3) *V. zoster*, (81) y de *Treponema pallidum*. (117)

En conclusión la técnica de coaglutinación es presentada muy fácilmente, siendo específica para IgG, y muy sensible cuando las condiciones son optimas, primero para la unión entre la proteína A y la porción Fc de la IgG y luego con su antígeno homólogo. Esta técnica aparece con un gran potencial para el estudio de la respuesta inmune específica en enfermedades humanas y experimentales. Además puede ser aplicada en los diagnósticos serológicos de la mayoría de las enfermedades infecciosas.

CAPITULO VI

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

- 01.- Al-Nakib, W. (1981) Trypsinised human O erythrocytes in the detection of rubella-specific IgM sera fractionation on sucrose density gradient and absorption with Staphylococcal protein A. *J. Clin. Pathol.* 34: 670-673.
- 02.- Arvilommi, H., Uurasmaa, O. & Nurkkala, A. (1978) Rapid Identification of Group A, B, C and G Beta-Haemolytic Streptococci by a Modification of the Co-agglutination Technique, Comparison of results obtained by Co-agglutination, Fluorescent antibody Test, Counterimmunoelectrophoresis and Precipitin Technique. *Acta Path. Microbiol. Scand. sect. B*, 86: 107-111.
- 03.- Atanasiu, P., & Perrin, P. (1979) Micromethod for rabies antibody detection by immunoenzymatic assay with Staphylococcus protein A. *Ann. Microbiol. (Paris)* 130 A: 257-268.
- 04.- Barnett, Foster, D.E., Sjonquist & Painter, R.H. (1982) The Effect of Fragment B of Staphylococcal protein A on the binding of rabbit IgG to human granulocytes and monocytes. *Molecular Immunol.* 19: 407-412.
- 05.- Barnham, M. & Glynn, A.A. (1978) Identification of Clinical Isolates of Neisseria gonorrhoeae by coagglutination test. *J. Clin. Pathol.* 31: 189-193.
- 06.- Beck, J.W., & Davis, J.E. (1984) *Parasitología Médica*, Ed. Interamericana 3ª Edición, pag's 33-39.
- 07.- Bjork, I., Petersson, B.A. & Sjonquist, J. (1972) Some Physicochemical properties of protein A from Staphylococcus aureus. *Eur. J. Biochem.* 29: 579-584.
- 08.- Brada, D. & Roth, J. (1984) "Golden Blot"- Detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A-gold

complexes. Analytical Biochem. 142: 79-83.

- 09.- Brill, B.M. Wasilauskas, & Richardson, S.H. (1979) Adaptation of Staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 9: 49-55.
- 10.- Brunda, M.J., Minden, P. & cols. (1977) Precipitation of radiolabeled antigen-antibody complexes with protein A-containing Staphylococcus aureus. J. Immunol., 119: 193-198.
- 11.- Bruner, H., Schaeg, W., Bruck, U. & cols. (1977) A Staphylococcal radioimmunoassay for detection of antibodies to Mycoplasma pneumoniae. Med. Microbiol. Immunol. 163: 25-35.
- 12.- Carlson, J.R. & McCarthy, L.R. (1979) Modified coagglutination procedure for serological grouping of Streptococci. J. Clin. Microbiol. 9: 329-332.
- 13.- Chandler, A.C. & Read, C.P. (1958) Introduction to Parasitology: With special reference to the parasites of man. New York, John Wiley, pag's 43-77.
- 14.- Cleveland, P.H., Richman, D.D. & cols. (1979) Immobilization of viral antigens on filter paper for a (¹²⁵I) Staphylococcal protein A immunoassay a rapid and sensitive technique for detection of Herpes simplex virus antigens and antiviral antibodies. J. Immunol. Methods, 29: 369-386.
- 15.- Crowter, J.R. & Abu Elzein, E.M.E. (1980) Detection of antibodies against foot and mouth disease virus using purified Staphylococcus a protein conjugated with alkaline phosphatase. J. Immunol. Methods, 34: 261-267.
- 16.- Culbertson, C.G. & Harper, K. (1980) Surface coagglutination with formalized, stained protein A Staphylococci in the immunologic study of three pathogenic amebae. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29(5): 785-794.
- 17.- Cullen, S.E. & Schwartz, B.D. (1976) An improved method for isolation of

- H-2 and Ia alloantigens with immunoprecipitation induced by protein A-bearing Staphylococci. *J. Immunol.*, 117: 136-142.
- 18.- Danielsson, D. & Olcén, P. (1979) Rapid serotyping of groups A, B and C meningococci by rocket-line immunoelectrophoresis and co-agglutination. *J. Clin. Pathol.* 32: 136-142.
- 19.- Danielsson, D. & Sandstrom, E. (1979) Serology of Neisseria gonorrhoeae. Demonstration of strain-specific antigens by immunoelectrophoresis and coagglutination techniques. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 87: 55-64.
- 20.- Danielsson, D. & Sandstrom, E. (1980) Serology of Neisseria gonorrhoeae. Demonstration by co-agglutination and immunoelectrophoresis of antigenic differences associated with colour/opacity colonial variants. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 88: 39-46.
- 21.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. (1979) *Tratado de Microbiología*. 2ª Edición, Salvat Editores, S.A., México.
- 22.- Deisenhofer, J. (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9 and 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, 20: 2361-2370.
- 23.- De León, Ch. S. (1986) Detección de antígenos solubles en LCR por reacciones de coaglutinación, para efectuar el diagnóstico de meningitis causada por Haemophilus influenzae. Facultad de Química.
- 24.- Dirks-Co, S.I.S. & Zanen, H.C. (1978) Latex agglutination, counterimmunoelectrophoresis, and protein A co-agglutination in diagnosis of bacterial meningitis. *J. Clin. Pathol.* 31: 1167-1171.
- 25.- Dishon, T. & Slutzky, G.M. (1981) Coagglutination and indirect haemaggluti

- nation in the detection of an excreted immunologically active substance from *Leishmania*. *Israel J. Med. Sci.* 17: 245-248.
- 26.- Edwards, E.A. & Hilderbrand, R.L. (1976) Method for identifying *Salmonella* and *Shigella* directly from the primary isolation peak by coagglutination of protein A containing *Staphylococci* sensitized with specific antibody. *J. Clin. Microbiol.* 3: 339-343.
- 27.- Espersen, F., Clemmensen, I. & cols. (1984) Human serum and plasma increase mouse mortality in *Staphylococcus aureus* intraperitoneal infection. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 92: 305-310.
- 28.- Espersen, F. & Hedstrom, S.A. (1982) Precipitating antibodies against *Staphylococcus aureus* in experimental rabbit osteomyelitis, investigated by means of quantitative immunoelectrophoretic methods. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 90: 211-216.
- 29.- Ferry, B.J. (1980) The epidemiology of congenital rubella. Symposium on po tency and efficacy of vaccines held in Manila, Philippines. Smith-Kline, RIT, Febraury, pag's 21-22.
- 30.- Field, P.R., Shanker, S. & Murphy, A.M. (1980) The use of protein A-sepharose affinity chromatography for separation and detection of specific IgM antibody in acquired rubella infection: A comparison with absorption by *Staphylococci* containing protein A and density gradient ultracentrifugation. *J. Immunol. Methods*, 32: 59-70.
- 31.- Figenschau, K.J. & Ulstrup, J.C. (1974) *Staphylococcal* radioimmunoassay for Hepatitis B antigen and antibody. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 82: 422-428.
- 32.- Filice, G.A., Yeager, A.S. & cols. (1980) Diagnostic significance of immuno

globulin M antibodies to Toxoplasma gondii detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies.

J. Clin. Microbiol. 12: 336-342.

- 33.- Finch, R.G. & Phillips, I. (1977) Serological grouping of Streptococci by a slide coagglutination method. J. Clin. Pathol. 30: 168-170.
- 34.- Forsgren, A. & Sjonquist, J. (1966) "Protein A" from S. aureus. I. Pseudo-Immune reaction with human γ -globulin.
J. Immunol., 97: 822-827.
- 35.- Fudenberg, H.H., Stites, D.P. & cols. (1980) Immunología Clínica, 2^a Ed. Editorial, El Manual Moderno S.A., México, pag's 23-39.
- 36.- González, A.H. y López, R.R. (1980) Proteína A en Staphylococcus aureus: cuantificación por microhemaglutinación. Arch. Invest. Méd. (México). 11: 497-506.
- 37.- Grov, A., Myklestad, B. & cols. (1964) Immunochemical studies on antigen preparations from Staphylococcus aureus.
Acta Pathol. Microbiol Scand. Sect. C, 61: 588-596.
- 38.- Gustafson, G.T., Sjonquist, J. & Stalenheim, G. (1967) "Protein A" from Staphylococcus aureus. II. Arthus-like reaction produced in rabbits by protein A and human γ -globulin. J. Immunol., 98: 1178-1181.
- 39.- Gustafson, G.T., Stalenheim, G. & cols. (1968) "Protein A" from Staphylococcus aureus. IV. Production of anaphylaxis-like cutaneous and systemic reactions in non-immunized guinea pigs.
J. Immunol., 100: 530-534.
- 40.- Gutiérrez, R.A. (1981) Identificación de Streptococcus del grupo A por reacción de coagglutinación. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

- 41.- Hamilton, R.G., Sobotka, A.K. & cols. (1979) Solid phase radioimmunoassay for quantitation of antigen-specific IgG in human sera with 125 I-protein A from Staphylococcus aureus. J. Immunol., 122: 1073-1079.
- 42.- Hampton, K.D., Stallings, R.A. & Wasilaukas, B.L. (1979) Comparison of a slide coagglutination technique with the minitek sistem for confirmation of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol. 10: 290-292.
- 43.- Handsher, R. & Fogel, A. (1977) Modified Staphylococcal absorption method used for detecting Rubella-Specific immunoglobulin M antibodies during a Rubella epidemic. J. Clin. Microbiol. 5: 588-592.
- 44.- Hanson, D.C., Yguerabide, J. & Schumaker, V.N. (1985) Rotational dynamics of immunoglobulin G antibodies anchored in protein A soluble complexes. Molecular Immunol.; 22: 237-244.
- 45.- Hjelm, H., Sjon Dahl, J. & Sjonquist, J. (1975) Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochem. 57: 395-403.
- 46.- Horstmann, D.M. (1971) Review Rubella; The challenge of it's control. J. Infect. Dis. 123: 640-654.
- 47.- Hunter, F.S. (1973) Manual de Medicina Tropical. 3^a Ed. Editorial, Prensa Médica Mexicana, México. pag's 330-353.
- 48.- Hovanec, D.L. & Gorzynski, E.A. (1980) Coagglutination as an expedient for grouping Escherichia coli associated with urinary tract infections. J. Clin. Microbiol. 11: 41-44.
- 49.- Howell-Saxton, E. & Wettstein, F.O. (1978) Immunoglobulin M synthesized by human lymphoblastoid cells: interaction with Staphylococcus aureus and protein A. J. Immunol., 121: 1334-1340.

- 50.- Jahrling, P.B., Hesse, R.A. & Metzenger, J.R. (1978) Radioimmunoassay for quantitation of antibodies to alphaviruses with Staphylococcal protein A. *J. Clin. Microbiol.* 8: 54-60.
- 51.- Jonsson, P., Lindberg, M. & cols. (1985) Virulence of Staphylococcus aureus in a mouse mastitis model: Studies of alpha hemolysin, coagulase and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect. Immun.*, 49: 765-769.
- 52.- Juhlin, I. & Winblad, S..(1973) Serotyping of Mycobacteria by a new technique using antibody globulin adsorbed to Staphylococcal protein A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 81: 179-180.
- 53.- Kearney, R., Chia, E. & Basten, A. (1975) Detection of membrane associated antigens on lymphoid cells by antibody coupled to Staphylococcal protein A. *J. Immunol.*, 114: 1143-1146.
- 54.- Kessler, S.W. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters on the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.*, 115: 1617-1624.
- 55.- Kessler, S.W. (1976) Cell membrane antigen isolation with the Staphylococcal protein A-antibody adsorbent. *J. Immunol.*, 117: 1482-1490.
- 56.- Kinsman, O.S., White, M.I. & Noble, W.C. (1981) Inflammatory reactions to Staphylococcal protein A in mice. *Br. J. Exp. Path.* 62: 142-145.
- 57.- Kirkegaard, M.K. & Field, C.R. (1977) Rapid slide coagglutination test for identifying and typing group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 6: 266-270.

- 58.- Kurstak, E. & Kurstak, C. (1977) Competitive diagnosis of viral disease human and related viruse. Part A, vol. I Academic Press, New York.
- 59.- Kosunen, T.U., Danielsson, D. & Kjellander, J. (1980) Serology of Campylobacter fetus ss. jejuni. ("Related" Campylobacters). Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 88: 207-218.
- 60.- Kosunen, T.U., Danielsson, D. & Kjellander, J. (1982) Serology of Campylobacter fetus ss. jejuni. 2.- Serotyping of live bacteria by slide, latex and coagglutination test. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 90: 191-196.
- 61.- Kronvall, G. & Williams, Jr., R.C. (1969) Differences in antiprotein A activity among IgG subgroups. J. Immunol., 103: 828-833.
- 62.- Kronvall, G. & Frommel, D. (1970) Definition of Staphylococcal protein A reactivity for human immunoglobulin G fragments. Immunochemistry, 7: 124-127.
- 63.- Kronvall, G., Grey, H.M. & Williams, Jr., R.C. (1970) Protein A reactivity with mouse immunoglobulins. Structural relationship between some mouse and human immunoglobulins. J. Immunol., 105: 1116-1123.
- 64.- Kronvall, G. (1973) A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A containing Staphylococci. J. Med. Microbiol. 6: 187-190.
- 65.- Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C.A. & Hoepflich, P.D. (1979) Occurrence of protein A in Staphylococcus aureus and closely related Staphylococcus species. J. Clin. Microbiol. 10: 752-753.
- 66.- Langone, J.J., Boyle, M.D.P. & Borsos, T. (1978) Studies on the interaction between protein A and immunoglobulin G. I.- Effect of protein A on the func

- tional activity of IgG. *J. Immunol.*, 121: 327-332.
- 67.- Langone, J.J., Boyle, M.D.P. & Borsos, T. (1978) Studies on the interaction between protein A and immunoglobulin G. II.- Composition and activity of complex formed between protein A and IgG. *J. Immunol.*, 121: 333-338.
- 68.- Leland, D.S., Lachapelle, R.C. & Wlodarski, F.M. (1978) Method for rapid detection of group B Streptococci by coagglutination. *J. Clin. Microbiol.* 7: 323-326.
- 69.- Lindmark, R. (1982) Estimation of the secondary structure of protein A from Staphylococcus aureus by cd-spectroscopy. *Molecular Immunol.*, 19: 957-959.
- 70.- Mackenzie, M.R., Warner, N.L. & Mitchell, G.F. (1978) The binding of marine immunoglobulins to Staphylococcal protein A. *J. Immunol.*, 120: 1493-1496.
- 71.- Madore, H.P. & Baumgarten, A. (1979) Enzyme-Linked Protein A: an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay reagent for detection of human immunoglobulin G and virus-specific antibody. *J. Clin. Microbiol.* 10: 529-532.
- 72.- Markell, E.K. & Voge, M. (1984) Parasitología, prevención, diagnóstico y tratamiento. 5^a Edición, Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., México, D.F., pag's 129-140.
- 73.- Miller, E., Cradock-Watson, J.E. & cols. (1982) Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet*, 2: 781-784.
- 74.- Mogensén, S.C. & Dishon, T. (1981) The use of Staphylococcus aureus rich in protein A in the detection of Herpes simplex virus antigens. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 89: 427-432.
- 75.- Movitz, J. (1974) A study on the biosynthesis of protein A in S. aureus. *Eur. J. Biochem.* 48: 131-136.

- 76.- Noble, E.R. (1965) Parasitología, Biología de los parasitos animales, 2^a Edición, Editorial, Interamericana, México, D.F. pag's 101-111.
- 77.- Oloén, P., Danielsson, D. & Kjellander, J. (1978) Laboratory identification of pathogenic Neisseria with special regard to atypical strains: An evaluation of sugar degradation, immunofluorescence and co-agglutination test. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 86: 327-334.
- 78.- Olsén, O.W. (1962) Animal parasites. Their life cycles and ecology. 3rd Ed., University Park Press E.U. pag's 76-83.
- 79.- Olvick, O. & Berdal, B.P. (1981) A sensitive ELISA method for protein A detection. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 89: 289-290.
- 80.- Potgieter, L.N.D., Rouse, B.T. & cols. (1980) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, using Staphylococcal protein A for detecting virus antibodies. Am. J. Vet. Res. 41: 978-980.
- 81.- Richman, D.D., Cleveland, P.H. & cols. (1981) A rapid radioimmunoassay using (¹²⁵I)-labeled Staphylococcal protein A for antibody to Varicella-zoster virus. J. Infect. Dis. 143: 693-699.
- 82.- Richman, D.D. (1983) The use of Staphylococcal protein A in diagnostic virology. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 104: 159-176.
- 83.- Richman, D.D., Cleveland, P.H. & cols. (1982) The binding of Staphylococcal protein A by sera of different animal species. J. Immunol., 128: 2300-2305.
- 84.- Rockhill, R.C., Rumans, L.W. & cols. (1980) Detection of Salmonella typhi D, Vi and d antigens, by slide coagglutination in urine from patients with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 11: 213-216.
- 85.- Russell, M.R., Crowder, J.G. & White, A. (1967) Human reactions to Staphylo

- coccal antigens. A possible role of leukocyte lysosomal enzymes.
J. Immunol., 99: 269-275.
- 86.- Russell, P.K. (1985) Alphavirus (Eastern, Western and Venezuelan Equine Encephalitis). Infectious Diseases and their etiologic agents, Chapter 116, part III, pages 917-920.
- 87.- Sandstrom, E. & Danielsson, D. (1980) Serology of Neisseria gonorrhoeae. Characterization of rabbit hyperimmune antisera by line-rocket immunoelectrophoresis for use in coagglutination.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 88: 17-26.
- 88.- Sandstrom, E. & Danielsson, D. (1980) Serology of Neisseria gonorrhoeae. Classification by coagglutination.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 88: 27-38.
- 89.- Seligson, D. (1978) Handbook Series in Clinical Laboratory Science. CRC Press Edit. in Chif. pages 222-223.
- 90.- Sakane, T. & Green, I. (1978) Protein A from Staphylococcus aureus a mitogen for human T lymphocytes and B lymphocytes but not L lymphocytes.
J. Immunol., 120: 302-311.
- 91.- Shanker, S., Daley, D. & Sorrell, T.C. (1981) A rapid slide coagglutination test an alternative to the fluorescent antibody test for identification of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Pathol. 34: 420-423.
- 92.- Shawitz, W.G. (1956) Medical Parasitology. 2nd Edition, Mc Graw-Hill Book Co. Inc. pag's 6-25.
- 93.- Sheehan, D.J., Bottone, E.J. & cols. (1979) Entamoeba histolytica: Efficacy of microscopic, cultural and serological techniques for laboratory diagnosis.
J. Clin. Microbiol. 10: 128-133.

- 94.- Sjöholm, I., Bjerken, A. & Sjöquist, J. (1973) Protein A from Staphylococcus aureus. XIV. The effect of nitration of protein A with tetranitromethane and subsequent reduction.
J. Immunol., 110: 1562-1569.
- 95.- Sjöquist, J. & Stalenheim, G. (1969) Protein A from Staphylococcus aureus. IX. Complement-fixing activity of protein A-IgG complex.
J. Immunol., 103: 467-473.
- 96.- Sjöquist, J., Movitz, J. & cols. (1972) Localization of protein A in the bacteria. Eur. J. Biochem. 30: 190-194.
- 97.- Sjöquist, J., Meloun, B. & Hejelm, H. (1972) Protein A isolated from Staphylococcus aureus after digestion with lysostaphin.
Eur. J. Biochem. 29: 572-578.
- 98.- Skaug, K. & Gaarder, P.I. (1978) An indirect immunofluorescent antibody test for determination of rubella virus specific IgM antibodies.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C, 86: 33-35.
- 99.- Soberón, G.P. y Fernández, D.P. (1962) Nociones de Parasitología Médica y Parasitología Tropical. Libro de Medicina, México. pag's 48-67 y 101-111.
- 100.- Stoner, R.A. (1978) Bacitracin and coagglutination for grouping of beta-hemolytic Streptococci. J. Clin. Microbiol. 7: 463-466.
- 101.- Suksanong, M. & Dajani, A.S. (1977) Detection of Haemophilus influenzae type b antigens in body fluids, using specific antibody-coated Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 5: 81-85.
- 102.- Svenungsson, B. & Lindberg, A.A. (1978) Identification of Salmonella bacteria by co-agglutination, using antibodies against synthetic disaccharide protein antigens 02, 04 and 09, adsorbed to protein A-containing Staphylococcus. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 86: 283-290.

- 103.- Svenungsson, B. & Lindberg, A.A. (1979) Diagnosis O-antigen 8 for immunofluorescence and co-agglutination using sensitized protein A-containing Staphylococci. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 87: 29-36.
- 104.- Sveen, K. & Grov, A. (1978) Induction of leukochemotaxis by protein A of Staphylococcus aureus. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 86: 369-373.
- 105.- Szilagyi, G., Mayer, E. & Eidelman, A.I. (1978) Rapid isolation and identification of group B Streptococci from selective broth medium by slide co-agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 8: 410-412.
- 106.- Thirumoorthi, M.C. & Dajani, A.S. (1979) Comparison of Staphylococcal coagglutination, latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for bacterial antigen detection. *J. Clin. Microbiol.* 9: 28-32.
- 107.- Tucker, D.F., Begent, R.H.J. & Hogg, N.M. (1978) Characterization of immune complexes in serum by adsorption on Staphylococcal protein A: Model studies and application to sera of rats bearing a gross virus-induced lymphoma. *J. Immunol.*, 121: 1644-1651.
- 108.- Wadstrom, T., Bjornberg, S. & Hjerten, S. (1985) Hydrophobized wound dressing in the treatment of experimental Staphylococcus aureus infections in the young pig. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 93: 359-363.
- 109.- Woxman, N.N. & Wolinsky, J. (1982) Immunochemical identification of rubella virus haemagglutinin. *Virology*. 126: 194-203.
- 110.- Webb, B.J. Edwards, M.S. & Baker, C. (1980) Comparison of slide coagglutination test and countercurrent immunoelectrophoresis for detection of group B Streptococcal antigen in cerebrospinal fluid from infants with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 11: 263-265.
- 111.- White, M.I. & Noble, W.C. (1985) The cutaneous reaction to Staphylococcal protein A in normal subjects and patients with atopic dermatitis or psor-

- riasis. Br. J. Dermatol. 113: 179-183.
- 112.- Yamada, S. & Matsumoto, A. (1984) Localization of protein A on the cell surface of Staphylococcus aureus Cowan I and protein A deficient strains. J. Electron Microsc. 33: 172-174.
- 113.- Yolken, R.H. & Leister, F.J. (1981) Staphylococcal protein A enzyme immuno globulin conjugates: versatile tools for enzyme immunoassays. J. Immunol. Methods, 43: 209-218.
- 114.- Yolken, R.H. & Stopa, P.J. (1980) Comparison of seven enzyme immunosorbent systems for measurement of cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 11: 546-551.
- 115.- Yoshida, A., Mudd, S. & Lenhart, N.A. (1963) The common protein agglutino gen of Staphylococcus aureus. II. Purification, chemical characterization and serologic comparison with Jensen's antigen. J. Immunol. 91: 777-782.
- 116.- Young, H. & Reid, K.G. (1984) Immunological identification of Neisseria gonorrhoeae with monoclonal and polyclonal antibody coaggluti nation reagents. J. Clin. Pathol. 37: 1276-1281.
- 117.- Zeltzer, P.M., Repose, J.S. & cols. (1978) Microassay for immunoglobulin G antibodies to Treponema pallidum with radioiodinated protein A from Staphylococcus aureus: Immunoglobulin G response in experimental syphilis in rabbits. Infect. Immun. 21: 163-170.
- 118.- Zimmerman, S.E. & Smith, J.W. (1978) Identification and grouping of Neisseria meningitidis directly on agar plates by coagglutination with specific antibody coated protein A-containing Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 7: 470-473.