

302927

Universidad femenina
de México



UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

REVISION BIBLIOGRAFICA DE LOS ANTICUERPOS
MONOCLONALES OBTENIDOS A PARTIR DE
LOS DIFERENTES DETERMINANTES
ANTIGENICOS DE ESCHERICHIA COLI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

ESPERANZA JUAREZ DEVEAUX



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F. 1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pag.
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
CAPITULO II. OBJETIVOS	3
CAPITULO III. GENERALIDADES	4
3.1. Anticuerpos monoclonales	4
3.1.1 Caracterización de la respuesta in- mune	4
3.1.2 Producción de anticuerpos monoclonales	6
3.1.3 Ventajas y desventajas	7
3.2. <u>Escherichia coli</u>	9
3.2.1 Etiología	9
3.2.2 Estructura antigénica	10
3.2.3 Diversas infecciones causadas por - <u>Escherichia coli</u>	13
CAPITULO IV. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES - FRENTE A LOS DIFERENTES EPITOPES DE <u>E. coli</u>	15
4.1. Lipopolisacáridos	15
4.2. Pili ó fimbrias	19
4.3. Proteínas	21
4.3.1 Proteína recA	22
4.3.2 Proteína TraT	23
4.3.3 Proteínas ribosomales L7/L12 y L2 .	24
4.4. Enzimas	25
4.4.1 Piruvato oxidasa	25
4.4.2 RNA polimerasa	26
4.4.3 Glutamina sintetasa	27
4.4.4 DNA polimerasa	28
4.4.5 Ribonucleotido reductasa	29

	Pag.
4.4.6 Hemolisinas	30
4.4.7 Citocromo d terminal oxidasa	30
4.5. Enterotoxinas	31
4.6. Producción de anticuerpos monoclonales - (MAbs)	35
4.6.1 Inmunización	35
4.6.2 Hibridación	35
4.6.3 Fluido ascítico	37
CAPITULO V. TECNICAS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	39
5.1. Técnicas de aglutinación	39
5.1.1 Hemaglutinación pasiva	39
5.1.2 Coaglutinación	40
5.1.3 Ensayos de inhibición de la hema <u>glu</u> tinación	41
5.2. Técnicas de precipitación	41
5.2.1 Inmunodifusión	41
5.2.2 Inmunolectroforesis (IEF)	42
5.2.3 Radio inmuno precipitación (RIP) ..	43
5.2.4 Electroforesis en gel de poliacrila mida (SDS-PAGE)	44
5.2.5 Papel de nitrocelulosa (Western - blot)	44
5.2.6 Radio inmuno análisis (RIA)	45
5.3. Tecnicas inmunohistoquimicas	46
5.3.1 Ensayo inmuno enzimático (ELISA) ..	46
5.3.2 GEL-ELISA	47
5.3.3 Ensayo de la actividad enzimática..	48

5.3.4	Medición de la inhibición de Ubiquinol-1 y de la actividad oxidasa de <u>ThiPD</u> por la utilización de IAbs ...	48
5.3.5	Inmunofluorescencia directa e indirecta	49
5.4.	Otras técnicas específicas	50
5.4.1	Ensayo de adherencia bacteriana ...	50
5.4.2	Ensayo de neutralización	50
5.4.3	Microscopio electrónico	52
CAPITULO VI.	RESULTADOS	53
6.1.	Lipopolisacáridos	53
6.2.	Pili ó fimbrias	59
6.3.	Proteínas	64
6.3.1	Proteína recA	64
6.3.2	Proteína TraT	65
6.3.3	Proteínas ribosomales L7/L12 y L2 .	66
6.4.	Enzimas	67
6.4.1	Piruvato oxidasa	67
6.4.2	RNA polimerasa	68
6.4.3	Glutamina sintetasa	68
6.4.4	DNA polimerasa	69
6.4.5	Ribonucleotido reductasa	71
6.4.6	Hemolisinas	72
6.4.7	Citocromo d terminal oxidasa	72
6.5.	Enterotoxinas	73
CAPITULO VII.	CONCLUSIONES	75
CAPITULO VIII	BIBLIOGRAFIA	77

CAPITULO I

INTRODUCCION

El desarrollo de anticuerpos monoclonales conjuga una serie de conocimientos diferentes y no relacionadas entre sí, tales como: cultivo, genética, metabolismo y bioquímica de células tumorales, así como expresión de los genes para inmunoglobulinas. Actualmente los anticuerpos monoclonales se están usando para resolver problemas prácticos y hacer investigaciones en áreas tales como: enfermedades causadas por microorganismos, pruebas clínicas del laboratorio, células cancerosas, estudios de las diferentes células que participan en la respuesta inmune y otras áreas de importancia para la salud (24).

La técnica de la formación de hibridomas, descrita por Köhler y Milstein en 1975, permitió a los inmunólogos preparar grandes cantidades de anticuerpos que son completamente homogéneos química, física e inmunológicamente (71).

La idea central de la técnica es el fusionar una célula normal, productora de anticuerpos, con una célula de mieloma, con lo cual se obtiene una célula híbrida capaz de producir el anticuerpo que formaba la célula normal y que conserva además la capacidad de crecimiento ilimitado de la célula de mieloma. A la célula híbrida se le conoce como hibridoma. Estas moléculas se libran entonces de reacciones cruzadas y de inespecificidad (20,71).

La demostración de la actividad de los anticuerpos monoclonales en los diferentes determinantes antigénicos ó epítopes, son mostrados por métodos como; inmunoblot, hemaglutinación

nación, coagulación, ensayo inmuno enzimático (ELISA), - electroforesis, SDS-PAGE, etc.

Los anticuerpos monoclonales actúan específicamente en cada determinante antigénico de Escherichia coli, esta bacteria produce enterotoxinas que causan una gran variedad de enfermedades diarreicas, que van desde una grave enfermedad de tipo cólera, observada tanto en niños como en adultos, hasta el cuadro menos grave, conocido como "diarrea del turista", observada con frecuencia en México entre viajeros norteamericanos (8,33,37). Así, tenemos los anticuerpos monoclonales - producidos para los determinantes antigénicos de la pared celular de Escherichia coli, compuesta por 3 partes principales: Polisacárido O, región central y lípido A (37). En estas partes, los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de mutantes de Escherichia coli y estos inhiben la acción de los determinantes antigénicos y sus subunidades.

En la parte estructural de Escherichia coli, el pili ó fimbrias, los cuales producen adherencia a las células del huésped, se producen anticuerpos para inhibir esta característica, actuando en los receptores del pili (37).

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) produce 2 enterotoxinas que son: una toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (TE) (37), donde la producción de anticuerpos monoclonales para enterotoxinas sirven para caracterizarlas e inhibir su actividad. También se producen contra las diferentes proteínas, enzimas, en la síntesis de nucleótidos y en la respiración aerobia.

CAPITULO II
O B J E T I V O S

- El presente trabajo tiene como objetivo primordial - investigar, informar y difundir los aspectos técnicos de un nuevo procedimiento propuesto, denominado "Obtención de anticuerpos monoclonales a partir de los diferentes determinantes antigénicos de Escherichia coli", tomando como base la técnica de hibridación de Köhler y Milstein.

- Otra meta es la enunciación de las ventajas y desventajas de los anticuerpos monoclonales, para su utilización como antisuero en pacientes con problemas inmunitarios, así como en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades producidas por Escherichia coli.

CAPITULO III

GENERALIDADES

3.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES

3.1.1 CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune juega un papel importante frente a los agentes infecciosos y desarrolla una protección contra los más patógenos de nuestra medio. Los anticuerpos son generados en respuesta a sustancias extrañas ó antígenos, además sirven como reactivos efectivos para el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades (24).

La especificidad del anticuerpo para los antígenos, es debido a que reconocen partes discretas de la molécula conocidos como "determinantes antigénicos". Cada antígeno tiene un número limitado de determinantes; así, una proteína como la albúmina, tiene de cinco a seis. Estos determinantes, en general, corresponden a la pared de la molécula expuesta en una estructura tridimensional nativa.

La capacidad de inducir anticuerpos por un antígeno dado, depende de factores bien conocidos (por ejemplo: peso molecular, presentación, vía de inoculación, dosis, etc) pero, a nivel de sus determinantes antigénicos, cada uno de ellos tiene una inmunogenicidad diferente, que depende de su estructura química y de la composición genética del animal inmunizado (25).

En el caso de que el estímulo antigénico sea dado por varios antígenos diferentes al mismo tiempo (por ejemplo un microorganismo), la respuesta contra cada uno de los antígenos

nos va a depender, además de los factores antes mencionados, de la concentración relativa de cada uno de ellos, así como de una serie de influencias que tiene la respuesta inmune para unos u otros antígenos (competencia antigénica, cooperación, supresión) (20).

De acuerdo a la teoría selectiva clonal de Burnet, un linfocito B expresa en su membrana un solo tipo de anticuerpo que le sirve de receptor para el antígeno, y los descendientes de ese linfocito siguen expresando el mismo receptor, formando lo que se llama una clona de linfocitos. La capacidad de formar un millón de anticuerpos diferentes, se debe a que existen en el organismo un millón de clonas diferentes.

Cuando un animal es estimulado por un antígeno, cada determinante antigénico activará a las clonas cuyo receptor le sea complementario. Esta complementariedad puede ser desde muy buena hasta regular, de lo cual resulta que los anticuerpos producidos cubren una gama de afinidades que van desde muy alta a baja.

El número de clonas que activa cada determinante antigénico ó epitope es variable, pero en general es alto (entre 10 y 80). Cada animal responde con clonas diferentes al mismo determinante antigénico, observándose también entre individuos que tengan su información genética idéntica (20).

La respuesta del receptor de un linfocito B con un antígeno, si sobrepasa cierto umbral de afinidad, dará como resultado que el linfocito se active y se transforme en una célula plasmática, liberando el anticuerpo. Al principio, la célula plasmática produce anticuerpos IgM, después cambia a

la producción de IgG, pero sin variar la especificidad de anticuerpo y después puede cambiar a la producción de IgA ó IgE, sin variar tampoco la especificidad del anticuerpo (20, -57).

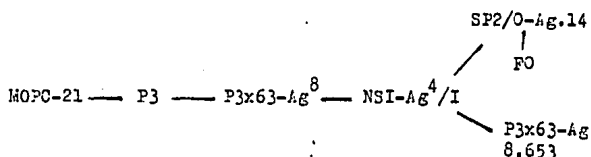
3.1.2 PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Primero se inmuniza un ratón con el antígeno deseado, luego se extraen los linfocitos del bazo y se fusionan, mediante el virus Sendai ó polietilenglicol (como agente fusioante), a una línea celular del ratón derivada de plasmocitos tumorales denominados mielomas, porque invaden la médula ósea (Tabla I) (20). La línea celular en división activa, selecciona de acuerdo a dos propiedades distintas: (1) falta de producción ó de secreción de inmunoglobulina y (2) carencia de la actividad de la enzima hipoxantina fosforibosil - transferasa (HGPRT), que es la que incorpora el análogo tóxico. Esta enzima, forma parte de un camino biosintético de síntesis de ácidos nucleicos, que tienen todas las células de mamíferos y que funciona cuando se bloquea, con aminopterina, la vía normal de síntesis de ácidos nucleicos, por lo tanto es incapaz de crecer en medio de HAT, que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina, las células HGPRT no pueden usar hipoxantina exógena para producir purinas. La aminopterina bloquea la síntesis endógena de purinas y pirimidinas y las células mueren, pero los híbridos resultantes sí pueden crecer en medio de HAT, y las clonas que secretan el anticuerpo deseado son susceptibles de ser identificados y -

puestos a crecer. La fusión con la célula tumoral vuelve inmortal al linfocito del bazo del ratón, que desde entonces - crece indefinidamente, in vitro (Fig I). También pueden ser implantados en ratones y ser mantenidos mediante trasplantes seriados de los tumores. Como todas las células derivarán de un único linfocito, los anticuerpos que se producen serán monoclonales y de alta pureza (13,17,24,28,45,54).

TABLA I

ORIGEN DE LAS LINEAS DE MIELOMA MURINE UTILIZADAS PARA LA OBTENCION DE HIBRIDOMAS (24).

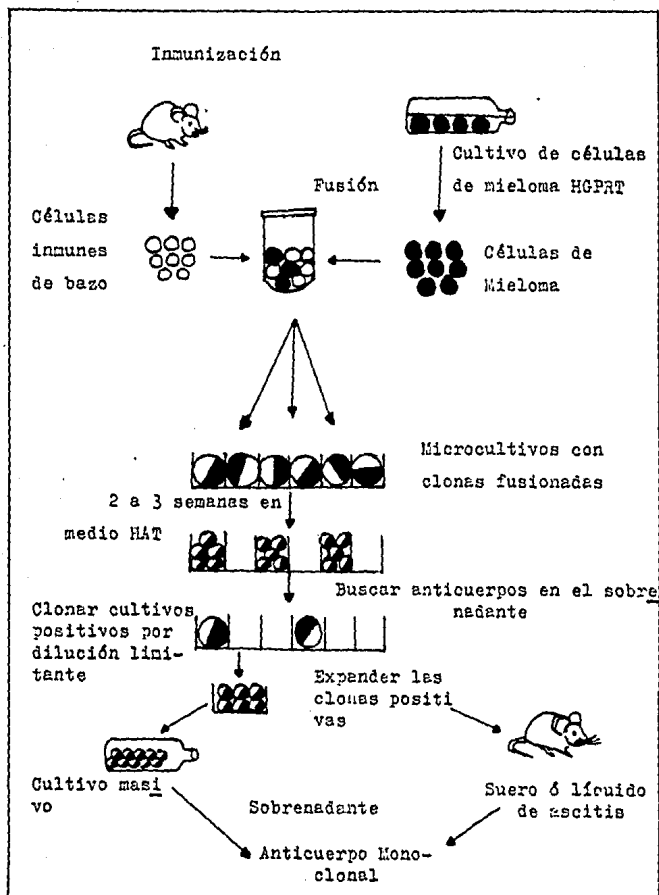


Mieloma inducido <u>in vivo</u>	Adaptado a crecer <u>in vitro</u>	Mutante produce anti- cuerpo	HGPRT produce anti-	No produce cadenas H Produce L	No produ- cen ni ca- denas H ni L
---------------------------------------	---	------------------------------------	------------------------	--------------------------------------	--

3.1.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Hay dos ventajas principales en la técnica de producción de anticuerpos monoclonales: una es el tener un anticuerpo totalmente homogéneo, por lo tanto invariable en sus propiedades y en cantidades prácticamente ilimitadas; la segunda ventaja, es la posibilidad de poder tener un anticuerpo, con las características mencionadas, contra un antígeno para

FIGURA I
PASOS PRINCIPALES PARA LA PRODUCCION
DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (20)



el cual hubiera sido muy difícil ó incluso imposible obtener un antisuero convencional.

Otra característica de los anticuerpos monoclonales y que, puede ser una ventaja ó una desventaja, es el hecho de que por reconocer un solo determinante antigénico, el anticuerpo monoclonal nos da una información muy específica, pero sólo de una pequeña parte de la molécula. Otras ventajas y desventajas se describen en la tabla II (24,38).

TABLA II (24)

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Sensibilidad intensa	Demasiado específico
Suministro ilimitado	Afinidad reducida
Alto grado de sensibilidad	Disminución en la red de complejos inmunitarios
Las propiedades inmunológicas del anticuerpo son específicas y definidas	Disminución en fijación del complemento
	Costo relativamente alto en el desarrollo de nuevos reactivos

3.2. ESCHERICHIA COLI

3.2.1 ETIOLOGIA

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo no esporulado, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Usualmente forman indol, y dan la reacción de Voges-Proskauer negativa, dando positiva la del rojo de metilo. No descomponen la urea y usualmente no crecen sobre amonio citrato-agar (agar de

Simmons). La gelatina no es licuada.

Los microorganismos de todos estos géneros resultan fácilmente cultivables en medios ordinarios y son aerobios ó anaerobios facultativos. Todas las especies fermentan la glucosa y la lactosa, reducen los nitratos a nitritos, y son oxidasa negativa y catalasa positiva (8,37:38).

3.2.2 ESTRUCTURA ANTIGENICA

La Escherichia coli es un organismo procarionte, mide alrededor de $2 \mu\text{m}$ (20.000 \AA) de longitud por $0.8 \mu\text{m}$ (8000 \AA) de ancho. Se encuentra rodeado de una rígida pared celular que contiene moléculas proteicas, lipídicas y de polisacáridos. Por dentro de la pared celular existe una verdadera membrana celular ó plasmática, estructura lipoproteica que constituye una barrera molecular para el medio externo. Esta membrana, que controla la entrada y salida de pequeñas moléculas e iones, contribuye al establecimiento de un medio interno para el protoplasma bacteriano, en esta membrana hay enzimas vinculadas con la oxidación de metabolitos que componen la cadena respiratoria. Mediante el microscopio electrónico, es posible reconocer regiones más claras (llamadas nucleoides), donde se encuentra el cromosoma de la bacteria, formado por una sola molécula circular de ácido desoxirribonucleico (DNA), fuertemente plegada y empaquetada dentro de la región nuclear. Mide alrededor de 1 mm de largo cuando está desenrollado, y contiene toda la información genética del organismo. El DNA se encuentra libre en el protoplasma y no

está separado de éste por una membrana nuclear, como ocurre en la célula eucarionte. El DNA está adherido en un punto a la membrana plasmática y rodeándolo, en la región más oscura del protoplasma, están los ribosomas, los cuales están formados por gran número de partículas (20.000 - 30.000) de alrededor de 250 \AA , compuestos de ácido ribonucleico (RNA) y proteínas, en estas partículas tiene lugar la síntesis de proteínas.

El resto de la célula se compone de agua, diferentes tipos de RNA, proteínas y otras moléculas más pequeñas.

Ciertas bacterias pueden desplazarse mediante finas prolongaciones llamadas flagelos, que tienen una sola fibrilla de 100 \AA de espesor. El flagelo se inserta al cuerpo de la célula bacteriana mediante una estructura compleja que consiste en un gancho y un cuerpo basal. Está formado de una sola clase de subunidad proteica, denominada flagelina; el flagelo está formado por la agregación de subunidades que forman una estructura cilíndrica hueca.

Otro organelo que se encuentra en la superficie es el pili ó fimbrias. Son más cortos y delgados que los flagelos y al igual que estos se componen de subunidades proteicas. Pueden diferenciarse dos clases, el pili ordinario que interviene en la adherencia de las bacterias simbióticas a las células del huésped y el pili sexual, que es el responsable de la unión de las células donadora y receptora en la conjugación bacteriana (23,76).

Algunas bacterias producen toxinas, las cuales suelen clasificarse como exotoxinas y endotoxinas. Las exotoxinas -

son, por definición, las excretadas en el medio donde los microorganismos se desarrollan; las endotoxinas, las que se liberan solamente al desintegrarse el microorganismo.

El criterio que comúnmente se aplica en la diferenciación de las exotoxinas y endotoxinas se presenta en la tabla III (39).

TABLA III (39)

EXOTOXINAS	ENDOTOXINAS
1. Se hallan en el líquido en que son cultivadas las bacterias.	Están íntimamente ligadas a la célula bacteriana.
2. Son en extremo tóxicas. La inyección de 0.001 ml mata pequeños animales.	Son poco tóxicas. La dosis mortal para pequeños animales es de 0.5 a 1.0 ml
3. Producen efectos tóxicos - altamente específicos en ciertos tejidos, como el miocardio, los nervios y las glándulas adrenales.	Producen efectos tóxicos no específicos, como lesiones en el lugar de la inyección y fiebre.
4. Son poco estables, pierden rápidamente su toxicidad por el calor a 60°C.	Son relativamente estables. Conservan su toxicidad después del calentamiento a 60°C.
5. Son fuertemente antigénicos.	Son débilmente antigénicos.
6. Presentan los siguientes síntomas: elevación de la temperatura, shock, hiperglucemia, edema y hemorragia.	El paciente presenta síntomas característicos y afectan un sustrato específico

Además, hay algunos otros productos de las bacterias - de naturaleza enzimática como la estreptocuinasa, coagulasa e hialuronidasa, que no son tóxicas por sí mismas, pero ayu-

dan a las bacterias a invadir el organismo.

3.2.3 DIVERSAS INFECCIONES CAUSADAS POR ESCHERICHIA COLI

Infecciones de las vías urinarias. Escherichia coli es la causante de más del 75% de las infecciones de las vías urinarias, incluyendo cistitis, pielitis, pielonefritis y bacteriuria sintomática. La infección puede ser ascendente, yendo de la uretra a la vejiga, a los ureteres, pelvicillas y riñones; ó descendente, viniendo entonces el germen de la sangre a los tubos urinarios y de éstos a la vejiga, donde causa cistitis (33,47).

Infecciones biliares y peritoneales. Generalmente es posible cultivar Escherichia coli de un apéndice perforado, inflamado ó de abscesos secundarios con perforación de divertículos, úlceras pépticas, abscesos subfrénicos ó de la bolsa omental, infarto mesentérico, etc. La colecistitis aguda con gangrena y perforación, se acompaña con frecuencia de infección por Escherichia coli (33).

Infección neonatal. Es frecuente que los recién nacidos, especialmente si se trata de prematuros, desarrollen bacteremia por Escherichia coli, junto con meningitis y pielonefritis por vía hematógena. La contaminación con materia fecal y la carencia de anticuerpos globulina gamma 6 (IgM) materna, son dos de los factores que hacen que este grupo sea especialmente susceptible a las infecciones coliformes (33).

Gastroenteritis. Los niños menores de dos años desarro

llan gastroentiritis, caracterizada por nauseas, vómito y -
diarrea. A causa de la rápida deshidratación y la correspon-
diente elevada mortalidad, es indispensable hacer rápido el
diagnóstico del padecimiento, aislar los niños enfermos y -
dar tratamiento con el antibiótico adecuado. La Escherichia
coli no ha sido considerada causa única de los padecimientos
diarreicos de los adultos. Es probable que sobrevenga dia-
rrea debido a la producción continua de enterotoxinas (33).

La razón de la mortalidad puede ser casi del 30 a 40%,
donde frecuentemente los individuos afectados son pacientes
cuyo sistema inmune está suprimido, como por ejemplo, los pa-
cientes con cancer recibiendo quimioterápicos ó terapia ra-
diactiva, pacientes con transplantes de organos, recibiendo
drogas inmunosupresoras y pacientes quemados. La terapia de
antibióticos es relativamente beneficiosa, ya que los micro-
organismos desarrollan resistencia a estos y pueden ser peo-
res las condiciones al encontrar esta resistencia. Es por es-
ta razón, que la inmunización pasiva con antisuero, ó quizás
con anticuerpos monoclonales, sea una gran alternativa con-
tra un amplio espectro de organismos Gram negativos (espe-
cialmente con los determinantes antigénicos de Escherichia
coli) (33,72).

CAPITULO IV

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS DIFERENTES EPITOPES DE *E. coli*

4.1. LIPOPOLISACARIDOS

El aprovechamiento del desarrollo de anticuerpos potentes, está basado en la protección contra un amplio espectro de organismos Gram negativos (*Escherichia coli*) (21,59). Estos anticuerpos reaccionen directamente contra el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de la bacteria. Esta pared celular esta compuesta de 3 partes principales (59):

- 1) El polisacárido - O
- 2) La región central
- 3) Lípido A

Un antisuero ó anticuerpo efectivo de protección, debe actuar directamente contra los determinantes antigénicos comunes en muchos microorganismos. En *Escherichia coli*, la diversidad antigénica expresada por el lipopolisacárido O es substancial, mientras el número de diferentes componentes de la región central y lípido A es menor (55,59).

Las bacterias mutantes carecen de lipopolisacárido - O y exponen varias porciones de la región central y lípido A. Las 2 mutantes más utilizadas para producir anticuerpos del antígeno central son: *Escherichia coli* J5 y *Salmonella minnesota Rc* 595 (32,55).

En un análisis inmunocúmico, utilizando antisuero policlonal contra el lipopolisacárido de *Escherichia coli* J5 ó de *Salmonella minnesota Rc*, el anticuerpo ataca al glicolípi

do central (CGL) de los lipopolisacáridos, utilizando este anticuerpo para proteger animales contra los efectos de bacterias heterógenas. Esta protección es posible que se deba al efecto antibacterial del anticuerpo, al cuerpo neutralizador de endotoxinas ó posiblemente a factores en el suero animal, donde se examina esta habilidad de reacción cruzada con células intactas de Escherichia coli capsular K, antígeno O ó purificado de LPS (21,32).

Los anticuerpos monoclonales murine específicos para el antígeno O de Escherichia coli designada como O111:E4, son utilizados para determinar si los LPS son realmente el mayor factor tóxico en la patogenésis de bacterias Gram negativas y septicemias (21).

Escherichia coli del serotipo K1, representa alrededor del 80% de todas las bacterias aisladas de recién nacidos con meningitis y pielonefritis. Observándose bacterias del tipo: O1:K1, O7:K1 y O18:K1, aisladas de muestras fecales de individuos sanos y de recién nacidos con meningitis. La O1:K1 es avirulenta, mientras que las cepas O7:K1 y O18:K1, son virulentas (26,60).

En el recién nacido, el tracto gastrointestinal parece ser el origen de Escherichia coli, pasando al torrente sanguíneo y de aquí al sistema nervioso central. La bacteria K1 puede ser detectada aproximadamente en el 20% de las muestras fecales de niños sanos y del 20 a 40% en el recto de individuos de todas las edades. Donde los neonatales nacidos de madres portadoras de Escherichia coli K1 llevan derivados de K1, la cual es el organismo predominante en infantes K1 -

positivo. Por lo tanto muchos niños tienen bacterias K1, pero solo un porcentaje pequeño coloniza produciendo bacteremia y meningitis (60).

Los anticuerpos específicos para el antígeno O de LPS, son del tipo IgG , los cuales se unen a α (2 - 8) ácido poli N-acetil neuráminico (41). Escherichia coli K1 y meningococcus del grupo B capsular, son química e inmunológicamente idénticas, por lo que los anticuerpos monoclonales utilizados son los mismos (10,15,26,43,60).

Las bacterias utilizadas para la producción de anticuerpos monoclonales contra el LPS, son aisladas de pacientes hospitalizados que presentan las siguientes enfermedades: septicemia, bacteremia, pielonefritis, meningitis, infecciones del tracto urinario, y la muestra de un varón blanco, que durante su tratamiento de anemia y sangrado rectal presenta una gammopatía monoclonal $IgM \lambda$, además un carcinoma en el recto sigmoides y anastomosis performeda, incluyendo problemas reumáticos, la cual es designada como NOV (41,42).

Una vez aisladas las bacterias son cultivadas en frascos que contienen 100 ml de caldo de tripticosa soya ó en medio de infusión cerebro-corazón, se incuban a $37^{\circ}C$, en un baño de agua, con agitación durante toda la noche. Las bacterias cultivadas son separadas por centrifugación y el sedimento es lavado 3 veces con buffer de solución salina fosfato (PBS) a un pH 7.4. El sedimento es suspendido en PBS y calentado durante 150 min, posteriormente es lavado 3 veces con PBS. Las bacterias son diluidas de 17 a 20% de transmitancia, medida en un colorímetro y estas diluciones son alma

cenadas añadiendo timerosal diluido a 1:10,000. Las muestras se reconstituyen en trietilamina al 0.5% ó en NaCl 0.09% (a cada 2 mg de muestra agregar 1 ml de NaCl), y todas las diluciones se realizan en condiciones estériles (32,43,46). De estas bacterias obtenemos los plásmidos pKT274, llevados a la clonación de genes para la producción de Escherichia coli capsular Kl. Los plásmidos P6B33 y P6B44 son mutantes gamma-delta derivados de PKT274, usados también para la producción de Escherichia coli capsular (22).

Los lipopolisacáridos son obtenidos de los Meningococcus de los grupos A, B y C, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium, Streptococcus pneumoniae (22,25). Esta obtención se realiza por 2 procedimientos de extracción: a) Método de Westphal y Jann (Fenol-Agua caliente) y b) Acetona seca. a) La bacteria suspendida en PBS se centrifuga y la capa bacteriana se extrae con alicuotas de fenol (a una concentración del 45%), y calentar a 65°C durante 5 min. La fase acuosa es dializada. La diálisis se efectúa suspendiendo el extracto en una membrana de celofán y sumergiendola en solución salina amortiguada. Se cambia la solución cada cuatro horas y la diálisis suele ser completa después de seis cambios, los LPS son recuperados por centrifugación a 100,000 X g durante 4 h, y el sedimento es secado y congelado. b) Acetona seca: la bacteria es extraída con una mezcla al 90% de fenol, cloroformo y petróleo-éter con un punto de ebullición bajo (2:5:8) y colocarlas en un baño de hielo durante 5 min. La mezcla se centrifuga y en el sobrenadante se encuentran los lipopolisacáridos. Estos se hidrolizan con áci-

do acético al 1% y son fraccionados, en 2 partes, en una columna de filtración Sephadex 650. El lipopolisacárido O es usado a una concentración de 1 mg/ml (59,60).

4.2. PILI O FIMBRIAE

Uno de los más importantes factores de virulencia de Escherichia coli en el tracto urinario, es la capacidad que tiene de adherirse a células uroepiteliales (18,80).

La virulencia de ciertas bacterias patógenas, no solo depende de la producción de toxinas sino también de los "antígenos de colonización", que actualmente son conocidos como pili. En las cepas de Escherichia coli enteropatógenas, tanto las enterotoxinas como los antígenos de colonización, están determinados genéticamente por plásmidos transmisibles. Ciertas cepas de Escherichia coli capsular (antígeno K), son asociadas con enfermedades invasivas en humanos, como septicemia, meningitis en recién nacidos y pielonefritis (18,29, 69).

El pili, que interviene en la adherencia bacteriana, se subdivide, según sus receptores reconocidos para dicha función en (18,29,69,75):

- 1) α -Manosa sensitiva (MS)
- 2) α -Manosa resistente (MR)

El fimbriae también se subdivide por la capacidad que tiene de aglutinar eritrocitos de varias especies:

a) Fimbriae que causa hemaglutinación manosa sensitiva de eritrocitos de cuyos (Tipo 1 fimbriae)

b) Fimbriae que no causa hemaglutinación (HA) de ningún eritrocito (1C fimbriae)

c) Fimbriae que causa hemaglutinación manosa resistente (MRHA) de eritrocitos humanos (1,16,66). Este grupo se subdivide de acuerdo a las bases de receptores específicos que reconoce y son: P, M, S y X fimbriae. El fimbriae P específico debe ser asociado con la patogénesis de pielonefritis (14). El fimbriae P de infecciones del tracto urinario de Escherichia coli reconoce α -galactosil 1,4- β -galactosa como receptor mínimo, el fimbriae S reconoce carbohidratos complejos terminando en O-N-acetil neuraminil-N-acetil galactosamina y el factor colonizador antigénico puede ser específico para ácido neuramínico, conteniendo receptores sobre células de la membrana de mamíferos (19,66).

Los pseudotipos del pili son: 1A, 1B y 1C. El tipo 1A es inmunológicamente distinto a 1B y 1C, estando estos dos en infecciones del tracto urinario.

El tipo 1C fimbriae con subunidad de alrededor de 17K, no da hemaglutinación con el contenido de eritrocitos humanos, buey, caballo, cuyos ó gallinas, y esto se debe a que se adhiere a células epiteliales bucales y no a células urinarias ó mucosa urinaria (66).

Escherichia coli aisladas de niños con meningitis neonatal son: O6:H13:H1, grupo B meningitidis y Escherichia coli capsulares y en pacientes con infecciones del tracto urinario; O9:K103:H⁻ (16,19,29).

Las bacterias crecen en caldo nutritivo, al cual se le agrega glucosa al 5% ó en tripticasa soya con una incubación

de 37^oC, tomar la película que se forma e inocular en placas de agar sangre al 5% y la fase fimbrial es identificada por la morfología de las colonias, para lo cual utilizar un microscopio electrónico y la técnica de aglutinación (1,18,23,29,67).

Los plásmidos crecen en placas de agar de infusión cerebro-corazón con la adición de 50 μ g de ampicilina, 100 μ g de cloranfenicol, ó 12.5 μ g de tetraciclina por ml.

Las muestras del pili purificado, son obtenidas por el método de Doolid y Eisenstein: las bacterias son lavadas con NaCl al 0.5% y suspendidas en un buffer de 5 mM TRIS (5 mM TRIS; NaN_3 a 0.002% (pH 7.4)). El fimbriae es removido por medio de ultracentrifugación (227,000 X g durante 2 h), obteniéndose el pili en el sedimento. Estos son suspendidos en buffer TRIS 50 mM (pH 7.5), que contiene azida de sodio al 0.02% y a una concentración de 5 a 10 mg/ml (23,29,66,67).

Las muestras son diluidas 1:2 en buffer de (TRIS 0.12 M SDS al 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol al 10%, azul de bromofenol al 0.005% (pH 6.8)). Calentar las muestras a 100^oC durante 5 min, tomar un volumen de 50 μ l y depositarlos en las tiras de gel. Las tiras polipeptídicas son reveladas con azul de Coomassie R250 al 0.25%.

4.3. PROTEINAS

Las bacterias tienen un DNA nuclear y un RNA encargado de la transcripción del mensaje que reproduce, trasladandolo a la fábrica de proteínas que son los ribosomas, donde se -

traduce este mensaje y se elaboran las distintas enzimas, proteínas, etc. (48,52).

transcripción

DNA --- DNA ----- RNA ---- PROTEINAS · (17)
replicación traducción

La habilidad de las bacterias Gram negativas de invadir al huésped, causando infecciones y resistencia a las defensas de la sangre, se debe a ciertos compuestos presentes en dichas bacterias, tales como LPS, proteínas de la membrana exterior y enzimas (5,78).

4.3.1 PROTEINA recA

La proteína recA juega un papel central en la recombinación genética de homólogos en Escherichia coli y es una proteína multifuncional, que promueve una amplia variedad de ATP dependientes de DNA. Los análogos eucarióticos de la proteína recA son aislados de un hongo. Las actividades de la proteína recA y estos análogos pueden explicar los pasos críticos de la recombinación de homólogos en eucarióticos así como en procarióticos. Esto da como resultado un intercambio recíproco de información genética, entre cromosomas homólogos.

La proteína recA obtenida por fusión celular, se une al DNA simple aislado (ssDNA), pero la misma proteína no se une al DNA doble aislado (dsDNA) por ser neutro, pero fragmentos de dsDNA se unen a la proteína recA, por medio de un modelo, en presencia de ATP y por cualquiera de los siguientes

tes pasos: (1) ssDNA-dependiente y (2) ssDNA-independiente - de la actividad de ATPasa. Los anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados como efectos específicos en el estudio de las reacciones complejas proporcionadas por la proteína recA (53).

4.3.2 PROTEINA TraT

La proteína TraT (traTp) de Escherichia coli, se encuentra en la membrana exterior de la bacteria. Esta proteína es desarrollada por un grupo conjugado de plásmidos, IncE. La proteína TraT interviene en la exclusión superficial del plásmido y resistencia bacteriana, pero no solo a actividades letales del suero, sino también a la fagocitosis y virulencia bacterial. Esta proteína es desarrollada en bacterias resistentes a las defensas del huésped.

Los anticuerpos monoclonales anti-TraT reaccionan con la proteína TraT de Escherichia coli capsular K1 patógena, mientras que con la no patógena no lo hace, demostrando que esta última carece de la proteína TraT (5).

El plásmido pKT107, el cual es un plásmido híbrido compuesto de la clona pACYC184, que contiene el gen TraT, y el plásmido pKT146 que es una hidroxilamina derivada de la mutante pKT107 y de la bacteria C600 Rif^r (pKT146), dan origen a traTp por la purificación de estas bacterias, las cuales son cultivadas en caldo de tripticasa soya que contiene, en el caso de bacteria que lleva plásmidos, tetraciclina a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los plásmidos son obtenidos de -

las bacterias aisladas de pacientes hospitalizados que presentan septicemia, infecciones en el tracto urinario superior (UTI) y de niños con diarrea (5).

La proteína TraT es obtenida de la membrana de las bacterias de Escherichia coli C600 Rif^r, la cual es extraída con Tritón X-100 al 2%. El tritón X-100 es un material insoluble y subsecuentemente solubilizado por incubación de 2 h a 37°C, en buffer TRIS-HCl al 0.125 M (pH 6.8) y sodio dodecil sulfato (SDS) al 2% y fraccionado por cromatografía en columna Sephacryl S-200, y estabilizada con buffer TRIS-glicina (0.025 M de TRIS, glicina 0.192 M, a un pH 8.3) y SDS al 1%. Se filtra y obtenemos 150 ml, los cuales contienen la proteína traTp, y cada ml es depositado en una bolsa de colodión. Para mayor pureza de la proteína se pasa por una segunda columna Sephacryl S-200. La región de la gel que contiene traTp es homogeneizada y extraída con volúmenes de 10 ml de buffer (TRIS de acetato a 0.05 M a un pH 7.8, mercaptoetanol 0.01 M y SDS al 1%) a 4°C durante un período de 8 h, adicionar urea a una concentración de 6 M y las muestras de 500 µl son depositados en una bolsa de colodión. El material insoluble es removido por centrifugación, y los sobrenadantes del fluido son dializados con buffer TRIS-HCl 0.125 M (pH 6.8), obteniéndose la proteína traTp pura (5).

4.3.3 PROTEINAS RIBOSOMALES L7/L12 y L2

La proteína L7/L12 está presente en la subunidad 50 S del ribosoma de Escherichia coli, donde L7 se refiere a la -

forma de translación de N-acetilación de L12.

Los anticuerpos monoclonales producidos, anti-L7/L12, sirven para identificar los diferentes epitopes de la proteína; uno en el N-terminal y el otro en el C-terminal dominante de la proteína. Estos anticuerpos inhiben la síntesis de polifenilamina dependiente de GTPasa y el enlace prolongado, en el ribosoma, del factor EF-G (56,70).

Otra proteína ribosomal es la proteína L2, con 272 aminoácidos y un peso molecular de 29,730. Esta proteína interviene en la función del centro peptidiltransferas y también en aspectos del ciclo de la síntesis de proteínas (56).

Las proteínas ribosomales son extraídas de las subunidades 50 S con ácido acético al 67%, son dializadas y liofilizadas con ácido acético al 6%. Las proteínas son disueltas a una concentración de 8 mg/ml en un buffer que contiene urea 6 M, NaH_2PO_4 a 0.05 M, metilamina 12 mM y 2-mercaptoetanol a 4 mM (pH 6.5), y son colocadas sobre la columna de fosfocelulosa, la cual es lavada y estabilizada con el mismo buffer. Las proteínas son entonces elucionadas con un gradiente lineal de NaCl 0 - 0.5 M en 3 litros del mismo buffer. Las fracciones que contienen las proteínas son dializadas, liofilizadas con ácido acético al 6%. Las proteínas son purificadas mediante cromatografía utilizando un buffer de urea 6 M (56,70).

4.4. ENZIMAS

4.4.1 PIRUVATO OXIDASA

Es una flavoproteína deshidrogenada asociada con la cadena respiratoria aeróbica de Escherichia coli. La enzima cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetato, y reduce la ubiquinona - 8 en la membrana citoplásmica. Esta enzima unida a lípidos, va a tener efectos drásticos en sus propiedades cinéticas debido a esta unión. La forma lipídica activa de la flavoproteína, tiene un número de enlaces de 20 a 30 veces más grande que la forma inactiva de la enzima.

El piruvato oxidasa puede también ser "proteasa activa", cuando exponemos a chymotripsina (Clomotripsina) en la presencia del sustrato y cofactor, piruvato y pirofosfato- Mg^{2+} -Tiamina. La forma modificada proteasa de la enzima es activada por lípidos, y la presencia de lípidos antes de la adición de la proteasa protege contra la proteólisis (3).

Los anticuerpos monoclonales obtenidos inhiben la inactivación y formas lipídicas activas de la enzima (3).

4.4.2 RNA POLIMERASA

Es una enzima oligomérica (11), esta formada de 4 diferentes subunidades, α , β , β' , y γ , las cuales sirven para síntesis de RNA (11,64,72).

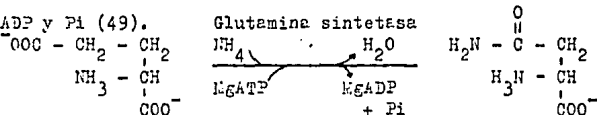
El RNA polimerasa, es preparado por el método de Burgess y Jendrisak. La haloenzima y la polimerasa central -

son separadas por cromatografía. La concentración de la proteína es determinada utilizando la extensión de los siguientes coeficientes: polimerasa central $E_{280\text{ nm}}^{1\%} = 5.8$ y de la haloenzima $E_{280\text{ nm}}^{1\%} = 6.7$ (64).

4.4.3 GLUTAMINA SINTETASA

La L-glutamina y el L-glutamato son de fundamental importancia para la biosíntesis de los aminoácidos en todas - las formas de vida; en animales, plantas y bacterias. La sin tesis de glutamina es catalizada por glutamina sintetasa, la cual es una enzima mitocondrial presente en gran cantidad en el tejido renal.

La síntesis del enlace amídico de la glutamina se lleva a cabo a expensas de la hidrólisis de un equivalente ATP en ADP y Pi (49).



L-glutamato

L-glutamina

Esta glutamina sintetasa tiene un peso molecular de - 600,000 y esta compuesta de 12 subunidades idénticas, colocadas en dos circunferencias hexagonales y existen en varias - formas: sin adenilación, con adenilación, y en la presencia de Mn^{2+} ó Mg^{2+} , la enzima es catión divalente (tenso) donde sus grupos no sulfhidrilos reaccionan con reactivos sulfhi- drilos y cuando la forma catión divalente es tratada con - EDTA ó por diálisis exhaustiva, la enzima es convertida a una configuración catalítica inactiva (relajada) (12).

Las preparaciones de glutamina sintetasa son obtenidas de Escherichia coli bajo condiciones de limitación de nitrógeno y exceso de nitrógeno, purificadas por precipitación con Zn^{2+} , seguido por acetona y ácido $(NH_4)_2SO_4$. Dos de las preparaciones de la enzima, $MgGS_{1.2}^{-1}$ (27.4 mg/ml) y $MgGS_{11.5}^{-}$ (21 mg/ml) son almacenadas en buffer de Mg-Hepes (pH 7.2, - KCl 100 mM, $MgCl_2$ 20 mM, EDTA 10 mM, y azida de sodio al 0.02%), y utilizadas para la preparación de las siguientes formas de glutamina sintetasa. La forma relajada $GS_{1.2}^{-}$ es preparada por diálisis de $MgGS_{1.2}^{-}$ con buffer que contiene Hepes a 20 mM (pH 7.2), KCl 100 mM y EDTA a 10 mM. La enzima relajada es disociada en monómeros $GS_{1.2}^{-}$ por diálisis con el buffer disociador (10 mM de TRIS, EDTA 10 mM, 2-mercaptoetanol a 143 mM, urea 1 M, pH 8.5). La enzima oxidasa $GS_{1.2}^{-}$ se obtiene esencialmente por el procedimiento de Levine; 4 mg de $GS_{1.2}^{-}$ son incubados con $50 \mu M$ $FeCl_3$ y ascorbato a 20 mM - en 20 ml de imidazol 20 mM (pH 7.2), que contiene KCl a 100 mM. La forma $MSOXGS_{1.2}^{-}$ es preparada por inactivación de 4 mg de $GS_{1.2}^{-}$ en la presencia de ATP 3 mM y L-metionina-S 3 mM, R-sulfoxiamina en 0.6 ml del buffer Mg-Hepes (12).

4.4.4 DNA POLIMERASA

El DNA polimerasa III es una haloenzima presente en el núcleo y es responsable de la duplicación de los cromosomas. Esta enzima tiene múltiples actividades catalíticas, una estructura compleja y un requerimiento por los trifosfatos de los 4-desoxirribonucleósidos de adenina, guanina, citosina y

timina. El papel principal de esta polimerasa es asegurar la fidelidad y reparar, más que duplicar, el DNA (82).

La enzima DNA polimerasa III, contiene un centro compuesto de 3 subunidades α , ϵ , y θ . Las subunidades auxiliares son β , γ , δ , y ν , que confieren las propiedades requeridas para la replicación natural de los cromosomas de Escherichia coli, los anticuerpos atacan la subunidad α de la enzima y son de la clase IgG (27,82).

4.4.5 RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA

La síntesis de los desoxirribonucleótidos purínicos y pirimidínicos, ocurre por reducción directa del carbon 2' - en la fracción ribosa del correspondiente nucleótido y no por la síntesis del nucleótido purínico entero, utilizando un análogo 2'-desoxi del 1-pirófosforribosil-5-fosfato (2Pri bosaP). La reducción en el carbono 2' ocurre sólo después de que los nucleótidos purínicos y pirimidínicos han sido convertidos en sus respectivos nucleósidos difosfatos. En algunas bacterias se requiere de la cobalamina (vitamina B₁₂) para este proceso reductor, aunque no se requiere para la misma reacción en los seres humanos. La reducción de los ribonucleosidodifosfatos es una reacción compleja en los mamíferos y es catalizada por el ribonucleótido reductasa, y requiere de tioredoxina (un cofactor proteico), tioredoxina reductasa (una flavoproteína) y NADPH (como cofactor) para realizar la reducción (17,37,48).

El ribonucleótido reductasa esta formado por 2 subuni-

dades no idénticas llamadas proteína B1 (PM, 170K) y la proteína B2 (PM, 87K), consistiendo cada una de dos cadenas polipeptídicas idénticas (2).

La subunidad B1 contiene 2 sitios, aparentemente idénticos, para sustratos y 2 sitios de efectos alostéricos. La segunda subunidad proteína B2, contiene un hierro central, que consiste de 2 anti-fierro magnéticamente unido a iones Fe^{3+} por un puente μ -oxo y un radical tirosil oxidado que son estables por el hierro central. Estos radicales son derivados de un residuo tirosil de la cadena polipeptídica y es postulada a participar en el proceso catalítico (2).

4.4.6 HEMOLISINAS

Muchos microorganismos producen sustancias que disuelven a los eritrocitos (hemolisinas). La hemolisina se identifica como una proteína de 107,000 dalton (107 K) derivada de diversas bacterias gramnegativas y espiroquetas (37). La hemólisis es producida en la membrana de los eritrocitos, produciendo la lisis de estos.

Los anticuerpos inhiben la hemolisina de Escherichia coli y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae (37).

4.4.7 CITOCROMO d TERMINAL OXIDASA

La cadena respiratoria, conocida también como el sistema del citocromo ó sistema de transporte de electrones, es una serie de reacciones de oxidación. La función de esta se-

rie de reacciones ordenadas, es aceptar electrones de compuestos reducidos y transferirlos al oxígeno para formar agua. Esta cadena la forman enzimas que tienen grupos prostéticos ó coenzimas y pueden ser considerados como las partes activas de las enzimas (65).

El grupo prostético de un citocromo, es un derivado de heme y contiene un solo átomo de hierro, causante de las propiedades oxidantes ó reductoras de la enzima, los citocromos se dividen en tres categorías principales: citocromo a y a₃ ó citocromo d terminal oxidasa, citocromo b y citocromo c y c₁ (30,39).

Los citocromos a y a₃, forman parte del citocromo oxidasa, el cual se relaciona con el transporte vectorial de electrones através de la membrana.

El citocromo oxidasa está formado por 2 subunidades, - la subunidad hidrofóbica (protéolípido), la cual se sintetiza por intermedio de los ribosomas mitocondriales, y la subunidad hidrofílica que se origina en el citoplasma.

La utilización de anticuerpos monoclonales contra las dos subunidades del citocromo d terminal oxidasa, se observa por la inhibición del transporte de electrones através de la membrana (46).

4.5. ENTEROTOXINAS

La capacidad para producir enterotóxicas no está restringida a ningún serotipo específico de Escherichia coli, - sino que es el resultado de un plásmido específico sobre la

superficie de esta bacteria.

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) produce una exotoxina termolábil que está bajo control genético de un plásmido transmisible. La toxina lábil (LT) está compuesta de péptidos unidos con un peso molecular total de aproximadamente 86,000, sus subunidades A y B tienen diferentes acciones. La subunidad B se fija al gangliósido G_{M1} en las células cilíndricas del tejido epitelial del intestino delgado, esta permite la entrada de la subunidad A a la célula, donde A (PM 26,000) activa a la adenilatociclase, la cual aumenta notablemente la concentración local de AMPc que da como resultado una hipersecreción intensa y prolongada de agua y cloruros e inhiben la reabsorción de sodio. Se destienden las paredes intestinales con los líquidos acumulados, sobreviniendo la hipermotilidad explosiva y la diarrea consiguiendo que continúe varios días (37).

La LT es antigénica, y da reacciones cruzadas con la enterotoxina de Vibrio cholerae. La LT estimula la producción de anticuerpos neutralizantes en el suero de personas que tuvieron una infección anterior con Escherichia coli enterotoxigénica (4,21,51,62).

La exotoxina termolábil se divide en LT_h y LT_p , que están estructuralmente, funcionalmente e inmunológicamente ligados a la enterotoxina producida por Vibrio cholerae (CT). Los determinantes antigénicos de Ct, LT_h y LT_p son cuatro (4):

- 1) Determinante único para una toxina simple
- 2) Determinante para las 3 toxinas

- 3) Determinante de LT_h y CT que están ocultos para LT_p
- 4) Determinante de LT_h y LT_p que no están presentes en CT

La enterotoxina cólera (CT) esta dividida en 2 subunidades (CT-A y CT-B), donde estos inmunógenos no están presentes en LT_h ó LT_p . La subunidad CT-B es un inmunógeno más potente que el CT-A (4).

Otra enterotoxina de Escherichia coli, es la enterotoxina termoestable (ST: PK < 5,000), la cual activa a la guanilato ciclasa en las células epiteliales del intestino y estimula la secreción de líquidos (7,74).

Hay dos clases de ST, las cuales difieren funcionalmente y estructuralmente: la primera es soluble STa (ST I), producida por humanos infectados con Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) y activadas en ratones de cría, la segunda, es insoluble STb (ST II), la cual se encuentra en porcinos y, en casos muy especiales, aislados de humanos (31,35,74).

Aparte de las enterotoxinas LT y ST, la Escherichia coli produce otras toxinas, estas toxinas se refieren a verotoxina ó Shigella dysenteriae I (toxina Shiga ó SLT), esta contiene una subunidad A y diversas copias de una subunidad B.

El estudio con el prototipo de toxina Shiga indica que la subunidad A contiene la porción biológica activa de la toxina y la subunidad B contiene uniones de componentes.

La SLT de Escherichia coli debe considerarse como un posible factor de virulencia en la patogénesis de enfermedades de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico (58).

Las bacterias aisladas de pacientes con diarrea son:

La Escherichia coli 64III, Escherichia coli HE22 (PTD2) y Escherichia coli HE12 que son cultivadas en placas de agar que contiene 30 ml de medio de ácido caseínico de extracto de levadura y son incubadas a 37°C durante 16 a 18 h con movimiento de rotación a 200 rpm. La bacteria Yersinia enterocolitica es también cultivada pero a 25°C durante 48 h. Después se centrifuga a 3,000 X g por 10 min, los sobrenadantes se calientan a 65°C durante 30 min y se congelan en porciones iguales hasta su utilización. Así, obtenemos de Escherichia coli 64III enterotoxinas termoestables, de Escherichia coli HE22 (LT_h) y de HE12 LT_p y la toxina CT se obtiene a partir del Vibrio cholerae 569 cultivado (4,51,74).

Las subunidades A y B de LT_h son aisladas por cromatografía en columnas de Biogel P60, estabilizadas con urea 1 M -glicina 0.1M-HCl a un pH 3.2 (4).

En el caso de la toxina ST, es purificada por el método carbodimida ó por utilización de glutaraldehído como un reactivo de enlace cruzado, ST es disuelto en suero albumina de bovino (BSA) ó con 25 mg de purificado CTB en la presencia de carbodimida y es congelada a -70°C hasta su utilización (74).

La toxina Shiga de Shigella dysenteriae tipo I 60R y -SLT de Escherichia coli H30 son usadas como controles y se almacenan a -70°C, manteniéndolas en el laboratorio, haciendo nuevos cultivos en placas inclinadas de tripticosa soya - (75).

4.6. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (Mabs)

4.6.1 INMUNIZACION

Hay dos sistemas de inmunización. El primero utiliza ratones BALB/c de 3 a 8 semanas de nacidos, los cuales están inmunizados con una suspensión que contiene el antígeno específico (ver tabla IV) en NaCl. Una dosis de 10^7 bacteria/ml es inyectada intraperitonealmente a cada ratón durante 4 meses (con intervalos de 2 semanas), 3 días antes de la fusión, se inyecta una dosis, de la misma manera, utilizando una suspensión de 10^8 bacteria/ml.

En el segundo sistema, se inmunizan los ratones intraperitonealmente 2 veces por semana, durante 4 semanas, con la suspensión del antígeno específico (ver tabla IV). La primera inyección es dada con adyuvante completo de Freund, y después de un mes, el ratón es reforzado, intraperitonealmente, con la suspensión específica, pero con adyuvante incompleto de Freund.

4.6.2 HIBRIDACION

Una vez que en el ratón se terminó el esquema de inmunización, se sacrifica y se extrae el bazo. Las células del bazo son fusionadas con la línea celular de mieloma específica (ver tabla IV). Utilizando polietilén glicol, como agente fusionante y clonados por dilución límite, las clonas obtenidas en placas que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Después de 6 días de crecimiento, las clo-

TABLA IV. Los sistemas de inmunización y mielomas, se utilizan - dependiendo del antígeno específico.

ANTIGENO	MIELOMA	SISTEMA DE INMUNIZACION	DOSIS
1.- <u>Escherichia coli</u> 0600 Rif ^r (pKT146)	X63-Ag8.653	(1)	20 μ g
2.- <u>Escherichia coli</u> J5 LPS	P3-X63-Ag8.653 6 Sp2/O	(1) (2)	20 μ g 0.25 ml
3.- <u>Escherichia coli</u> 0111:B4	NS-1 Murine	(1)	20 μ g
4.- Grupo B <u>meningococcico</u>	X63-Ag8.653	(1,2)	5 X 10 ⁸ bac teria/ml
5.- <u>Escherichia coli</u> K1	Sp2/O	(2)	2.5 μ g
6.- CFA/I pili	NS1/Sp2	(1)	10 μ g
7.- Pili	Sp2/O-Ag14	(1)	50 μ g
8.- Pimbrial crudo	Sp2/O-Ag8 6 Sp2/O-Ag14	(2)	50 μ g
9.- <u>Escherichia coli</u> (0101:K30;H ⁻ ;K99 :F41 ⁺)	Sp2/O-Ag14	(1)	5 X 10 ⁶ bac teria/ml
10.- Proteína TraT	X63-Ag8.653	(2)	20 μ g
11.- Proteína recA	P3X.63-Ag8.653	(2)	
12.- Proteína L7/L12 6 L2	Tinocitos y Macrofagos	(1,2)	100 μ g
13.- Piruvato oxidasa	Sp2/O-Ag14	(1)	1 μ g
14.- RNA polimerasa	P3/Ag8.653	(1)	100 μ g
15.- Subunidad ρ y ρ' de RNA polimerasa	P3X63-Ag8.653	(2)	23 y 43 μ g
16.- DNA polimerasa	P3X63-Ag8.653	(2)	100 μ g
17.- Glutamina Sintetasa MnGS _{1,2} ⁻	Sp2/O-Ag14	(2)	100 ng
18.- Ribonucleótido reductasa	P3-X63-Ag8	(1)	100 μ g
19.- Citocromo d oxidasa	Sp2/O-Ag14	(2)	200 μ g
20.- STA 6 STh	Sp2/O	(2)	50 μ g
21.- ST	FO	(2)	1 - 2 μ g
22.- LTh y CT	Sp2/O-Ag14	(2)	1 - 2 μ g
23.- SLT	Sp2/O-Ag14	(2)	0.4 - 1.6 μ g

nas son seleccionadas para la producción del fluido ascítico

La línea celular mieloma y hibridomas son mantenidos en frascos de cultivo con medio Delbecco modificado Eagle. - El cultivo celular crece a 37°C en un incubador húmedo que contiene 7.5% de CO₂ (56).

4.6.3 FLUIDO ASCITICO

Los hibridomas obtenidos después de 6 días de crecimiento, son inyectados a un ratón previamente tratado con 2,6,10-4-tetrametil pentadecano (PRISTANE) e irradiado con 50 - 450 rads. A las 24 h de ser irradiado, el ratón es inyectado intraperitonealmente con 5×10^6 células híbridas en 0.5 - 1 ml de solución salina. El fluido ascítico es extraído después de 7 a 10 días, utilizando una aguja de calibre 18. Los lípidos son removidos con Freon 113, e inactivados - completamente por incubación del fluido ascítico a 56°C durante 30 min.

Los anticuerpos monoclonales son purificados mediante precipitación con sulfato de amonio saturado al 50%. El precipitado es disuelto en solución salina, dializado y congelado a -70°C.

Por medio de cromatografía se purifican los anticuerpos, en una columna Sepharosa Cl-6B, una vez corrida la columna, es lavada con 30 ml de PBS (pH 7.4) y los anticuerpos son elucionados con glicina-HCl a 0.2 M (pH 3.0) ó con NaCl 0.5 M. Las fracciones (de 1 ml) que contienen el anticuerpo son neutralizadas por adición de 40 μ l de buffer TRIS-HCl -

1 M a un pH 8.8.

Los anticuerpos son dializados con buffer TRIS-HCl -
10 mM a un pH 7.2, acetato de magnesio 1 mM, NH_4Cl 150 mM, y
son concentrados por ultrafiltración aproximadamente a 20 μg
comoles/ μl y almacenados a -20°C .

CAPITULO V

TECNICAS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

5.1. TECNICAS DE AGLUTINACION

La bacteria es cultivada en caldo L, e incubada a 37°C durante toda la noche. El desarrollo obtenido se suspende en un buffer de solución salina fosfato (PBS) y se incuba 1 h a 100°C. Posteriormente, adicionar a la suspensión solución de safranina al 3% y formaldehído 0.05%. Tomar de la suspensión, alícuotas de 50 μ l y depositarlos en cada pozo, los cuales contienen 50 μ l del anticuerpo monoclonal diluido en forma seriada. Las placas son selladas, agitadas e incubadas a 50°C durante 16 h. La aglutinación positiva se observa cuando la red de suspensión bacterial está distribuida uniformemente en el fondo del pozo, y cuando está en forma de botón, la aglutinación es negativa (13,35,50,56).

5.1.1 HEMAGLUTINACION PASIVA

Esta técnica consiste en:

1) Sensibilización de eritrocitos de guajolote. Los eritrocitos de guajolote son fijados con formaldehído y tratados con ácido tánico. El siguiente paso es la sensibilización de los eritrocitos con una dilución óptima (determinada por titración) del antígeno ó del anticuerpo monoclonal.

2) Ensayo de hemaglutinación pasiva. Primero se hace una solución de PBS 0.1 M (pH 7.2) que contenga suero normal de guajolote al 1% inactivado por calor, está solución es

tritiada con 4 ó 10 μ l de una dilución inicial de 1 en 4 ó 1 en 10, respectivamente, en placas microtiter (75 μ l por pozo) Hacer una suspensión al 1% (25 μ l) de eritrocitos sensibilizados disueltos en PBS 0.1 M (pH 7.2) que contiene suero normal de conejo al 1% inactivado por calor, está suspensión es adicionada a cada pozo, agitando suavemente. Finalmente, las placas son cubiertas e incubadas 30 min a temperatura ambiente, y son leídas. Dando un resultado positivo, cuando la aglutinación se encuentra uniformemente distribuida en el fondo del pozo. Por medio de este método identificamos a los anticuerpos monoclonales, utilizando eritrocitos recubiertos con el antígeno específico (12,14,62).

5.1.2 COAGLUTINACION

Los Staphylococcus aureus crecen en agar de columbia a 37°C durante 16 h. Estos Staphylococcus aureus son lavados 3 veces con PBS y suspendidos en PBS que contiene formalina al 0.5%, está suspensión se incuba 3 h a temperatura ambiente, pasando este tiempo se lavan 4 veces con PBS y se incuban 10 min a 80°C, posteriormente se vuelven a lavar 2 veces, con PBS, y se suspende el sedimento en PBS, el cual contiene azida de sodio al 0.01%, dando una concentración del 10%, está suspensión es almacenada a 4°C. Tomar 0.5 ml de la suspensión de Staphylococcus aureus y 50 μ l del anticuerpo monoclonal no diluido, mezclar e incubar 10 min a temperatura ambiente, en este paso los anticuerpos monoclonales son cubiertos con la proteína A de los Staphylococcus aureus. Los ensa

yos de aglutinación son ejecutados sobre una laminilla de vidrio, mezclando una gota de la suspensión bacteriana ó del antígeno específico disuelto en PBS, y una gota del anticuerpo monoclonal cubierto con la proteína A de Staphylococcus aureus. La reacción positiva es cuando la aglutinación se observa distribuida uniformemente en el fondo del pozo, identificando así, a los antígenos específicos para el anticuerpo monoclonal recubierto (19).

5.1.3 ENSAYOS DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (HI)

Para esta técnica, se utiliza la concentración más baja de la bacteria (4×10^8 células/ml), y el anticuerpo monoclonal a una concentración que no aglutine a esta, mezclar y tomar $50 \mu\text{l}$ de la mezcla, y colocarlos en $50 \mu\text{l}$ de eritrocitos humanos (0.5%) del tipo O; se puede agregar α -metil-D-manosidasa al 2.5% permitiendo así mayor adsorbancia del antígeno, e incubar 2 h a 25°C , después de dicho tiempo se lee la reacción de aglutinación. Incubar a 4°C y leer a intervalos de 16 h, donde un resultado positivo es cuando se forma un botón de globulos rojos en el fondo del pozo. Los resultados de inhibición de la hemaglutinación, son expresados como: el recíproco de la dilución más alta del anticuerpo, la cual inhibe la aglutinación de los eritrocitos (52,62).

5.2. TECNICAS DE PRECIPITACION

5.2.1 INMUNODIFUSION

La bacteria es cultivada en 300 ml de caldo de tripti-
casa soya, el cual contiene 75 mg de glucosa e incubar a 37°C
durante toda la noche. El cultivo es centrifugado a 3,000 -
X g, y el sobrenadante es incubado, con 600 mg de bromuro de
hexadeciltrimetilamonio, durante 8 h a 4°C. Los sedimentos -
son disueltos en 10 ml de CaCl₂ 1 M, después son dializados
y concentrados con un grano de CaCl₂, siendo nuevamente dia-
lizados con un buffer A (K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 ml, NaCl 15 ml (pH
7.5)). La prueba se realiza vaciando, en las cajas petri, a
agar que contiene el anticuerpo monoclonal específico para el
antígeno. Se horaden pequeños pozos en el agar, separados al
gunos milímetro, el pozo central es llenado con una canti-
dad medida, con exactitud, de material que contiene la bacte-
ria antes dializada (antígeno). Se deja que el antígeno di-
funda desde el pozo central durante un tiempo de 24 - 48 h.
La unión antígeno-anticuerpo monoclonal se observa, mediante
un halo de precipitación (45,46,61).

5.2.2 INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

Una laminilla de vidrio es cubierta con agar fundido ó
con agarosa en solución amortiguadora (pH 8.2). Excavar una
depresión larga y estrecha en forma de canal y un pozo, en -
este último colocamos el antígeno específico, esté antígeno
es separado mediante un campo eléctrico, con una diferencia
de potencial de 3.3 V/cm durante 30 - 60 min. Después de es-

te corrimiento, se coloca el anticuerpo monoclonal específico en la depresión ó canal y se deja difundir el antígeno y el anticuerpo monoclonal durante 18 - 24 h, donde la unión - antígeno-anticuerpo monoclonal, aparece en forma de líneas - de precipitación. Estas líneas resultantes se pueden fotografiar ó pueden ser teñidas para un registro permanente (45,61)

5.2.3 RADIO INMUNO PRECIPITACION (RIP)

Una suspensión al 1% de proteína A-Sepharose CL-4B, se incuba durante 18 h a 4°C con una dilución 1:100 de suero de cabra, que contiene anticuerpos anti-ratón. El complejo es lavado con PBS-T, suspendido en suero de albumina de bovino al 5% con PBS-T, e incubado a 25°C durante 15 min, después - de este tiempo lavar con PBS-T. El complejo obtenido proteína A-Sepharose-inmunoglobulina de cabra, que contiene anticuerpos de anti-ratón, es incubado con el anticuerpo monoclonal a 4°C durante 18 h. El complejo proteína A-Sepharose-inmunoglobulina de cabra que contiene anticuerpos anti-ratón - KAb es incubado con el antígeno específico marcado radiactivamente con I^{125} , a 25°C durante 2 h. Después, el complejo - es centrifugado y el sedimento es lavado y suspendido en - buffer TRIS-HCl 0.05 M, y se separa por SDS-PAGE. Otro procedimiento de RIP, es cuando la bacteria es suspendido en 1 ml de medio mínimo A (MLA), la cual es marcada con $[H^3]$ leucina, y es centrifugada. El sedimento es solubilizado por unión, - en una suspensión que contiene 1% de SDS 50 mM, TRIS 1 mM, EDTA (pH 8.0). Esta solución es diluida en un buffer de TRITON X-100, y las células son removidas por centrifugación. -

Una cantidad de 2 μ l de anticuerpo monoclonal específico es adicionado a la solución diluida e incubada a 4°C durante toda la noche. La precipitación del antígeno es completa cuando agregamos 1 μ l de suero de conejo que contiene anticuerpos anti-ratón. Donde la unión antígeno-anticuerpo monoclonal, aparece en forma de bandas de precipitación (13,28,35, - 52).

5.2.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La bacteria crece en placas de agar sangre a 37°C durante toda la noche, las colonias resultantes son lavadas 2 veces con solución salina fisiológica, y se diluyen a una concentración de 5×10^8 células/ml, centrifugar y suspender el sedimento en 100 ml de buffer muestra (0.062 M de TRIS-HCl)pH 6.8), 2-mercaptoetanol a 1%, sodio dodecil sulfato (SDS) al 2% y glicina al 12.5%), la suspensión se calienta - 10 min a 100°C. La cantidad de 10^8 bacteria (20 μ l) de la - suspensión es depositada en la gel de electroforesis de sodio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE), está gel - es corrida durante 4 h en un aparato de electroforesis. Después de este corrimiento, la gel es teñida con azul de bromo fenol, azul brillante de Coomassie, ó pueden transferirse a papel de nitrocelulosa, obteniéndose así la separación de - los componentes del antígeno específico (30,35,51,59,61).

5.2.5 PAPEL DE NITROCELULOSA (WESTERN BLOT)

Los componentes del antígeno separados por electrofore

sis en gel de poliacrilamida-SDS, son transferidos a papel - de nitrocelulosa utilizando un aparato llamado Western blot ó de inmunoblot, y un buffer que contiene TRIS 25 mM (pH - 8.4), glicina 19.2 mM y metanol al 20%, la transferencia dura de 16 a 18 h de 6 a 8 V/cm. Una vez transferidos los componentes del antígeno, la membrana de nitrocelulosa es incubada con el anticuerpo monoclonal específico y con:

- 1% de suero de albumina de bovino (BSA) disuelto en PBS (BSA-PBS) durante una hora.

- Suero de conejo diluido a 1:1,000 (suero no adsorbido) ó 1:120 suero adsorbido durante 90 min, en BSA-PBS.

- Peroxidasa conjugada con suero de cabra que contiene anticuerpos anti-conejo IgG ó IgM diluido a 1:1,000 en PBS-BSA.

- Fosfatasa conjugada con peroxidasa de cabra diluida a 1:100 en BSA-PBS. Después de la incubación a temperatura ambiente, las membranas son lavadas con PBS y reveladas con tinte de azul de nitrotetrazolium ó 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl fosfato, donde esta revelación indica la unión del antígeno específico con el anticuerpo monoclonal (12,42,45,50,51, 58).

5.2.6 RADIO INMUNO ANALISIS (RIA)

Las placas microtiter son cubiertas con el antígeno específico disuelto en PBS (3 - 20 $\mu\text{g/ml}$) ó con la bacteria - inactivada por calor (5 a 50 $\times 10^6$), las placas son incubadas a 4°C durante toda la noche ó 2 h a 37°C. El ensayo de

RIA es ejecutado en 3 pasos:

1).- Tomar 100 μ l del anticuerpo monoclonal diluido en forma seriada y adicionar en los pozos de las placas.

2).- Adicionar de 20 a 50 μ l/pozo de proteina A marcada radiactivamente con I^{125} , aproximadamente 50,000 cuentas por minuto (cpm) por pozo, e incubar las placas 2 h a 37°C y lavar con NaCl 0.9% y secar a temperatura ambiente.

3).- Medir la radiactividad de I^{125} , en un espectrometro gamma, este I^{125} es usado como isotopo para detectar la unió n antigéno-anticuerpo monoclonal (13,21).

5.3. TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

5.3.1 ENSAYO INMUNO ENZIMATICO (ELISA)

Se utilizan placas microtiter, a las cuales se les agrega el antigéno específico a una concentraci6 n de 10 - 50 μ g/ml disuelto en buffer de carbonato 6 bicarbonato 0.015 M (pH 9.6) 6 en $MgCl_2$ 0.01M, e incubar a 37°C durante toda la noche. Despu6 s, cada pozo es lavado 3 veces con buffer de salina fosfato (PBS) que contiene 0.05% de Tween 20 (PBS-T). El anticuerpo monoclonal es agregado a cada pozo, el cual es diluido en forma seriada (0.1 ml/pozo), e incubar durante toda la noche a temperatura ambiente, despu6 s los pozos son lavados con PBS-T, y la presencia del anticuerpo monoclonal es específico es detectada con una soluci6 n de fosfatasa alcalina conjugada con antisuero de cabra IgG 6 IgM diluida 1:500, se incuba 2 h a temperatura ambiente, posteriormente es lavada con PBS-T, donde la actividad del anticuerpo monoclonal es -

detectada colorimétricamente por la adición de O-fenilendiamina 0.04%, el cual está disuelto en buffer de citrato-fosfato (pH 4.5) y H_2O_2 0.005%. Esta reacción es desarrollada en la obscuridad durante 15 min a temperatura ambiente, y es almacenada con H_2SO_4 2 M. Se mide la absorbancia de la actividad enzimática, la cual está relacionada con la cantidad de anticuerpo monoclonal unido al antígeno específico (12,35,41, 42,59,62).

5.3.2 GML-ELISA

En este método, el receptor es el gangliosido GML, para cualquier enterotoxina (ST ó LT). Una solución de GML 5 M es adsorbida en cada pozo, incubando 100 μ l de esta solución en cada pozo durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, los pozos son lavados 2 veces con PBS. Los sitios de unión restantes del GML, son bloqueados con suero de albúmina de bovino al 1% disuelto en PBS (BSA-PBS) (0.2 ml por pozo) e incubar a 37°C durante 30 min, después de este tiempo lavar con PBS. Las placas se incuban 1 h a temperatura ambiente con una solución de enterotoxina disuelta en PBS (1 μ l/ml). Los fluidos ascíticos son diluidos 1:2 en PBS-T que contiene solución de albumina de bovino 0.1%, agregar a cada pozo dejando la reacción 1 h y después lavar con PBS. Agregar a cada pozo anti-suero de cabra conjugada con peroxidasa diluida 1:500 en PBS-T, y las reacciones son leídas utilizando O-fenilendiamina- H_2O_2 (10 ml de O-fenilendiamina disueltos en buffer de citrato de sodio 0.1 M (pH 4.5); al -

cual se adiciona 4 μ l de H_2O_2 al 30%); después de 20 min de reacción, las placas son leídas en un espectrofotómetro, donde de la actividad enzimática se da en una absorbancia de 450 nm (4,6,8,35,46,62).

5.3.3 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Mediante un ensayo de ferricianina, la actividad de la enzima es medida in vitro. Para esto se hace una solución con el anticuerpo monoclonal y la enzima, los cuales son disueltos en TBS (pH 7.2), esta solución es incubada a 4°C durante toda la noche. Cuando la unión Mab-Ag es completa, adicionar pansorbin disuelto en TBS (pH 8.0), mezclar e incubar los complejos proteína A-antígeno-anticuerpo monoclonal durante 1 h a 37°C. Centrifugar la suspensión y en el sobrenadante medir la actividad de la enzima (3,6,8,12).

5.3.4 MEDICION DE LA INHIBICION DE UBIQUINOL-I Y DE LA ACTIVIDAD OXIDASA DE TMPD POR LA UTILIZACION DE MAbS.

Mezclar, el citocromo d purificado (aproximadamente 15 μ g) y el anticuerpo monoclonal específico, los cuales son disueltos en 100 μ l de buffer B (Tritón X-100 al 1%, fosfato de sodio 0.1 M, a un pH 7.0), esta mezcla se incuba 1 h a 37°C. El oxígeno utilizado, es obtenido de un electrodo del tipo Clark, el cual primero es incubado con; TMPD 2 mM (N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamina) y ditioeritritol 1 mM ó con Ubiquinol-1 y ditioeritritol 2 mM, esta preincubación es

adicionada a la mezcla del anticuerpo monoclonal con el citocromo d terminal, a la cual se le adicionan 50 μ l de pansombin e incubar 1 h a 37°C. Después de la incubación, los tubos son centrifugados durante 3 min y en el sobrenadante se mide la actividad oxidasa de TMBPD ó de Ubiquinol-1, utilizando como control antisuero de conejo ó suero normal (46).

5.3.5 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA e INDIRECTA

El análisis del fenotipo de la línea celular B es ejecutado por inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia indirecta utiliza el anticuerpo monoclonal específico, el monocito específico según el anticuerpo, la célula T y la fluoresceína conjugada con el purificado F(ab')₂ del suero de cabra que contiene anticuerpos anti-ratón IgG + IgM, usando un modelo de citofluorografía 30-H. La inmunofluorescencia directa utiliza fluoresceína conjugada con fragmentos F(ab')₂ de la cadena K del suero de cabra, y también fluoresceína conjugada con IgG del suero de conejo y humano. La fluoresceína conjugada es adicionada a la dilución celular ó suspensión bacteriana (5 X 10⁵), se mezclan e incuban 30 min a 4°C, lavar 2 veces con PBS y resuspender con PBS que contiene azida de sodio al 0.1%. La fluoresceína conjugada con la línea celular T, es incubada y usada como control. Utilizando un microscopio fluorescente, observamos que el antígeno es identificado por el anticuerpo monoclonal específico, está unida se detecta por el color verde brillante que emite el anticuerpo monoclonal conjugado con la fluoresceína (41).

5.4. OTRAS TECNICAS ESPECIFICAS

5.4.1 ENSAYO DE ADHERENCIA BACTERIANA

La bacteria es preincubada 1 h con cada anticuerpo monoclonal, el cual debe tener una concentración que presenta el resultado más bajo de subaglutinación, y los anticuerpos que no aglutinan son diluidos a 10^{-2} e incubados. La bacteria preincubada es adicionada a los pozos de las placas microtiter, que contienen eritrocitos inmunizados. La adherencia bacteriana es evaluada por un método ELISA indirecto, usando un antisuero específico conjugado con peroxidasa unida al suero de cabra que contienen anticuerpos anti-ratón IgG, y un cromóforo (O-fenilendiamina). El porcentaje de inhibición, es calculado por comparación de valores de absorbancia, con los valores de un control sin anticuerpo (1,49).

5.4.2 ENSAYOS DE NEUTRALIZACION

Se describen 4 tipos de ensayos de neutralización:

1).- Medición de la actividad biológica de la enterotoxina a partir de la secreción producida en el lumen del intestino de ratas lactantes. Disolver 240 ng de la toxina pura con el anticuerpo monoclonal específico, en 0.8 ml de PBS (pH 7.4), e incubar 18 h a 4°C. Tomar de esta suspensión 100 μ l, los cuales son inyectados intraperitonealmente, a las ratas lactantes, las cuales deben pesar 3.5 g. Después de 2 h de reacción, los animales son sacrificados y el intestino entero es extraído y pesado. La razón intestino/esqueleto

es calculado, donde un peso de 0.10 g es una respuesta positiva y menor a este, es negativa.

2).- En este método, se mide la capacidad neutralizante del anticuerpo monoclonal, el cual es ensayado en la piel de un conejo. El anticuerpo monoclonal es diluido en PBS, el cual contiene suero de albumina de bovino al 0.1%. A estas diluciones agregar la toxina a una concentración de 20 ng/ml, se incuban 60 min a temperatura ambiente. Tomar 0.1 ml de esta mezcla y colocarlos en diferentes partes de la piel del conejo. Medir el diámetro de las zonas azules producidas por la toxina a una concentración de 20 ng/ml, estas mediciones son comparadas con las producidas por las diluciones seriadas de esta toxina. Donde, el resultado neutralizador para los anticuerpos monoclonales es de 4 mm de diámetro.

3).- Extensión de lisis. Los anticuerpos monoclonales (50 μ l) son colocados en los pozos y se mezclan con la hemolisina fresca (8 unidades hemolíticas por ml). Una unidad hemolítica por ml es definida como la concentración de la toxina que produce el $\geq 90\%$ de hemólisis en un volumen igual de la suspensión de eritrocitos al 2.5%, y agregarlos a los pozos incubados, después de 60 min de incubación a 37°C se mide la extensión de lisis, midiendo la hemoglobina (absorbancia de 412 nm) en el sobrenadante.

4).- Inmunización de animales. Se utilizan 5 ratones por grupo experimental, los cuales son inoculados intraperitonealmente con el anticuerpo monoclonal específico (0.1 ml), una hora antes de ser estimulados con el antígeno específico. Los ratones después de ser protegidos con el anticuerpo mono

clonal, se inyectan intraperitonealmente con 2 - 5 dosis letales del antígeno (DL_{50}), la cual es determinada por el método de Reed y Muench. Otro grupo de ratones es inyectado con una preparación heterógena de sulfato de amonio con el anticuerpo monoclonal IgM precipitado para Pseudomonas aeruginosa, NaCl al 0.58% ó con almidón al 20%, estos ratones son usados como controles. Donde el número de fallecimientos es determinado a las 24 - 72 h después de ser inoculados (10, 15, 33, 40, 44, 61).

5.4.3 MICROSCOPIO ELECTRONICO

Mezclar 50 μ l de una suspensión bacterial con un volumen igual de anticuerpo monoclonal específico diluido 1:2000 en PBS, agitar durante 5 min, después lavar con PBS, secar y marcarlos negativamente con silicotungstato de sodio al 20% ó con fosfotungstato de sodio al 1%, también se puede usar - ferritina, observando la unión antígeno-anticuerpo monoclonal en un microscopio electrónico Phillips EM300. El anticuerpo monoclonal libre es usado como control (36,69,81).

CAPITULO VI
R E S U L T A D O S

6.1. LIPOPOLISACARIDOS

La producción de anticuerpos monoclonales, la realización a partir de muestras de pacientes con infecciones bacterémicas, causadas por Escherichia coli K1 y de 4 voluntarios vacunados con un complejo no covalente (polisacáridos de Meningococo del grupo B), dando como resultado una concentración de $< 5 \mu\text{g}$ de anticuerpo monoclonal específico para Escherichia coli K1/ml (13,26). Después de 2 semanas de inmunización en los 4 voluntarios, obtenemos una concentración del - 48 - 100 μg /ml de anticuerpo monoclonal (IgG); prevaleciendo iguales antes de la inmunización, si adicionamos suero post-inmunizado al anticuerpo monoclonal, complemento y neutrófilos, la habilidad del anticuerpo monoclonal no se ve afectada para destruir a los lipopolisacáridos de Escherichia coli K1. El anticuerpo monoclonal (2-2-B) obtenido de un paciente bacterémico, destruye a los lipopolisacáridos de Escherichia coli K1 y Meningococo del grupo B (Tabla V) a una dilución de 1:250,000, donde esta destrucción fagocítica no se observa en la ausencia de neutrófilos. A una dilución de 1:3,000 se obtiene una prozona, el destruido bacteriano máximo (99.9%) es detectado a una dilución final entre 1:10,000 y 1:100,000. Para comprobar que el anticuerpo monoclonal destruye específicamente al LPS, se agregan grandes cantidades de anticuerpos monoclonales heterógenos producidos para el meningococo del grupo C, lo cual indica que el anticuerpo monoclonal se

E N S A Y O A N T I G E N O R E S U L T A D O

Fase sólida radio inmuno ensayo, unión directa	<u>Meningococcus</u> del grupo B polisacárido-poli-L-lisi- na	1:2,560
	<u>Meningococcus</u> del grupo C polisacárido-poli-L-lisi- na	Unión nega- tiva a 1:10
	Lipopolisacárido de P355 <u>Meningococcus</u> del grupo B	Unión nega- tiva a 1:10
	Complejos no agrupados en membrana exterior de P355	Unión nega- tiva a 1:10
	Polisacárido K1 purificado de <u>Escherichia coli</u>	1:2,560
Fase sólida radio inmuno ensayo, in hibición	Purificado de <u>Meningococcus</u> del grupo B polisacárido	+
	Purificado de <u>Meningococcus</u> del grupo C polisacárido	-
Aglutinación bac- terial	<u>Meningococcus</u> del grupo B (todos los 150 ensayos)	+
	<u>Meningococcus</u> del grupo A, C, W-135, Y, Z, 29E, X	-
	<u>Escherichia coli</u> K1 (+) - de 5 bacterias mutantes	+
	K1-negativo isogénico mu- tantes de 5 bacterias	-

TABLA V. Anticuerpos monoclonales Lurine específicos para el
Meningococo del grupo B (2-2-B) (15).

une al polisacárido K1 de Escherichia coli (8,42').

Haciendo una comparación entre el sistema de inmunización de un ratón BALB/c y un ratón NZB, se comprueba que el ratón NZB exhibe una hiperactividad de los sistemas celulares B y T, dando una respuesta positiva para los antígenos débiles, en este sistema de inmunización obtenemos anticuerpos de la clase IgG, el cual reacciona positivamente con los LPS de Escherichia coli y Meningococcus del grupo B, pero negativamente con los lipopolisacáridos de mutantes K⁻ de Escherichia coli. Mientras que en el sistema de inmunización del ratón BALB/c, se obtienen anticuerpos monoclonales de la clase IgM, el cual no cambia después de 5 inmunizaciones subsecuentes, mientras que en el ratón NZB da una respuesta débil de IgM después de 5 días, igualando al ratón BALB/c después de la quinta inmunización. El tratamiento de los sueros obtenidos de ratones BALB/c y NZB con 2-mercaptoetanol, da como resultado que la actividad del anticuerpo monoclonal obtenido del ratón BALB/c sea totalmente anulada, mientras que la actividad del anticuerpo monoclonal obtenido del ratón NZB se elimina solo parcialmente. Para inducir la respuesta inmune IgG, en ambos ratones, hay que inmunizarlos con lipopolisacáridos de Meningococcus del grupo C, en donde observamos una respuesta 4 veces mayor en ratones NZB que en los ratones BALB/c (26).

La producción de anticuerpos monoclonales para la región central de la pared celular, se realiza utilizando dos mutantes: Escherichia coli J5 y Salmonella minnesota Rc 595, -obteniendo los siguientes anticuerpos monoclonales; MAb 786

(IgG), MAbs 865 (IgK) y MAbs 898 (IgM), los cuales dan un resultado del 100% de reactividad en las mutantes, un 63 - 90% cuando no tienen las bacterias β -D glucosa fosfato en el centro exterior del LPS, y muy poca reactividad cuando tienen solamente α -D glucosa fosfato (59).

La Tabla VI muestra los resultados de hemaglutinación pasiva, RIA y la concentración de cada anticuerpo monoclonal obtenido de los ratones inmunizados con Escherichia coli J5 y Escherichia coli O111:B4 inactivadas por calor (43,32). La figura 2 muestra los resultados de unión y porcentaje de inhibición de estos anticuerpos. La figura 2A representa los anticuerpos monoclonales que no exhiben reactividad cruzada y la figura 2B representan a los MAbs que tienen reactividad cruzada. Por medio de SDS-PAGE e inmunoblot, se comprueba que estos anticuerpos monoclonales no reaccionan con otros LPS de bacterias seleccionadas. Por lo tanto, estos anticuerpos monoclonales son específicos para el centro exterior (Rc) de Escherichia coli (55).

Los anticuerpos monoclonales para el serotipo de Escherichia coli O18:K1 son: PL15, PL13, PL5 y PL6. Por medio de ensayos de aglutinación, los 4 anticuerpos monoclonales reaccionan con un epítipo que está presente en todas las variantes de O18:K1. Mediante ensayos de inmunoblot, se comprueba que estos anticuerpos monoclonales (MAbs) son específicos para todas las moléculas del lipopolisacárido-O, utilizando como control el lípido A central (60,61).

La protección pasiva con anticuerpos monoclonales IgK contra infecciones de Escherichia coli K1, en ratas recién

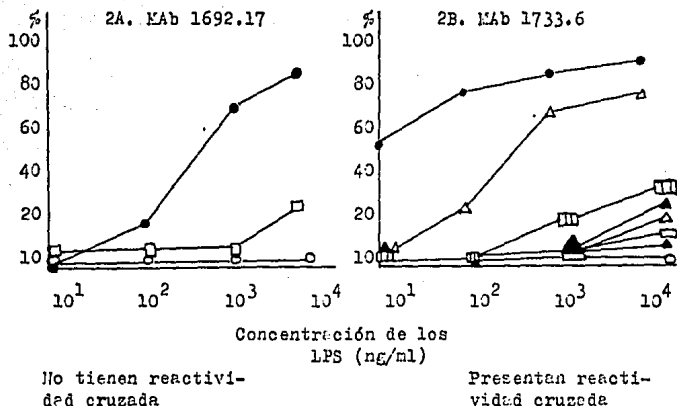
EABs	Isotipo	Resultado de:		Conc. de Ac (ng/ml)
		RIA	EA	
79.4	IgG2a	10 ⁷	256	13
82.1	IgG2a	10 ⁵	256	3
195.5	IgG2b	10 ²	>1,024	2
290.5	IgG2b	10 ⁴	>1,024	4
1066.14	NT	10 ³	512	1
1074.1	IgA	10 ²	>1,024	1
1114.3	IgG2a	10 ²	256	2
1121.3	IgG2a	10 ¹	ND	4
1224.5	IgG1	10 ⁴	>1,024	1
1517.2	IgG2b	ND	>1,024	8
1519.4	IgG2b	10 ⁴	>1,024	4
1628.6	NT	10 ²	512	1
1659.6	IgM	10 ¹	>1,024	1
1676.31	IgG1	10 ⁴	>1,024	1
1680.2	IgG1	10 ⁴	>1,024	8
1682.1	IgM	10 ²	>1,024	2
1692.6	IgM	10 ³	>1,024	4
1717.5	IgM	10 ⁴	256	1
1727.1	IgG3	10 ³	512	8
1730.1	IgG3	10 ⁴	512	0.5
1732.2	IgG2a	10 ⁸	256	4
1733.6	IgG2a	10 ⁴	64	5
1742.6	IgG2a	10 ²	512	1
1814.5	IgG1	10 ⁴	>1,024	21
1823.14	IgG1	10 ⁴	>1,024	1
1840.2	IgG3	10 ¹	32	1
1883.4	IgG2a	10 ⁶	256	3
1884.17	IgG1	10 ⁶	>1,024	1

Conc. del Ac = Fluido ascítico normal conteniendo aproximadamente 0.1 μ g de inmunoglobulina por ml

NT = No tipo

ND = No determinado

TABLE VI. Caracterización de EABs directos contra endotoxinas de Escherichia coli (55).



Los LPS usados son:

- | | | | |
|-----------------|-----|-----------------|-----|
| E. coli J5 | (●) | E. coli 0127:B8 | (□) |
| E. coli 0111:B4 | (○) | E. coli K235 | (▲) |
| E. coli 055:B5 | (▣) | E. coli 026:B | (△) |
- S. minnesota Rc 595, Serratia marcescens, Y. enterocolitica, V. cholerae, K. pneumoniae y P. aeruginosa, siendo estas bacterias negativas.

FIGURA 2. Ensayo de competición de unión, utilizando varias concentraciones de endotoxinas. El anticuerpo monoclonal en el origen, es usado a una dilución de 1:10. (A) representa a los reactivos que no tienen reactividad cruzada con MAb 1692.17 y (B) representa los reactivos que tienen reactividad cruzada con MAb 1733.6. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de unión, en la ausencia de endotoxina, usando los LPS a una concentración de ng/ml (55).

nacidas, es determinado por inyecciones de 25, 5 ó 0 μg del anticuerpo monoclonal disuelto en solución salina, inyectando intraperitonealmente al ratón. El control, inyectado en otro ratón, está formado por solución salina sin anticuerpo. Dando como resultado un 98% de protección, lo cual significa $P < 0.01$ (40,50). Otro resultado de protección pasiva, es el obtenido en ratones inyectados intraperitonealmente con la dosis letal (LD_{50}) de Escherichia coli J5 y Escherichia coli O111:B4, aproximadamente 150 μg y administrando Actinomicina D 2 ng. Estos ratones reciben 20 LD_{50} , donde 9 de los anticuerpos monoclonales IgG protegen a los ratones. Los sobrevivientes se recuperan rápido después de las 24 - 30 h (37,53, 52,59).

6.2. FILI 6 FIMBRIAE

Los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a Escherichia coli fimbriada son: mc 20025-Fab, mc 20025-F2c (IgG), mc 2980-F2 (IgG), MAb 11-2, MAb 34-3, MAb 73-3, MAb 82-1, - MAb 91-1, C3, D5, E11 y G10, y algunos anticuerpos monoclonales de la clase IgM. Por medio de un ensayo de inhibición de ELISA, utilizando los anticuerpos monoclonales tanto de la clase IgG, como los de la clase IgM para inhibir al pili purificado, Escherichia coli fimbriada y Escherichia coli no fimbriada, los antígenos son incubados durante 1 h con el anticuerpo monoclonal específico, dando como resultado que los anticuerpos monoclonales de la clase IgG, sean más específicos a unirse al pili purificado y a la Escherichia coli fim-

brida, que los anticuerpos monoclonales de la clase IgM, pero ninguno de los MAbs se une a Escherichia coli no fimbriada (18,19,23,67,68).

La determinación de la reactividad cruzada entre el pili heterólogo y el pili homólogo, se hace por medio de un método de ELISA, dando como resultado que el anticuerpo monoclonal MAb 11-2 reacciona con el pili homólogo, y los MAb - 34-3 y MAb 73-3 reaccionan con el pili heterólogo; y los anticuerpos monoclonales 82-1 y MAb 91-1 presentan reactividad cruzada con el pili del tipo 1 y el pili P. Por medio de ensayos de inmunoblot, los anticuerpos monoclonales reaccionan con el pili intacto marcado con I^{125} , y muestra 2 polipeptidos de un peso molecular de 15,700 y 19,300 y dos subunidades de 15.7 y 17.8 K (Fig. 3). Donde el MAb 34-3 (Ruta 1) reacciona con la subunidad 15.7 K, el MAb 11-2 (Ruta 2) reacciona con la subunidad 19.3 K y el MAb 81-1 (Ruta 3) reacciona solo con polímeros de los restos de subunidades fimbriales. Por medio de RIP se comprueba que el antisuero polivalente como el anticuerpo monoclonal reconocen la misma molécula proteínica (Fig. 4) (19,23,63,66,81).

Las subunidades fimbriales separadas por Western blot, son puestas a reaccionar con cada anticuerpo monoclonal específico y con el antisuero polivalente, dando como resultado que el antisuero polivalente reacciona tanto con agregados fimbriales como en subunidades, y los anticuerpos monoclonales solo reconocen al pili. Pero al reducir las subunidades con β -mercapto etanol, los MAbs G3 y G10 reaccionan con la subunidad reducida y no reducida, y cuando las subunidades -

fimbriales son asociadas y reasociadas, la unión con los anticuerpos monoclonales se ve afectada, debido a que el antígeno no es completamente igual al fimbrial original (18,19,63,69).

Los resultados obtenidos de los ensayos de hemaglutinación, de los ensayos HI y aglutinación, comprueban que los anticuerpos monoclonales obtenidos son específicos para Escherichia coli fimbriada, los cuales aglutinan los eritrocitos humanos del tipo O; y por medio de la coagulación, estos anticuerpos monoclonales reconocen al pili de las clonas homólogas (18,29,63,69,81).

La propiedad antiadherente de los anticuerpos monoclonales es ensayada in vitro e in situ, utilizando células epiteliales y vejigas urinarias. Donde la medición de unión de Escherichia coli fimbriada a células epiteliales está entre 54 ± 23 por célula epitelial en la ausencia de azúcar, 12 ± 14 en la presencia de α -metil-D-manosidasa y de 54 ± 24 en la presencia de N-acetil galactosamina, donde α -metil-D-manosidasa reduce la asociación de Escherichia coli fimbriada en la superficie mucosa de la vejiga en un 89%. Estos resultados indican que D-manosa es la unión específica de las células de Escherichia coli fimbriada a las células epiteliales y a la superficie mucosa de la vejiga (44,66). Por medio del microscopio electrónico, se observa la unión pili-anticuerpo monoclonal, para lo cual el anticuerpo monoclonal es diluido 1:100 e incubado con $5 \mu\text{g}$ de pili CFA/I. Donde la adhesión del anticuerpo se observa a lo largo del organelo fimbriae (Fig. 5) (69,81).

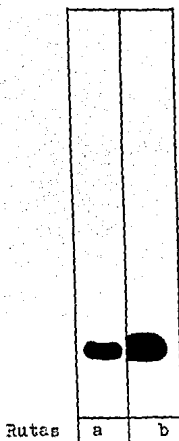


FIGURA 4. RIP de fimbriae con anticuerpos monoclonales anti fimbrial. La bacteria CSH50 - crece en leucina, es solubilizada en buffer de detergente e inmunoprecipitada con el suero antifimbrial de conejo (Ruta a), ó anticuerpo monoclonal obtenido de un ratón - (Ruta b) (23).

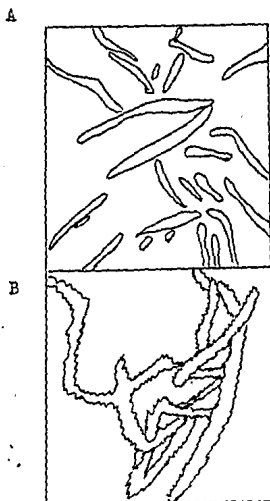


FIGURA 5. Observación del pili CFA/I, en el microscopio electrónico antes y después de la adición del anticuerpo monoclonal. Ruta (A) Intacto pili CFA/I sin anticuerpo. (B) pili CFA/I unido con el anticuerpo monoclonal (81).

La protección obtenida en ratas de 5 días de nacidas, inmunizadas con anticuerpos monoclonales anti-pili e infectadas con Escherichia coli fimbriada, fué del 79% (29,81).

6.3. PROTEINAS

6.3.1 PROTEINA recA

De 9 clones que producen IgG, 6 muestran unión específica con la proteína recA, comprobadas mediante ensayos de -immunoblot. Estos anticuerpos son purificados por cromatografía, los cuales no presentan actividad de ATPasa ó endonucleasa. Las propiedades físicas del purificado anti-recA son resumidas en la tabla VII (53).

ANTICUERPO MONOCLONAL	SUBCLASES	GRUPO	MASA MOLECULAR	
			Cadena pesada	Cadena ligera
			(kD)	
ARM 132	G1	I	53	27
ARM 191	G1	IV	51	28
ARM 193	G2b	III	57	27
ARM 321	G1	II	53	26
ARM 414	G2b	II	54	26

TABLA VII. Propiedades de los anticuerpos monoclonales anti-recA (53).

Los 5 anticuerpos monoclonales anti-recA muestran efectos sobre las 3 actividades de la proteína recA; ssDNA-ATPasa, en la formación de D-hélice y en la actividad de la doble hélice de DNA-ATPasa (shDNA-ATPasa), donde estos 5 anticuerpos monoclonales de IgG son clasificados en 4 grupos:

grupo I, donde una IgG inhibe ligeramente a ambas actividades, ssDNA-ATPasa y shDNA-ATPasa, el grupo II, inhibe completamente las 3 actividades de la proteína recA (ARM 321 y ARM 414); grupo III, ARM 193 inhibe solamente la actividad shDNA-ATPasa y el grupo IV, donde el anticuerpo ARM 191 inhibe la formación de D-hélice y la actividad shDNA-ATPasa. Esta clasificación de los anticuerpos anti-recA sugieren que las IgG obtenidas, inhiben específicamente uno ó más centros activos de la proteína (53).

6.3.2 PROTEINA TraT.

Debido a que la proteína traTp aumenta la resistencia bacteriana, se obtuvieron 2 anticuerpos monoclonales anti-TraT que son: Ko414-B9 y Ko759-68, ambos son de la clase IgG, los cuales son utilizados para detectar la presencia de la proteína TraT en 400 muestras de Escherichia coli, aisladas de pacientes hospitalizados, 38% fueron obtenidas de muestras fecales, 56% en sepsias y un 51% del tracto urinario, y en niños con diarrea se obtuvo un 73% de la presencia de traTp. Las Escherichia coli capsulares presentan un gran porcentaje (66 a 85%) de traTp, por lo que la proteína TraT es un factor virulento de Escherichia coli capsular. Por medio de ensayos de inmunoblot, se determinó la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales Ko414-B9 y Ko759-68, utilizándolos a una dilución de $1:10^3$, detectándose la proteína traTp a una dilución de 10^7 de la bacteria, y por medio de ELISA se detecta traTp a una dilución de 5×10^5 de la bacteria (5).

6.3.3 PROTEINAS RIBOSOMALES L7/L12 y L2.

Para la proteína L7/L12, hay dos anticuerpos monoclonales que reaccionan en distintos determinantes antigénicos. El primero Ac-NTF reacciona en la porción del N-terminal de la proteína, y el segundo Ac-CTF reconoce la porción del C-terminal de la proteína L7/L12. Los anticuerpos monoclonales son digeridos con papaina y los fragmentos Fab resultantes son purificados en una columna de cromatografía DEAE celulosa, bajando el pH del buffer de elución a 3.0, se detecta la presencia de la porción Fc y Fab de las moléculas IgG. Los 2 anticuerpos monoclonales reaccionan con el ribosoma intacto (70S), pero el anticuerpo Ac-CTF es más reactivo, ya que reacciona con la subunidad 50 S, pero por medio del análisis inmunoblot, ningún anticuerpo monoclonal (Ac-NTF y Ac-CTF) reacciona con la subunidad 30 S (3,70).

En el caso de la proteína L2, hay dos anticuerpos monoclonales (Ac5-186 y Ac187-272), los cuales inhiben la síntesis de polifenilalanina. Esta inhibición es más fuerte cuando la subunidad 50S ó 70S, es incubada con un exceso molar de cualquier anticuerpo monoclonal, requiriendo un exceso molar de 3 para causar completa inhibición (56). Con un exceso molar de 4 se ve inhibida la asociación de las subunidades ribosomales, esto es en el caso del anticuerpo Ac5-186 y un exceso molar de 9 para el anticuerpo Ac187-272, pero si tenemos una alta concentración de Mg^{2+} no se ve afectada la asociación de las subunidades, el IAb Ac5-186 no tiene efecto sobre el ribosoma 70S a cualquier concentración de Mg^{2+} (10

6 15 mM), pero el anticuerpo Acl87-272 causa disociación de 70S sólo a una concentración de 10 mM de Mg^{2+} . El efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la actividad de peptidil-transferasa, es de 3 - 4 molar del anticuerpo monoclonal (56).

6.4. ENZIMAS

6.4.1 PIRUVATO OXIDASA

De 6 anticuerpos monoclonales obtenidos, solo el MA b 111 (IgG) inhibe la actividad de la enzima. De este anticuerpo - monoclonal obtenemos los fragmentos Fab, los cuales inhiben la oxidación de la enzima, donde el anticuerpo es divalente, ya que se une a las dos subunidades dentro de la oxidación - tetramérica. El complejo MA b 111-piruvato oxidasa precipita con pansorbin, lo cual indica que el anticuerpo es el único que se une a la enzima en solución (3). Este anticuerpo monoclonal 111, es un potente inhibidor de las formas inactivas y formas lipídicas activas de la enzima, pero no de la forma proteasa de la enzima, ya que la unión del anticuerpo y la actividad de la enzima son compatibles, esto se debe a que el epítope reconocido por el MA b 111 no es directamente el sitio activo de la enzima, ya que los efectos de unión - del anticuerpo son dependientes del estado conformacional de la enzima (3).

6.4.2 RNA POLIMERASA

Los anticuerpos monoclonales producidos son de la clase IgG, usados para inhibir ciertos sitios de la transcripción, ya sea en la unión de RNA polimerasa a DNA ó después del inicio de la síntesis de RNA. Esta inhibición indica que los anticuerpos monoclonales afectan al estado de transcripción (11,57,64). Para detectar los determinantes antigénicos de las subunidades de RNA polimerasa, se separan en una gel de acetato de celulosa y luego son transferidas a papel de nitrocelulosa, obteniéndose dos subunidades β y β' , las cuales son puestas a reacción con los anticuerpos monoclonales anti- β y anti- β' , la unión resultante afecta la síntesis de RNA (64).

6.4.3 GLUTAMINA SINTETASA

Los anticuerpos monoclonales producidos para diferenciar las conformaciones de glutamina sintetasa son: 10-76-1 (IgM), 48-76-1 (IgG), 68-2-1 (IgG), 57-142-2 (IgG), 72-104-1 (IgG), 68-3-2 (IgG) y 57-8-1 (IgG), los cuales son caracterizados de acuerdo a la unión específica y efectos que ejercen sobre la actividad de glutamina sintetasa. Dos de estos anticuerpos (10-76-1 y 48-76-1), se unen solo a la forma monomérica de la enzima, y los anticuerpos 57-142-2 y 68-3-2, se unen a la forma dodecamérica de la enzima y el resto de los anticuerpos, se unen a ambas formas de la enzima (12). Esta unión es determinada a una baja concentración del anti-

cuerpo monoclonal, dando un precipitado insoluble, pero cuando aumentamos la concentración del anticuerpo, el complejo inmune insoluble se convierte en soluble, lo cual varía en el efecto del anticuerpo monoclonal hacia la enzima. Por ejemplo, una baja concentración del anticuerpo 68-2-1 estimula las actividades de Mn^{2+} dependientes de $GS_{1.2}^-$ y $GS_{11.5}^-$ y la actividad de Mg^{2+} dependiente de $GS_{1.2}^-$; sin embargo, esta estimulación se ve afectada por un exceso de anticuerpo monoclonal. Además, el anticuerpo 68-3-2, inhibe la actividad de Mg^{2+} dependiente de $GS_{11.5}^-$, en un 83 y 63% respectivamente, pero no afecta la actividad de Mn^{2+} dependiente de $GS_{1.2}^-$. Sin embargo, la formación de los complejos inmunes solubles en la presencia de un exceso del anticuerpo 68-3-2 no afecta a las 3 actividades de la enzima. El complejo resultante anticuerpo-glutamina sintetasa, presenta diferentes actividades de α -glutamyltransferasa, donde esta actividad está influenciada por el estado de adenilación y de catión divalente de la enzima (12).

6.4.4 DNA POLIMERASA

Se obtuvieron 3 anticuerpos monoclonales directos contra la subunidad α del DNA polimerasa III haloenzima de *Escherichia coli*, estos anticuerpos son de la clase IgG. Por medio de ensayos de inmunoprecipitación (Fig. 6), se comprueba el efecto de estos anticuerpos monoclonales, inhibiendo la actividad catalítica de la haloenzima, la cual es tratada con I^{125} , un exceso de BSA (Ruta A), y con urea 6 M, destru-

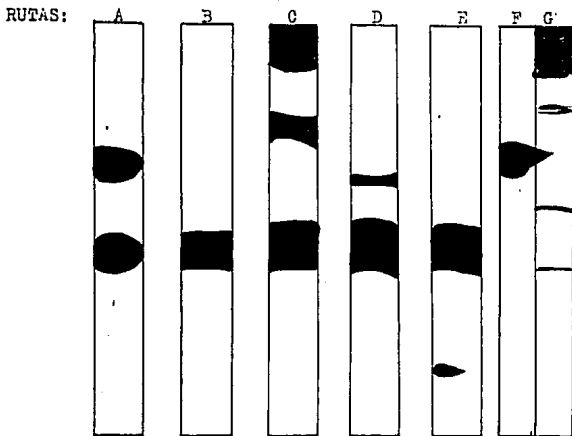


FIGURA 6. Immunoprecipitación de la subunidad α de la holoenzima de DNA polimerasa, la cual es tratada con los MAbs, mediante ensayos de inmunoprecipitación. Ruta A, el DNA polimerasa es marcado con I^{125} y un exceso de BSA ($3 \mu\text{l}$). Ruta B, la holoenzima es tratada con mieloma IgM (1mg/ml). Ruta C, holoenzima tratada con anti- α IgM ($652 \mu\text{g/ml}$). Rutas D y E, la holoenzima es tratada con anti- β y IgG (3.8 y 10ng/ml , respectivamente). Ruta F y G, la holoenzima es tratada con anti- β IgG y anti- α IgM, respectivamente (8.2).

yendo así la estructura de la haloenzima, y es puesta a reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti- α (IgM) donde la subunidad α precipita (Ruta C), utilizando IgM como control (Ruta B). La subunidad γ de la haloenzima comparte un determinante antigénico con la subunidad α , la cual es reconocida por el anticuerpo monoclonal en solución, pero no por el método de papel de nitrocelulosa. En la ruta D y E, la haloenzima es tratada con anti- β y se utiliza la subunidad β de la haloenzima como control. Cuando se omite el tratamiento de la haloenzima con urea (Rutas F y G), se comprueba que el anticuerpo puede ser útil en estudios de inmunoprecipitación en la presencia ó ausencia de sustancias que destruyan la estructura de la haloenzima, donde los anticuerpos monoclonales IgM son específicos para precipitar la subunidad α de la haloenzima (82).

La determinación de la subunidad α en extractos crudos y en la forma pura de la haloenzima, se hace utilizando un método de inmunoblot, donde se comprueba que la subunidad α tiene el mismo peso molecular en ambas formas (82).

6.4.5 RIBONUCLEOTIDO REDUCTASA

Se obtienen 5 anticuerpos monoclonales contra la subunidad B1 y 3 contra la subunidad B2 del ribonucleotido reductasa. Todos los anticuerpos son de la clase IgG, los cuales presentan una alta afinidad por el antígeno y una constante de disociación en el rango nanomolar. Cuatro de los anti-B1 y todos los anti-B2, neutralizan la actividad reductasa de -

la enzima. Los fragmentos Fab, obtenidos de 3 anticuerpos monoclonales anti-B1, tienen similar constante de disociación (K_d). Los anti-B1 se unen a epítopes separados de la subunidad B1, y por medio de la inhibición de la oxidación de NADPH, puede calcularse la cantidad de B1 inhibida por el anticuerpo. La cantidad de anti-B1 requerida para neutralizar un 1 mg de B1 es de 2 - 3 mg, esta unión no depende de ningún estado alostérico de B1. Los resultados de B2 son similares a B1. Todos los anticuerpos monoclonales neutralizan a las dos subunidades, presentándose este efecto sobre la actividad de la enzima, ya que la actividad de ribonucleotido reductasa depende del complejo B1-B2 (K_d).

6.4.6 HEMOLISINAS

Los anticuerpos monoclonales (IgG) producidos, son específicos para la hemolisina 137,000 dalton, la cual es desarrollada por el determinante hemolítico de Escherichia coli. Estas hemolisinas son aisladas de 35 Escherichias coli hemolíticas y de otros miembros hemolíticos de la familia Enterobacteriacea de origen clínico, las cuales presentan β -hemólisis y son puestas a reaccionar con los anticuerpos monoclonales IgG mostrando especificidad por las hemolisinas de Escherichia coli (49).

6.4.7 CITOCROMO d TERMINAL OXIDASA.

Se obtienen 4 anticuerpos monoclonales contra la subu-

nidad del citocromo d terminal oxidasa, los cuales presentan la siguiente afinidad de unión: A414-5 > B20-5 > B3-3 > A16-1. Por medio de ensayos de inmunoblot, se muestra que los anticuerpos monoclonales directos contra la subunidad I, inhiben la oxidación de Ubiquinol-1, mientras que los anticuerpos monoclonales unidos a la subunidad II del citocromo, inhiben la oxidación de TMPD (N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina), pero no afectan a la oxidación del quinol. De esto se concluye que el sitio de oxidación del quinol está en la subunidad I y la oxidación de TMPD está en la subunidad II del citocromo d terminal oxidasa (46).

6.5. ENTEROTOXINAS

Ocho hibridomas producen anticuerpos monoclonales anti-LT_h, donde las uniones específicas de estos anticuerpos producidos, están determinadas por ensayos de Western blot y radio inmuno ensayos. Dos de los anticuerpos (de las clonas - 5F9 y 11E8) presentan reacción cruzada con CT, el resto de los anticuerpos monoclonales son específicos para los determinantes antigénicos de LT_h que no están presentes en la toxina CT. El anticuerpo monoclonal producido por la clona 7C6 es específico para un epítopo que está en LT_h-B, el cual no está en LT_h ó en CT, pero 4 de los anticuerpos monoclonales reaccionan con LT_h-A ó LT_h-B, pero no con las subunidades A y B de la enterotoxina termolábil, por lo que estos anticuerpos monoclonales anti-LT_h son específicos para LT_h, neutralizando la actividad de la enterotoxina termolábil (4,51).

Los anticuerpos monoclonales producidos contra la enterotoxina termoestable (STa), fueron detectados por ELISA, usando 500 ng de Escherichia coli termoestable (STa), mostrando su actividad neutralizante a una dilución de 1:500,000. Haciendo una comparación de unión, utilizando las toxinas - STa, CT, LT y la enterotoxina B de Staphylococcus aureus, se comprobó que los anticuerpos monoclonales neutralizan solamente a la enterotoxina termoestable (STa) (7,31,74).

Existe otra producción de anticuerpos monoclonales contra las verotoxinas de Escherichia coli ó Shigella dysenteriae I toxina (Shiga ó SLT), dando como resultado los siguientes anticuerpos monoclonales: MAb 16E6, MAb 13C4, MAb 19G8, los cuales son de la clase IgG. Estos anticuerpos monoclonales neutralizan las 3 actividades de la toxina SLT; citotoxicidad, letalidad y enterotoxigenicidad, principales factores patogénicos en las enfermedades diarreicas (75).

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

La producción de anticuerpos monoclonales, para los diferentes determinantes antigénicos de Escherichia coli, son desarrollados debido a que estos anticuerpos son agentes poderosos que dan información muy específica del determinante antigénico reconocido. Esta especificidad del anticuerpo monoclonal, es determinada mediante técnicas de aglutinación, precipitación, inmuno histoquímicas y otras técnicas específicas. Pero debido al alto costo de realización y al equipo complejo usado, algunas técnicas no son posibles de llevar a cabo en los laboratorios, por lo que se concluye, que en la actualidad la técnica más usada para ciertas pruebas clínicas del laboratorio, es la técnica ELISA, la cual da especificidad y sensibilidad de determinación, dando precisión y exactitud, para asegurar la interpretación correcta de cada anticuerpo monoclonal.

Dadas las características de cada uno de los anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los determinantes antigénicos de Escherichia coli, estos anticuerpos monoclonales pueden tener en un futuro una amplia aplicación en el estudio de los diferentes determinantes antigénicos de Escherichia coli, y para la determinación del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades producidas por Escherichia coli.

Escherichia coli es la causante de más del 75% de las infecciones de las vías urinarias, incluyendo cistitis, pie-

litis, pielonefritis, bacteremia, septicemia y meningitis. A causa de la rápida deshidratación y la correspondiente elevada mortalidad, es indispensable hacer rápido el diagnóstico del padecimiento y dar tratamiento con el antimicrobiano adecuado, pudiéndose presentar resistencia a estos antimicrobianos. Es por esta razón, que la inmunización pasiva con anti-suero, ó quizás con anticuerpos monoclonales, sea una gran alternativa contra un amplio espectro de organismos Gram negativos.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abraham S.N, et al. Protección contra Escherichia coli la cual produce infecciones en el tracto urinario, con hibridomas directos contra Fimbrise del tipo 1 ó receptores complementarios D-Lanosa. Infection and Immunity (1975); 48: 625 - 628.
- 2.- Anderson A, et al. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra las dos subunidades proteicas B1 y B2 de ribonucleotido reductasa de Escherichia coli. Biochemistry (1986); 25: 860 - 867.
- 3.- Barassi C.A, et al. Caracterización de anticuerpos monoclonales contra piruvato oxidasa de Escherichia coli. Biochemical and biophysical Research Communications (1986); 137: 884 - 891.
- 4.- Belisle B.W, et al. Caracterización de anticuerpos monoclonales para la enterotoxina termolábil desarrollada por un plásmido aislado de Escherichia coli. Infection and Immunity (1984); 43: 1027 - 1032.
- 5.- Bittet-Suermann D, et al. Anticuerpo monoclonal contra la proteína TraT, desarrollada por Escherichia coli aislada de pacientes hospitalizados. Infection and Immunity (1984); 46: 308 - 313.
- 6.- Boot J.H, et al. Anticuerpo monoclonal murine cambia su isotipo de acuerdo a la variante. Determinación y aislamiento de los anticuerpos monoclonales, obtenidos de las ratas inmunizadas, por medio de ELISA. Journal Immunology Methods (1988); 106: 195 - 202.
- 7.- Brandwein H, et al. Producción de anticuerpos monoclonales, que neutralizan a la enterotoxina termoestable de Escherichia coli. Infection and Immunity (1985); 47: 242 - 246.
- 8.- Brunner K, et al. Dos nuevos métodos de ELISAs, usando anticuerpos monoclonales H-Y. Journal Immunology Methods (1988); 106: 49 - 55.
- 9.- Cabilly S, et al. Generación del anticuerpo, actividad de la inmunoglobulina, formada por cadenas polipeptidas reducidas en Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984); 81: 7998 - 8003.
- 10.- Cervera, Ernesto. Tratado de microbiología. 3a. edición, España, Editorial Porrua (1970). pp 287 - 303.
- 11.- Christmann J.L, et al. Anticuerpo monoclonal específico para RNA polimerasa IID y IIA. Journal Biological Che-

- mistry (1981); 256: 11798 - 11803.
- 12.- Chung H.K, et al. Conformación específica de los anticuerpos monoclonales para glutamina sintetasa de Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry (1984); 259: 11756 - 11762.
 - 13.- Conway de Macario E, et al. Anticuerpos monoclonales para el análisis inmuno químico de la bacteria. Journal of Immunology (1982); 129: 1670 - 1674.
 - 14.- Coughlin R.T, et al. Inmunoprotección con anticuerpos monoclonales murine específicos para el polisacárido y para el antígeno - O de Escherichia coli O111:B4. The Journal of Immunology (1987); 139: 557 - 561.
 - 15.- Cross As, et al. Evaluación de inmunoterapia del tratamiento de infecciones causadas por Escherichia coli K1 positiva. The Journal of Infectious Diseases (1983); 147: 68 - 76.
 - 16.- De Mol P, et al. Detección de la enterotoxina termoestable de Escherichia coli por ELISA basado en anticuerpo monoclonal. The Lancet (1984); 2: 285.
 - 17.- De Robertis y De Robertis (h) E.D.P. Biología Celular y Molecular. Decima Edición, México, Librería "El Ateneo" Editorial (1984). p
 - 18.- De Ree J.M, et al. Anticuerpos monoclonales que reconocen el Fimbriae F F71, F72, F9 y F11 en Escherichia coli uropatogénica. Infection and Immunity (1985); 50: 900 - 904.
 - 19.- De Ree J.M, et al. Anticuerpos monoclonales para el serotipo del Fimbriae F para Escherichia coli uropatogénica. Journal of Clinical Microbiology (1986); 24: 121 - 125.
 - 20.- Diamond B, et al. Anticuerpos monoclonales. JAMA (1982); 248: 3165 - 3169.
 - 21.- Dunn D.L, et al. Prevención de septicemia Gram negativa por la utilización de un anticuerpo monoclonal Murine. Arch. Surg. (1985); 120: 50 - 53.
 - 22.- Dwayne C. Savage y Madilyn. Bacterial Adhesión. Editada por Dwayne y Madilyn, Plenum Press, New York (1985). pp 107 - 130.
 - 23.- Eisenstein B.I, et al. Aislamiento y caracterización de un anticuerpo monoclonal contra el organelo Fimbriae del tipo 1 de Escherichia coli. Infection and Immunity (1983); 42: 333 - 340.

- 24.- Favila Castillo, Luis et al. Principios generales de la técnica de obtención de anticuerpos monoclonales. Salud Publica Mexicana (1985); 27: 185 - 193.
- 25.- Friguet B, et al. Un conveniente ensayo inmuno enzimático para ver si los anticuerpos monoclonales reconocen el mismo sitio antigénico. Aplicación de un hibridoma específico para la subunidad P_2 de triptofano sintetasa de Escherichia coli. Journal of Immunological Methods (1983); 60: 351 - 358.
- 26.- Frosch K, et al. Sistema de inmunización NZB para la producción de anticuerpos monoclonales: Aislando un anticuerpo IgG para el polisacárido capsular de Escherichia coli y Meningococcus del grupo B. Proc. Natl Acad Sci USA (1985); 82: 1194 - 1198.
- 27.- Frost G.H, et al. Anticuerpo monoclonal para el receptor estimulante de DNA en combinación con gamma-trombin ó con acetato. Journal Cell Biology (1987); 105: 2551 - 2558.
- 28.- Galfre G, et al. Preparación de anticuerpos monoclonales estrategias y procedimientos. Methods Enzymology (1981); 73: 3 - 46.
- 29.- Gander R.M, et al. Utilización de la técnica de cromatografía y anticuerpos monoclonales para caracterizar múltiples tipos de pilis en enfermedades uropatogenicas, aisladas de Escherichia coli O6. Infection and Immunity (1986); 51: 385 - 393.
- 30.- Georgiou C.D, et al. Regulación de expresión del citocromo d terminal oxidasa en Escherichia coli, en la transcripción. Journal the Bacteriology (1988); 170: 961 - 966.
- 31.- Giannella R.A, et al. Anticuerpos monoclonales para la enterotoxina termolábil de Escherichia coli. Lancet (1984); 1: 1011 - 1012.
- 32.- Gigliotti F, et al. Anticuerpos monoclonales para glicolípido central de Escherichia coli. The Journal of Infections Diseases (1985); 151: 1005 - 1011.
- 33.- Harrison, Luis. Medicina Interna Vol I y II. 5a Edición, México, Ediciones Cientificas. pp 1115 - 1125 (1976).
- 34.- Haynes e Eisenbarth. Anticuerpos monoclonales. Editadas por Barton F. Haynes e George S. Eisenbarth, Academic Press, Inc. (1983). p

- 35.- Hemelhof W, et al. Producción de un anticuerpo monoclonal contra la enterotoxina termoestable producida por Escherichia coli. Lancet (1984); 1: 1360.
- 36.- Hugo F, et al. Producción de un anticuerpo monoclonal - que identifique a la hemolisina producida por Escherichia coli. Journal of Clinical Microbiology (1987); 25: 26 - 30.
- 37.- Jawetz, Ernesto. Microbiología médica. 10a Edición, México, Editorial El Manual Moderno (1983). p
- 38.- J. del Rey Calera. Microbiología e Inmunología de las - enfermedades infecciosas. Primera Edición, México, Editorial Marban (1976). pp 313 - 315.
- 39.- Jean Francois Bach. Inmunología. Primera Edición, México. Editorial Limusa (1968). pp 150 - 156, 217 - 221.
- 40.- Jónsdóttir I, et al. Caracterización inmunológica de los isómeros encargados del crecimiento hormonal de las bacterias con anticuerpos monoclonales. FEBS Lett (1984) 167: 15 - 18.
- 41.- Kabat E.A, et al. Una macroglobulina monoclonal humana con especificidad para el ácido neuramínico, el polisacárido capsular del Meningococcus del grupo B y de Escherichia coli K1, con reactividad cruzada con polinucleótidos y con DNA desnaturalizado. Journal Exp Med (1986) 164: 642 - 654.
- 42.- Kabat E.A, et al. El epítipo asociado con la unión del polisacárido capsular del Meningococcus del grupo B y de Escherichia coli K1 para una macroglobulina monoclonal humana, IgGNOV. Journal Exp Med (1988); 168: 699 - 711.
- 43.- Kaufman B.K, et al. Anticuerpos monoclonales reactivos con polipolisacáridos de Escherichia coli, los cuales - protegen contra un desafío letal. Infection and Immunology (1986); 52: 617 - 619.
- 44.- Kennett R.H, et al. Detección de colonias de Escherichia coli, que presenta productos v-sis oncogénicos con anticuerpos monoclonales hechos contra péptidos sintéticos. Journal of Immunological Methods (1985); 85: 169 - 182.
- 45.- Köhler Milstein C. Derivación de la producción de un anticuerpo monoclonal específico y líneas tumorales por fusión celular. Eur J Immunology (1976); 6 : 511 - 519.
- 46.- Kranz R.G, et al. Caracterización del citocromo c terminal oxidasa de Escherichia coli, usando anticuerpos monoclonales y policlonales. The Journal of Biological

- Chemistry (1984); 259: 7998 - 8003.
- 47.- Krupp, Marcus. Diagnóstico Clínico y del Laboratorio. 8a. Edición, México, Editorial El Manual Moderno (1986) pp 221 - 223, 292 - 297.
 - 48.- Lehninger, Albert. Bioquímica. Segunda Edición, Barcelona, Editorial Omega (1985). pp 330 - 333, p.
 - 49.- Le J, et al. Natural y recombinado interferon de Escherichia coli, diferenciados con anticuerpos monoclonales The Journal of Immunology (1984); 132: 1300 - 1304.
 - 50.- Li X.N, et al. Anticuerpos monoclonales que inhiben la actividad de transcripción por el receptor AMP cíclico de Escherichia coli. The Journal of Biology Chemistry (1988); 263: 3448 - 3453.
 - 51.- Lindholm L, et al. Anticuerpos monoclonales para la toxina Colera con especial referencia a reacciones cruzadas con enterotoxina termolábil de Escherichia coli. Infection and Immunity (1983); 40: 570 - 576.
 - 52.- Mayes Rodwell, Martin. Bioquímica de Harper. 9a Edición México, Editorial El Manual Moderno (1984). pp 95 - 175, 497 - 514, p
 - 53.- Makino O, et al. Anticuerpos monoclonales con efectos - específicos sobre las actividades de la proteína recA de Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry (1985); 260: 15402 - 15405.
 - 54.- Mc Gregor A.M, et al. Anticuerpos monoclonales: Producción y utilización. Br Med J (1981); 283: 1143 - 1144.
 - 55.- Minner K.M, et al. Caracterización de anticuerpos monoclonales Murine para Escherichia coli J5. Infection and Immunology (1986); 52: 56 - 62.
 - 56.- Nag B, et al. Dos anticuerpos monoclonales contra proteína ribosomal L2 de Escherichia coli, distinguiendo diferentes epitopes en ribosomas intactos. The Journal of Biological Chemistry (1986); 261: 13892 - 13897.
 - 57.- Niliforov V.G, et al. Anticuerpos monoclonales inhiben a RNA polimerasa de Escherichia coli. FEBS (1983); 158: 113 - 115.
 - 58.- Pérera.- Caracterización de anticuerpos monoclonales para Shiga II de enterohemorrágica Escherichia coli, los cuales son producidos por medio de inmunizaciones y caracterizados por ensayos enzimáticos (ELISA). Journal Clinical Microbiology (1988); 26: 2127 - 2131.

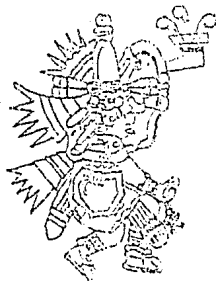
- 59.- Peters H, et al. Anticuerpos monoclonales para un antígeno común Enterobacteria, y para lipopolisacáridos de Escherichia coli; Demostrando un determinante antigénico compartido entre el antígeno común y el polisacárido capsular de Escherichia coli. Infection and Immunity (1985); 50: 459 - 466.
- 60.- Pluschke G, et al. Anticuerpos monoclonales para el antígeno - O del lipopolisacárido son protegidos contra infecciones neonatales con Escherichia coli K1. Infection and Immunity (1985); 49: 365 - 370.
- 61.- Pluschke G, et al. Electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato de policrilamina y anticuerpos monoclonales contra los subgrupos de lipopolisacáridos O18 y O23 de Escherichia coli. Infection and Immunity (1986); 51: 286 - 293.
- 62.- Oii ITO I, et al. Diferentes tipos de anticuerpos monoclonales para antígenos de Vibrio cholerae. Journal Clinical of Microbiology (1987); 25: 2289 - 2293.
- 63.- Raybould T.J.G, et al. Anticuerpo monoclonal detectado por hemaglutinación pasiva y ensayos inmuno enzimáticos para cuantificar los antígenos F41 y K99 de Escherichia coli. Journal of Clinical Microbiology (1987); 25: 278 - 284.
- 64.- Rockwell P, et al. Caracterización de los efectos de anti- β y anti- ϕ anticuerpos monoclonales sobre la actividad de RNA polimerasa de Escherichia coli. Biochemistry (1985); 24: 3240 - 3245.
- 65.- Salle, Ernesto. Fundamental principles of Bacteriology. 6a. Edición, New York, Editorial Mc Graw-hill Brook Company (1968). pp 265 - 301, 302 - 334.
- 66.- Schmitz S, et al. Anticuerpos monoclonales contra el antígeno LC (pseudotipo 1) de Escherichia coli. Infection and Immunity (1986); 51: 54 - 59.
- 67.- Schifferli D.K, et al. Uso de anticuerpos monoclonales para epítopos de Fimbriae 987 P de Escherichia coli. Infection and Immunity (1987); 55: 923 - 930.
- 68.- Sherman D.K, et al. Protección contra Colibacilos por la administración de Escherichia coli K99, usando anticuerpos monoclonales. Infection and Immunity (1983); 42: 653 - 658.
- 69.- Söderstrom T, et al. Propiedades serológicas y funcionales de los anticuerpos monoclonales para el tipo 1 de

- pili y antígenos capsulares de Escherichia coli. Prog Allergy (1983); 33: 259 - 274.
- 70.- Sommer A, et al. Preparación y caracterización de dos anticuerpos monoclonales contra diferentes epitopes de la proteína ribosomal L7/L12 de Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry (1985); 260: 6522 - 6527
- 71.- Stites, Daniel. Immunología Básica y Clínica. 5a. Edición, México. Editorial El Manual Moderno (1985). pp 330 - 333, 403 - 414, p.
- 72.- Strickland N.S, et al. Estructura y función de la subunidad α -70 de RNA polimerasa de Escherichia coli, anticuerpos monoclonales que localizan los epitopes y su efecto en la transcripción. Biochemistry (1988); 27: 5755 - 5762.
- 73.- Strockbine N.A, et al. Caracterización de anticuerpos monoclonales contra la toxina SLT de Escherichia coli. Infection and Immunity (1985); 50: 695 - 700.
- 74.- Svennerholm A.K, et al. Anticuerpos monoclonales contra la enterotoxina termoestable (StA) de Escherichia coli y utilizando un ensayo inmuno enzimático GM1. Journal of Clinical Microbiology (1986); 24: 585 - 590.
- 75.- Tacket Co, et al. Purificación, morfología y genética de un nuevo fimbriae, factor colonizador de enterotoxigenica Escherichia coli O159:H4. Infection and Immunity (1987); 55: 1063 - 1068.
- 76.- Tlaskalová-Hogenová H, et al. Opsonico, citotóxico, precipitación, bloqueo de adherencia bacterial y otras actividades del anticuerpo monoclonal IgE comparadas con IgA y IgM. Immunology (1984); 53: 427 - 433.
- 77.- Tood Sanford. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a Edición, México, Editorial Salvat (1976). p
- 78.- Van der Ley P, et al. Anticuerpos monoclonales directos contra la pared celular expuesta de la proteína PhoE de Escherichia coli K12. Eur Journal Biochemistry (1985); 147: 401 - 407.
- 79.- Vox Sang, et al. Anticuerpos monoclonales (1983); 45: 166 - 179.
- 80.- Worobec E.A, et al. Anticuerpos monoclonales contra el factor colonizador ó antígeno 1 pili de Escherichia coli Infection and Immunity (1983); 41: 1296 - 1301.
- 81.- Weiss E.J, et al. Caracterización de los anticuerpos monoclonales contra el fimbriae de bacteroides. Infection

- and Immunity (1988); 56: 219 - 224.
- 82.- Wu Y.H, et al. Anticuerpos monoclonales específicos para la subunidad α del DNA polimerasa III holoenzima de Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry (1984); 259: 12117 - 12122.

QUETZALCOATL

Quetzalcóatl, fue quizás el más complejo y fascinante de todos los Dioses mesoamericanos. Su concepto primordial, sin duda muy antiguo en el área, parece haber sido el de un manatruco serpiente celeste con funciones dominantes de fertilidad y creatividad. A este núcleo se agregaron gradualmente otros aspectos: la leyenda lo había mezclado con la vida y los hechos del gran Rey sacerdote Tepilliztín, cuyo título sacerdotil era el propio nombre del Dios del que fue especial devoto. En el momento de la conquista, Quetzalcóatl, considerado como Dios Único de los mayas varias funciones: creador, Dios del viento, Dios del planeta Venus, héroe cultural, arquetipo del sereno día, patrón del calendario y de las actividades intelectuales en general, etc. Un análisis adicional es necesario para poder describir las lógicas (aparentemente independientes que entran al tejido de su compleja personalidad.



IMPRESO EN LOS TALLERES DE:
EDITORIAL QUETZALCOATL, S. A.
MEDICINA NO. 57 LOCALS 1 Y 2 (ENTRADA POR PASO DE LAS
FACULTADES) FRENTE A LA FACULTAD DE MEDICINA DE U. N. A.
MEXICO 20, D. F. TELEFONO 654-73-66 Y 654-70-62