



26
24

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



V. N. A. M.

FALLA DE ORIGEN

PREPARACION DE UN CONJUGADO
PROTEINA A-ANTICHO "C" ESPECIFICO DE
STREPTOCOCCUS B-HEMOLITICO GRUPO A

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
NORMA LUZ LUNA CASASOLA

DIRECTOR DE TESIS:
Q.F.I. ANDREA BECERRIL OSNAYA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

	PAG.
RESUMEN -----	4
I INTRODUCCION -----	5
II GENERALIDADES -----	6
A) Presencia de protefna A -----	6
B) Producción de protefna A -----	6
C) Aislamiento y propiedades de protefna A -----	10
D) Actividad con inmunoglobulinas -----	13
E) Mecanismo de precipitación de protefna A-IgG -----	13
F) Actividad biológica de la protefna A -----	19
G) Efectos de la protefna A -----	20
H) Aplicaciones de la protefna A -----	24
III OBJETIVO -----	32
IV ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO -----	33
V MATERIAL Y METODOS -----	35
Material y soluciones -----	35
Métodos -----	36
1) Cultivos y cosecha de cepas bacterianas -----	36
2) Pruebas bioquímicas -----	36
3) Preparación de Estafilococo rico en protefna A -----	38
4) Sensibilización con sueros hiperinmunes -----	39
5) Prueba de coaglutinación -----	39
VI RESULTADOS -----	41
VII DISCUSION -----	43
VIII CONCLUSIONES -----	45
IX BIBLIOGRAFIA -----	46

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	PAG.
Tabla 1. Producción de proteína A por diferentes cepas de estafilococos y bacterias no estafilococales -----	7
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la proteína A -----	12
Tabla 3. Afinidad de unión proteína A-IgG -----	17
Tabla 4. Derivados de proteína A marcados para uso en Inmunoensayo -----	27
Tabla 5. Tabla de resultados de los reactivos de coaglutinación -----	42
Tabla 6. Tabla de resultados de la reacción de coaglutinación con el Reactivo 2 -----	42
Figura 1. Modelo de la estructura de la pared celular de <u>S. aureus</u> -----	11
Figura 2. Diagrama esquemático de la proteína A -----	14
Figura 3. Diagrama de trabajo para la preparación de estafilococo rico en proteína A -----	37

ABREVIATURAS

- Ac : Anticuerpo
Ag : Antígeno
BMR⁺ : Células formadoras de rosetas de eritrocitos de ratón activadas con SAC
BMR⁻ : Células cuya proliferación no fué estimulada con SAC
CHO : Carbohidrato
Ig : Inmunoglobulina
Igs : Inmunoglobulinas
(I¹²⁵)-IgE : IgE marcada con I¹²⁵
(I¹²⁵)-SpA : Proteína A de S. aureus marcada con I¹²⁵
NK : Asesino natural
PMN : Polimorfonucleares
PWM : Mitógeno Pokeweed
SAC : Staphylococcus aureus cepa Cowan I
SpA : Proteína A de S. aureus
UV : Ultravioleta

RESUMEN

La proteína A es un componente de pared celular que se liga intensamente a la porción Fc de cualquier molécula de IgG. Esto hace que la región Fab de cualquier molécula de anticuerpo esté cara afuera, de manera que esté libre para combinarse con un antígeno específico.

La reacción de coaglutinación consiste en insertar a la proteína A estafilocócica un anticuerpo específico IgG dirigido contra un antígeno X, aglutinando a este último.

En este trabajo se preparó un conjugado proteína A-anti CHO-C específico de Streptococcus B-Hemolítico del grupo A, utilizando un reactivo de Staphylococcus rico en proteína A y sueros anti-CHO-C específico del Streptococcus B-Hemolítico del grupo A.

Con el objeto de probar su especificidad, se puso en contacto con el antígeno específico; observándose claramente la reacción de coaglutinación.

Se utilizaron como controles: Positivo, un reactivo comercial de coaglutinación Phadebact para Strep. A; Negativos, suspensiones de Staphylococcus aureus cepa Cowan I y Streptococcus B-Hemolítico del grupo A en solución salina.

La reacción de coaglutinación es económica, sencilla y muy sensible. Este proceso ha hallado muchas aplicaciones en Inmunología y Tecnología Diagnóstica.

1. INTRODUCCION

El interés por la proteína A de Staphilococcus aureus (SpA) - es por su actividad con Inmunoglobulinas. Forsgren y Sjoquist probaron en sus experimentos la capacidad de mezclas de SpA y ambas - IgG normal y de mieloma o fragmentos aislados Fab, Fc o Fc' para - inhibir la formación de líneas de precipitación contra IgG completa, en difusión en gel. Concluyeron que la actividad de SpA se dirige a la fracción Fc de la IgG y la clasificaron como unión no específica, reacción pseudo-inmune, en oposición a la unión específica antígeno-anticuerpo en los sitios Fab. Estos hallazgos se reforzaron con los resultados de otros trabajos que demostraron que la actividad de algunas proteínas IgG de mieloma con SpA, o la eliminación selectiva de IgG de algunos sueros inunes o normales por algunas cepas de S. aureus que se sabe expresan SpA en la membrana. También establecieron la unión de IgG inmune o normal marcada con fluorescencia a la mayoría de las cepas de S. aureus, no es la reacción antígeno-anticuerpo específica; la unión se da entre la región Fc de la IgG y la SpA en la superficie de la bacteria (11, 15).

Estos y otros estudios demostraron la capacidad de SpA de comportarse como receptor Fc, aunque estudios recientes muestran que también puede haber actividad en sitios Fab de ciertas inmunoglobulinas. Además, otras clases de IgG pueden unirse a SpA y la actividad depende de las especies y subclases. Aunque la SpA ha sido estudiada más extensamente, otros microorganismos como estreptococos producen proteína A que se unen específicamente a IgG y otras clases de inmunoglobulinas a través de los sitios de unión Fc (18, 27 28).

II. GENERALIDADES

A) PRESENCIA DE PROTEINA A

Una vez que SpA ha sido clasificada como una protefna de pared celular que se une en forma específica a la región Fc de moléculas de Inmunoglobulinas (Igs) principalmente a la IgG, se han -- realizado numerosos estudios orientados a determinar su presencia en forma sistemática. Estudios recientes sugieren que la SpA es común a los estafilococos; alrededor de los años 70 es que se empieza hacer una clasificación, los resultados de estos trabajos se -- muestran en la tabla 1.

Una cantidad de cepas de estafilococos y organismos relacionados son positivos a la producción de SpA de superficie celular o -- extracelular. La cepa Cowan I y Wood 46 generalmente se usan como -- controles positivo y negativo respectivamente. Kronval y col. utilizan IgG₁ de mieloma marcada con I¹²⁵ para cuantificar el número -- de sitios de unión en la superficie de S. aureus y demostrar así -- que la cepa Cowan I expresa aproximadamente 80,000 sitios de unión -- por organismo. La SpA extracelular y la SpA extraída de la bacteria -- generalmente son detectadas por difusión en gel, permitiendo -- que los sobrenadantes migren dentro del agar que contiene IgG. La -- formación de líneas de precipitación y comparación con precipita-- ciones estándar de SpA purificada permiten determinar la concentra-- ción. Trabajos similares utilizan gel que contiene el antisuero -- contra diferentes cepas de S. aureus (35).

B) PRODUCCION DE PROTEINA A

S. aureus es un patógeno potencial, por lo cual se deben -- tener precauciones para prevenir posibles infecciones, Las condi-- ciones óptimas de crecimiento han sido establecidas y hay dos for--

TABLA Nº 1: PRODUCCION DE PROTEINA A POR DIFERENTES CEPAS DE ESTAFILOCOCOS Y BACTERIAS NO ESTAFILOCOCALES.

NUMERO	CEPAS	No.POSITIVOS/No.PROBADOS
1	<u>S. aureus</u>	692/700 (99%)
2	"	2/100 (2%)
3	"	141/156 (90%)
4	"	302/455 (66%)
5	"	215/215 (100%)
6	"	318/341 (93%)
7	"	
8	"	49/56 (88%)
9	"	297/360 (83%)
10	"	75/107 (70%)
11	"	46/48 (95%)
12	"	95/106 (90%)
13	"	54/120 (45%)
14	"	58/173 (34%)
15	"	30/30 (100%)
16	"	148/149 (99%)
17	"	420/433 (97%)
18	"	0/570 (0%)
19	"	142/143 (99%)
20	"	38/100 (38%)
21	<u>S.epidermidis</u>	0/47 (0%)
22	"	0/157 (0%)
23	"	1-7/77 (1-9%)
24	<u>S.hyicus</u>	0/34 (0%)
25	<u>S. intermedius</u>	4/127 (3%)
26	No. Estafilococo	0/13 (0%)

mulaciones básicas: Caldo CCY (Hidrolizado de Caseína-Extracto de Levadura) y el Caldo Penassay fortificado, son los más apropiados para la mayoría de las cepas incluyendo la Cowan I (35).

Los tiempos de cultivo tienen también variaciones, pero generalmente los organismos se colectan después de 12-18 horas de incubación a 37°C. De los cultivos de rutina se han aislado de 9-13 mg de células por litro (peso húmedo), aunque también se han reportado datos de 25 mg por litro. S. aureus se ha cultivado también en agar enriquecido o en geles comerciales y caldos (19).

Después que los organismos son colectados y lavados, pueden guardarse en refrigeración de -30 a -70°C, o pueden ser liofilizados, sin que disminuya significativamente la actividad de SpA. La bacteria muerta por calor tratada con soluciones diluidas de forma lina mantiene su actividad; se vende en forma comercial como un reactivo precipitante para la IgG o bien como reactivo de complejos inmunes conteniendo IgG (15, 33, 35).

Utilizando la técnica de un cultivo por diálisis con la cepa A 676 de S. aureus, la cual produce solamente SpA extracelular, rinde arriba de 2 mg/L de SpA comparado con 0.2-0.3 mg/L bajo las condiciones usuales de cultivo.

Altas concentraciones de cloruro de sodio (7.5%) pueden bajar la producción de SpA hasta en más de un 90%. En medios con cloruro de sodio al 24% no hay producción de SpA (35).

La temperatura de incubación puede afectar los niveles de SpA ligada a células. Comparando con la incubación a 37°C, los organismos de la cepa Cowan I incubados a 20°C en caldo Penassay exhibieron un 50% menos SpA sobre su superficie, en tanto que los organismos incubados a 41°C tienen un 20% más. Utilizando métodos microscópicos cuantitativos con IgG marcada con peroxidasa no se encontró una diferencia significativa en la cantidad de SpA en la super

ficie de Los organismos incubados a 37°C o a 44°C en caldo CCY (18, 35).

Se ha demostrado la presencia de SpA extracelular, así como también la SpA ligada a células, esto implica que la SpA sobre la membrana tiene fácil acceso a las moléculas de Igs en las fases -- fluidas o uniéndose a antígenos de superficie celular, de tal forma que la región Fc pueda interactuar con receptores de SpA. Los -- estudios han demostrado que la SpA se localiza primeramente en la superficie de la bacteria SAC y está unida en forma covalente a la porción de peptidoglucán de las membranas (35, 62).

Por medio de microscopía electrónica utilizando complejos antígeno-anticuerpo ligados a células como indicadores, se encontró que la SpA está distribuida uniformemente en la superficie de SAC, 209 P y FDA. Resultados similares se han obtenido utilizando IgG -- fluorescente o marcada con ferritina. Basándose en el peso seco de la bacteria de la cepa Cowan I y aislando la pared celular de estas bacterias, contenían 1.7% y 6.7% de proteína A respectivamente.

Los estudios del origen de la proteína A de S. aureus extracelular han demostrado que las cepas Cowan I y 3695 secretan más del 9% del total de SpA producida, mientras que de un 90-95% se encuentra unida a la pared celular y un 1% se encuentra en el citoplasma.

Durante el crecimiento exponencial de la bacteria se libera -- SpA extracelular, directamente después de la síntesis en ribosomas y este producto y SpA de pared celular son liberados con lisostafín de las cepas Cowan I, E 2219 y 4972; son indistinguibles por -- electroforesis en gel y la composición de los aminoácidos es la -- misma (35).

C) AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LA PROTEINA A

a) Aislamiento:

La SpA ha sido aislada por extracción con calor de la cepa Co wan I en una solución Buffer de fosfatos sometidos a ebullición, - seguida de una precipitación con ácido o altas concentraciones de sal, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida; la lisosima también se ha uti lizado para la liberación de SpA de la superficie de S. aureus, pe ro la cantidad es variable y los productos generalmente son hetero géneos. A menudo contiene fragmentos de peptidoglicán y son de 25 30 veces menos activos que la SpA extracelular encontrada en me--- dios de cultivo líquidos. En contraste la SpA aislada después de - la digestión con lisostafin es homogénea y completamente activa (6 9, 13, 16, 18, 19).

En el procedimiento original después del tratamiento con la - enzima y acidificación del precipitado, se extrae la proteína. La SpA es precipitada con sulfato de amonio al 80% y purificada por - cromatografía de intercambio iónico seguida de la filtración en -- gel. El procedimiento de purificación ha sido mejorado utilizando- la cromatografía por afinidad con IgG inmovilizada. Los sobrenadan tes que contienen SpA se agregan a una columna de IgG humana aco-- plada a sefarosa o IgG procina unida a poliacrilamida, posterior-- mente se lava con solución buffer neutro, se homogeniza y toda la SpA activa se eluye con glicina 0.1M, pH 3.0. El rendimiento es -- aproximadamente del 75% (20, 42, 48, 50, 53, 54, 55).

b) Estructura y Actividad de la proteína A:

La proteína A está constituida por cinco fragmentos: A, B, C, D y X. Los fragmentos A, B y C son monovalentes, no aglutinan eri-

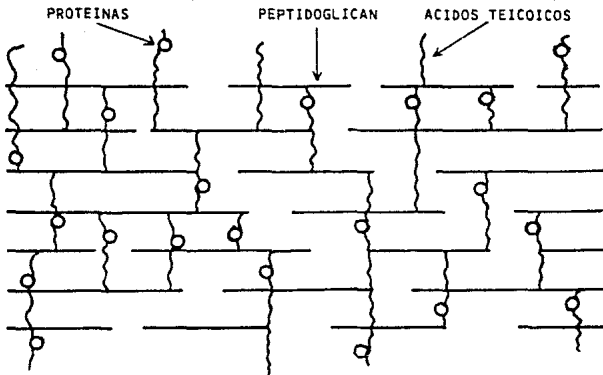


FIGURA 1. Modelo de la estructura de la pared celular de *S. aureus* la capa gruesa de la pared esta compuesta principalmente de peptidoglicán, los ácidos teicoicos estan unidos covalentemente al peptidoglicán y muchos de ellos se extienden hacia afuera y hacia el interior. Las proteínas, estan probablemente unidas a las cadenas de ácidos teicoicos.

TABLA No. 2 : PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA PROTEINA A

PROPIEDAD	VALOR
Peso Molecular	42 000
$\frac{1X}{A_{275}}$	1.65
Punto Isoeléctrico	5.1
Densidad a 20w (S)	2.1
$D_{(20w)} (cm^2 / s)$	4.3×10^{-7}
Radio de Stokes (nm)	5.0
Radio Friccional (FF/min)	2.1
Viscosidad intrínseca (ml/gm)	29.0
Constante de Huggins K	0.66
Volúmen específico (ml/gm)	0.72
pKa (cuatro equivalentes de tirosina)	10.25

trocitos sensibilizados de carnero, pero inhibir la reacción entre IgG y células cubiertas con SpA pura. Los fragmentos A y B tienen pesos moleculares entre 6000 y 7000 D.

El fragmento D es altamente afín a la región Fc de unión y está compuesto por 60 aminoácidos aproximadamente. La región X está compuesta por 150 aminoácidos; este segmento no se une a Fc y difiere mucho de los fragmentos activos (13, 18, 35).

El orden de las unidades y el acoplamiento a la pared celular se muestra en la figura 2.

D) ACTIVIDAD CON INMUNOGLOBULINAS

La capacidad de moléculas de inmunoglobulinas de unirse a la proteína A de S. aureus ha sido ampliamente estudiada. Sabemos que la IgG reacciona eficientemente con la SpA.

Kronvall y Williams fueron los primeros en determinar que las subclases 1, 2 y 4 de IgG se unen a la SpA reportando también que la IgG₃ no lo hace (27, 28, 35).

Cuando se probó la unión de proteínas de mieloma marcadas con I¹²⁵ a S. aureus más del 96% de IgG₁, IgG₂ e IgG₄ se unieron y sólo el 1.5% de la IgG₃. La IgG₃ representa generalmente menos del 5% de la IgG humana y las técnicas usadas comúnmente para probar la actividad entre la SpA y los compuestos en el suero completo -- no fueron lo bastante sensibles para discriminar las diferencias cuantitativas con las subclases de IgG humana (27, 28).

A los fragmentos y subfragmentos de IgG se les ha probado su actividad con la SpA para localizar el sitio activo en la molécula de Ig. Los datos indican que la actividad principal reside en la región Fc (20).

Se ha demostrado que otras clases de Igs humanas son activas-

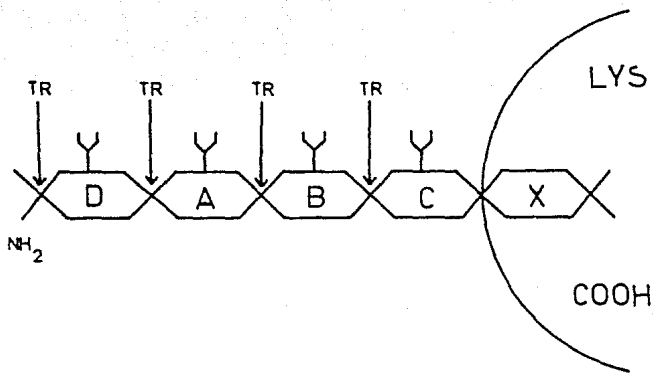


FIGURA 2. Diagrama esquemático de la proteína A incluyendo las cuatro regiones de unión Fc, D, A, B y C principio del bloque en N-terminal y unión a la región X, la cual se une a través del C-terminal a la porción de peptidoglicán de la membrana celular. Las horquillas representan los sitios de unión Fc y LYS y TR indican los puntos de división o desdoblamiento por lisostafina y tripsina respectivamente. Dado que la región no libera o separa de la bacteria por tripsina, es probable que la región X, como aquí se muestra quede enterrada en la pared celular, haciendo que la región C sea menos accesible.

en el caso de la IgM, se sabe que una subclase designada como IgM₂ reacciona con la SpA, en tanto que la IgM₁ no lo hace. Brunda demostró que más del 80% de (I¹²⁵)-IgM de mieloma humano se unía a S. aureus (35, 42)

Utilizando una IgM monoclonal se encontró que menos del 3% de la molécula intacta o de los productos monoméricos se unen a S. aureus. Grovs concluyó que la actividad de la IgM reside en la región Fc. Romagnani también apoyó lo anterior, sin embargo, Inganas en 1981 reportó que la unión de SpA a IgM se da en los fragmentos F (ab')₂ (28, 48).

La IgA de calostro humano y la IgA mono y policlonal de suero humano se unen a SpA. Las proteínas activas representan de un 20% a un 33% del total de IgA. La actividad se localizó en Fc. Virella y col. demostraron que la IgA₂ de suero se une a SpA pero no la IgA₁. La unión de IgA a proteína A reside en la porción Fab de la inmunoglobulina (20, 28).

La IgE policlonal humana interactúa con la SpA, no así la IgE monoclonal. Se ha reportado que el punto de unión en la IgE policlonal se localiza en la región Fab (27).

Existen pocos datos acerca de la actividad entre la IgD humana y la SpA. Kronvall y colaboradores encontraron que la IgD de mieloma no reacciona con la SpA purificada (15, 35, 48).

De las inmunoglobulinas de animales se sabe que la IgG de cerdo, también se une a la SpA; los sitios de unión se localizan en la región Fc. También la IgM e IgA pueden unirse a la SpA a través de los sitios de unión en la región Fab (35).

Zikan reportó que el 40% de la IgM de suero y el 47% de la IgA dimerica de calostro se unen a SpA-sefarosa (25, 35).

Andersen encontró que sólo el 15% de las IgG de conejo se unen eficientemente a SpA y esencialmente todas pueden ser removi-

das de suero completo. La mayoría de los reportes indican que el sitio de unión en la IgG de conejo se localiza principalmente en la región Fc; aunque también hay indicios de actividad en la región Fab de la molécula, probablemente fuera del sitio de combinación del antígeno (27, 35).

La IgM de conejo también se une a la SpA (25, 35).

En cobayos las subclases IgG₁ e IgG₂ se unen a SpA, pero no la IgM, la unión se localiza principalmente en la región Fc, aunque también se ha detectado actividad en la región Fab (25, 35).

Las cuatro subclases de IgG de ratón (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃) se unen a SpA, aunque cada una presenta diferente afinidad (42, 51).

El sitio de unión se encuentra en la región Fc de la IgG de ratón. Algunos reportes sugieren que algunas IgM policlonales e IgA mono o policlonal de ratón se unen a SpA (66, 69).

Young y Tamura demostraron que los anticuerpos monoclonales de ratón se unen a la proteína A estafilococal, a través de los sitios Fab (35, 69).

De las cuatro subclases de IgG de rata, la IgG_{2c} y la IgG₁ interactúan fuertemente con la SpA y la IgG_{2b} muestra débil actividad. La IgM también es activa, dos de tres IgM monoclonales y la IgA se unen a SpA. La IgE monoclonal no mostró actividad (5, 42, 66, 69).

Todas las IgG, IgM e IgA de perro se unen a SpA.

En el caso de los corderos las subclases IgG₂ tienen alta afinidad por la SpA más que la IgG₁.

La IgG₂ de vaca también se une eficientemente a la SpA.

De un 20-70% de las cuatro subclases de IgG de caballo se unen a SpA-sefarcosa: IgG_b, IgG_c, IgG_a y la IgG (T); la IgM e IgA no se unen significativamente. Algunas pero no todas las IgG, IgA-

e IgM de gato son activas (35).

Pequeñas cantidades de IgM de suero de pollo, de carpa se unieron a SpA-sefarosa (pH 7.4) pero no a sefarosa sólo (35).

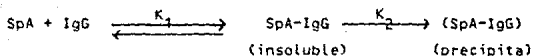
La constante de afinidad para la reacción entre la IgG humana y de conejo con la proteína A de S. aureus y para fragmentos purificados de Fc de conejo y el fragmento monovalente B ha sido determinada, los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3.

TABLA No. 3. AFINIDAD DE UNION PROTEINA A-IgG

ESPECIES DE IgG	K_D (M)	REFERENCIAS
IgG, de mieloma Humano	2.2×10^{-8}	Kronvall y col (1970)
Conejo	2.0×10^{-8}	Mynre y Kronvall (1980)
Conejo	2.0×10^{-8}	Johnson y Kronvall (1974)
Conejo	5.0×10^{-9}	Kessler (1975)
Conejo	1.0×10^{-10}	Okeefe y Bennet (1978)
Conejo	7.9×10^{-9}	Sandor y Langone (1981)
Fc de conejo	2.3×10^{-7}	Lancet y col. (1978)

E) MECANISMO DE PRECIPITACION
 PROTEINA A-IgG

Muchas de las relaciones estructura-actividad se basan en --- reacciones de precipitación en gel, para determinar la actividad - de Igs completas o fragmentos de las mismas con SpA. Kronvall postuló un mecanismo de dos pasos para la reacción de precipitación:



En donde K_1 se toma como el valor de la K_D (tabla 3). El primer - paso incluye la interacción SpA-Fc y el segundo paso de precipita- ción, para el cual, no se ha determinado el valor de K_2 incluye -- otra actividad, tal vez localizada en los sitios Fab. Los resulta- dos incluyendo determinaciones colorimétricas están de acuerdo con esta interpretación, que demuestra que la reacción primaria entre- la fracción Fc de la IgG₁ de mieloma humano y la SpA es altamente- exotérmica.

Cuando las reacciones en gel se examinaron más detalladamente un tipo de reacción de precipitación poco común fué descubierta, - llamándola fenómeno "Star" o fenómeno estrella. Esta es una reac- ción de tres componentes, en la cual una precipitación en forma es- trellada se produjo por la interacción de SpA e IgG, que formaba - sólo complejos solubles con SpA (conejo, cordero o vaca) y los --- fragmentos F(ab')₂ de IgG de conejo anti-SpA o de especies que nor- malmente tienen IgG precipitante (humano, cobayo o cerdo). Los --- reactivos se adicionaron en tres pozos bien separados y la forma- ción de la estrella ocurrió sólo cuando todos los componentes estu- vieron presentes.

El mecanismo del fenómeno estrella, ha sido estudiado, los es

tudios más recientes están de acuerdo en que la actividad de Fc en la IgG no precipitante es necesaria, aunque no está muy claro si la precipitación requiere un componente $F(ab')_2$ con actividad de anticuerpo dirigido contra SpA. De esta forma Endresen y Grov encontraron que sólo un mínimo (5%) de fragmentos $F(ab')_2$ de la IgG normal precipitante son activos a SpA.

Se sabe que la afinidad de los fragmentos $F(ab')_2$ purificados de anticuerpos IgG de cobayo contra albúmina de huevo y virus de sarampión pueden participar en la reacción estrella, lo cual sugiere que la actividad de anticuerpo contra SpA no se requiere (35).

F) ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PROTEÍNA A

La posible función biológica de la proteína A de acuerdo a los trabajos de Dosset, es el bloqueo completo del reconocimiento y muerte de la bacteria en la fagocitosis utilizando opsoninas IgG. Otras investigaciones han demostrado que la proteína A es capaz de provocar reacciones anafilácticas en cobayos, reacciones de Arthus en conejos, además se ha encontrado que los complejos proteína A - IgG fijan complemento de cobayo y también complemento de suero fresco de humano, cerdo y perro.

La máxima fijación de complemento se obtuvo en presencia de un exceso de anticuerpo. Kronvall y col. sugieren que la proteína A es otra sustancia capaz de unirse a la molécula de globulina en la proximidad necesaria para la activación de C_1 -Esterasa. Ellos han sugerido que la dimerización de la IgG por la proteína A y de las estructuras largas debido a una agregación secundaria pueden elevar el complemento activado por complejos.

Stalenheim y Castenson estudiaron la acción de los complejos-

proteína A-IgG sobre el componente C_3 del sistema de complemento.

Cuando se adicionó proteína A a suero humano C_3 paso a C_{3a} y C_{3b} , pero la proteína o agregados de proteína A e IgG no provocan la conversión de C_3 purificado. La explicación más probable a esta observación es que la proteína A reacciona con la región Fc de la IgG y entonces C_1 es activado por fijación al complejo proteína A-IgG. El C_1 activado actúa entonces sobre C_4 y C_2 para dar C_3 convertasa el cual actúa en turno sobre C_3 . De esta manera los complejos proteína A-IgG tienen un efecto similar sobre el sistema complemento como un complejo antígeno-anticuerpo.

La importancia en infecciones estafilococales de la actividad de complemento inducida por proteína A no esta muy clara, no obstante los estudios de Kronvall han indicado que puede haber aproximadamente 80,000 residuos de proteína A por cada célula bacteriana y más del 90% de la IgG humana es capaz de reaccionar con la proteína; de esta manera es posible imaginar una vía de complejos proteína A-IgG, activación de complemento, liberación de factores quimiotácticos, atracción de PMN y formación de pus. Kronvall también ha sugerido que las lesiones por complejos inmunes observadas en los pacientes con endocarditis puede deberse a la proteína A (33,-35).

G) EFECTOS DE LA PROTEINA A

Los leucocitos PMN humanos ingieren y degradan rápidamente -- los complejos insolubles preparados con IgG humana y SpA, las células blancas sanguíneas liberan histamina en presencia de SpA. Los complejos con (125 I)-IgG se han utilizado para demostrar que el reconocimiento depende de la concentración de neutrófilos, la naturaleza de los complejos, el tiempo de incubación y la presencia de -

factores del suero. Similar a la activación del complemento, el grado de fagocitosis depende de la dosis de SpA y es óptima para los precipitados formados en equivalencia. La presencia de suero humano da un resultado más rápido e incrementa la ingestión aún cuando los complejos, suero y neutrófilos se mezclen o cuando los complejos se tratan primariamente con suero y se lavan antes de la exposición a las células. El complemento juega un papel importante en el incremento, pero otros factores también están involucrados, dado que el suero inactivado por calor aún tiene un efecto opsonizante significativo. La IgA policlonal purificada y una fracción conteniendo IgA e IgM aisladas por afinidad cromatográfica sobre SpA-sefarosa, también incrementaron la actividad y se postuló que la IgA e IgM actúan como opsoninas por interacción directa con complejos SpA-IgG. Esto puede suceder debido a que las opsoninas estables al calor son anticuerpos con especificidad contra determinantes ocultos, expuesto en la IgG cuando se une a SpA. Es importante que la unión de SpA a sitios Fc en IgG no bloquee la unión a receptores Fc sobre neutrófilos. Por esta razón la proteína A marcada con 125 I puede usarse para detectar la unión de neutrófilos a anticuerpos IgG en el suero de pacientes con neutropenia autoinmune (35, 47).

Se sabe que los factores de suero lábiles al calor juegan un papel importante en la opsonización y fagocitosis de la bacteria y algunos estudios han revelado que la SpA soluble y ligada a células inhiben la fagocitosis de S. aureus, primeramente formando complejos con IgG que suprimen la capacidad de opsonización de complemento (54). Se ha reportado que dos componentes de pared celular de S. aureus; peptidoglucán y proteína A afectan la capacidad de los PMN para migrar e ingerir al estafilococo "in vitro" (42).

La unión de SpA a IgG puede servir para inhibir la respuesta-

del hospedero a una infección estafilococal, interfiriendo la opsonización. La proteína A interfiere con los mecanismos de defensa - del hospedero principalmente por supresión de la quimiotaxis y fagocitosis. Bajo condiciones de incubación con proteína A se inhibe enormemente la capacidad fagocítica de los PMN (41, 54, 63).

Vanderbrouke y col. estudiaron la interacción entre los leucocitos PMN y el S. aureus en presencia y ausencia de opsoninas; comparando la cinética de reconocimiento, la actividad metabólica y la degranulación durante la fagocitosis de S. aureus opsonizado y no opsonizado, midiendo la producción de anión superóxido y la liberación de lisosima por los PMN mediante la estimulación con la bacteria opsonizada y no opsonizada; como una medida del desencadenamiento de la actividad metabólica y degranulación. Demostraron que la bacteria no opsonizada es capaz de estimular la degranulación de lisosomas y el desencadenamiento metabólico de los PMN y no se encontró diferencia entre la cantidad del ión superóxido producido bajo estimulación con la bacteria opsonizada y no opsonizada (64).

Ferrante y col. demostraron que los leucocitos mononucleares cuando son cultivados en presencia de S. aureus fijado con formalina, liberan mediadores, que regulan las funciones de los neutrófilos humanos. Este estafilococo inhibe la migración de neutrófilos en presencia y ausencia de un gradiente quimiotáctico; los estudios en filtración en gel han demostrado que las propiedades que actúan sobre los neutrófilos, del estafilococo residen en las moléculas con un rango de peso molecular de 50,000-80,000 (13, 20).

Hawiger reportó que la bacteria de la cepa Cowan I liofilizada e incubada en plasma rico en plaquetas, causa la agregación plaquetaria y libera serotonina. La agregación plaquetaria se atribuyó a la interacción de la SpA con IgG, porque los fragmentos Fc o-

un exceso de SpA libre bloquean la agregación y tripsinización de la bacteria para remover la SpA libre, la agregación y reducción de la serotonina liberada (35).

Se sabe también que la SpA neutraliza complejos infecciosos entre vaccinia o virus Herpes simple y anticuerpos específicos IgG antivirales. También inhibe la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos o dependientes del complemento, contra células de riñón de conejo o fibroblastos humanos infectados con virus Herpes simple y sensibilizados con IgG antiviral (2).

Aunado a los efectos que ya se mencionaron, también se ha demostrado que la SpA activa a los linfocitos "in vitro", algunos estudios han demostrado que la actividad mitógena de SpA sobre las células B o T y la naturaleza de la respuesta dependen de algunos factores incluyendo: si la SpA es soluble o insoluble, la dosis de SpA, la presencia de factores del suero, el papel de las células ayudadoras o supresoras, la especie y tejido fuente de linfocitos, si se utilizaron linfocitos fetales o maduros y la presencia de estados anormales tales como deficiencias inmunes o leucemias (6, 14, 22, 23, 34, 43, 48, 49, 50, 52).

Estudios recientes sugieren que la activación de células B tiene un efecto significativo en la determinación de cuales son las señales requeridas "in vitro" para estimular a las células B a proliferar y diferenciarse a células secretoras de Igs. En el hombre S. aureus de la cepa Cowan I induce la proliferación de células B pero no induce la secreción de Igs. Cuando las células T y un mitógeno Pokeweed se adicionan a los cultivos, las células B se diferencian a células secretoras de Igs. Estos resultados sugieren que S. aureus de la cepa Cowan I activa a subpoblaciones de células B para recibir señales de ayuda suministradas por las células T activadas por el mitógeno (22, 23, 57, 67).

Cuando las células T se agregan a las células B estimuladas con SAC, las células B se direrencian a células secretoras de inmunoglobulinas (30).

Ito y Lawton reportaron que el sinergismo entre el mitógeno Pokeween y S. aureus cepa Cowan I, en la estimulación de la respuesta de las células formadoras de placas por células mononucleares humanas no separadas, sugiere la posibilidad de que SAC puede activar a las células formadoras de rosetas de eritrocitos de ratón (BMR+) para empezar a responder a la estimulación dependiente de las células T por el mitógeno. Sus resultados mostraron que efectivamente son activadas con SAC, pero que la activación para iniciar la síntesis de DNA no puede ser regulada con el desarrollo de la sensibilidad a los factores de diferenciación derivados de las células T (23, 30, 57).

La SpA contenida en la bacteria también estimula la producción y liberación de Igs de linfocitos de sangre periférica humana. La SpA unida a sefarosa también estimula la producción de Igs en sangre periférica y células de bazo (50).

Low demostró que la C-Kinasa probablemente esta involucrada en una etapa temprana de la activación de células B, por un mitógeno no específico (SAC) de las células B policlonales (10, 67).

La SpA estimula la producción de interferon tipo 2 en receptores FC+. La reducción de células T en preparaciones de linfocitos humanos y sobrenadantes de células efectoras tratadas con SpA aumentan la actividad natural asesina (NK) y la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos "in vitro" (35, 43).

H) APLICACIONES DE LA PROTEINA A

La SpA se ha convertido en un reactivo inmunológico extrema-

damente importante, más allá de su capacidad para aislar IgG o subclases de IgG. Algunas de sus aplicaciones se enuncian en la tabla 4, que es una lista de los derivados de SpA marcados que se han -- utilizado en algunos métodos, incluyendo inmunoensayos de linfocitos o antígenos tumorales de superficie celular, antígenos y anticuerpos virales, ensayos de anticuerpos IgG específicos a un antígeno en suero, o anticuerpos monoclonales producidos por híbrido-- mas, o para la cuantificación de antígenos en fluidos fisiológicos por procedimientos competitivos de RIA. Derivados marcados con --- fluoresceína, ferritina, hemocianina, también ofrece ventajas so-- bre anticuerpos marcados con marcadores citoculmicos (4, 7, 12, 18, 21, 31, 44, 54, 68).

Una ventaja del radiomarcado de la SpA marcada con la enzima-- en inmunoensayos competitivos, es la capacidad para usar una sóla-- molécula indicadora, sensible a la naturaleza del antígeno, o espe-- cificidad del anticuerpo. Esto ha permitido el desarrollo de inmu-- noensayos para algunas drogas y derivados de prostaglandinas que -- son inestables en las condiciones convencionales de marcado y para las cuales el Radioinmunoensayo (RIA) clásico no podría llevarse a cabo (35).

La bacteria de la cepa Cowan I muerta por calor y fijada con-- formalina es ofrecida por algunas firmas comerciales, representan-- do una alternativa a la precipitación con doble anticuerpo o a --- otros métodos de separación de antígenos marcados, de complejos an-- tígeno-anticuerpo en inmunoensayo. Este procedimiento fué desarro-- llado por Johnson y Kronvall para el RIA de la alfa-fetoproteína, -- usada subsecuentemente en ensayos para albúmina, factores de creci-- miento epidérmico, ferritina, digoxina, toxinas, hormonas, autoan-- ticuerpos a albúmina humana y anticuerpos a virus. La precipita--- ción con SpA en fase sólida también es una forma útil para aislar--

complejos inmunes de suero; así como también de membranas celulares solubilizadas o de otras fuentes (35, 37).

El ensayo en placa desarrollado por Gronowicz permite la detección de Igs secretadas por linfocitos en cultivo, los eritrocitos cubiertos con SpA unidos a las inmunoglobulinas secretadas y la formación de la placa hemolítica ocurren en presencia de un segundo anti-Ig y complemento.

Boot reporta dos ejemplos de la aplicación de las variantes isotópicas de anticuerpos antiperoxidasa. Dichas variantes son comparadas con respecto a su capacidad de unión a la proteína A. La unión de Igs de ciertas especies a proteína A es dependiente del isotipo en la cadena pesada (5).

Yllingworth reporta la utilización de SpA en la serotipificación de campilobacters, basándose en antígenos estables al calor - utilizando una combinación de técnicas; la hemaglutinación pasiva y la técnica de coaglutinación, siendo esta última una técnica sensible, simple y económica (16, 26).

Srinivasakuma y Rao reportaron la utilización de proteína A para el análisis de la reacción cruzada entre antígenos del microorganismo Bacteroides fragilis con suero inmune de conejo conteniendo anticuerpos predominantemente IgG (55).

Se ha comparado la técnica de coaglutinación y la contraelectroforesis en la detección de antígenos de los microorganismos Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae en líquido cefalorraquídeo, resultando la coaglutinación más sensible que la contraelectroforesis (60).

También se ha utilizado la proteína A para comparar la actividad de un receptor de un estreptococo del grupo C (39, 45, 46).

TABLA No. 4:

DERIVADOS DE PROTEINA A MARCADOS PARA USO EN INMUNOENSAYO

Proteína A marcada con:

I. Radionucleos

A) ^{125}I

1. Método de la T-cloramina

B) ^3H

1. Metilación reductiva (Formaldehido)

2. Acetilación (anhídrido acético)

C) ^{32}P -Bacteria Cepa Cowan I

II. Fluorescencia

A) Isotiocianato de fluoresceína

B) Bacteria Cepa Cowan I marcada con fluoresceína.

III. Enzimas

A) Peroxidasa

1. Glutaraldehido

B) Fosfatasa Alcalina (Glutaraldehido)

C) Invertasa (Glutaraldehido)

IV. Otros indicadores (para microscopia)

A) Ferritina

B) -Hemocianina

C) Partículas doradas (Oro y Uranio)

Los métodos de radioinmunoensayo derivan su aplicabilidad fundamental y general como recursos de la medicina clínica de dos propiedades separadas, pero relacionadas: gran sensibilidad y especificidad.

Un esbozo de las etapas requeridas para establecer un radioinmunoensayo para una substancia proteica humana hipotética "X", es como sigue:

1. Antisuero para X es producido en especies heterólogas, por ejemplo, conejo o cobayo.

2. Si la substancia X no es en sí inmunógena, es decir es un hapteno, primero se acopla con un transportador macromolecular; y el complejo portador es usado para producir un antisuero.

3. X es marcada con radiactividad, por lo general con ^{125}I -- ("X").

4. El antígeno "X marcado reacciona con suficiente anticuerpo para fijar aproximadamente 70% de "X.

5. Diversas cantidades conocidas de substancia X no marcada -- son añadidas a una mezcla de "X y anti-X, y compiten por los sitios de combinación del anticuerpo.

6. Después de un periodo apropiado de incubación, "X marcada -- fijada al anticuerpo se separa de "X no fijada.

7. De la cantidad de "X fijada a diversas concentraciones puede construirse una curva que permitirá la computación de cualquier concentración deseada de X que sea desconocida.

Para la marcación radiactiva de X (antígeno) un método generalmente aceptado es la yodación con ^{125}I o ^{131}I , en la cual la molécula de yodo está ligada por covalencia al grupo tirosina en el caso de antígenos proteicos.

Esta reacción se facilita en presencia de un agente oxidante -- como la cloramina T. Si el antígeno que va a ser marcado carece de

grupos tirosina, se han ideado procedimientos alternativos de yoda ción. Por ejemplo, marcación intrínseca por la síntesis orgánica-- con ^3H puede lograrse con hormonas esteroideas.

Después de la incubación del antígeno marcado ("X) con el anticuerpo específico en presencia de cantidades de X libre no marca do, la separación del anticuerpo fijado del "X libre debiera de ser efectuada para estimar la cantidad de X presente en la reacción de fijación competitiva. En general, la separación puede ser efectuada por medios fisicoquímicos (cromatografía, difusión en gel, proteína A estafilocócica, etc). o inmunológicos (método del doble -- anticuerpo) (7, 12, 31).

La fluorescencia es la emisión de luz de un color, es decir,-- de una longitud de onda, mientras una sustancia es irradiada con luz de un color diferente. La longitud de onda emitida está neces ariamente a un menor nivel de energía que la luz incidente o absorbida. Los fluorocromos como la rodamina o la fluoresceína, tienen espectros característicos de absorción y de emisión.

El isotiosianato de fluoresceína es una forma de fluoresceína que con facilidad se fija a las proteínas mediante enlaces covalen tes a un pH alcalino, primordialmente a través de residuos amig-- nos E de lisina y grupos amígenos terminales. El isotiosianato de tetrametilrodamina, que emite luz roja, tiene una absorción máxima a 550 nm y una emisión máxima a 580 nm (para los conjugados de rodamina--proteína).

Virtualmente cualquier antígeno puede ser descubierto en cortes de tejido fijado o en las suspensiones de células vivientes me diante la inmunofluorescencia. Las etapas involucradas en la inmu-- nofluorescencia incluyen la preparación de antisuero inmunizante o de G^{a} -globulina purificada conjugación con el colorante fluore--- cente y finalmente el procedimiento de tinción.

El método de anticuerpo ligado a las enzimas depende de la -- conjugación de una enzima con el anticuerpo que está dirigido para un antígeno celular o histico. El conjugado resultante tiene actividad enzimática e inmunitaria. Por lo tanto, los principios son -- totalmente análogos a los principios en que se basan las técnicas -- de inmunofluorescencia directa o indirecta.

La peroxidasa del rabano es habitualmente la enzima elegida -- para el acoplamiento con el anticuerpo. Primero se tiñen los tejidos directamente con un conjugado de anticuerpo-enzima o directa-- mente con reactivo antiglobulina ligado a la enzima, seguido de in cubación en suero inmune no marcado. Después el tejido es incubado con el sustrato para la enzima. La enzima en este caso es identificada visualmente por la formación de un color negro después de -- la incubación con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina.

Otras técnicas son la de anticuerpo acoplados a un hapteno, -- el uso de proteína A de estafilococo como reactivo intermedio y -- sistemas con más de un reactivo inmunoenzimático, es decir, de tin ción doble (21).

Las dos variantes más ampliamente empleadas de análisis inmu nitario enzimático son el inmunoanálisis enzimático competitivo y el análisis inmunosorbente ligado a enzimas. Las enzimas que han -- sido empleadas con frecuencia incluyen: a la peroxidasa del rába no fosfatasa alcalina, lisozima y glucosa -6-fosfato deshidrogenasa. Estas enzimas se acoplan a antígenos o anticuerpos mediante a-- gentes de enlace cruzado, particularmente el glutaraldehido y la -- demalefida. Cualquier enzima puede ser usada mientras sea soluble estable y esté presente en los líquidos biológicos en cantidades -- que pudieran interferir con las determinaciones en el suero (21).

Por otra parte la ferritina, una proteína que contiene hierro tiene una elevada densidad electrónica. Cuando está acoplada con --

Los anticuerpos puede ser usada para la tinción directa o indirecta de los tejidos. La localización de los complejos antígeno-anticuerpo conjugados con la ferritina en los tejidos fijos puede ser lograda con el microscopio electrónico. Otras partículas electro-- densas como el oro o el uranio también pueden ser introducidos químicamente en el interior de los anticuerpos específicos antihistícos (7, 12, 21, 31).

III. O B J E T I V O

PREPARACION DE UN CONJUGADO
PROTEINA A-ANTI CHO "C" ESPECIFICO
Streptococcus B-HEMOLITICO DEL GRUPO A

IV. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

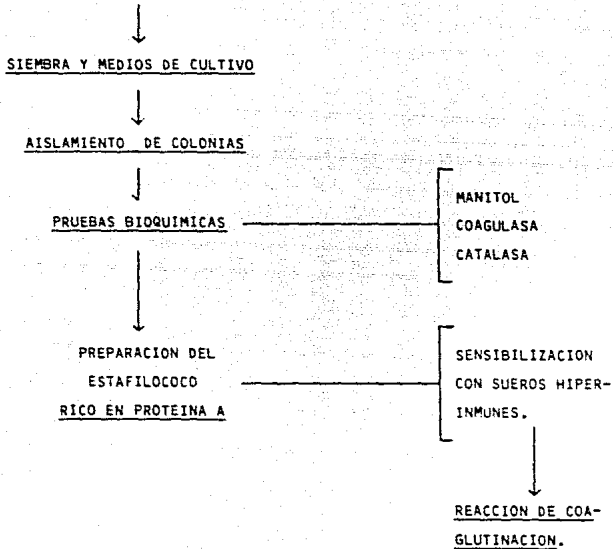
I. CONFIRMACION BIOQUIMICA DE Staphylococcus aureus CEPA COWAN I

II. PREPARACION DEL REACTIVO DE COAGLUTINACION

III. REACCION DE COAGLUTINACION

IV. DIAGRAMA DE FLUJO

Staphylococcus aureus CEPA COWAN I



V. MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y SOLUCIONES

1. Material Biológico

a) Cepas bacterianas:

Se trabajó con las siguientes cepas: Staphylococcus aureus Cepa Cowan I.
Streptococcus B-Hemolítico del grupo A.

b) Antisueros:

Se trabajó con antisueros anti-CHO "C" específico de Strep. B Hemolítico del grupo A.

2. Soluciones y medios de cultivo

a) Solución salina fisiológica (SSF)

Cloruro de sodio 8.5g

Agua destilada 1.0L

b) Caldo soya tripticaseína (CST)

CST 30.0g

Agua destilada 1.0L

c) Agar sangre base soya tripticaseína

Agar Soya tripticaseína 40.0g

Sangre 50.0ml

Agua destilada 1.0L

d) Sales Manitol

Caldo Nutritivo 100.0ml

Manitol 1.0g

Rojo de fenol 2.5mg

e) Coagulasa

Plasma de conejo 0.5ml

Agua destilada 2.0ml

f) Alcohol Etflico (70%)

g) Formaldehido (0.5%)

MÉTODOS

1. Cultivo y cosecha de cepas bacterianas:

Las bacterias de la cepa Cowan I se inocularon en medio líquido de caldo soya tripticaseína (10ml) incubándose a 37°C durante 24h. De cada cultivo se sembró una asada por el método de dilución, en medio sólido agar sangre base soya tripticaseína. Se propagaron colonias aisladas de la segunda resiembra en tubos con caldo soya tripticaseína. Se prepararon frotis que se tiñeron con la técnica de Gram.

2. Pruebas Bioquímicas

a. Fermentación de Manitol

Se inocularon tubos que contenían 3ml de caldo nutritivo (pH 7) adicionado de manitol (1g/100ml) y rojo de fenol (2.5mg/100ml) con una asada de los cultivos de S. aureus, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las cepas que viraron el indicador a un color amarillo se consideraron fermentadoras del manitol.

Esta prueba se realizó también en placa, sembrando por estria, con iguales resultados que la anterior (19).

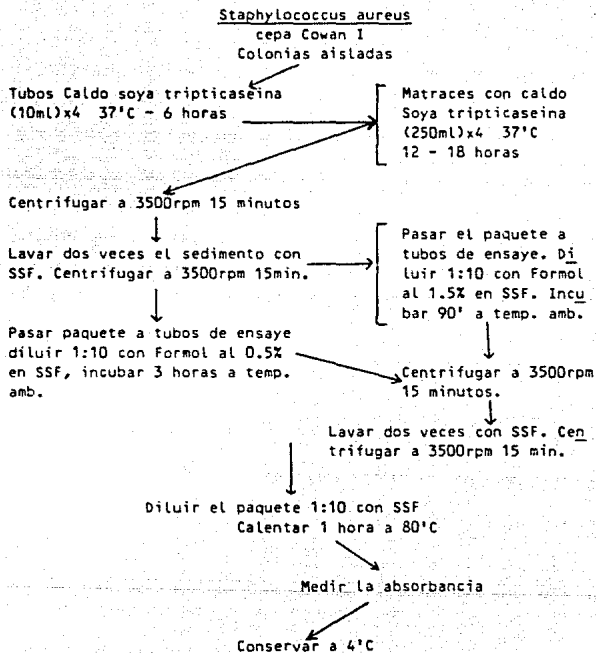
b. Pruebas de coagulasa:

Se inocularon tubos que contenían 0.5ml de plasma de conejo diluido 1:4 en SSF, con una asada del crecimiento bacteriano de 18--24 horas. Las mezclas se incubaron a 37°C y se observaron cada 30 minutos durante 4 horas. Los tubos en los que no se formó coágulo en este periodo se incubaron hasta 24 horas. Se consideraron coagulasa positivas las cepas en las que sí hubo producción de coágulos a la 4 ó 24 horas de incubación (19).

c. Prueba de Catalasa:

Se realizó sobre el portaobjetos, agregando la bacteria con una varilla de vidrio y adicionando unas gotas de H₂O₂, observándose la efervecencia producida por el desprendimiento de oxígeno (19).

FIGURA No. 3 DIAGRAMA DE TRABAJO PARA LA PREPARACION DE ESTAFILOCOCO RICO EN PROTEINA "A"



PREPARACION DE ESTAFILOCOCO RICO EN PROTEINA A

1. Una vez que se seleccionó la colonia, se inocularon 4 tubos con caldo soya tripticaseína (10ml), incubandolos a 37°C durante 6 horas.

2. Se inocularon 4 matraces con 250ml de caldo soya tripticaseína con 10ml (cada matraz) de S. aureus incubado durante 6 horas. Los matraces se incubaron a 37°C durante 12-18 horas.

3. El contenido de los matraces se centrifugó a 3500rpm durante 15 minutos, lavando dos veces con SSF con volúmenes de 25ml.

4. El paquete se pasó a tubos de ensaye y se diluyó 1:10 con formal al 0.5% en SSF.

Se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas; al termino del cual se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Se lavó dos veces con SSF diluyendose el paquete 1:10 con SSF.

Se calentó a 80°C durante una hora. Se lavó dos veces más y se resuspendió al 10% en SSF; se determina la concentración midiendo la absorbancia a 525nm. Se guardó en refrigeración a 4°C (16, 18).

NOTA:

Se probó también en el punto anterior, la dilución 1:10 con formal al 1.5% en SSF, incubando 90 minutos a temperatura ambiente, - prosiguiendo con la metodología arriba descrita.

SENSIBILIZACION CON SUEROS HIPERINMUNES
(reactivo de coaglutinación)

Reactivo 1.

A 0.2 ml del antisuero no diluido (título 1:312) se le agregó 1.0 ml del reactivo de estafilococo rico en proteína A (26).

Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el paquete al 10% en SSF. De este reactivo no se realizaron diluciones (16).

Reactivo 2.

A 0.2 ml del antisuero no diluido (título 1:312) se le agregó 1.0 ml del reactivo de estafilococo rico en proteína A (26).

Se incubó a 37°C durante 1 hora. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el paquete se resuspendió al 10% en SSF. De este reactivo se realizaron diluciones -dobles como sigue:

0.4 ml del reactivo 2 + 0.8 ml de SSF (1:2)	Sol. 1
0.4 ml de la Sol. 1 + 0.8 ml de SSF (1:4)	Sol. 2
0.4 ml de la sol. 2 + 0.8 ml de SSF (1:8)	Sol. 3
0.4 ml de la Sol. 3 + 0.8 ml de SSF (1:16)	Sol. 4

etc. etc..

Los reactivos se guardaron en refrigeración a 4°C (16).

PRUEBA DE COAGLUTINACION

Sobre un portaobjetos limpio se colocó una gota del reactivo de coaglutinación (1 ó 2) agregando una gota de la suspensión de -Streptococcus B Hemolítico del grupo A en SSF (16).

Se agita el portaobjetos con un movimiento circular y se observa la formación de pequeños aglomerados.

Para comparar los resultados se utilizaron los controles siguientes:

Control positivo, un reactivo comercial de coagulación --- Phadebact para Strep. A, el cual trae un reactivo de coagulina--- ción que se mezcla con una gota del anticuerpo respectivo para la - reacción de coagulación.

Controles negativos: Una suspensión de Streptococcus B-Hemolítico del grupo A en SSF y una suspensión de Staphylococcus aureus cepa Cowan I en SSF. Las dos soluciones se prepararon con una asada del microorganismo correspondiente en 3ml de SSF incubadas a 37°C durante 30 minutos.

VI. RESULTADOS

Las técnicas empleadas para la preparación del estafilococorrico en proteína A obtenido por el método de Kessler con ligeras modificaciones y la técnica de coaglutinación, dieron los resultados esperados, cumpliéndose el objetivo planteado: Preparación de un conjugado proteína A-anti CHO C específico de Streptococcus B-Hemolítico del grupo A.

La absorbancia a 525nm de los reactivos de estafilococos ricos en proteína A fueron : Reactivo 1= 0.29 y Reactivo 2= 0.3

La sensibilización de los reactivos de estafilococos ricos en proteína A con suero hiperinmune da como resultado el Reactivo de coaglutinación. Trabajándose con un suero anti-CHO C específico de Streptococcus B-Hemolítico del grupo A, cuyo título de anticuerpos correspondió a 1:312.

Enfrentando los reactivos de Coaglutinación al antígeno específico se observó claramente el fenómeno de coaglutinación. Los resultados de estas pruebas se compararon con un reactivo comercial de coaglutinación (Phadebact) siendo la lectura en ambas muy semejantes; es decir se formaron pequeños aglomerados, diferenciando una prueba de otra, por la coloración del reactivo comercial de coaglutinación, lo que nos da idea de la efectividad de los reactivos preparados en este trabajo.

Se realizaron diluciones al reactivo 2 de coaglutinación; observándose claramente la reacción de coaglutinación hasta la dilución 1:16, a partir de la dilución 1:32 la reacción ya no se observa tan franca, perdiéndose totalmente en la dilución 1:128.

El reactivo de coaglutinación 1 tuvo un tiempo de vida de 3 meses 20 días aproximadamente. El reactivo 2 de 2 meses aproximadamente. Lo anterior se determinó realizando reacciones de coaglutinación cada semana durante varios meses.

TABLA 5:

TABLA DE RESULTADOS DE LOS REACTIVOS DE COAGLUTINACION

Características	Reactivos de coaglutinación	
	1	2
Absorbancia a 525 nm	0.29	0.31
Reacción de coaglutinación	+++	+++
Tiempo de vida	3 meses	2 meses
Diluciones	NO	SI

TABLA 6:

REACCIÓN DE COAGLUTINACION CON EL REACTIVO 2

Dilución	Reacción de coaglutinación
1.2	+++
1.4	+++
1.8	+++
1.16	+++
1.32	++
1.64	+
1.128	---

VII DISCUSION

Los resultados de este estudio confirman ampliamente los datos reportados por Kronvall, Langone, Lind y Kessler entre otros que han demostrado luego de estudios minuciosos, la importancia de las condiciones de cultivo: Medios, Temperaturas, Tiempos, Soluciones Buffer, pH de las mismas, la inactivación de la bacteria -- etc. (33, 35, 36).

En este proyecto se realizaron varias (4) preparaciones de estafilococo rico en protefina A. Por circunstancias ajenas al proyecto en una de las preparaciones (2^a) se modificaron dichas condiciones; primeramente se prolongó el tiempo de incubación de la bacteria de 18 horas a casi 36 horas, posteriormente una vez incubados los matraces, estos permanecieron durante 23 días en refrigeración al termino del cual se continuo con la técnica descrita, obteniéndose resultados negativos, ya que no se observó la reacción de coaglutinación.

Lo anterior porbablemente a que hay un decremento en la producción de SpA ligada a células debido a la citolisis, después de tiempos de cultivo prolongados (35)

Por otra parte las bacterias tratadas con soluciones diluidas de formol (formalina o formaldehido) mantienen su actividad. Lo anterior se probó diluyendo 1:10 el paquete bacteriano con formol al 0.05% en SSF, incubando a temperatura durante 3 horas, los resultados fueron satisfactorios observándose claramente la reacción de coaglutinación (16, 48, 49, 50).

Cuando se modifico la concentración de formol, al 1.5% en SSF con un tiempo de incubación de 90 minutos a temperatura ambiente, se observaron resultados iguales a los anteriores; lo cual esta en concordancia con Kessler y otros investigadores quienes reportaron

que las bacterias así tratadas mantienen en un 70% su capacidad de unión original a las IgG. Mientras que las bacterias incubadas con formol al 5% durante 24 horas mantienen solo el 25% de su capacidad de unión (35).

Posterior al tratamiento con formol viene el calentamiento a 80°C durante 1 hora (16); también se ha reportado esta misma temperatura pero durante 5 (6, 18, 19) y tres minutos (13, 49, 50, 53) con iguales resultados.

En este trabajo se probó la temperatura de 80°C durante 1 hora y durante 5 minutos (reactivos 1 y 2 respectivamente) los resultados en ambos reactivos son iguales en lo que se refiere a la efectividad de los reactivos de coaglutinación; aunque es posible que esta variación este relacionada con el tiempo de actividad de los reactivos de coaglutinación: para el reactivo 1 se tiene un tiempo de actividad de 3 meses y 20 días aproximadamente, para el reactivo 2 es de 2 meses y ambos se guardaron en refrigeración a 4°C y a ninguno de los reactivos se les adicionó conservador alguno; siendo la única diferencia la incubación a 80°C durante 1 hora y durante 5 minutos.

La absorbancia a 525 nm de los reactivos 1 y 2 fué de 0.29 y 0.30 respectivamente, que coinciden con el dato de Goding que reporta 0.3 de absorbancia a 525 nm que corresponde a 5×10^8 células formadoras de colonia por mililitro (22).

Al enfrentar el reactivo de coaglutinación (1 y 2) al antígeno específico se observó claramente la reacción de coaglutinación así cuando se enfrentó a otro antígeno.

VIII CONCLUSIONES

- Las condiciones de cultivo (tiempo, temperatura y medios) son de gran importancia para la preparación del reactivo de coagulación y su eficiencia en la reacción de coagulación.
- La técnica de coagulación es económica, sencilla que proporciona resultados satisfactorios.
- La reacción de coagulación constituye una alternativa en el diagnóstico de origen bacteriano y viral de acuerdo con el fundamento de esta.
- De acuerdo con la literatura consultada y los resultados presentados que son congruentes, se cumplió el objetivo planteado en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ANDERSON J. C. and Williams M. R. (1985) The contribution of a capsule survival of Staphylococci within bovine neutrophils. *Journal of Medical Microbiology* 20: 317-323
- 2.- AUSTIN MARSHALL R. and Daniels A. Charles (1974) Interaction of Staphylococcal protein A with virus-IgG complexes. *The Journal of Immunology* 113: 1568-1574
- 3.- BERKOWITZ CAROL D. Anthony F. Bascom, Kaplan L. Edward, Wolinsky Emanuel and Bisne Alan L. (1985) Cooperative study of latex agglutination to identify group A Streptococcal antigen on throat swabs in patients with acute pharyngitis. *The Journal of Pediatrics* 107: 89-91
- 4.- BONDESEN PETER G. and Gordon Julius (1979) Cell separation with Staphylococcal protein A immunoadsorbent surfaces. *Journal of Immunological Methods* 36: 179-194
- 5.- BOOT J.H.A. Geerts M.E.J. and Aarden L. A. (1987) Monoclonal antiperoxidase isotype switch variants. Application in studies of protein A binding and Characterization of rat monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 103: 69-77
- 6.- BORDS I. GHETIE, Boros Joana, Mata Gabriela and Sjoquist J. (1980) Staphylococcus aureus and protein A as mitogens for rabbit lymphocytes. *Immunobiology* 157: 30-40
- 7.- BUCHANAN DEBSIE, Kamarck Michael and Rudle H. Nancy (1981) Development of a protein A enzyme-immunoassay for use in screening hybridomas. *Journal of Immunological Methods* 42: 179-185
- 8.- CHANG J. MARGAN and Mohla Chitra (1985) Sensitive detection of group A Streptococci in pediatric throat swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 21: 258-259
- 9.- COLEMAN GEOFREY, Jakeman M. Clifford and Martin Michelas (1978) *Journal of General Microbiology* 107: 189-192

- 10.- COOPER R. LOUW J. DANIELS J. De Bear D.P. Nel A.E. (1987) C -- Kinase activity in normal B cells treated with Staphylococcus au- -- reus Cowan I, and phorbol ester: response differences in patient -- with polymphocytic leukaemia 61: 697-502
- 11.- CASTREE GERALD R. (1980) Fc receptors of human promyelocytic-- leukemic cell line: evidence for two types of receptors defined by binding of the Staphylococcal protein A-IgG₁ complex. J. of Immunology 125: 448-453
- 12.- FAIFERMAM ISIDORE AND Koffler David (1982) Staphylococcal protein A for immune complexes. Arthritis and Rheumatism 25: 799 - 801
- 13.- FERRANTE A. Nandoskar M., Bates E.J. and Goth B. 91987) ---- Staphylococcus aureus-stimulates human mononuclear leucocyte-condi- tioned medium augments the basal and stimuli-induced neutrophil --- respirate burst and degranulation. Immunology 60:431-438
- 14.- FLEISCHER BERNHARD (1981) Induction of T cell growth factor -- synthesis in human peripheral blood lymphocytes by staphylococcal - protein A. Journal of Immunological Methods 47: 191-200
- 15.- FORSGREN ARNE an Grubb Anders (1979) Many bacterial species - bind human IgD₁. Journal of Immunol. 122: 1468-1472
- 16.- fricker C.R., uradzinski J., Alemohammed M.M.M Park R.W.A. - Whelan C. and Girdwood R.W.A. (1985) Serotyping of campylobacters - by coagglutination on the basis of heat-stable antigens. J. Med. Mi- crobiology 21: 83-86
- GEBER A. MICHAEL, Spadaccini J. Linda, Wright L. Laura and Deutsch- Larry (1984) Latex agglutination test for rapid identification of - group A streptococci directly from throat swabs. The Journal of - Pediatrics 105: 702-705
- 18.- GODING. W. JAMES (1978) Use of staphylococcal protein A as an- immunological reagent. J. Immunol. Methods 20: 241-253

- 19.- GONZALEZ AGULLAR HUMBERTO Y López revilla Rubén. (1980) pro-
teína A en Staphylococcus aureus: cuantificación por microhemaglu-
tínación. Arch. Invet. Méd. 11: 497-506
- 20.- GORTER A., Hiemstra P.S., Leijh P.C.J., Van Der Sluys M.E., --
Van Der Basrselaar M. I., Van Es L.A. and M.R. (1987) IgA-and secre-
tory IgA-opsonized S. aureus induce a respiratory burst and phago-
cytosis by polymorphonuclear leucocytes. Immunol. 61: 303-309
- 21.- HAMILTON G. ROBERT and Adkinson Jr. Franklin M. (1980) Quanti-
tation of antigen-specific IgG in human serum: standarization by --
a staph A solid phase Radioimmunoassay elution technique J. of ---
Immunol. 125: 2966-2971
- 22.- HANS MICHAEL DÖSCH, Schuurman K.B. Ruud and Gelfand W. Erwin -
(1980) Polyclonal activation of human lymphocytes IN VITRO. J. of -
immunol. 11: 827-831
- 23.- HIRANO TOSHIO, Teranishi Tsuyashi, LinBihu and Gheeue Kaoru-
(1984) Human helper T cell factors. IV Demonstration of a human la-
te-acting B cell differentiation factor acting on Staphylococcus --
aureus Cowan stimulated B cells J. of Immunol. 133: 798-802
- 24.- HOFFMAN STEEN (1985) Lack of reliability of primary grouping -
of B-hemolytic streptococci by culture of throat swabs with strep -
tococulture supplemented with bacitracin disks in general practice.
J. of Clin. Microbiol. 22: 497-500
- 25.- HOWELL SAXTON ERNESTINA AND Wettstein O. Felix (1978) Immung-
globulin M Synthesizad by human limphoblasted cell: interaction -
with Staphylococcus aureus and protein A. J. of Immunol. 121: 1334-
-1340
- 26.- ILLINGWORTH D.S. and Fricker C.R. (1987) Papid seotyping of
campylobacters based on heat-stable antigens used a combined pa-
ssive haemagglutination/coagglutination technique 5 : 61-53
- 27.- INGANAS M., Johansson S.G.O. and Bennich H.H. (1980) Interac

tion of human polyclonal IgG and IgG from different species with protein A from Staphylococcus aureus; demonstration of protein A -- reactive sites located in Fab₂ fragment of human IgG. Scand. J. Immunol. 12: 23-31

28.- INGANAS M. (1981) Comparison of mechanism of interaction between protein A from Staphylococcus aureus and human monoclonal -- IgG IgA and IgM in relation to the classical Fc and the alternative F(ab) protein A interactions. Scand. J. Immunol. 14: 343-352

29.- INGANAS M., Johansson S.G.O. and Sjoquist (1981) Further characterization of the alternative protein A interaction of immunoglobulins: demonstration of an Fc-binding fragment of protein A expressing the alternative reactivity. Scand. J. Immunol. 14: 378-388

30.- ITO SHIGERU and Lawton R. Alexander (1984) Response of human B cells to Staphylococcus aureus Cowan I: Independent proliferation and T-dependent differentiation to immunoglobulin secretion -- involve subsets separable by resetting with mouse erythrocytes. J. of Immunol. 133: 1891-1895

31.- JUNGERS J., Delogne-Desnoeck J. and Robin C. (1981) A simple and rapid solid phase radioimmunoassay for serum progesterone, using the protein A of Staphylococcus aureus as immunoadsorbent. J. Lab. Clin. Med. 98: 30-36

32.- KELLOG A. JAMES, Bankert A. David and Levisky S. John (1987) Comparison cultures for detection of group A streptococci from -- oropharyngeal swabs. Brief Scientific Reports 86: 631-634

33.- KRONVALL GORAN, Quie G. Paul and Williams C. Jr. Ralph (1970) Quantitation of staphylococcal protein A: determination of equilibrium constant and number of protein residues on bacteria. J. Of Immunol. 104 : 273-278

34.- KURITANI TARO, Kishimoto Tadimitsu, Muraguchi Atsushi and Yamura Yuichi (1980) In vitro immune response of human peripheral--

lymphocytes. VI Distribution and characterization of precursors -- for PHA and protein A induced colony forming B cell. J. of Immunol. 125: 2633-2637

35.- LANGONE J. JOHN (1982) Protein A related receptor. Advances - in Immunol. 32: 158-252

36.- LANGONE J. JOHN, Das Chandra, Bennet Donna and Terman S. David (1984) Generation of human C_{3a}, C_{4a} and C_{5a} anaphylotoxins by protein A of Staphylococcus aureus and immobilized protein A reagents used in serotherapy of cancer J. of Immunol. 133: 10-57-1063

37.- LAPEYRE C., Kaveri S. V. and Strosberg A. D. (1987) A novel approach to prevent the interference of protein A in immunoassays - of enterotoxins. Letters in Applied Microbiol. 5: 55-59

38.- McCUSKER J. JAMES, McCoy L. Edna, Young L. Cynthia, Alamaresup Reynaldo and Hirsch S. Linda (1984) Comparison of directigen - group A strep test with a traditional culture technique for detection of group A Beta-haemolytic streptococci. J. Clin. Microbiol. 20: 824-826

39.- MICEIKA B.G., Vitous and Thopson K.D. (1985) Detection of group A streptococcal antigen directly from throat swabs with a ten - minute latex agglutination test. J. of Clin. Microbiol. 21: 467-469

40.- MOTA GABRIELA, Moraru I., Sjocquist J. and Gutie V. (1981) Protein A as a molecular probe for the detection of antigen in conformational change in region Fc. of rabbit antibody. Molecular Immunology. 18: 373-378

41.- MIHRE E.B. an Kronvall G. (1980) Binding of murine myeloma - protein of different Ig classes and subclasses and subclasses to Fc-reactive surface structures in Gram-positive cocci. Scand. J. - Immunol. 11: 37-46

42.- MUSHER M. DANIEL, Verbrugh A. Henri and Verhoef Jan (1981) Suppression of phagocytosis and chemotaxis by cell wall components of Staphylococcus aureus Cowan I By natural human gamma interferon.--

Immunology 60: 51-55

44.- PAIN DEBKUMAR an Surolia Avadhesh (1981) Preparation of protein A-peroxidase mononjugate using a heterobifunctional reagent and its use in enzyme immunoassays. J. of Immunol. 43: 219-230

45.- REIS J. KATHLEEN, Ayoub M. Elia and Boyle D.P. Michael (1984) Streptococcal Fc. receptors I; Isolation and partial characterization of the receptor from a group C streptococcus J. of Immunology 132: 3091-3097

46.-RIES J. KATHLEEN, Ayoub M. Elia and Boyle D.P. Michael (1984) Streptococcal Fc. receptors. II: Comparison of the reactivity of receptor from group C streptococcus with staphylococcal protein A J. of Immunol. 132: 3098-3102

47.- RHODES M. JOAN and Lind Inga (1980) Uptake and degradation of staphylococcal protein A-IgG and HSA-IgG complexes by peritoneal-macrophages from rabbits, Guinea pigs and mice. Immunol. 47: 75-82

48.- ROMAGNANI SERGIO, Giudizi M. Grazia, Almerigogna F. Nicoletti P.L. and Ricci M. (1980) Protein A of Staphylococcus aureus - mitogenic for IgG-bearing, but also for a subpopulation of IgM and /or IgD bearing human lymphocytes. Immunol. 39:417-425

49.- ROMAGNANI SERGIO, Giudizi M. Grazia, Biagiotti Roberta, Almerigogna Fabio, Maggi Enrico, Del Prete Gianfranco and Ricci Mario- (1981) Surface immunoglobulins are involved in the interaction of protein A with human B cell and in triggering of B cell proliferations induced by protein A-containing Staphylococcus aureus. J. of Immunology 127: 1307-1313

50.- ROMAGNANI S., Giudizi M. Grazia, Del Prete Gianfranco, Maggi Enrico, Biagiotti Roberta, Almerigogna F. and Ricci M. (1982) Demonstration of protein A of two distinct immunoglobulin-binding sites and their role in the mitogenic activity of Staphylococcus aureus Cowan I on B cells J. Immunol. 128: 596-602

- 51.- SEPPALA I., Sarvas H., Peterfy F. and Makela D. (1981) The -- four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using -- protein A-sepharose. Scand J. Immunol. 14: 335-342
- 52.- SJOBERG O. and Kurnick J. (1980) Conditions for inductions - of specific and polyclonal antibody production by Cowan I Bacteria and by pokeweed mitogen. Scand J. Immunol. 11: 47-51
- 53.- SPEZIALE PIETRO , Raucci Guiseppe, Visal Livia and Magnus Hook (1986) Binding of collagen to Staphylococcus aureus. J. Bacteriology 167: 77-81
- 54.- SPIKA S. JOHN, Verbrugh A. Henri and Verhoef M. (1981) Protein A effect on alternative pathway complement activation and opsonization of Staphylococcus aureus. Infection and Immunity 34: 455-460
- 55.- SRINIVASAKUMAR N. and Roa R.S. (1986) Staphylococcus aureus - Protein A-antibody-mediated a naemaglutination for the analysis of cross-reactivity between phenol-water extracts of Bacteroides fragilis. J. Med. Microbiol. 21 : 343-347
- 56.- STEVENS P., Alan s., Young L. S. and Chesbro K. (1981) Sensiti ve measurement of endotoxin by radio rocket immunoelectrophoresis - usin_(I¹²⁵) Staphylococcus aureus protein A. J. Immunological Me--- tnds. 43: 199-207
- 57.- TAI KIM YOUNG, Schwartz Abby, Siskind W. Gregory and Weksler- blood lymphocytes. Cell. Immunol. 59: 256-267
- 58.- TERANISHI TSOYOSHI, Hirano Toshio, Lin Bi-Hu and Onoue Kaoru-- (1984) Demonstration of the involvement of interleukin 2 in the di- fferentiation of Staphylococcus aureus Cowan I-stimulaed B cells. J. of Immunol. 33: 3062-3067
- 59.- TERMAN S. DAVID, Young B. James KShearer T. William, Ayus Car los, Lehane D. and Daskal Yerahc (1981) Preliminary obserbations of

the effects on breast adenocarcinoma of plasma perfused over immobilized protein A. The New England Journal of Medicine 12: 1195-1199

60.- TILTON RICHARD D., Diaz Feliciano and Ryan W. Raymond (1984) Comparative evaluation of three commercial products and counterimmunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. J. Clin Microbiol. 20: 2312-34

61.- TSOKOS C. GEORGE, Christian B. Carole and Balow F. James (1983) Induction of monocytic suppression after stimulation of peripheral human mononuclear cell with staphylococcal protein A and Staphylococcus aureus. Cell. Immunol. 78: 144-151

62.- UMEDA AKIKO, Ueki Yuji and Amoko Kazunobu (1987) Structure of the Staphylococcus aureus cell wall determined by the freeze-substitution method. J. Bacteriol. 169: 2482-2487

63.- VERBRUGH A. HENRI, Hoidal R. John, Hgguyen T. Bach-Yen, Verhoeft Jan, Que G. Paul and Peterson K. Phillippe (1982) Human Alveolar macrophage cytophilic in immunoglobulin G-mediated phagocytosis of protein A-positive staphylococci. J. Clin. Invest. 69: 63-74

64.- VERHOEF JAN, Vanderbrouke-Grauls Christina (1984) Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and Staphylococcus aureus in the presence and absence of opsonins. Immunol. 52: 427-435.

65.- WALKER EDWIN, Leemhuis Tom and Roeder William (1988) Murine B lymphoma cell lines release functionally active interleukin 2 after stimulation with Staphylococcus aureus. J. Immunol. 140: 859-865

66.- WARNER L. NOEL, Mackenzie R. Malcolm and Mitchel F. Graham A. J. Immunol. 120: 1493-1496

67.- WRIGLEY M. DOROTHY and Choi Sung Young (1983) characterization of the subpopulations of human peripheral blood B lymphocytes which react to Staphylococcus aureus Cowan I and T cell help. Cell Immunology 78: 130-143

68.- YOLKEN H. ROBERT and Leister J. Flora (1981) Staphylococcal-protein A-Enzyme immunoglobulin conjugates: versatile tools for enzyme immunoassays. The Journal of Immunological Methods 43: 209-218 .

69.- YOUNG W. WILLIAM, Tamura Yoshiro, Wolock M. David and Fox W. Jay (1984) Staphylococcal protein A binding to the Fab fragment - os mouse monoclonal antibodies. J. Immunol 133: 3163-3166