

104  
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

CONTENIDO  
DE

ANTIGENO COMUN ENTERO BACTERIANO  
(ECA) EN EL INTESTINO DE VARIAS  
ESPECIES DE ROEDORES.

T E S I S

SOFIA DEL CARMEN PEREZ VILCHIS  
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991.



## **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.

## INTRODUCCION

## OBJETIVOS

## GENERALIDADES

CRUCE ANTIGENICO Y SU SIGNIFICADO BIOLOGICO

ANTIGENO COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS (ECA)

METODOS INMUNOLOGICOS PARA EL ESTUDIO DEL (ECA)

## PARTE EXPERIMENTAL

### A MATERIAL

#### 1.- MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Cultivo de bacterias

1.2 Preparación del suero antiespecie

1.3 Obtención del Lipopolisacárido crudo

1.4 Apareamiento de roedores

1.5 Obtención de Intestinos

#### 2.- REACTIVOS

2.1 Globulos rojos de carnero

2.2 Complemento

#### 3.- SOLUCIONES Y REACTIVOS

#### 4.- EQUIPO

### B METODOS

- 1.- Reaccion de hemaglotinación indirecta
- 2.- Titulación de Complemento
- 3.- Reacción de Inmunohemólisis
- 4.- Preparación de las fracciones antigénicas de los intestinos
- 5.- Reacción de la inhibición de la inmunohemólisis

## RESULTADOS

## DISCUSION

## CONCLUSIONES

## BIBLIOGRAFIA



## TABLA DE ABREVIATURAS

IgA	INMUNOGLOBULINA A
ECA	ANTIGENO COMUN ENTEROBACTERIANO
LPS	LÍPOPOLISACARIDO
(O)	ANTIGENO SOMATICO LIPOPOLISACARIDO DE LA PARED CELULAR
(R)	CEPA RUGOSA
(S)	CEPA LISA
LD <sub>50</sub>	DOSIS LETAL PARA EL 50% DE LOS ANIMALES
DEAE	DIETIL AMINO ETIL
IHA	INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION
IgG	INMUNOGLOBULINA G
S.S.I.	SOLUCION SALINA ISOTONICA
rpm	REVOLUCIONES POR MINUTO
ml	MILILITRO
TSA	AGAR TRIPTICASA Y SOYA
°C	GRADOS CENTIGRADOS
GRC	GLOBULOS ROJOS DE GARNERO
D.O.	DENSIDAD OPTICA
V	VOLUMEN
TBS	SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIETANOL AMINA
nm	MANOMETRO

FIE FRACCION INSOLUBLE EN ETANOL AL 85%

FSE FRACCION SOLUBLE EN ETANOL AL 85%

UCH<sub>50</sub> UNIDAD 50% HEMOLITICA

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

1

El intestino tiene funciones bien definidas que lo relacionan particularmente con la digestión de los alimentos; sin embargo, desde el punto de vista inmunológico es la parte del organismo que recibe y procesa la mayor cantidad de material antigénico. Esto aunado al proceso de defender al organismo de gérmenes patógenos y ser a su vez nicho de microorganismos comensales, hace a la mucosa intestinal una interfase vulnerable en donde continuamente se encuentra lo propio con lo ajeno.

La respuesta inmunológica local del intestino no debe considerarse algo tan sencillo como la simple síntesis de anticuerpos de secreción. En realidad es un proceso mucho más complicado. El tubo digestivo realiza un trabajo que, en cierto sentido, puede resultar paradójico. Por una parte debe degradar macromoléculas y transformarlas en nutrientes sencillos para ser absorbidas. Por otro lado, también debe aceptar la absorción de sustancias no degradadas para iniciar la respuesta del sistema inmunológico local. De no ser así, no se justificaría la presencia de inmunoglobulinas séricas que reaccionan con antígenos de la dieta o de las enterobacterias (47). Este comportamiento dual ante un mismo reto implica un balance entre nutrición e inmunidad. De esta manera, la primera sintetiza lo propio y la segunda realiza una

serie de mecanismos que rechazarán esas mismas sustancias - como algo extraño.

Con todo lo dicho anteriormente nos preguntamos lo siguiente: ¿Cuáles son las condiciones que deciden, a nivel de mucosa intestinal, dónde termina lo propio y comienza lo ajeno? y la otra pregunta es ¿Las mismas sustancias pueden comportarse como nutrientes y/o inmunógenos?

La colonización bacteriana que sigue al nacimiento - hace difícil recuperar sustancias propias de la mucosa que - no se encuentren "contaminadas" con productos que procedan - de microorganismos comensales o de la dieta.

Si se recurre al estudio de intestinos estériles de recién nacidos, se encuentra que algunos de sus polisacáridos tienen una composición antigénica similar a la de las enterobacterias (1). Por otra parte, cada vez se encuentra un número mayor de sustancias compartidas que relacionan filogenéticamente a los microorganismos con las células eucariotas - (49). Pero el estudio de los antígenos propios plantea otro problema que no se puede solucionar fácilmente.

El respeto a la integridad de la mucosa intestinal es --

una situación inmunológica tan compleja como la invasividad bacteriana y las lesiones al epitelio. Las observaciones de que un mismo serotipo de Escherichia coli puede comportarse como patógena y/o comensal en un mismo individuo (27) y la comprobación de portadores sanos de Salmonella thyphi o Entamoeba histolytica, confieren cierta individualidad al estado de salud o enfermedad de un individuo (18). De este modo no se puede generalizar el concepto de que existen grupos de -- microorganismos que sistemáticamente lesionan el intestino y otros que "siempre" vayan a ser inofensivos (23).

El interés de este trabajo es demostrar que en el intestino de embriones de roedores existen sustancias con determinantes similares a los de un antígeno común compartido por todas las bacterias Gram negativas que habitan el tubo digestivo. Este hapteno se conoce desde 1962, cuando fué descubierto por Kunin (26). Se ha denominado antígeno común de las enterobacterias o ECA. La asociación entre el ECA e intestino ya se ha demostrado indirectamente en humanos y ratas (16). La existencia de un antígeno que comparten las -- bacterias y la mucosa intestinal, ha servido para postular -- mecanismos inmunológicos que explican la patogenia de algunas enfermedades (48) y también el grado de virulencia de algunos microorganismos (55). Al proponer que la mucosa intes

tinal de embriones de roedores contienen antígenos similares al ECA, se trata de probar que este cruce antigénico no depende de la colonización del tubo digestivo por la flora bacteriana comensal. Si es así, se puede suponer que los animales roedores tienen almacenada una información genética que les permite expresar durante su desarrollo embrionario, varias determinantes antigénicas similares a las de las bacterias comensales, en las que se encuentran los tejidos que -- después del nacimiento van a ser colonizados por estos microorganismos. La explicación del significado biológico que -- puede tener este fenómeno no se contempla como un objetivo -- en el momento de iniciar este trabajo. La posibilidad de que los antígenos similares al ECA que tiene el intestino del embrión, proceden del lipopolisacárido (LPS) bacteriano de origen materno que cruza la placenta, es otro punto que deberá ser objeto de más estudios para complementar los resultados del actual.

## Objetivos.

Comprobar si el cruce entigénico (ECA inmunointestinal) que se ha demostrado ya en ratas adultas, existe también en los embriones de la misma especie de roedores.

Demostrar que el mismo fenómeno se encuentra presente en los embriones de varias especies de roedores y no exclusivamente en las ratas.



## GENERALIDADES

Desde el año de 1911, cuando Forssman descubrió el antígeno que lleva su nombre, compartido por glóbulos rojos de carnero y el hígado, riñones, adrenales, testículos y cerebro de cobayos, los inmunólogos han encontrado muchas otras sustancias comunes en animales diferentes. El mismo antígeno de Forssman se encontró más adelante en los tejidos de caballos, perros, gatos, ratones, aves, tortugas, otros animales y aún bacterias. Desde entonces, esos antígenos compartidos se conocen con el término genérico de antígenos heterófilos.

El de Forssman representa solamente una de las muchas sustancias de origen vegetal o animal que pueden ser comunes a varios tejidos (7). Otro antígeno heterófilo muy conocido, fué el descubierto por Paul y Bunnell que se relacionó con la infección provocada por el virus de la mononucleosis infecciosa. -- Springer (53), ha realizado extensos estudios acerca de los determinantes antigénicos de las sustancias de grupos sanguíneos que comparten los lipopolisacáridos bacterianos. En líneas generales, los antígenos heterófilos representan curiosidades inmunológicas que aparentemente ocurren al azar. Pero es indudable que, compartir antígenos debe tener un significado biológico -- que hasta ahora no se comprende por completo. Se puede suponer que, a nivel de tubo digestivo, los antígenos compartidos por la mucosa y las bacterias pueden con-----

tribuir para que la relación huésped -parásito se establezca en un comensalismo y no evolucione hacia la enfermedad. Pero por las mismas razones, no parece probable que las aglutininas anti-glóbulos rojos de carnero que tienen los pacientes infectados por el virus de la mononucleosis infecciosa, resulten una consecuencia "sin sentido" de un simple accidente inmunológico que relaciona antigénicamente los virus con los eritrocitos. El capítulo de los anticuerpos heterófilos está lleno de sorpresas e incógnitas cuya solución podría mejorar nuestro conocimiento acerca de la patogenia de algunas enfermedades (20) (48) (60).

El descubrimiento de algunos cruces antigénicos entre -- los tejidos de mamíferos y las estructuras de bacterias patógenas ha conducido a proponer varias hipótesis que tratan de explicar la patogenia de las enfermedades con un fondo inmunológico. Uno de los ejemplos más estudiados ha sido el cruce antigénico entre el estreptococo beta hemolítico y diversos tejidos como el cardíaco, renal y sinovial (60). Existe una literatura abundante acerca de la fiebre reumática y los antígenos compartidos (20).

En el año de 1967, Perlman (48) propuso que si el intestino humano y Escherichia coli poseían determinantes antigé-

nicas similares, las lesiones de la colitis ulcerosa podían ser consecuencia de una "desviación" de la respuesta inmunológica contra las bacterias. En el año de 1982, Carrillo -- (3) expuso una teoría acerca de la mayor o menor susceptibilidad de las infecciones entéricas de acuerdo a los antígenos lipopolisacáridos contenidos en la mucosa intestinal de cada individuo. Sus estudios acerca del mosaico antigénico de la mucosa intestinal revelan que los anticuerpos preparados contra diferentes serotipos de Escherichia coli podían reaccionar contra varios extractos de intestinos obtenidos de niños mortinatos, conforme a un patrón que resultaba completamente diferente de persona a persona. En este mismo -- trabajo se demostró que el ECA estaba presente en todas las muestras de mucosa intestinal humana que se analizaron.

El ECA fué descubierto por Kunin (26) en el año de 1962. Este investigador demostró que 145 serogrupos de Escherichia coli compartían un antígeno común cuya presencia en el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular se podría demostrar -- por medio de una reacción de hemaglutinación pasiva (25). -- Posteriormente se hicieron dos nuevas observaciones importantes. Por una parte se pudo comprobar que el hapteno no sólo era común a todas las cepas de Escherichia coli, sino también a todos los demás miembros de la familia Enterobacteria ceae ya que fué demostrado en Proteus, Shigella, Salmonella,

Erwinia, Klebsiella, Yersinia, Serratia, Enterobacter, Citrobacter, Edwardsiella (49). Desde ese momento se comenzó a llamar "antígeno común de las enterobacterias o ECA". Pero, por otra parte, diferentes experimentos (46) confirmaron que aunque el ECA estaba presente en todas las cepas de una misma bacteria, su grado de inmunogenicidad resultaba diferente, - los conejos que formaban la mayor cantidad de anticuerpos - anti-ECA eran aquéllos inoculados con Escherichia coli 014. La inmunización con Escherichia coli 056,0124,0144 inducía - la síntesis de muy pocos anticuerpos anti-ECA. Cuando los - conejos se inyectaban con suspensión de Escherichia coli 014 debía contener la mayor cantidad, mientras que las otras cepas probablemente contenían tan poco ECA, que por esta razón no sintetizaba anticuerpos o simplemente inducía una respuesta muy débil. Sin embargo, bien pronto se pudo comprender - que la inmunogenicidad del ECA no dependía de su concentración, sino más bien de la forma en la cual se encontraba ligado a la pared celular. Existía un ECA libre, en forma de hapteno, que no se comportaba como inmunógeno y otro ECA conjugado covalentemente a un núcleo de polisacárido de las cepas rugosas de enterobacterias que era capaz de estimular la síntesis de anticuerpos (57).

En 1962, Whang y Neter (58) obtuvieron pruebas experimen

tales de que no existía una relación antigénica entre ECA y los antígenos somáticos de la pared celular. Aunque las preparaciones crudas de todos los lipopolisacáridos de las enterobacterias contenían el ECA, se observó que al aplicar las técnicas de Westphal para obtener un LPS purificado, esta preparación contenía el hapteno descubierto por Kunin (24).

En seguida de esta observación las personas que trabajaban en el estudio del nuevo antígeno común encontraron una dificultad que no esperaban, las bacterias que contenían ECA en su pared celular no podían ser aglutinadas por los anticuerpos anti ECA (58). Más aún, las partículas de látex forradas con el ECA tampoco podían ser aglutinadas cuando se mezclaban con el suero anti-*Escherichia coli* 014 (58); todo lo cual estaba en marcado contraste con la aglutinación bacteriana que se observaba cuando los anticuerpos estaban dirigidos contra los antígenos somáticos 0. Esto último se había demostrado desde el final del siglo pasado. También con anterioridad se había comprobado la aglutinación del látex cubierto con los lipopolisacáridos bacterianos y mezclados con los anticuerpos específicos anti-0. Por otra parte, Kunin (24) observó además que las fracciones separadas de las enterobacterias no eran precipitadas por los anticuerpos anti-ECA a pesar de que contenían el hapteno en forma libre y/o conjugado.

A raíz de esta dificultad para aglutinar las cepas lisas (S) de varias enterobacterias que sí contenían el ECA en su pared celular, se comenzó a trabajar con la finalidad de conocer la localización del antígeno común (1). Del mismo modo, otros investigadores iniciaron diferentes pruebas para tratar de encontrar las condiciones ideales que permitieran la precipitación del ECA en geles de agarosa (56). Los dos grupos de personas obtuvieron resultados positivos que sirvieron para aumentar el conocimiento acumulado sobre el ECA.

Marx (36) pudo lograr que los anticuerpos anti-ECA aglutinasen los cuerpos celulares de varias capas rugosas (R) de Salmonella y Escherichia coli. Sus resultados demostraron una correlación entre los títulos aglutinantes de las bacterias y hemaglutinantes pasivos. Por esta razón se consideró que era válida la hipótesis de que, al perder su envoltura de polisacárido, las bacterias exponían las porciones más internas de la pared celular y dejaban al descubierto el ECA conjugado a un polisacárido denominado central o "core" que es constante para cada especie.

Por medio de técnicas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis (32), se pudo obtener la precipitación inmunológica



del ECA contenido en extractos crudos de los LPS. Se comprobó que el hapteno estaba cargado negativamente y migraba francamente hacia el polo negativo. Sin embargo, fué evidente que un mismo suero no tenía la misma capacidad para precipitar -- que para hemoaglutinar. Aparentemente la reacción de precipitación dependía de tres factores: la relación o cantidad de anticuerpos IgM presentes en el suero, el carácter monoespecífico del suero que previamente hubiera sido absorbido en mutantes ECA y finalmente que el suero no estuviera preservado en glicerol.

Los estudios para conocer el número de cepas que fueran ECA+ condujeron inevitablemente al hallazgo de que algunas Escheriachia coli, Proteus y otras enterobacterias podían -- ser ECA- (19) . Esto sirvió para estimular varios estudios -- acerca del control genético en la biosíntesis del ECA. En -- estos estudios se demostró que el grupo de genes rfe y rff -- estaban relacionados con la biosíntesis de ECA. Estos dos genes se encuentran localizados cerca de los genes isoleucina/valina (i/v) en la posición 84 del mapa cromosomal de Salmonella (52). También se observó que se requiere la región rfe para la síntesis del polisacárido o en ciertas especies de Salmonella, pero no en otras. Por otro lado, una parte del -- gen rfb que es determinante para formar el polisacárido o es -- pecífico, se requiere a su vez para síntesis del ECA. Tam-- bién se observó que otros genes del LPS están involucra ---



dos en la unión del ECA al LPS en ciertas cepas ECA inmunogénicas (19).

La estructura de los lipopolisacáridos de las paredes celulares de las bacterias Gram<sup>-</sup> constan de un lípido complejo denominado lípido A, al cual se le fija un polisacárido - constituido por un centro que es constante para cada especie y una serie terminal de unidades repetidoras de trisacáridos lineales o tetrapentasacáridos ramificados. Al polisacárido central se le conoce también como "core".

La biosíntesis del "core" y de las cadenas para el antígeno O están bajo el control de los genes *rfa* y *rfb*. Una mutación en cualquiera de estas regiones producirá una mutante rugosa (R) cuyo fenotipo será *rfb*, esto dará como resultado la ausencia del ECA en esta cepa.

Otra mutación que bloquea la síntesis del ECA, pero que no afecta al polisacárido O se encontró accidentalmente en S. minnesota. El sitio de mutación está ligado a la región *i/v rfe* y al gen *rff* (30). Por otra parte, se demostró que el gen *rff* se relaciona con la síntesis de la forma activada -- del ácido D-manosamin-urónico que es el principal constituyente del ECA(27).

Esto llevó a la conclusión de que cuando las mutantes - (R) tenían grandes alteraciones en el gen *rfb* se presentaban como ECA<sup>-</sup> y aquellas cuyas alteraciones en el gen *rfb* fueran menores, serían ECA<sup>+</sup>. Sin embargo, se vió que cuando se sustituía un *rfb*<sup>-</sup> por un *rfb*<sup>+</sup> se obtenían híbridos de cepas lisas (S) que continuaban siendo ECA<sup>-</sup>. Esto llevó a suponer una segunda mutación provocada por *rff*. Si se sustituían *rff*<sup>-</sup> por *rff*<sup>+</sup> se obtenían híbridos sólo con trazas de ECA.

Por otra parte, para que las bacterias sean ECA inmunogénicas, la inmunodeterminante antigénica del ECA debe estar unida al "core" del LPS (38). Existen diferentes centros o "core" R1, R2, R3, R4 que son esenciales para que el ECA sea inmunogénico (51). Por ejemplo: si una mutante de *E. coli* - 014 *rfa* R4 tiene un "core" incompleto será no inmunogénica.

Las mutantes R1 y R4 que contengan un gen *rfaL* defectuoso, (*rfaL* es parte del gen *rfa* que se relaciona con la traslocación de cadenas O al "core") serán no inmunogénicas aunque produzcan el antígeno ECA (35) (52). Esto sugiere que se requiere la función del gen *rfaL* para la traslocación del ECA en el "core" del LPS y es esencial para que el ECA sea inmunogénico.

El hallazgo del ECA en la porción más externa de la pared celular (1), sirvió para suponer que el hapteno podría tener relación con la virulencia de las bacterias. Los estudios que realizaron en este sentido dieron resultados contradictorios. Las inyecciones intraperitoneales, utilizando como inóculo varias cepas de Salmonella typhimurium, demostraron que cuando las bacterias contenían el ECA, se comportaban en forma mucho más virulenta que cuando no lo contenían. Los resultados de Valtonen (55) fueron contrarios a los encontrados por Carrillo (4) y col. Estos últimos encontraron que Escherichia coli aislada de la materia fecal de niños lactantes con diarrea, contenía menor cantidad de ECA que los mismos serotipos aislados en los mismos niños durante la convalecencia.

Estos estudios se estimularon con el gran número de enfermedades que pueden causar las enterobacterias tanto en el hombre como en los animales (8). El interés de los investigadores iba tras la posibilidad de lograr una profilaxis efectiva contra las infecciones causadas por las bacterias Gram<sup>-</sup>, después de inmunizarlos contra el ECA (7). Sin embargo, los resultados experimentales no demostraron que la sensibilización al ECA pudiera impedir las lesiones que implica

ban un reto subsiguiente por enterobacterias patógenas.

Habitualmente el suero humano normal contiene muy pocos anticuerpos anti-ECA. Las personas con un proceso inflamatorio del intestino tienen aumentados sus títulos de anticuerpos anti-Escheriachia coli 014. Sin embargo, el valor profi-láctico de la respuesta inmunológica contra los determinan-tes antigénicos del ECA no ha quedado completamente confirma-do. Estudios experimentales con ratones (13) han demostrado que la inmunización de los animales si tiene un efecto pro-ector aunque éste sea transitorio. Pero en voluntarios hu-manos inmunizados con el ECA apenas se ha logrado demostrar un aumento de la actividad opsónica de los anticuerpos anti-ECA (14). otros experimentos que han investigado la LD50 en animales inyectados intravenosamente (iv) (39) con enterobac-terias vivas, no revelan diferencia entre los que habían si-do vacunados previamente con el ECA y los que no habían reci-bido la inmunización. La transferencia pasiva de los anti--cuerpos anti-ECA también condujo a resultados variables: de tres muestras, dos no mostraron protección y una sí. El sue-ro protector mostró contener, además de anticuerpos anti-ECA otro tipo de anticuerpos dirigidos en contra de una determi-nante del "core" del lipopolisacárido conocida como Re que -

al parecer es común a la mayoría de las enterobacterias (39). Estudios posteriores han demostrado que los anticuerpos anti-Re y no los anti-ECA, producen actividad protectora en septicemias humanas causadas por bacterias entéricas (40).

La composición química del ECA ha estado sujeta a discusión y ha sido objeto de varios estudios. Probablemente el adelanto más importante se observó cuando Susuki (54) descubrió que el ECA y el LPS de una cepa no inmunogénica podían separarse por un simple tratamiento con etanol al 85%. El hapteno es soluble en etanol mientras el LPS permanece en la fracción insoluble. La mayor parte de los procedimientos de extracción que se desarrollaron posteriormente se basan en esta solubilidad del ECA en etanol.

En el año de 1963 Kunin (24) utilizó una mezcla de fenol agua y calor para extraer el ECA de Escherichia coli 014; la fase acuosa resultante se precipitó con etanol. Hammarstrom (15) también empleó la mezcla de fenol y agua, luego siguió un tratamiento a base de álcali que no modificaba la especificidad serológica del ECA y terminaba hidrolizando con ácido acético a 100°C para romper la unión entre el lípido A y las cadenas de azúcar del LPS. Con estos procedimientos de extracción que se utilizaron inicialmente, se conoció que el

ECA era termoestable y que su antigenicidad no era modificada por la hidrólisis ni desaparecía después del tratamiento con tripsina o pronasas, además se encontró que el hapteno estaba cargado negativamente. En Pseudomonas aeruginosa (59) se demostró un factor, probablemente una enzima capaz de destruir selectivamente el ECA de varias especies. Bajo la acción de la fosfolipasa A (33), el ECA también pierde su antigenicidad al mismo tiempo que libera ácidos grasos por lo cual se supuso debía tener una estructura de fosfoglicérido (59).

En 1975 Marx y Petcovici (34) lograron la extracción del ECA después de pasos sucesivos en etanol al 96%. Tres años después Mannel y Mayer (31) combinaron la técnica de extracción de Westphal en fenol-agua con el uso posterior de una mezcla de fenol-cloroformo-eter de petroleo, más una cromatografía a través de DEAE celulosa. Estos trabajos revelaron que el ECA era un heteropolímero de aminoazúcares, compuestos principalmente por N-acetil-D-glucosamin y N-acetil-D-ácido manosamín-urónico que se encuentra parcialmente esterificado por pequeñas cantidades de ácido palmítico y ácido acético. Lugowski y Romanowska (29) también encontraron los mismos componentes, aunque la relación entre los amino-azúcares era diferente.

Se han descrito varios métodos para investigar el contenido de ECA en muestras biológicas obtenidas de fuentes diversas. El más conocido es la inhibición de la hemaglutinación (IHA) que la utilizó inicialmente Neter (45).

La prueba se basa en un sistema antígeno-anticuerpo heterólogo con LPS crudo de Salmonella typhimurium como fuente antigénica y un suero anti-Escherichia coli 014 como fuente de los anticuerpos anti-ECA. Como los anticuerpos anti-Escherichia coli no deben reaccionar con los antígenos de Salmonella, la positividad de la prueba sólo se explica en razón de un antígeno compartido que sería el ECA. Para practicar la inhibición se titula el suero, se diluye hasta cuatro dosis mínimas hemaglutinantes, se coloca el mismo volumen en cada tubo y se preincuba con diluciones seriadas 2X de la muestra problema que contiene ECA. Los anticuerpos que reaccionan con el hapteno quedan con sus sitios activos ocupados y, en la siguiente incubación con los GRC sensibilizados por el LPS de Salmonella typhimurium, no serán capaces de aglutinar los eritrocitos. Según la dilución de la muestra problema y su contenido del ECA, variará el grado de inhibición de la prueba. Las dos incubaciones se realizan a 37°C durante treinta minutos. El título de la inhibición es proporcional a la cantidad de ECA presente en la muestra analizada.



20. Aunque la reacción de inhibición de la hemaglutinación es -- una técnica cualitativa sencilla y específica que tiene una sensibilidad aceptable, sin embargo, la técnica de inhibi--- ción de la inmunohemólisis (44) es un método más sensible y confiable, aunque de mayor complejidad. El método se ha estandarizado para estudiar el contenido de ECA, comprobándose que la cantidad del hapteno en la muestra es proporcional al grado de inhibición de la activación del complemento y de la hemólisis consiguiente (21). La liberación de hemoglobina se lee espectrofotométricamente. La prueba también se apoya en la utilización de un sistema heterólogo antígeno-anticuerpo, con suero de conejo anti-Escherichia coli 014 y GRC sensibilizados con el LPS de Salmonella typhimurium. Los anticuerpos se preincuban con la muestra problema cuyo contenido de ECA se quiere conocer. Los resultados se expresan como el porcentaje en que se inhibe el consumo de unidades cincuenta por ciento hemolíticas (UCH50) de complemento.

Recientemente se ha probado unir el ECA purificado y no inmunogénico al toxoide tetánico (28) para formar un complejo hapteno acarreador que estimule al sistema inmunológico de los animales e induzca una buena síntesis de anticuerpos anti-ECA que son principalmente del tipo IgG y IgM y precipitan en genes de agarosa. La técnica de inmunoelectroforesis en cohete permite conocer el contenido del ECA en una mues--



**tra problema, después de trazar la curva de calibración con soluciones que tienen cantidades conocidas del hapteno.**

## P A R T E E X P E R I M E N T A L

## A. MATERIAL

### 1.- Material Biológico.

#### 1.1. CULTIVO DE BACTERIAS.

Se utilizaron los serotipos 014 y 08 de Escherichia coli y una cepa de Salmonella Typhimurium. Las bacterias se cultivaron en cajas petri las cuales contenían 10 ml de TSA por caja, se esterilizaron previamente en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Se utilizaron 15 cajas para cada serotipo. Después de la siembra las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente las colonias de bacterias se desprendieron lavando la superficie del agar con -- 10 ml de solución salina isotónica (SSI). Las bacterias suspendidas se lavaron tres veces utilizando 10 volúmenes de -- SSI por volumen de paquetes. La suspensión se centrifugó a -- 5,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C.

#### 1.2. PREPARACION DEL SUERO ANTI-ESPECIE.

Se preparó a partir de una cepa de Escherichia coli 1a -- cual se lavó tres veces y se suspendió en 10 ml de SSI calentando a 100°C durante una hora para desnaturalizar los antígenos K y H que son de naturaleza protéica. Posteriormente -- la suspensión de bacterias se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se -- resuspendió en SSI. La concentración de las bacterias se ---

ajustó a  $9,000 \times 10^5$ /ml con la ayuda de varias diluciones de una suspensión de cloruro de bario y el uso de un nefelómetro (2). La suspensión ajustada de Escherichia coli se inyectó a tres conejos machos, sanos y adultos de la raza New Zealand, por vía endovenosa, cada cuatro días.

Primera dosis ..... 0,5 ml

Segunda dosis ..... 1.0 ml

Tercera dosis ..... 1.5 ml

Cuarta dosis ..... 2.0 ml

Quinta dosis ..... 2.5 ml

Una semana después de la última inyección, los conejos se sangraron por punción intracardiaca. El suero se separó y se inactivó a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, se repartió en alícuotas de 0.5 ml conservandose a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso. Este suero se tituló conforme técnicas que se explican más adelante y posteriormente se utilizó para todas las pruebas de inhibición de la inmunohemólisis.

### 1.3. OBTENCION DEL LIPOPOLISACARIDO CRUDO.

Se obtuvo una cepa de Salmonella Typhimurium cultivada en 10 cajas Petri con TSA. Después de la siembra las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se procedió a lavar la superficie de agar con 10 ml de SSI estéril por caja para desprender las colonias que habían crecido. Las bacterias se lavaron 3 veces con SSI centrifugando a 10,000 rpm, durante 15 minutos y finalmente todo el sedimento se resuspendió en 20 ml de SSI calentando a 100°C durante 2 horas. Posteriormente este material se centrifugó para separar el sobrenadante, el cual se consideró como un LPS crudo y sirvió para sensibilizar los glóbulos rojos de carnero (GRC) durante la reacción de inhibición de la inmunohemólisis. El LPS crudo se separó en alícuotas de 0.5 ml, conservándose a 40°C hasta el momento de su uso.

### 1.4. APAREAMIENTO DE ROEDORES.

Se procedió al apareamiento de 5 ratas hembras Wistar y de 10 ratones NHI hembras adultas, las cuales se colocaron en parejas, con machos de la misma raza, durante un lapso de 24 horas. Los animales eran de fertilidad comprobada. Las ratas y ratones gestantes se seleccionaron cuando faltaban dos días para el final de su gestación y se procedió a intervenirlas quirúrgicamente, utilizando como anestesia el éter sulfúrico. Bajo condiciones de asepsia y trabajando sobre -

un baño de hielo, cada embrión se sacrificó y enseguida se le abrió la cavidad abdominal y se les retiró la totalidad del intestino. El tubo digestivo se lavó con SSI.

Cinco animales hembras de cada una de estas especies, cobayos tipo albino Hartley y conejos Nueva Zelanda, se aparearon en iguales condiciones a los anteriores y nuevamente la gestación se detuvo faltando dos días para llevarse a término. Los productos se trataron en forma similar con el fin de obtener la porción delgada y gruesa del intestino de cada uno de los roedores.

#### 1.5. OBTENCION DE INTESTINOS DE ROEDORES NEONATOS.

En los embriones de cobayo y conejo fué posible separar el intestino grueso del intestino delgado y las dos muestras se procesaron independientemente. En el caso de los ratones y las ratas las dos porciones quedaron unidas en una sola muestra. Cada cinco embriones se seleccionaron al azar y los intestinos se mezclaron. Los tejidos se desmenuzaron en trozos pequeños con una tijera esteril y luego se homogeneizaron durante 5 minutos a 4°C. Las suspensiones que resultaron se ajustaron con SSI hasta que todas tuvieran un volumen de 10 ml y luego se calentaron a 100°C durante 2 horas.

Una vez que se enfriaron los tubos se procedió a centrifugar cada muestra a 5,000 rpm, durante 30 minutos a una tem

peratura de 4°C. Los sobrenadantes se obtuvieron por decantación, se separaron en frascos y se congelaron a -4°C. Posteriormente se liofilizaron en un equipo Lab-Con-Co.

## 2. Reactivos.

### 2.1. GLOBULOS ROJOS DE CARNERO.

Los glóbulos rojos se obtuvieron de un carnero que se sangró en la vena yugular mediante un procedimiento estéril. La sangre se mezcló volumen a volumen con solución anticoagulante estéril de Alsever (18) y luego se guardó a 4°C durante 5 días o más, antes de utilizar los eritrocitos.

La suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRC) necesaria para la reacción de la inmunohemólisis se preparó después de lavar tres veces las células con 15 ml de solución amortiguadora de trietanol amina (TBS), pH 7.3. El paquete de eritrocitos se separó después de centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos. En el caso de observar hemólisis en el sobrenadante se descartaba la suspensión y se revisaba el pH de la solución amortiguadora.

Después de sensibilizar los GRC según métodos que se describirán más adelante, la suspensión se ajustó espectrofotométricamente. El mismo procedimiento se utilizó con la suspensión de GRC que sirvió para titular el complemento de

cobayo. El ajuste procuró tener las células a una concentración tal que con 0.6 ml de la suspensión más 1.4 ml de agua destilada, la cantidad de hemoglobina liberada daba una lectura de absorbancia igual a 0.5 con el Coleman Jr. a una longitud de onda de 510 nm. La lectura correcta debe dejar los GRC ajustados a  $2.5 \times 10^8$  células/ml. El volumen final de la suspensión se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$DO_1 \times V_1 = V_2$$

$DO_1$  = Densidad óptica inicial.

$V_1$  = Volumen inicial.

$DO_2$  = 0.5, que será la lectura de la densidad óptica cuando la suspensión contiene  $2.5 \times 10^8 \frac{\text{GRC}}{\text{ml}}$

$V_2$  = Volumen final necesario para obtener la  $DO_2$ .

### 3.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

a) Cloruro de sodio al 0.85%, conocida también como solución salina isotónica.

b) Solución anticoagulante de Alsever, preparada según



una modificación de la fórmula original (18).

Esta solución se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. El pH se ajustó a 6.1 con un potenciómetro Matrohm Herin E-520. En el momento de utilizarla se mezcló volumen a volumen con sangre fresca y estéril de carnero.

- c) Solución amortiguadora de trietanol-amina (TRS) preparada según la fórmula siguiente (21):

Cloruro de sodio.....	NaCl.....	75.00 g
Cloruro de magnesio.....	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O.....	1.00 g
Cloruro de Calcio.....	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0.22 g
Trietanol-amina.....	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N.....	28.00 ml
Acido clorhídrico IN.....	HCl.....	171.00 ml
Agua destilada.....	H <sub>2</sub> O.....	1000.00 ml

La cantidad de ácido clorhídrico In fue la necesaria para ajustar el pH a 7.3 - 7.4; la solución así preparada se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. En el momento de utilizarla se diluyó 1:10 con agua destilada adicionado antes de aforar, 10 ml de gelatina al 5% por cada litro de la dilución final de TBS. -

- d) Medio de cultivo agar sangre. Del producto comercial deshidratado se pesaron 40 g y se disolvieron en un litro de agua destilada. El medio se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos y después se distribuyó en cajas Petri estériles. Las cajas se dejaron en reposo hasta que gelificara su contenido y luego se incubaron a 37°C durante 24 -- horas como prueba de esterilidad.
- e) Caldo tripticasa de soya. El medio deshidratado se disolvió en agua destilada y luego se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Enseguida se distribuyó en matraces que habían sido esterilizados previamente. Se conservaron en la estufa a -- 37°C durante 24 horas como una prueba de esterilidad

#### 4.- EQUIPO.

- a.) Espectofotómetro Coleman Jr 11 modelo 6/20.
- b.) Potenciómetro Metrohm-Herim E-520.
- c.) Estufa Medilab, Modelo H-201.
- d.) Centrífuga Sorvall refrigerada, modelo K-58-R.

- e.) Congelador Revco.
- f.) Balanza analítica Sartorius, modelo 2442.
- g.) Centrífuga clínica universal Curtin.
- h.) Autoclave Wilmont Castle, Rochester, N4.
- i.) Liofilizadora Lab-Con. -C03.
- j.) Nefelómetro Coleman A.
- k.) Baño de Agua BTL.
- l.) Balanza granataria.
- m.) Refrigerador.

## B. METODOS.

### 1.- REACCION DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

Se utilizó para titular el contenido de anticuerpos anti-ECA en el suero de conejo anti-Escherichia coli 014, el cual se diluyó progresivamente en solución salina isotónica 2X, desde una dilución 1:2 hasta la final de 1:8192, con un

volumen constante de 0.25 ml. A cada tubo se le añadió 0.1 ml de una suspensión de GRC sensibilizados con el LPS crudo de Salmonella typhimurium y ajustados al 2% en la misma SSI. Los tubos se incubaron en un baño de agua corriente a 37°C - durante 30 minutos. La lectura se hizo golpeando el fondo - de cada tubo con el pulpejo de un dedo y observando el grado en que los GRC eran aglutinados por los anticuerpos. La mayor dilución del suero capaz de aglutinar se consideró como el título anti-ECA del suero del conejo.

Antes de la reacción, el suero del conejo se descomple-  
mentó por calor a 56°C durante 30 minutos. Para sensibili-  
zar los GRC, las células se lavaron 3 veces con SSI, se ajug-  
taron al 2% y el paquete de eritrocitos que se obtuvo des-  
pués de la última centrifugación se mezcló con un volumen --  
igual de LPS crudo, incubado durante 30 minutos a 37°C con -  
agitación continua y luego lavado nuevamente tres veces con  
SSI.

## 2.- TITULACION DEL COMPLEMENTO.

El protocolo de esta reacción viene esquematizado en la  
tabla I. Lo primero que se hace es preparar una suspensión  
de GRC sensibilizados con hemolisina comercial Hoechst diluí-  
da 1:2,000 en solución amortiguadora TBS. Para ello se mez-

clan volumen a volumen y gota a gota los GRC lavados y ajustados espectrofotométricamente y la dilución de hemolisina - comercial 1:2,000. Enseguida se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación periódica cada 10 minutos. Los GRC -- sensibilizados se separaron por centrifugación y la hemolisina libre quedó fuera de la rreacción mediante tres lavados - con solución de TBS.

Las células se ajustaron nuevamente con el espectrofotó metro Coleman Jr. de modo que la hemólisis total de 0.6 ml - de la suspensión diera una lectura igual a 0.5 de absorban-- cia. Mientras se incubaron los GRC con la hemolisina, se -- procedió a preparar, sobre un baño de hielo, el contenido de tres hileras de tubos 12 X 75 mm, que contenían diferentes - cantidades de suero de cobayo, TBS y agua destilada conforme aparece en el protocolo de la tabla I. A cada tubo se le aña dieron 0.6 ml de la suspensión de GRC sensibilizados con hemolisina, los tubos se incubaron a 37°C Durante 30 minutos - con agitación cada 10 minutos; al final la reacción se detu vo añadiendo 0.5 ml de solución TBS fría a cada tubo y luego se procedió a centrifugar todos los tubos a 1,500 rpm duran te 5 minutos. El sobrenadante ~ se vació a cubetas de vidrio - previamente calibradas y la lectura de la densidad óptica se realizó en un espectrofotómetro Coleman Jr con una longitud

de onda de 510 nm. El tubo testigo con GRC sensibilizados más agua destilada, se consideró como el 100% de hemólisis y se tomó como referencia para calcular los porcentajes de hemólisis en los otros tubos que contenían las diferentes cantidades del complemento problema. Los porcentajes de hemólisis de cada tubo se correlacionan con las cantidades de suero de cobayo --- (complemento) que contenían y se graficaron en papel semilogarítmico de probitas K-E-358-22. Se extrapolaó el valor de 5 - unidades de probabilidad para obtener la cantidad en mililitros de suero de cobayo con el valor de una unidad 50% hemolítica - ( $UCH_{50}$ ) tal como aparece en la figura I. Mediante una regla de tres se calculó el número de unidades por mililitros y el resultado se multiplicó por el factor de dilución que era el valor recíproco de la dilución del suero de cobayo utilizado para titular el complemento. Al final quedó la cantidad de unidades de complemento 50% hemolíticas/ml de suero.

### 3.- REACCION DE INMUNOHEMOLISIS.

Para esta prueba se utilizó el suero de cobayo diluido - 1:10 en solución amortiguadora de TBS, de tal modo que contuviera aproximadamente 10 unidades 50% hemolíticas/ml. Los GRC ya no se sensibilizaron con hemolisina sino con el LPS -- crudo de Salmonella typhimurium, mezclando volumen a volumen el paquete de células y la solución 1:1 de LPS. El suero - con el cual se trabajó fue el de conejo inmunizado ---

con Escherichia coli 014. Es decir que se diseñó un sistema antígeno-anticuerpo heterólogo que sólo podía dar una activación del complemento y por consiguiente una hemólisis, en el caso de que los anticuerpos anti-Escherichia coli reconocieran un antígeno común compartido por el LPS de Salmonella. - Este antígeno se considera como ECA para el propósito de este trabajo.

El paso inicial consistió en la estandarización de la prueba que, en último término, sólo necesitaba calcular la dilución del suero anti-Escherichia coli 014 que podría dar el menor consumo de unidades 50% hemolíticas de complemento después de extrapolar los resultados de la reacción sobre papel de probitas. En la tabla II y III se presentan los protocolos de la reacción y el tratamiento de los resultados, con las cantidades de reactantes que se utilizan para una dilución del suero, en la inteligencia de que las mismas series de tubos son necesarias para cada una de las diluciones restantes. Al tener varias cantidades de mililitros de suero de cobayo o sea unidades 50% hemolíticas de complemento correspondientes a cada una de las diluciones del suero, se hace una correlación de las mismas y se grafican los resultados sobre papel milimétrico tal como aparece en la figura 2. De esta forma se puede conocer la mayor dilución del suero -



menos concentración de los anticuerpos- que activan la mayor cantidad de las unidades de complemento añadidas al sistema.

La reacción de la inmunohemólisis se emplea para titular el suero, mientras que la inhibición de la misma prueba permite conocer la cantidad de antígeno soluble en una muestra problema.

#### 4.- PREPARACION DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS DE LOS INTESTINOS.

Los tejidos homogeneizados de los intestinos se suspendieron en 10 ml de agua y luego calentados a 100°C durante 2 horas. Una vez que se enfriaron los tubos se procedió a centrifugar cada muestra a 4°C durante 30 minutos a 5,000 rpm.- Los sobrenadantes se obtuvieron por decantación, se separaron en frascos y se congelaron a -40°C. Posteriormente se liofilizaron en un equipo LAB-CON-CO.

A 100 mg del material liofilizado se le añadieron 10 ml de agua destilada y se esperó hasta que se solubilizaran. - Posteriormente se agregó alcohol absoluto hasta que la concentración de este último quedara al 85%. Se agitó la mezcla y luego se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 18 horas; por centrifugación a 5,000 rpm durante 30 minutos se separaron dos fracciones: una soluble y la otra in-



soluble en etanol, las cuales se dejaron secar a 37°C. De cada una de las dos fracciones se pesaron 10 mg que luego se disolvieron en 10 ml de agua destilada estéril. Con estas soluciones se preincubaron posteriormente alícuotas del suero anti-Escherichia coli 014 en el momento de realizar la inhibición de la inmunohemólisis.

#### 5.- REACCION DE INHIBICION DE LA INMUNOHEMOLISIS.

Para esta reacción ya se encuentran previamente tituladas las unidades de complemento 50% hemolíticas/ml de suero de cobayo y la dilución óptima del suero anti-Escherichia coli 014. La variable va a ser la cantidad de la fracción soluble o insoluble en etanol, obtenida de los intestinos de los roedores. Para ello se preparan varias diluciones seriadas, módulo 2X de cada solución que contiene un mg/ml. En una serie de cuatro tubos para cada dilución de la sustancia supuestamente inhibidora, se añaden volúmenes constantes del suero previamente diluido y la fracción bajo estudio, conforme aparece en el protocolo de la tabla IV. La prueba lleva dos series de cuatro tubos cada una, que sirven como testigos de la inmunohemólisis. El primero lleva todos los reactantes menos la fracción inhibidora y se utiliza como un control del suero antiespecie.

El segundo lleva todos los reactantes menos el suero, - tal como aparece en la tabla IV y sirve para conocer si la - solución problema tiene alguna actividad anticomplementaria.

Después de preincubar los tubos a 37°C durante 30 minutos se añaden las cantidades conocidas del suero de cobayo - diluido, 0.5, 0.35, 0.25, 0.15 y un volumen constante de 0.6 ml de la suspensión de GRC previamente sensibilizados con el LPS de Salmonella typhimurium y luego ajustados espectrofotométricamente según se describió anteriormente. De nuevo todos los tubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos y finalmente se añaden 0.5 ml de solución de TBS fría para detener la activación del complemento y la hemólisis subsiguiente. - después de centrifugar a 1,500 rpm durante 3 minutos, el sobrenadante de cada tubo se vacía en una cubeta calibrada y se lee su absorbancia a una longitud de onda de 510 nm.

Las lecturas obtenidas se convierten a porcentajes de hemólisis y luego a unidades 50% hemolíticas de complemento según aparecen en la tabla V. Con estos valores ya es posible conocer los porcentajes de inhibición de la inmunohemólisis, según se presenta en la tabla VII. Enseguida se puede establecer una correlación entre las cantidades de las fracciones soluble o insoluble en etanol, de los intestinos que se

preincubaron con el suero para inhibir la reacción y los porcentajes de inhibición que al final se obtuvieron. En la figura 3 se presenta una gráfica de esta relación y se observa cómo las mayores cantidades de las fracciones intestinales - causan los mayores porcentajes de inhibición.

## RESULTADOS

1.- Los conejos inmunizados con Escherichia coli 014 se sangraron ocho días después de la última inyección intravenosa de la suspensión de bacterias. El suero se separó en alícuotas y enseguida se le midió su título hemaglutinante frente a GRC sensibilizados con el LPS crudo de Salmonella typhimurium así como también su capacidad para fijar complemento, con el mismo sistema heterólogo más suero de cobayo diluido 1:100. En la tabla V se presentan los resultados, como unidades de complemento 50% hemolíticas consumidas por cada dilución del suero. En la Figura 2 viene la gráfica obtenida después de correlacionar las unidades consumidas contra el valor recíproco de las diluciones del suero de conejo.

2.- El suero de cobayo se tituló antes de cada reacción de inmunohemólisis o de inhibición de la misma. Los valores obtenidos generalmente estuvieron entre 0.16 y 0.20 ml de suero diluido 1:100 como unidades 50% hemolíticas, lo cual equivale a 6.2 y 5.00 unidades 50% hemolíticas/ml de suero diluido, respectivamente. Con éstas últimas cantidades se realizaron todas las pruebas de inhibición de la inmunohemólisis. En la Figura I se presenta un ejemplo de los resultados obtenidos al titular el complemento. Las cantidades de unidades/ml de complemento que se mencionan permitieron utilizar la mayor dilu-

ción del suero anti-Escherichia coli 014 que, en este trabajo resultó ser el título de 1:4,000.

3.- En los embriones de ratas y ratones no se pudo separar el intestino grueso del delgado. Los cobayos y conejos sí se trabajaron por separado empleando las fracciones de cada una de estas porciones de intestinos.

4.- En las tablas VII y X se presentan los resultados de los porcentajes de inhibición de la inmunohemólisis después de preincubar el suero con las fracciones insolubles en etanol -- (FIE) de los intestinos de embriones de ratón y rata. Las fracciones solubles en etanol (FSE) de los intestinos de estos dos grupos de animales no inhibieron la reacción. En cambio, en las tablas VII y IX se puede apreciar que la inmunohemólisis, con el mismo sistema, solo fue inhibida por las fracciones solubles en etanol (FSE) de los intestinos gruesos y delgados de los embriones de cobayo. Las fracciones insolubles en etanol (FIE) de los embriones de cobayos no inhibieron. En el caso de los conejos, ninguna de las dos fracciones solubles o insolubles en etanol, inhibieron la reacción. En la tabla XI se presentan además, los resultados de la inhibición de la misma reacción con la fracción soluble en etanol del LPS crudo de

Escherichia coli 08, la cual se utilizó como un testigo positivo. En la Figura 3 están las correlaciones entre las cantidades (microgramos) de las diferentes fracciones utilizadas para inhibir los porcentos de inhibición que se obtuvieron. Las líneas rectas se ajustaron conforme un programa de regresión lineal cuyos resultados se presentan en la tabla - XII. En la figura 4 se comparan las diferentes cantidades (microgramos) de las fracciones solubles e insolubles en etanol que fueron necesarias para inhibir un 50% la reacción de la inmunohemólisis.

T A B L A I

PROTOCOLO DE LA REACCION PARA TITULAR EL CONTENIDO DE COMPLEMENTO  
50% HEMOLITICO EN EL SUERO DE COBAYO

TUBO	1	2	3	4	5 <sup>+</sup>	6 <sup>++</sup>
Suero de Cobayo 1:50 (ml) <sup>+++</sup>	0.50	0.35	0.25	0.15	--	--
Solucion TBS pH=7.3 (ml)	0.40	0.55	0.65	0.75	0.90	--
GRC ml <sup>+++</sup>	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60

INCUBACION A 37°C DURANTE 30 MINUTOS

Solucion de TBS fría (ml) pH = 7.3	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	--
Agua destilada (ml)	--	--	--	--	--	1.4

CENTRIFUGACION A 1,500 rpm DURANTE 30 minutos

LEER EL GRADO DE HEMOLISIS A 510 nm.

+ Testigo negativo o Blanco

++ Testigo positivo que dara el 100% de Hemolisis.

+++ Esta reaccion se lleva a cabo por triplicado, con el suero de cobayo diluido 1:150; 1:200; 1:250

++++ Globulos rojos de carnero previamente sensibilizados con Hemolisina 1:200 posteriormente ajustada al 2%.



T A B L A II

PROTOCOLO DE LA REACCION DE INMUNOHEMOLISIS  
 PARA TITULAR EL SUERO ANTI-ESCHERICHIA COLI 014 ANTI-ECA

TUBO	1	2	3	4	5	6
Suero anti-ECA 1:400 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25		
Suero de cobayo 1:75 (ml)	0.50	0.35	0.25	0.15		
Solución TBS pH =7.3 (ml)	0.15	0.30	0.40	0.50		
GRC <sup>+</sup>	0.60	0.60	0.60	0.60		

INCUBACION A 37°C DURANTE 30 MINUTOS CON  
 AGITACION CADA 10 MINUTOS.

Solución TBS pH = 7.3 (ml)	0.50	0.50	0.50	0.50
----------------------------	------	------	------	------

CENTRIFUGACION A 1,500 rpm durante 3 minutos Leer  
 EL GRADO DE HEMOLISIS A 530 nm.

El protocolo corresponde a los 4 tubos de suero diluido 1:4000 ; pero el mismo tratamiento se aplico a las restantes seis diluciones del suero.

+ Globulos rojos de camero sensibilizados con el DIF crudo de SALMONELLA TYPHIMURUM ajustados a  $2.5 \times 10^8$  globulos rojos/ml en solución de TBS pH = 7.3

TABLA III

PROTOCOLO DE LA REACCION AL TITULAR EL SUERO ANTI-ECA  
 POR MEDIO DE LA INMUNOHEMOLISIS

TUBO	1	2	3	4	5	6
Suero de cobayo 1:100 (ml) <sup>++</sup>	0.50	0.35	0.25	0.15	--	--
DO a 510 nm <sup>+++</sup>	0.39	0.31	0.24	0.11	--	--
% de Hemolisis	78	62	48	22	--	100

+ Los resultados correspondientes a 4 tubos con el suero diluido 1:250 pero el mismo tratamiento se aplico a las restantes 6 diluciones del suero.

++ El suero de cobayo se titulo previamente para esta reaccion se utilizo diluido 1:100 en solución TBS pH = 7.3

+++ La absorción a 510 nm se realizo en un coleman Jr. después de centrifugar los tubos a 1,500 rpm durante 3 minutos.

++++ Para conocer la unidad 50% hemolitica se utilizo papel semilogaritmico de probitas K-F-358-22, al trazar la línea recta (ver figura I) la unidad 50% hemolitica se obtuvo al extrapolar contra los mililitros de suero de cobayo, el punto en donde la línea recta, curva el eje de las 5 unidades de probabilidad.

El resultado fue 0.27 ml = 1 unidad 50% Hemolitica

Unidades 50% Hemoliticas/ml      0.27 ml ----- 1 Unidad

1.0 ml ----- X

X = 3.7 Este valor se multiplica por 100 (facator de dilución del suero de cobayo) y se obtiene el número de unidades/ ml de suero sin diluir.

## T A B L A I V

Valores obtenidos -unidades de complemento 50% hemolítico- al titular el antisuero anti-Escherichia coli 014 por medio de - la reacción de la inmunohemólisis.

DILUCION	SUERO DE COBAYO 1:100 ml	D.O.	HEMOLISIS	UCH <sub>50</sub>
1:1,000	0.50	0.48	96	
	0.35	0.47	94	0.6
	0.25	0.45	90	
	0.15	0.39	78	
1:2,000	0.50	0.48	96	
	0.35	0.46	92	
	0.25	0.44	88	0.11
	0.15	0.33	66	
1:4,000	0.50	0.42	84	
	0.35	0.39	78	
	0.25	0.32	64	0.19
	0.15	0.19	38	
1:8,000	0.50	0.32	64	
	0.35	0.27	54	0.36
	0.25	0.19	38	
	0.15	0.07	14	
1:32,000	0.50	0.07	14	
	0.35	0.06	12	(-)
	0.25	0.04	8	
	0.15	0.00	0	

## T A B L A V

Titulación del suero anti-Escherichia coli 014.

Unidades de complemento 50% hemolíticas consumidas por diferentes diluciones del suero.

DILUCION	UCH <sub>50</sub>
1:1,000	0.6
1:2,000	0.11
1:4,000	0.19
1:8,000	0.36
1:8,929	0.50 <sup>+</sup>

+ Valores obtenidos con la ecuación de la correlación lineal.

$$y = a + b_x$$

TABLA VI

PROTOKOLO DE LA REACCION DE INHIBICION DE LA IMMUNOFLUORESCENCIA PARA TITULAR EL  
CONTENIDO DE ANTICUERPO COLON DE DIFERENTES FRACCIONES  
DE INTESTINOS DE CONEJOS

TUPO	I				II							
	1	2	3	4	1	2	3	4				
Fracción <sup>+</sup>	0.15	0.15	0.15	0.15 ml	—	—	—	—	0.15	0.15	0.15	0.15 ml
Suero anti-PCA <sup>++</sup>	0.25	0.25	0.25	0.25 ml	0.25	0.25	0.25	0.25 ml	—	—	—	—
Solución TBS pH=7.3	—	0.15	0.25	0.35 ml	0.15	0.30	0.40	0.50 ml	0.25	0.40	0.50	0.60 ml

PRE - INCUBACION A 37°C DURANTE 30 MINUTOS

Suero de conejo 1:75 <sup>++</sup>	0.50	0.35	0.25	0.15 ml	0.50	0.35	0.25	0.15 ml	0.50	0.35	0.25	0.15 ml
GRC	0.60	0.60	0.60	0.60 ml	0.60	0.60	0.60	0.60 ml	0.60	0.60	0.60	0.60 ml

INCUBAR A 37°C DURANTE 30 MINUTOS

Solución TBS pH=7.3	0.50	0.50	0.50	0.50 ml	0.50	0.50	0.50	0.50 ml	0.50	0.50	0.50	0.50 ml
---------------------	------	------	------	---------	------	------	------	---------	------	------	------	---------

CENTRIFUGACION A 1,500 rpm DURANTE 3 MINUTOS LEER A 510 mμ

+ El protocolo de esta tabla corresponde a una dilución de la fracción cuyo contenido de PCA se quiere conocer en la práctica se preparan varias diluciones de la fracción de intestino, generalmente a partir de una solución de 1,000 mg/ml.

++ Suero de conejo anti-*Escherichia coli* 014 diluido 1:4,00; que fue el título óptimo encontrado mediante la titulación del suero por la reacción de inmunofluorescencia TABLA IV.

+++ Globulos rojos de conejo sensibilizados con el DPS crudo de *Salmonella typhimurium* y ajustados a  $2.5 \times 10^8$  células /μl en TBS pH=7.3

I Control de Suero

II Control del Suero que mide la posibilidad de anticomplementariedad del mismo.

T A B L A V I I

UCH<sub>50</sub><sup>+</sup> consumidas por el sistema suero anti-Escherichia coli 014 1:4,000 más GRC sensibilizados con el L/S crudo de Salmonella typhimurium, cuando el suero es pre-incubado con diferentes cantidades de la fracción insoluble (FI) de intestino de embriones de ratas Wistar.

ug FI	SUERO DE COBAYO	D.O.	% DE HEMOLISIS	UCH <sub>50</sub> <sup>+</sup>	1	2	3
600	0.50	0.14	28	1.0	1.0	22.9	77.1
	0.35	0.10	20				
	0.25	0.08	16				
	0.15	0.05	10				
300	0.50	0.27	54	0.45	2.2	37.7	62.3
	0.35	0.20	40				
	0.25	0.12	24				
	0.15	0.08	16				
150	0.50	0.37	74	0.37	2.7	45.9	52.1
	0.35	0.26	42				
	0.25	0.11	22				
	0.15	0.06	12				
75	0.50	0.40	80	0.26	3.8	65.5	34.5
	0.35	0.30	60				
	0.25	0.23	46				
	0.15	0.10	20				
37.50	0.50	0.45	90	0.24	4.2	70.9	29.1
	0.35	0.37	74				
	0.25	0.26	52				
	0.15	0.12	24				
18.75	0.50	0.45	90	0.19	5.3	89.5	10.5
	0.35	0.38	76				
	0.25	0.30	60				
	0.15	0.20	40				
CONTROL (-)	0.50	0.50	100	0.17	5.8	100.0	(-)
	0.35	0.45	90				
	0.25	0.36	72				
	0.15	0.24	48				

+ mL. de suero de cobayo diluido 1:100 necesarios para causar 50% de hemólisis.

1 Unidades de complemento 50% hemolítico/mL consumidas después de preincubar el suero con la fracción insoluble del intestino de ratas.

2 % de unidades de complemento consumidas considerando que el control negativo representa el 100%

3 % de Inhibición.

T A B L A V I I I

UCH<sup>+</sup><sub>50</sub> consumidas por el sistema suero anti-*Escherichia coli* 014 1:4,000 más GRC sensibilizados con el LPS crudo de *Salmonella typhimurium*, cuando el suero se pre-incuba con diferentes cantidades de la fracción soluble - en etanol (FS) del intestino grueso de embriones de cobayo.

ug FS	SUERO DE COBAYO 1 : 1,00	D.O.	% DE HEMOLISIS	UCH <sup>+</sup> <sub>50</sub>	1	2	3
600	0.50	0.23	46	0.52	1.9	35.0	65.0
	0.35	0.13	26				
	0.25	0.05	10				
	0.15	0.00	0				
300	0.50	0.36	72	0.37	2.7	46.0	54.0
	0.35	0.26	52				
	0.25	0.14	28				
	0.15	0.10	20				
150	0.50	0.38	76	0.33	3.3	60.0	40.0
	0.35	0.28	56				
	0.25	0.18	36				
	0.15	0.06	12				
CONTROL (-)	0.50	0.50	100	0.18	5.6	100.0	(-)
	0.35	0.47	94				
	0.25	0.34	68				
	0.15	0.16	32				

+ ml de suero de cobayo diluido 1:100 necesarios para causar el 50% de hemólisis.

- 1 Unidades de complemento 50% hemolítico/ml consumidas después de preincubar el suero con la fracción insoluble del intestino de ratas.
- 2 % de unidades de complemento consumidas considerando que el control negativo presenta el 100%.
- 3 % de inhibición.

T A B L A I X

UCH<sub>50</sub><sup>+</sup> consumidas por el sistema suero anti-*Escherichia coli* 014 1:4,000 más GRC sensibilizados con el LPS de *Salmonella syphimurium*, cuando el suero se pre-incuba con diferentes cantidades de la fracción soluble en etano (FS) del intestino delgado de embriones de cobayo.

ug FS	SUERO DE COBAYO	D.O.	% DE HEMOLISIS	UCH <sub>50</sub> <sup>+</sup>	1	2	3
600	0.50	0.38	76	0.30	3.3	52.3	47.7
	0.35	0.30	60				
	0.25	0.20	40				
	0.15	0.09	18				
300	0.50	0.45	90	0.28	3.7	64.0	36.0
	0.35	0.36	72				
	0.25	0.22	36				
	0.15	0.10	16				
150	0.50	0.48	96	0.23	4.3	78.2	21.8
	0.35	0.40	80				
	0.25	0.28	56				
	0.15	0.12	24				
CONTROL (-)	0.50	0.50	100	0.18	5.5	100.0	(-)
	0.35	0.45	90				
	0.25	0.32	64				
	0.15	0.15	30				

+ ml de suero de cobayo diluido 1:100 necesarios para causar el 50% de hemólisis.

- 1 Unidades de complemento 50% hemolítico / ml consumidos después de pre-incubar el suero con la fracción insoluble del intestino de rata.
- 2 % de unidades de complemento consumidas considerando que el control negativo representa el 100%
- 3 % de inhibición.



T A B L A X.

UCH<sup>(+)</sup><sub>50</sub> consumidas por el sistema suero anti-Escherichia coli o14 ----  
 - 1:4000 - más GRC sensibilizados con el LPS curdo de S. typhimurium, --  
 cuando el suero se preincuba con diferentes cantidades de la fracción in  
 soluble en etanol -FI - del intestino de embriones de ratón.

ug FI	SUERO DE COBAYO 1:100 -ml-	D.O.	% DE HEMOLISIS.	UCH <sub>50</sub> <sup>(+)</sup>	1	2	3
600	0.50	0.35	70	0.37	2.7	45.9	54.1
	0.35	0.21	42				
	0.25	0.13	26				
	0.15	0.09	18				
300	0.50	0.40	80	0.29	3.4	58.9	41.1
	0.35	0.32	64				
	0.25	0.21	42				
	0.15	0.13	26				
150	0.50	0.47	94	0.25	4.0	68.0	32.0
	0.35	0.37	74				
	0.25	0.25	50				
	0.15	0.13	26				
CONTROL	0.50	0.50	100	0.17	5.8	100	(-)
	0.35	0.45	90				
	0.25	0.36	72				
	0.15	0.21	42				

- + ml. DE SUERO DE COBAYO DILUIDO 1:100 NECESARIOS PARA CAUSAR EL 50% DE HEMOLISIS.
- 1 UNIDADES DE COMPLEMENTO 50% HEMOLITICO / .ml CONSUMIDOS DESPUES DE PRE-INCUBAR EL SUERO CON LA FRACCION INSOLUBLE DEL INTESTINO DE RATAS.
  - 2 % DE UNIDADES DE COMPLEMENTO CONSUMIDAS CONSIDERANDO QUE EL CONTROL NEGATIVO REPRESENTA EL 100 POR CIENTO.
  - 3 % DE INHIBICION.

T A B L A XI.

UCH<sup>(+)</sup><sub>50</sub> consumidas por el sistema suero anti - Escherichia coli 014 ---  
 - 1:4000 - más GRC sensibilizados con el LPS crudo de Salmonella typhimurium, cuando el suero se preincubó con diferentes cantidades de fracción-soluble en etanol de Escherichia coli 08.

ug FS	SUERO DE COBAYO			UCH <sup>(+)</sup> <sub>50</sub>	1	2	3
	1:100 -ml--.	D.O.	% HEMOLISIS				
18.75	0.50	0.10	20	1.50	0.61	12.51	87.61
	0.35	0.07	14				
	0.25	0.05	10				
	0.15	0.02	4				
9.37	0.50	0.28	56	0.45	2.21	42.2	57.8
	0.35	0.20	40				
	0.25	0.14	28				
	0.15	0.06	12				
4.69	0.50	0.35	70	0.30	3.3	63.3	36.7
	0.35	0.31	61				
	0.25	0.25	50				
	0.15	0.11	22				
2.34	0.50	0.41	82	0.26	4.3	82.5	17.5
	0.35	0.35	70				
	0.25	0.28	56				
	0.15	0.16	32				
CONTROL	0.50	0.43	86	0.19	5.2	100	(-)
	0.35	0.39	78				
	0.25	0.32	64				
	0.15	0.20	40				

+ ml. de suero de cobayo diluido 1:100 necesarios para causar el 50% - de hemólisis.

- 1 Unidades de complemento 50% hemolítico / ml consumido después de preincubar el suero con la fracción insoluble del intestino de ratas.
- 2 % de unidades de complemento consumidas considerando que el control negativo representa el 100 por ciento.
- 3 % de inhibición.

T A B L A XII.

Regresión lineal de los resultados (% de inhibición) cuando el suero se preincubó con diferentes cantidades (microgramos) de las fracciones separadas después de un tratamiento con etanol al 85%.

	$X_1$	$X_2$	$Y_1$	$Y_2$	b	r	m
INTESTINO DE RATA	2.9	1.8	82.0	34.9	-42.2	0.99	42.8
INTESTINO DELGADO DE COBAYO.	2.9	1.8	53.7	6.2	-71.4	0.99	43.2
INTESTINO GRUESO DE COBAYO	2.9	1.8	70.9	25.1	-49.9	0.99	41.6
INTESTINO DE RATON.	2.9	1.8	58.2	17.7	-48.5	0.99	36.8
E. <u>COLI</u> 08.	1.4	0.2	94.3	2.77	-12.4	0.99	76.3

$X_1$   $X_2$   $Y_1$   $Y_2$  = SIRVIERON PARA TRAZAR LA LINEA RECTA AJUSTADA.

b = PUNTO DE INTERSECCION EN EL EJE Y

r = COEFICIENTE DE CORRELACION.

m = PENDIENTE.

FIGURA 1.

Resultados de la inmunohemólisis. Trazo de la línea recta según los porcentajes de hemólisis con cuatro diferentes cantidades de complemento, para obtener el valor de la unidad cincuenta por ciento hemolítica.

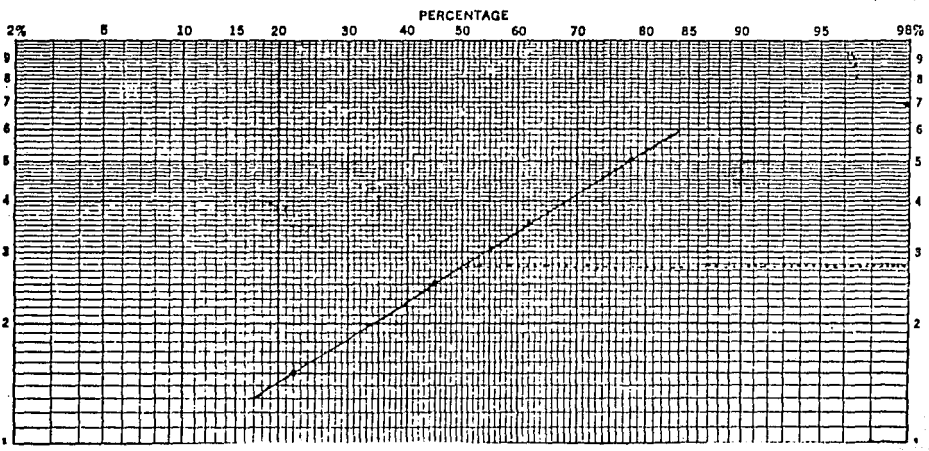


FIGURA 2.

Unidades 50% hemolíticas (suero de cobayo 1:75) consumidas por diferentes diluciones del suero anti-Escherichia coli 014, para dar lugar a la hemólisis de los GRC sensibilizados con el LPS crudo de Salmonella Tiphymu--- rium. La dilución 1:4,000 del suero anti-E. coli 014 se consideró el título óptimo.

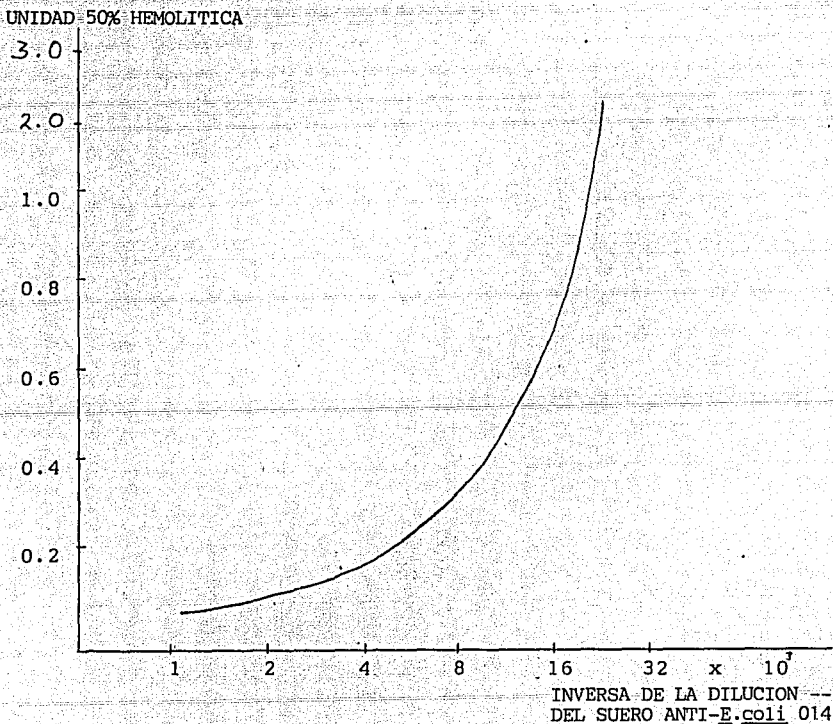


FIGURA 3.

POR CIENTO DE INHIBICION DE LA INMUNOHEMOLISIS POR DIFERENTES CANTIDADES MICROGRAMOS DE LAS FRACCIONES SOLUBLES EN ETANOL OBTENIDAS DE INTESTINO DE RATA (1), INTESTINO DELGADO DE COBAYO (2), INTESTINO GRUESO DE COBAYO (3), INTESTINO DE RATON (4), LPS DE ESCHERICHIA COLI (5) E INTESTINO GRUESO Y DELGADO DE CONEJO (6).

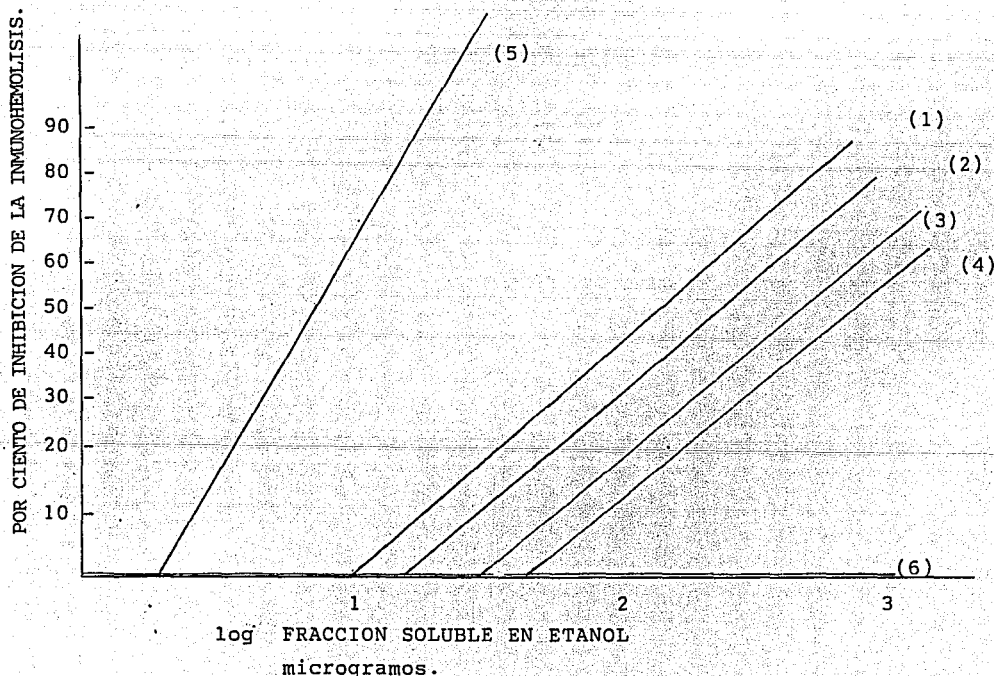
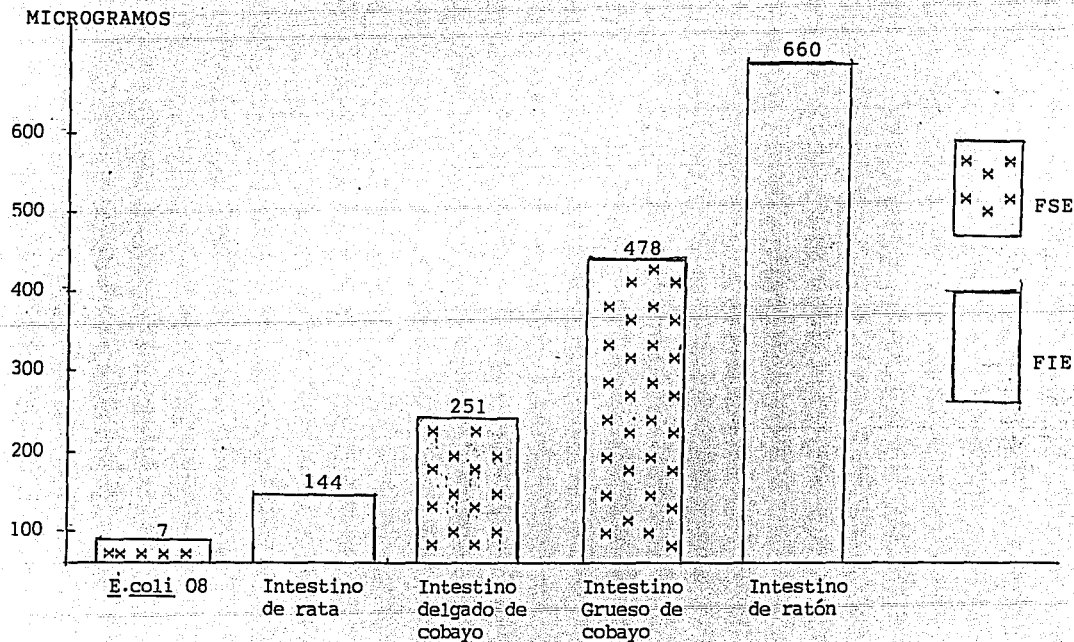


FIGURA 4.

Microgramos de las diferentes fracciones solubles e insolubles en etanol necesarias para inhibir un 50% de la reacción de inmunohemólisis.



## DISCUSSION



El hapteno descubierto por Kunin (26) en el año de 1962 posteriormente se encontró en la mayoría de las bacterias -- Gram negativas y consiguientemente, en seguida comenzó a ser denominado "antígeno común de las enterobacterias o ECA". Al principio se trató de establecer una relación entre la cantidad del ECA por gramo de bacterias secas (o por miligramo de las fracciones solubles en etanol que se obtenían de los LPS crudos) y el grado de virulencia de los microorganismos. Los resultados fueron contradictorios, por una parte, según algunos investigadores la disminución del ECA estaría asociada -- con una mayor patogenicidad (4), mientras otros trabajos sugerían todo lo contrario (55). Pero además, se comprobó que la relación ECA-virulencia parecía depender de la edad de las -- personas con diarrea infecciosa causada por Escherichia coli (22). Se encontró que regularmente era en los lactantes menores de seis meses en quienes coincidían los episodios diarréicos con el aislamiento de cepas que tenían un bajo contenido del ECA, mientras que en los niños mayores no se podía -- establecer una correlación similar.

No obstante, el contenido del ECA en los microorganismos volvió a relacionarse con la enfermedad diarréica de las personas infectadas cuando se comprobó que, si el hapteno se --

comportaba como un buen inmunógeno aunque esto sucediera independientemente de su concentración en las bacterias, la estimulación podía conducir a la síntesis de anticuerpos anti-ECA capaces de reconocer los determinantes antigénicos propios de la mucosa intestinal de ratas y pacientes humanos (48). Apparently los anticuerpos anti-ECA actuaban como "auto anticuerpos", que se unían a la mucosa, probablemente mediante -- mecanismos de hipersensibilidad tipo I y II y eran capaces de provocar lesiones tisulares compatibles con el cuadro clínico de la colitis ulcerosa. Estos resultados permitieron proponer una etiopatología autoinmune para la enfermedad mencionada, en la cual el elemento desencadenante sería el hecho de compartir el mismo antígeno (ECA) las enterobacterias y las células del intestino.

Más adelante, Carrillo (3) encontró que la mucosa intestinal de niños mortinatos no solo podía contener sustancias --- antigenicamente similares al ECA sino que, además también tenía otras más que daban una reacción cruzada con los determinantes antigénicos somáticos O de los lipopolisacáridos de varios serotipos de Escherichia coli. Este fenómeno de cruce antigénico tenía un patrón característico para cada uno de -- los casos estudiados, razón por la cual el mismo autor propu-

so una hipótesis acerca del control genético de ese fenotipo intestinal y su probable relación con el estado de salud o enfermedad de cada persona una vez que se estableciera la inevitable relación huésped-parásito entre cada individuo y su flora comensal a nivel de intestino.

Posteriormente se demostró que los extractos crudos del protozoario Entamoeba histolytica parásito que habitualmente se localiza e invade el intestino humano, también contenía sustancias que presentaban el mismo cruce antigénico con el ECA (10). Al encontrar los mismos determinantes compartidos por la mucosa intestinal, las enterobacterias y protozoarios que eran parásitos reconocidos del tubo digestivo, de nuevo cobraron interés antiguas proposiciones acerca de que los antígenos comunes podían participar de alguna forma en las interacciones entre el huésped y los microorganismos que se localizaban en el intestino bien como comensal o como parásito.

Con el propósito de ampliar nuestro conocimiento acerca de los antígenos que se encuentran compartidos por la mucosa intestinal y los microorganismos que habitualmente se multiplican en su superficie e llegan a invadirlo, se propuso el presente trabajo sobre el tubo digestivo de embriones de roedo-

res. Si en los embriones de los animales seleccionados también se encontraban determinantes antigénicas similares a los del ECA, entonces, se podía contar con alguna especie propia para el diseño de modelos experimentales en los cuales la manipulación inmunológica de los mismos podría permitir que aumentara nuestro conocimiento sobre el significado biológico del ECA o de sustancias similares a este hepteno, compartidas por la mucosa intestinal de los animales y las esterobacterias.

El objetivo del presente estudio estuvo apoyado, además, en trabajos recientes que demuestran cómo también existen sustancias con los mismo determinantes antigénicos del ECA en -- varios tejidos animales tales como el hígado, corazón y riñón (17), (12) (41). Aunque estos últimos experimentos hayan sido practicados en animales gnotobióticos (11), con lo cual se elimina la posibilidad de que los hallazgos resulten una consecuencia de la "contaminación" tisular por la flora bacteriana (Gram negativa comensal), de todos modos quedan numerosas interrogantes sobre el destino y el catabolismo de las endotoxinas que normalmente cruzan la mucosa, pasan a la circulación del animal gestante y, teóricamente, pueden atravesar la barrera placentaria durante el embarazo e ir a localizarse en el tubo digestivo del producto in-utero.

Los resultados de nuestro estudio y de otros similares - no pueden contestar la pregunta de si los antígenos bacterianos que se encuentran en los tejidos animales están o no sintetizados verdaderamente por las células eucariotas. A pesar de todo, desde hace años está propuesta la ubicuidad de los - sistemas enzimáticos necesarios para ensamblar moléculas con una composición química y una conformación similar a la de ECA (37). Esta sería una explicación razonable para el hallazgo - del ECA en varios tejidos humanos y animales.

Naturalmente hacen falta más estudios que demuestren los ciclos metabólicos comunes, comparen cromatográficamente la - existencia de los mismo amino-azúcares en estructuras celulares diferentes y confirmen la síntesis de novo del ECA en los diferentes tejidos que han mostrado la similitud antigénica. Así mismo también faltan más estudios sobre el destino metabólico de los LPS bacterianos absorbidos por la mucosa intestinal . Los hallazgos recientes que demuestran antígenos comunes con los de Escherichia coli en la aorta normal de va---rios animales y humanos (50), el informe de que la orina de - pacientes con cierto tipo de neoplasias, contienen determinantes antigénicos del ECA (9) y los experimentos conocidos que de--muestran cómo los linfocitos y los macrófagos pueden ser esti

mulados por LPS de origen bacteriano (42), son todos ellos -- evidencia que está a favor de que las sustancias conocidas genéricamente como "endotoxinas" no se deben encontrar exclusivamente relacionadas con las manifestaciones clínicas de los procesos diarreicos causados por infecciones enterales.

Los resultados del presente trabajo confirman la existencia de antígenos similares al ECA en el intestino de los embriones de roedores. Hasta ahora solo había evidencias indirectas de que las ratas tenían el ECA en su mucosa intestinal.

Llama la atención la negatividad de la reacción con las fracciones separadas del intestino de embriones de conejo. Estas muestras dieron resultados negativos aunque el estudio se repitió varias veces con diferentes muestras. Por otra parte, también fué un hallazgo inesperado el encontrar los determinantes antigénicos del ECA solamente en las fracciones solubles en etanol de los intestinos, grueso y delgado, de los embriones de cobayo. En cambio, cuando no fué posible separar las dos porciones del intestino (como sucedió con los embriones de ratas y ratones), los determinantes antigénicos similares al ECA solamente se encontraron en las fracciones insolubles en etanol. Desde el trabajo de Susuki (54) se --



conoce que el etanol al 85% separa el ECA de los LPS y deja al primero en la fase soluble, mientras los últimos precipitan. Conforme los objetivos que se plantearon al iniciar este estudio, los resultados obtenidos al final no permiten explicar las diferencias anteriores. Pero se puede suponer que la causa estuvo en la metodología, ya que en el caso de las ratas y ratones, se mezclaron los intestinos grueso y delgado, mientras que en los embriones de cobayo si fué posible separar y estudiar independientemente las dos porciones del intestino.

Según el peso seco (microgramos) de las fracciones utilizadas y, además, tomando en cuenta los resultados obtenidos al inhibir la misma reacción con la fracción soluble en etanol -- separada del LPS crudo de Escherichia coli 08, se observó que para inhibir la inmunohemólisis era necesario utilizar cantidades mayores de los intestinos de los embriones que de los -- LPS de las enterobacterias. Esto indica que la cantidad de -- ECA o de los determinantes antigénicos similares a los de este hapteno en las fracciones obtenidas después del tratamiento con etanol, fué significativamente mayor que en el caso de -- Escherichia coli y mucho menor en los tejidos de los roedores. Este resultado era el esperado.

Las diferencias entre el contenido de las sustancias inhibidoras que se encontraron según la especie animal estudiada, requerirían más investigaciones antes de poder afirmar si se trata de un hallazgo constante o son variaciones que dependen de la cepa utilizada. Las fracciones de los intestinos de -- embriones de ratas fueron los que más inhibieron, es decir que la inhibición fué positiva con las menores cantidades de microgramos de las fracciones de los intestinos de embriones de cobayo y finalmente las de los ratones. Tampoco formó parte de los objetivos de este estudio conocer las variaciones del ECA intestinal según el desarrollo embrionario.



## CONCLUSIONES

1.- En el intestino de embriones de ratas, ratones y cobayos se encuentran sustancias que, mediante la reacción de inhibición de la inmunohemólisis, revelan determinantes antigénicos compartidos con el antígeno común enterobacteriano -- (ECA).

2.- En el intestino de embriones de conejo no se pudo -- comprobar el mismo cruce antigénico.

3.- Las sustancias que tienen determinantes antigénicos compartidos con el ECA se encontraron en las fracciones solubles en etanol que se separaron de los intestinos delgado y grueso de los embriones de cobayo. En cambio, cuando el tubo digestivo de los animales no se separó en sus dos porciones -- (como fué el caso de los embriones de rata y ratón), al procesar todos los tejidos mezclados se encontró que las sustancias similares al ECA estaban en las fracciones insolubles en etanol.

4.- Según la especie animal y el segmento del intestino, se observaron diferentes grados de inhibición de la inmunohemólisis. Estas diferencias fueron significativas.

## VII Bibliografía

- 1.- Aoki, S., Merkel, M., Mc. Cabe, W.R. "Immunofloorescent demonstration of common enterobacterial antigen" Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121 p. 230 (1960)
- 2.- Cambell, D.H., Garuey, J. S. Cremer, H. E., Sussjrof, S. H.  
METHODS IN IMMUNOLOGY  
W.A. Benjamin, INC.  
New York. p. 435 (1970)
- 3.- Carrillo, J. "Cruce antigénico entre mucosa intestinal de neonatos y algunos serotipos de Escherichia coli." Biol. Med. Hosp. Inf. Mex. 39 p. 11 (1982)
- 4.- Carrillo, J., Hashimoto, B., Kumate, J. "Content of heterogenetic antigen in Escherichia coli and its relationships to diarrhea in newborn infants". J. Infect Dis 116 p. 285 (1978)
- 5.- Crabe, P., Heremans, J. F. "The distribution of immunoglobulin containing cells along the human gastrointestinal tract" Gastroenterology 51 p. 305 (1966)
- 6.- Diaz, F., Nester, E. "Antibody response to the common enterobacterial antigen of children with shiselosis, salmonellosis or urinary tract infection"

- Am. J. Med. Sci 256 p. 18 (1968)
- 7.- Domingue, G. J., Salhi, A., Roontree, C., Little, H.  
"Prevention of experimental hematogenous and retro--  
grade pyelonephritis by antibodies against enterobac--  
terial common antigen. Infect Immun 2 175 (1970)
  - 8.- Evans, D. J., Evans, D. G. "Three characteristics - -  
associated with enterotoxigenic Escherichia coli -  
isolated from man." Infect Immun 8 p. 322 (1973)
  - 9.- García, F., Carrillo, J., Silva, S.M. "Antígeno de -  
las enterobacterias y enfermedades neoplásicas y eli--  
minación urinaria". LIX Revn. Req. de la Asoc. de -  
Inv. Ped. Méx. p. 130 (1980)
  - 10.- García, F., Carrillo, J., Drago, E., Avila, E. "Cross  
reaction of antiserum against enterobacterial common  
antigen with Entamoeba histolytica HK-9 extracts".  
Arch. Invest. Med. Mex. 13 p. 245 (1982)
  - 11.- Gorzynski, E. A., Krasny, S.A. "Cross reactivity --  
between organ extracts of gnotobiotic mice and ente--  
robacterial common antigen". J. Reticuloendothel -  
Soc. 17 p. 346 (1975 a)
  - 12.- Gorzynski, E.A., Krasny, S.A. "Immunological mimicry  
between mouse tissue and enterobacterial common an--  
tigen". Immunol. Commun 4 p. 39 (1975b)

- 13.- Gorzyniski, E.A., Priore, R. L. Meter, E. "Effect of immunization with common enterobacterial antigen on experimental Salmonella typhimurium infection of mice".  
Immunol. Commun. I p. 123 (1972 a)
- 14.- Gorzynski, E.A., van Oss, C. J., Ambrus, J. L. "The hemagglutinin response of human subjects to common enterobacterial antigen". Infect Immun. S p.625 (1972 b)
- 15.- Hammarstrom, S., Carlsson, H.E., Perlmann, P., - - Svensson, S. "Immunochemistry of the common antigen of Enterobacteriaceae (Kunin)". J. Exp. Med. 134 - p. 567 ( 1971 )
- 16.- Hammarstrom, S., Perlmann, P. "Immunological studies of ulcerative colitis Immunochemistry of common - antigen of Enterobacteriaceae (kunin) relation to - lipopolysaccharide core structure". Acta Pathol. -- Microbiol. Scand. (B) 80 p. 165 (1972)
- 17.- Holmgren, J., Hanson, L. A., Holm, S.E., Karjser, - B. "An antigenic relationship between kidney and -- certain Escherichia coli Straoms". Int. Arch. - - Allergy Appl. Immunol. 41 p. 463 (1971)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 18.- Hormache, Ce. "Natural resistance to Salmonella - Typhimurium indifferent inbred mouse strains".  
Immunol. 37 p. 31 (1979)
- 19.- John, M. A., Whiteside, R. E., Baker, E.E., McCabe, W.R. "Common enterobacterial antigen I. Isolation and purification from Salmonella Typhosa - - O: 901".  
J. Immunol. 110 p. 781 (1973)
- 20.- Kaplan, M.H. "Autoantibodies to heart and rheumatic fever: the induction of autoimmunity to heart by streptococcal antigen cross reactive with heart".  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 124 p. 904 (1965)
- 21.- Kent, J. F. "Precise standarization of reagents - for complement fixation". Amer. J. Trop. 12 p.103 (1963)
- 22.- Kumate, J., Cravioto, J., Hashimoto, B., Vega, L., Carrillo, J. "Content of common antigen of Escherichia coli, and diarrhea of newborn and infants in - a Mexican preindustrial community".  
Ann. N. Y. Acad. Sci 176 p. 350 (1971)
- 23.- Kumate, J., Gutierrez, G.

MANUAL DE INFECTOLOGIA

Ediciones médicas del Hospital Infantil de México

- 4a. Ed. México p. 359 (1976)
- 24.- Kunin, C.M. "Separation, characterization and biological significance of a common antigen in Esterobacteriaceae", J. Exp. Med. 118 p. 565 (1963)
- 25.- Kunin, C.M., Beard, M.V. "Serological studies of O antigens of Escherichia coli by means of the hemagglutination test". J. Bacteriol 85 p. 541 (1963)
- 26.- Kunin, C.M., Beard, M.V., Halmagyl, N.E. "Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of Escherichia coli and other enterobacteriaceae".  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111 p. 160 (1962)
- 27.- Lew, H. C., N. Kaido, H., Makela, P.H. "The biosynthesis of uridine diphosphate N. acetyl mannosaminuronic acid in rff mutants of Salmonella typhimurium".  
J. Bacteriol 136 p. 227 (1978)
- 28.- Lugowski, C., Romanowska, E. "Enterobacterial common antigen tetanus toxoid conjugate as immunogen". Infect. Immun. 42 p. 1086 (1983)
- 29.- Lugowski, C., Romanowska, E. "Enterobacterial common antigen: Isolation from Shisolla Sonnei, purification and immunochemical characterization" Eur. J. Biochem 91 p. 89 (1978)
- 30.- Makela, P.H., Mayer, H., whang, H. Y., Neter, E., "Participation of lipopolysaccharide genes in the determination of the common enterobacterial antigen: analysis of R motants of Salmonella minnesota".

- J. Bacteriol 119 p. 760 (1974)
- 31.- Männel, D., Mayer H. "Isolation and chemical - -  
characterization of the enterobacterial common an-  
tigen" Eur. J. Biochem 86 p. 361 (1978a)
- 32.- Männel D., Mayer, H. "Serological and immunologi--  
cal properties of isolated enterobacterial common\_  
antigen". Eur. J. Biochem 86 p. 371 (1978b)
- 33.- Marx, A., Mayer, H. "The action of phospholipasa A  
on the common enterobacteriaceae antigen of the --  
Kunin - type." Zentralbl. Bakteriol (Orig A) 226  
p. 224 (1974)
- 34.- Marx, A., Petcovici, M. "Immunochemical studies on\_  
purified common enterobacterial antigen."  
Zentralbl. Bakteriol. (Orig A) 233 p. 486 (1975)
- 35.- Marx, A., Petcovici, M. "Role of the rfa locus in - -  
immunogenicity of common enterobacterial antigen -  
(kunin)." Infect Immun 13 p. 360 (1976)
- 36.- Marx, A., Petcovici, M., Nacescu, N., Mayer, H., --  
Schmidt, G. "Demonstration of enterobacterial common  
antigen by bacterial agglutination".  
Inf. ect. Immun 18 p. 563 (1977)
- 37.- Mayer, H., Schmidt, G. "Chemistry and biology of - -  
the enterobacterial common antigen (ECA)."



- Current, top. Microbiol. Immunol. 85 p. 99
- 38.- Mayer, It., Schmidt, G., Whang. H. Y., Neter, E.  
"Biochemical basis of the immunogenicity of the -  
common enterobacterial antigen." Infect. Immun. -  
6 p. 540 (1972)
- 39.- Mc. Cabe, W. R., Greely, A. "Common Eterobacterial  
antigen. II. Effect. of immunization on challenge\_  
with heterologous bacilli." Infect. Immun. - -  
7 p. 386 (1973)
- 40.- Mc. Cabe, W. R., Kreger, B.E., Johns, M. "Type -  
specific and cross-reactive antibodies in Gram-ne  
gative Bacteremia." N. Engl. J. Med. 287 p. 261\_  
(1972)
- 41.- Morgenstern, M. A., Gorzinski, E.A. "Immunogenic\_  
cross - reactivity between human tissues and the\_  
enterobacterial common antigen." Infect Immun -  
17 p. 36 (1977)
- 42.- Morrison, D.C., Ryan, J.L. "Bacterial endotonins  
and host immune response". Adv. Immun. 28 - -  
p. 293 (1979)
- 43.- Neva, F.A., Morgan, H. R. "Tolerance to the action  
of endotonins of enteric bacilli in patients con-  
valesient from typhoid and paratiphoid fever --

- K. Lab. Clin. Med. 35 p. 911 (1950)
- 44.- Neter, E. "Bacterial hemagglutination and hemolysis".  
Bacteriol. Rev. 20 p. 166 (1956)
- 45.- Neter, E. "Indirect bacterial hemagglutination and its applications to the study of bacterial antigens and serological diagnosis". Pathol. Microbiol. (Basel) 28 p. 859 (1965)
- 46.- Neter, E., Whang, H. Y., Suzuki, T., Gorzynski, E. A. "Differences in antibody response of rabbit to intravenously injected soluble and cell attached enterobacterial antigen. Immunology 7 p. 657 (1964)
- 47.- Nolan, L.P., Hare, D. K., Ali, M. U. "In vitro studies of intestinal endotoxin absorption" - - - Gastroenterology. 72 p. 434 (1977)
- 48.- Perlmann, P., Hammarström, S., Lagercrantz, A., Gustafsson, B.E. "Autoantibodies to colon in rats and human ulcerative colitis: cross reactivity with Escherichia coli 014 antigen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 p. 975 (1967)
- 49.- Roth, J., Le Roith, D., Shildack, L., Rosenzweig, J. L., Lesniak, M., Havranlova, K. "The evolution

- nary origino of hormones, neurotransmitters and -  
 other entracellular chemical messengers".  
New. Engl. J. Med. 306 p. 527 (1982)
- 50.- Scebat, I., Renais, J., Goldstein, J., Groult, N.,  
 Hadjenski, P. "Cross antigenicity between - -  
Escherichia coli lipopolisacharide and aortic - -  
 glycoproteins in immunity and atherosclerosis".  
Academic Press. New York. 121 p. I (1980)
- 51.- Schmidt, G., Jann, B. K., "Genetic and immunoche--  
 mical studies on Escherichia coli 014 ; K 7 : H".  
Eur. J. Biochem. 42 p. 303
- 52.- Schmidt, G., Männel D., Mayer, H., Whang. H. Y., -  
 Neter, E. "The roli of a lipopolysaccharide gene -  
 for immunogenuity of the enterobacterial common -  
 antigen". J. Bacteriol. 126 p. 579 (1976 a)
- 53.- Springer, G. F., Williamson, P., Brandes, E. C. -  
 "Blood group activity of Gram negative bacteria".  
J. Express. Med. 113 p. 1077 (1961)
- 54.- Suzuki, T., Gorzynski, E.A., Neter, E. "Separation  
 by ethanol of common and somatic antigens of . - -  
 Enterobateriaceae". J. Bacteriol. 88 p. 1240 -  
 ( 1964a)
- 55.- Voltonen, M. V., Larinkari, U.M., Plasila, M., -

- Valtonen, U. U., Mäkelä, P.H. "Effect of entero--  
bacterial common antigen on mouse virulence of Salmonella typhimurium". Infect Immun 13 - -  
p. 1601 (1976)
- 56.- Whang, H. Y., Loza, V., Neter, E. Milgrom F. - -  
"Gel precipitation of common enterobacterial anti-  
gen by its antibody". Int. Arch. Allergy Appl. -  
Immunol. 45 p. 905 (1973)
- 57.- Whang, H. Y., Mayer, H., Schmidt, G., Neter, E. - -  
"Immunogenicity of the common enterobacterial - -  
antigen produced by smooth and rough Strains." - -  
Infect. Immun. 6 p. 533 (1972b)
- 58.- Whang, H. Y., Nester E. "Immunochemical studies -  
of a heterogenetic enterobacterial antigen - - -  
(Kunin)".  
J. Bacteriol. 84 p. 1245 (1962)
- 59.- Whang, H. Y., Nester E. "Selective destruction by  
Pseudomonas aeruginosa of common antigen of ente-  
robacteriaceae". J. Bacteriol 88 p. 1244 (1964)
- 60.- Zabriskie, J.B. "Mimetric relationships between -  
group A Streptococci and mammalian tissues".  
Adv. Immunol. 7 p. 147 (1967)