

33
2 EJ



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA
PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS
CONTRA CAMPYLOBACTER PYLORI**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

VERONICA GABRIELA LUQUEÑO MARTINEZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO. D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION	
Antecedentes	1
Taxonomia	2
Características generales	6
Mecanismos de patogenicidad	7
Características antigénicas	9
FUNDAMENTACION DEL TEMA	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
OBJETIVOS	14
HIPOTESIS	15
MATERIAL Y METODO	
Diseño	16
Material y método	18
RESULTADOS	29
DISCUSION	42
CONCLUSIONES	46
APENDICE	
A) Reactivos y soluciones	49
B) Tinción de plata	53
BIBLIOGRAFIA	55

Estandarización del método de ELISA para la detección de anticuerpos contra Campylobacter pylori

INTRODUCCION

Antecedentes

Campylobacter pylori es un microorganismo localizado en mucosa gástrica y asociado a enfermedad ácido péptica. Los primeros hallazgos datan desde 1874 en que Bottcher observó por primera vez bacterias en estómago humano(1), más tarde Bizzozero en 1893 y posteriormente Salomon en 1896, observan estructuras bacterianas espirales en mucosa gástrica de animales (2,3).

En 1938 Doenges observó en piezas de autopsia bacterias espirales en estómagos humanos (4), y fué hasta 1975 en que Steer informó la asociación entre la presencia de estas bacterias espirales (por microscopía electrónica) y datos histopatológicos de úlcera gástrica (5).

El aislamiento de Campylobacter pylori no fué posible sino hasta 1983 en que Marshall y Cols. utilizando técnicas de cultivo para el desarrollo de Campylobacter, aislaron bacterias curvas microaerofílicas de mucosa de antro gástrico (6). Posteriormente Marshall y Warren en un estudio de cultivos de biopsias de mucosa gástrica cultivadas de pacientes con sintomatología ácido péptica determinaron el grado de asociación de este microorganismo con el padecimiento y encontraron que en úlcera péptica el 87% se asocia

a cultivo positivo, en gastritis crónica y aguda el 81% y en mucosa gástrica normal el 6%, determinados por el estudio histopatológico (7). Lambert en 1985 encontró una gran asociación de Campylobacter pylori con enfermedad ácido péptica, obteniendo hasta de un 97% de aislamientos en gastritis (8). En 1987 Goodwin informó hasta un 100% de aislamientos en casos de úlcera duodenal (9) y Buck un 14% de cultivos positivos en pacientes con mucosa gástrica normal(10).

Taxonomía.

Campylobacter pylori fué inicialmente clasificado como el principal exponente de los organismos gástricos similares a Campylobacter (GCLO), posteriormente se denominó Campylobacter pyloridis (11) y finalmente, por acuerdo del Comité Internacional de Taxonomía, fué denominado Campylobacter pylori (12). Su clasificación taxonómica aún no está bien definida ya que posee características morfológicas, estructurales y bioquímicas que lo diferencian del género Campylobacter y lo asocian a los géneros Woinella y Aquaspirillum (Tabla I). Por su secuencia de bases RNA 16S está estrechamente relacionado al género Woinella (13) y por sus características ultraestructurales tiene gran similitud con el género Aquaspirillum (14), aunque por sus diferencias podría constituirse como parte de un nuevo grupo taxonómico (15).

TABLA 1
 CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE DIFERENTES ESPECIES DE CAMPYLOBACTER

Microorganismo	Crecimiento			reacción				bioquímica			
	25	37	42	OX	CA	GL	U	RN	HS	HH	AN
<i>C. pylori</i>		-		+	+	-	+	-	+	-	R
<i>C. jejuni</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	S
<i>C. coli</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	S
<i>C. fetus</i>	+	+	d	+	+	-	-	+	d	-	R
<i>C. cinaedi</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	R
<i>C. fennelliae</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	S
<i>C. fecalis</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	d

OX = Oxidasa	RN = Reducción de nitrato	- = Negativa
CA = Catalasa	HH = Hidrólisis de hipurato	S = Sensible
GL = Glucosa	AN = Acido Nalidixico	R = Resistente
U = Ureasa	d = 11-89% son positivas	
HS = H ₂ S	+ = positiva	

Tomada de referencia 49

El GCLO-1 que corresponde a lo que actualmente se conoce como C. pylori no es el único organismo aislado de mucosa gástrica humana. Kasper y Dick aislaron un organismo diferente de mucosa gástrica con crecimiento abundante a las 48 hrs. Este microorganismo es similar a C. pylori pero con características bioquímicas diferentes; no produce ureasa, no se asocia a enfermedad ácido péptica, y se le dió el nombre de GCLO-2 (16).

Estudios en diferentes animales han demostrado la presencia de bacterias espirales en mucosa gástrica; en gatos y perros se han observado verdaderas espiroquetas que no son cultivables(17); en cerdos, primates y hurones se han logrado aislar bacterias espirales que junto con las aisladas de mucosa gástrica humana (GCLO-1 y GCLO-2), forman el grupo llamado Organismos Gástricos Similares a Campylobacter. (En la tabla 2 se muestran las características bioquímicas de estos organismos).

Los organismos aislados en mucosa gástrica de primates y cerdos son similares a C. pylori humano por sus características bioquímicas, similitud en el patrón electroforético de las proteínas en geles de poliacrilamida y en la inmunorreacción de la mayoría de bandas de los GCLO de cerdo y primates, con suero de pacientes infectados por C. pylori (18,19,20), no así con las proteínas de los GCLO aislados de hurones (21,22).

Por análisis de restricción de endonucleasas de DNA se ha demostrado que C. pylori humano, y el GCLO de hurón no corresponden al mismo microorganismo(20).

TABLA 2
Organismos Gástricos Similares a *Campylobacter*
(GCLO)

	CO	O y C	HH	RN	U	FA	AGT	AN	C
<i>C. pylori</i>	37°C	+	-	-	+	+	+	R	S
GCLO de cerdo	37°C	+	-	-	+	+	+	R	S
GCLO de primates*	37°C	+	-	-	+	+	+	R	S
GCLO-2	37°C	+	+	-	-	-	ND	R	S
GCLO de hurones	ND	+	-	+	+	+	+	R	S

CO = Crecimiento óptimo	AGT = Alfa glutamilo-amino-peptidasa
O = Oxidasa	AC = Acido Nalidíxico
C = Catalasa	C = Cefalotina
HH = Hidrólisis de hipurato	ND = No determinado
U = Ureasa	R = Resistente
FA = Fosfatasa alcalina	S = Sensible
	* = <i>Macacus rhesus</i> y <i>M. manestrina</i>

Tomada de ref. 18,19,20,21 y 22

Características generales.

C. pylori es un bacilo gram negativo, no esporulado, móvil, microaerofílico, de 3-3.5 μm de longitud y 0.5-1 μm de diámetro, su forma es pleomórfico ya que puede adoptar forma curva, espiral, de S o forma cocoide esta última es característica de cultivos viejos (más de 72 hrs) La superficie de la membrana es lisa, en contraste con otros Campylobacter tiene de 4-6 flagelos unipolares, el flagelo es cubierto y tiene bulbo terminal en su extremo distal, lo que implica que el flagelo es una prolongación de la membrana citoplasmática (6,24).

C. pylori es una bacteria que para su crecimiento requiere de medios muy enriquecidos, ambiente microaerofílico (85% N_2 , 10% CO_2 y 5% O_2), y temperatura de 37°C; su crecimiento óptimo es de 3 a 7 días; y se ha descrito que en agar sangre o chocolate forma colonias de 0.5 -1 mm, con aspecto metálico, bordes continuos, forma circular y concava (6). Su composición de bases ADN es de 35.8-37.1 mol% que concuerda con el rango encontrado en el género Campylobacter (7). Su composición de ácidos grasos difiere de otros Campylobacter, sus principales ácidos son tetradecanoico (14:0) y cis-9,10 metilenoctadecanoico(19:0) (23). En otros Campylobacter el ácido hexadecanoico (16:0), octadecenoico(18:1) y hexadecenoico(16:1) son los principales (25).

Campylobacter pylori posee la capacidad de producir una variedad de enzimas, entre las más importantes se menciona; la ureasa por su gran contenido, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, DNAsa, gamaglutamyltranspeptidasa, lipasa esterasa, superóxido dismutasa y catalasa(15,26).

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de C. pylori son selectivos. El medio propuesto por Marshall fué el agar chocolate suplementado con antibióticos, los cuales son: vancomicina, trimetoprim y polimixina que inhiben el crecimiento de bacterias de la flora intestinal (6). Otros autores obtienen desarrollo adecuado con diferentes medios enriquecidos suplementados con sangre de caballo y la adición de los antibióticos descritos por Skirrow (24,15).

Mecanismos de patogenicidad.

Campylobacter pylori se aísla de mucosa gástrica preferentemente de la región antral, aunque también se ha aislado de cuerpo y región fúndica (27), y sólo puede ser aislado de duodeno y esófago en presencia de metaplasia gástrica (14,28).

Campylobacter pylori se localiza preferentemente en las zonas de unión intercelulares estrechamente asociada a la superficie de las células productoras de moco y dentro de criptas de la mucosa gástrica (29); y por microscopía electrónica la

bacteria aparece fusionada o parcialmente adsorbida a la membrana de las células productoras de moco, algunas bacterias está cubiertas por microvellocidades englobadas en vacuolas endocíticas (27a,30).

C. pylori al invadir la mucosa posee alta movilidad que le permite desplazarse fácilmente en el medio viscoso; quizás debido a su forma espiral, movimiento en forma de tirabuzón, flexibilidad y el alineamiento paralelo que adopta con respecto a los filamentos del moco (29, 33). Bajo estímulos quimiotácticos, la bacteria llega a la unión intercelular, en la que obtiene los nutrientes y factores de crecimiento (29).

La actividad enzimática de C. pylori posiblemente participe en un papel importante como mecanismo de protección contra el huésped, se ha postulado: 1) que la ureasa al hidrolizar la urea libera amoníaco que cubre a la bacteria protegiéndola contra el efecto bactericida del ácido gástrico (30). 2) que las proteasas causan rápida degradación del polímero de glicoproteína (mucina), presente en el moco y lo degrada a glicopéptidos dando como resultado la disminución gradual del moco con un consecuente incremento en la permeabilidad de iones hidrógeno, esto permite aumentar la movilidad de la bacteria en el medio y favorecer las lesiones en la mucosa por efecto del ácido (31). 3) además la catalasa y superóxidos dismutasa extracelulares confieren resistencia a los mecanismos de muerte oxidativa de macrófagos y neutrófilos (32).

Las alteraciones que se han observado en las células infectadas con C. pylori son: 1) Disminución de carbohidratos neutros (fucosa, galactosamina) localizados dentro de los gránulos del moco; 2) aumento del ácido y las glicoproteínas; y atrofia en las microvellosidades (32). W M Johnson y H Lior en un estudio in vitro utilizando diversas líneas celulares señalan la presencia de una citotoxina de carácter termolábil en cepas de C. pylori de pacientes con gastritis (34).

Características antigénicas.

Las alteraciones estructurales y bioquímicas en las células infectadas por C. pylori originan una respuesta local y generalizada que induce a la fagocitosis de la bacteria por neutrófilos y eosinófilos; y una respuesta inmunológica humoral que origina la producción de anticuerpos específicos contra estructuras de C. pylori, constituidos principalmente por IgA e IgG (35).

Probablemente los componentes de la membrana externa de C. pylori al igual que en los otros microorganismos gram negativos participen de manera importante en la relación - huésped parásito: 1) tal vez en el mecanismo de adherencia del patógeno, y/o resistencia a fagocitosis, y 2) confiriéndole características antigénicas.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Se estima que la enfermedad ácido péptica es muy frecuente en México, a pesar de que no existen estudios que indiquen su prevalencia en la población general. En 1980 un estudio realizado en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) mostró que de 15,647 ingresos a consulta externa, el 6.4% fueron enfermos con úlcera péptica (sin incluir gastritis), tasa que se ha incrementado a través del tiempo (36).

En la actualidad se han propuesto varias teorías que tratan de explicar el origen de la enfermedad ácido péptica, sin embargo, ninguna de ellas logra explicarla completamente (36).

Se han publicado infinidad de estudios en otros países que muestran la asociación de C. pylori con enfermedad ácido péptica (7,8,9,10) mediante cultivos de microorganismo hasta en un 100% en los casos de úlcera duodenal (9) y en el 97% de los casos de gastritis (8), y se menciona también del 0 al 14 % de aislamientos en pacientes con mucosa gástrica normal (9,10).

El diagnóstico de la infección por C. pylori se realiza mediante una endoscopia y biopsia, mismos que son drásticos por su invasividad; la detección de la ureasa (enzima producida por C. pylori), mediante cuantificación en el aliento del CO₂, como producto final de la hidrólisis de la urea que es marcado con carbono 14 radioactivo (47), este método es sensible, específico y no invasivo, aunque es costoso; de ahí la necesidad

de establecer un método indirecto, rápido no invasivo y confiable para el diagnóstico de esta infección. Se ha valorado la presencia de anticuerpos específicos contra C. pylori empleándose para ello diferentes técnicas inmunológicas, tales como: aglutinación bacteriana, fijación de complemento, ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunoelectrotransferencia (37,38), de las cuales ELISA ha mostrado ser el más específico al utilizarse el antígeno de las proteínas externas (PE) de C. pylori extraídas con glicina ácida, se ha descrito reacción cruzada del 1.8% con el antígeno común de C. jejuni (39,40,41) lo cual afectará la especificidad de la prueba; si la prevalencia de infección por C. jejuni en la población aplicada, es elevada.

El método de ELISA ha sido validado en poblaciones donde la incidencia por C. jejuni es baja. En México este método aún no se ha estandarizado y dado que en nuestra población las infecciones por C. jejuni son frecuentes desde temprana edad, como se demostró en el estudio realizado en 1985 durante el transcurso de un año, en una cohorte de 179 niños de una zona suburbana de la ciudad de México, en donde el 68% presentaron por lo menos una infección por C. jejuni (42). Es posible que la especificidad de la prueba sea muy diferente a lo descrito.

Se ha intentado la infección experimental por C. pylori en diferentes modelos animales, encontrándose que sólo los lechones (43) y los primates (44) son susceptibles de infectarse, y desarrollan de forma secundaria un cuadro histológico en mucosa gástrica similar al descrito en humanos con gastritis.

En la actualidad, se desconoce la existencia de el o los posibles reservorios, ni la fuente de transmisión al humano; pero dado que se ha encontrado C. pylori en animales, puede postularse la posibilidad de una zoonosis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Campylobacter pylori se encuentra asociado a enfermedad ácido péptica (7,8,9,10). En México no existen datos publicados de esta asociación, sin embargo, un estudio piloto realizado en el INNSZ se logró aislar C. pylori de biopsia de mucosa gástrica en 10 pacientes con enfermedad ácido péptica (gastritis y/o úlcera) diagnosticada por endoscopia y estudio histológico.

La necesidad de recurrir a la endoscopia . biopsia y cultivo para el diagnóstico de infección por C. pylori que es un método invasivo y molesto para el paciente , hace necesario encontrar un método no invasivo para detectarla. Hasta el momento el método no invasivo, más sensible y específico es la detección de anticuerpos específicos por ELISA, utilizando como antígeno las proteínas de C.pylori extraídas con glicina ácida. Se requiere estandarización de la detección de anticuerpos específicos por ELISA para contar con un método no invasivo en el diagnóstico de infección por C. pylori que sea reproducible, sensible y específico en nuestra población, que como tiene alta prevalencia de infección por C. jejuni debe ser valorado en su

especificidad, dada por la reacción cruzada descrita entre antígenos de C. pylori y C. jejuni.

La detección de anticuerpos específicos por ELISA requiere la obtención del antígeno; lo que demanda cultivos masivos de C. pylori mediante un medio de cultivo óptimo para su crecimiento y propagación, el cual no ha sido descrito.

El conocer la proporción de la reacción cruzada de las proteínas extraídas con glicina ácida de C. pylori y de C. jejuni, directamente nos conducirá a la purificación de un antígeno único presente en C. pylori para la detección de anticuerpos específicos.

Hasta la fecha no se ha descrito reservorio ni fuente de transmisión al humano de esta infección, sin embargo, dado que C. pylori ha sido aislado de animales y que la infección experimental sólo se ha logrado en el humano y en estos animales, sugerimos que posiblemente se trate de una zoonosis, para dar base a esta hipótesis es necesario determinar la prevalencia de anticuerpos contra C. pylori en población de alto riesgo laboral a enfermedades infecciosas transmitidas por animales.

OBJETIVOS

1.- Estandarizar el método de ELISA indirecto para la detección anticuerpos específicos contra las proteínas extraídas con glicina ácida de Campylobacter pylori, que nos permitan correlacionar la enfermedad ácido péptica asociada a este microorganismo.

- a) Determinar el mejor medio de cultivo, propagación y tiempo óptimo de crecimiento para Campylobacter pylori.
- b) Estandarizar la obtención del antígeno (PE) de C. pylori por extracción con glicina ácida.
- c) Determinar antigenicidad y la proporción de la reacción cruzada de las proteína extraídas con glicina ácida de C. pylori y el antígeno común de C. jejuni.

2.- Determinar la prevalencia de anticuerpos contra C.pylori en una población con alto riesgo laboral para enfermedades infecciosas transmitidas por animales y compararla con prevalencia de anticuerpos en personas sanas sin este riesgo laboral.

HIPOTESIS

El método de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra C.pylori es un método confiable, específico y la reacción cruzada que presenta con C.jejuni no interfiere significativamente por lo que es aplicable a una población como la nuestra, en donde son frecuentes las infecciones por C.jejuni.

La prevalencia de anticuerpos específicos contra C.pylori en personas con alto riesgo laboral para enfermedades infecciosas es superior a la prevalencia en personas sin este riesgo laboral.

MATERIAL Y METODO

Diseño.

Se valoró el crecimiento bacteriano por lectura de absorbancia a una longitud de onda de 660nm. (24,48,72 y 96 hrs) en tres medios de cultivo para el crecimiento y propagación de C.pylori, estos fueron: caldo infusión cerebro corazón, soya tripticaseína y brucella.

Una vez identificado el mejor medio de cultivo se inoculó C.pylori en forma masiva obteniéndose la cantidad necesaria de bacteria para la preparación del antígeno mediante la técnica descrita por Mc Coy (45); el antígeno de C.jejuni fué preparado de la misma manera. Con los antígenos obtenidos de estos dos microorganismos, se realizó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida; para conocer y comparar los perfiles proteicos de ambos antígenos.

Se prepararon sueros hiperinmunes en conejos Nueva Zelanda contra la bacteria completa formalinizada de C. pylori y el antígeno común de C. jejuni. Con la finalidad de determinar antigenicidad y la proporción de la reacción cruzada se realizó una inmunoelectrotransferencia ; haciéndose reaccionar los antígenos de C. pylori y C. jejuni con sueros hiperinmunes homólogo y heterólogo de ambos.

Para la estandarización de anticuerpos específicos contra C. pylori por ELISA se realizó una tabla de ajedrez, empleando para ello diferentes concentraciones de antígeno y diferentes diluciones de anticuerpo. El anticuerpo empleado fue el suero de un paciente a quien se le aisló C. pylori de mucosa gástrica (control positivo). La concentración de antígeno y la dilución del anticuerpo adecuada se determinó en base a que la absorbancia obtenida fuera directamente proporcional a los anticuerpos presentes (a mayor dilución menor absorbancia). Las lecturas de absorbancia se realizaron a los 15,30,45 y 60 minutos, hasta la hidrólisis total del sustrato (límite del valor de la absorbancia).

En la valoración de anticuerpos específicos contra C. pylori en una población con alto riesgo laboral para enfermedades infecciosas se utilizaron: 25 sueros de trabajadores de rastro, considerados de alto riesgo por su constante exposición a diferentes animales; 25 sueros de pacientes a quienes se les aisló C. pylori de mucosa gástrica (control positivo); y 25 suero de donadores que por interrogatorio y exploración física fueron considerados clínicamente sanos. Los tres grupos fueron pareados por edad y sexo, para eliminar variables consideradas como posibles factores de confusión. La especificidad en la detección de anticuerpos a C. pylori y C. jejuni se realizó en los 25 sueros de trabajadores de rastro en forma independiente.

3.- Crecimiento y propagación de C. pylori

Incubadora con agitación

Jarra para atmosfera microaerofílica

Matraces Erlenmeyer de 50 ml. (Tapón de rosca)

Medios de cultivo

Caldo infusión cerebro corazón (BHI)

Caldo brucella (BRUC)

Caldo soya tripticaseína (ST)

Suero de caballo estelizado

Agar BHI con Suplementos: sangre de caballo

anfotericina

vancomicina

polienriquecimiento

Por duplicado se prepararon 25 ml de cada medio (caldo BHI, ST y BRUC) en matraces de 50 ml. Una vez esterilizados los medios se suplementaron con suero de caballo al 10%, vancomicina 6 µg/ml y anfotericina 8 µg/ml; como control de contaminación se incubó a temperatura ambiente por 24 hrs. Cada matraz fué inoculado con 100 µl. de una suspensión bacteriana de C. pylori en PBS a una concentración mayor de 3.4×10^{14} y se incubaron a 37° C en agitación constante a 100 revoluciones por minuto (rpm), y con atmósfera de 85% de N₂, 10% CO₂ y 5% de O₂.

Los medios de cultivo inoculados se revisaron a las 24,48,72 y 96 hrs. y se efectuaron lecturas de absorbancia a 660nm (como indicador de crecimiento bacteriano) utilizando como blanco el mismo medio de cultivo sin inocular, sometido a las mismas condiciones que los inoculados. El ensayo se realizó por triplicado.

4.- Preparación de antígeno (Método de Mc Coy).

Parrilla de agitación magnética

Barra de agitación magnética

Vaso de precipitados de 50 ml.

Membrana de diálisis con punto de exclusión 12,000 D.

Sistema amicon diafiltrado UM10.

El paquete bacteriano obtenido por centrifugación se lavó 2 veces con PBS y una vez con agua destilada, centrifugando a 14,000 rpm durante 20 minutos.

Se expuso la proteína con buffer de glicina pH 2.2 en agitación constante durante 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 20 minutos y el sobrenadante se neutralizó con NaOH 1M, y se dializó durante 48 hrs. a 4°C con membrana para diálisis de punto de exclusión 12,000 contra agua destilada estéril

Las proteínas extraídas se concentraron por ultrafiltración en sistema Amicon diafiltrado empleándose membranas que permiten el paso de pesos moleculares menores de 10,000 y se determinó la concentración de proteínas por el método de Coomassie (24). El antígeno preparado se almacenó a -70°C hasta su utilización.

4.1 SDS-poliacrilamida electroforesis

Equipo de electroforesis

Se preparó un gel de SDS-poliacrilamida (grosor de 0.5 mm), éste constituido por dos geles de diferente concentración de acrilamida.

	Gel Inferior 10%	Gel Superior 3%
Solución bis-acrilamida(30%)	3.33ml	0.975ml
Solución reguladora (gel inferior o gel superior	2.50ml	2.57ml
SDS (10%)	100 μl	50 μl
Persulfato de amonio (10%)	50 μl	50 μl
Agua desionizada	3.51ml	6.42ml
TEMED	5 μl	10 μl

Las muestras que se corrieron en gel de SDS-poliacrilamida fueron las siguientes:

El antígeno de C. pylori (350 µg/ml)

El antígeno de C. jejuni (550 µg/ml)

Marcadores de peso molecular. 14-96 Kda.

Se desnaturalizaron las muestras con la solución de disociación (1:1) calentándose cinco minutos a 100 ° C en un buffer de SDS-2 mercaptoetanol.

El corrimiento se efectuó a un voltaje constante de 100 v. durante aproximadamente dos horas (tiempo suficiente en que las proteínas habían recorrido todo el gel). Posteriormente el gel fue teñido con una solución de nitrato de plata amoniacal (Apendice B).

5.- Preparación de suero de conejo hiperinmunes contra C. pylori

Jeringas de 3 ml.

jeringas de 10 ml.

Algodon

Tubos de ensaye 13 x 100

Centrifuga

Viales ependorff capacidad 1.5 ml.

Adyuvante completo de Freund

Xileno

Alcohol

2 conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 1Kg. de peso

Paquete bacteriano de C. pylori

El esquema de inmunización en 2 conejos Nueva Zelanda fué de la siguiente manera:

la semana. Se inocularon con 2.4 mg de peso húmedo de la bacteria completa formalinizada (C. pylori), suspendida en 50 µl de solución salina con 50 µl de adjuvante completo de Freund, en sitios múltiples del lomo del conejo.

2a ,3a y 4a semana. Se inocularon con 1.2 mg de peso húmedo e la bacteria con 50 µl de solución salina por vía intravenosa, por semana, previa inoculación se tomaron 5 ml. de sangre, se extrajo suero y se almacenó a -70°C.

A los 30 días se extrajeron 5 ml. de sangre y se tituló el suero para determinar anticuerpos contra C. pylori y los conejos fueron sangrados a blanco al tener títulos superiores de 1:1000; el suero se almacenó a -70°C.

5.1 Inmunotransferencia.

Equipo para inmunotransferencia (BIO RAD)

Membrana de nitrocelulosa (0.45 µm.)

Antígeno de C. pylori y de C. jejuni

Suero de conejo hiperinmune contra C. pylori

Suero de conejo hiperinmune contra C. jejuni

Las membranas se sacaron de la solución de bloqueo y se hicieron reaccionar de la siguiente manera:

Antígeno de C. pylori con suero de conejo hiperinmune contra C. pylori.

Antígeno de C. pylori con suero de conejo hiperinmune contra C. jejuni.

Antígeno de C. jejuni con suero de conejo hiperinmune contra C. pylori

Antígeno de C. jejuni con suero de conejo hiperinmune contra C. jejuni.

La dilución de suero empleada fué de 1:25. Las membranas permanecieron en contacto con el anticuerpo a temperatura ambiente y en agitación constante durante 18 hrs.

La membrana se lavó 3 veces con solución buffer tris (TBS) durante 10 minutos cada lavado con agitación constante , para remover el anticuerpo libre.

La membrana se puso en contacto con el conjugado a una dilución 1:1000, incubando a temperatura ambiente con agitación durante 1 hr. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween (TTBS).

La reacción antígeno anticuerpo en la membrana se reveló con la siguiente solución: El sustrato se disolvió en el metanol absoluto frío y se dejó que tomara la temperatura ambiente, mezclándose con TBS y peróxido de hidrógeno. La membrana se sumergió en esta solución y se dejó en agitación, el revelado de la reacción fué a los 15 minutos, la reacción se detuvo sumergiendo la membrana en agua corriente.

6.-Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

6.1 Estandarización

Placas de poliestireno (Beckman)

Micropipeta multicanal de 50 a 250 μ l. (volumen variable)

Micropipeta de 100 μ l. (volumen fijo)

Microjeringa de 1 a 10 μ l.

Lector de placas de ELISA (filtro 450 nm)

Suero de paciente con cultivo positivo de C. pylori

Antigamaglobulinas humanas totales conjugadas con peroxidasa (DAKO)

Albumina sérica bovina

Antígeno de C.pylori (extracción ácida)

Para la estandarización se prepararon concentraciones del antígeno de 1,2,5,10 μ g./ml.en buffer de carbonatos y diluciones del suero de un paciente con cultivo positivo a C. pylori de 1:125, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000 en PBS-albumina al 0.1%.

Sensibilización

En los diferentes pozos de las microplacas de ELISA, fueron depositados 100 μ l de cada concentración de antígeno, previa incubación a 4°C durante 24 hrs., la placa fué lavada con PBS por triplicado.

Bloqueo

Para evitar la unión inespecífica a la placa, fueron bloqueados los sitios que no se recubrieron con el antígeno, colocando 200 µl. por pozo de una solución de albúmina sérica bovina al 1% en PBS durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se lavó 2 veces con PBS.

Reacción antígeno anticuerpo

Se depositaron 100 µl de las diferentes diluciones del suero para cada concentración de antígeno presente en diferentes pozos de la microplaca y se incubó a 37°C /1hr. Al terminó se realizaron 3 lavados con PBS.

Se adicionó 100 µl del conjugado (antigamaglobulinas totales humanas unidas con peroxidasa) diluido 1:1000 en PBS-albúmina al 0.1% y se incubó a 37°C. Posteriormente la placa fué lavada 3 veces con PBS-Tween y 2 veces con PBS.

El sustrato se preparó en el momento de utilizarlo. En una solución de citratos se disolvió o-parafenilendiamina, posteriormente se adicionó peróxido de hidrógeno. Se colocaron 100 µl de esta solución por pozo y la placa se incubó en un lugar oscuro a temperatura ambiente. La reacción se valoró en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm a los 15, 30, 45 y 60 minutos.

6.2 Valoración de anticuerpos específicos contra C. pylori en 3 poblaciones.

Bajo las mismas condiciones de estandarización y empleando la dilución óptima identificada en ella se determinaron los niveles de anticuerpos específicos contra C. pylori en sueros de 3 grupos diferentes: 25 sueros control positivo, 25 sueros control negativo y 25 sueros de trabajadores de rastro general pareados por edad y sexo.

6.3 Valoración de anticuerpos específicos contra C. jejuni

25 sueros de trabajadores de rastro
antígeno de C. jejuni (antígeno común)

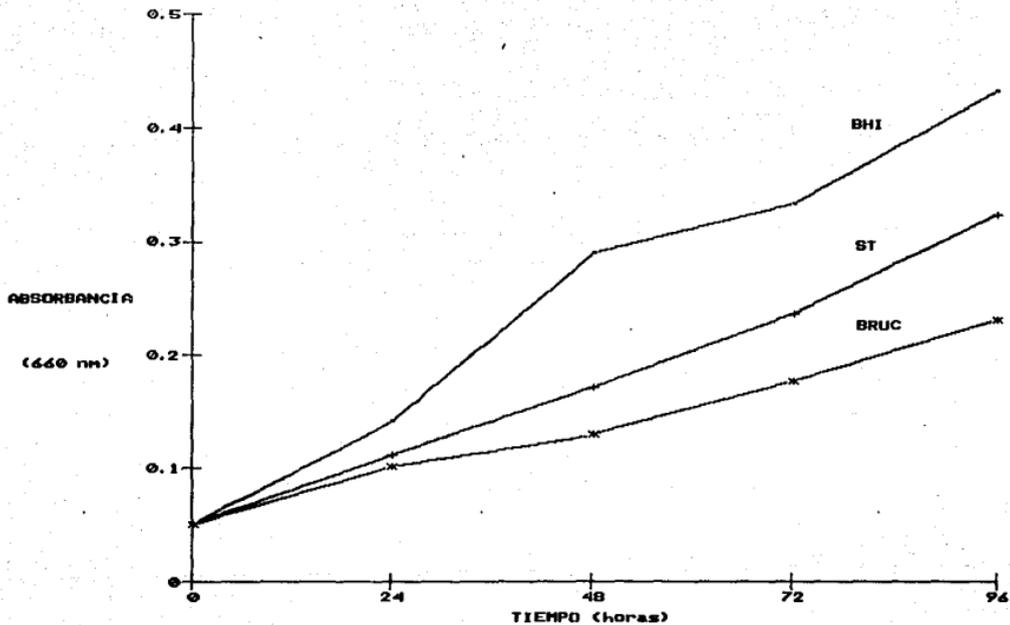
Bajo las mismas condiciones de estandarización y empleando 5 µg/ml antígeno y dilución de suero de 1:1000 se determinaron los niveles de anticuerpos contra C. jejuni en los 25 sueros de trabajadores de rastro.

RESULTADOS

1.- Crecimiento y propagación de C. pylori.

Los tres medios valorados para el crecimiento de este microorganismo mostraron fases de crecimiento similares; la fase latente fué de 0 a 24 horas, la fase logarítmica de 24 a 48 hrs. y la fase estacionaria (máximo crecimiento) fué de 48 a 72 hrs., como se indica en la gráfica 1. El crecimiento en los tres medios de cultivo fué diferente; el valor promedio de las lecturas de absorbancia determinado a las 72 hrs. fué de 0.333 U en caldo BHI, de 0.236 U y de 0.193 U en caldo BRUC. La tabla 3 muestra los promedios de lecturas de absorbancia como indicador de crecimiento de C. pylori a diferentes tiempos de incubación en los tres medios.

Para demostrar la significancia de las diferencias de crecimiento en los tres medios de cultivo valorados, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA), para el cual se incluyen medias aritméticas y desviaciones estandar de las lecturas de absorbancia a las 72 hrs. de incubación; el resultado mostró que al menos uno tenía un crecimiento significativamente diferente ($p < 0.05$). La T de Bonferroni, que es una T de Student modificada para más de una comparación, mostró que BHI con BRUC y BHI con ST tuvieron una $0.1 < p > 0.05$ y $p > 0.1$ respectivamente.



GRAFICA 1. Curvas de crecimiento de *C. pylori* en 3 medios líquidos de cultivo

TABLA 3
CRECIMIENTO DE *C. pylori* A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION
 (Absorbancia a 660 nm)

tiempo de incubación (Hrs.)	infusión cerebro corazón	Soya tripticasefna X + SD	Brucella
24	0.141 ± 0.051	0.112 ± 0.040	0.102 ± 0.050
48	0.289 ± 0.163	0.171 ± 0.024	0.129 ± 0.059
72 *	0.333 ± 0.127	0.236 ± 0.038	0.193 ± 0.042
96	0.430 ± 0.124	0.323 ± 0.091	0.230 ± 0.092

* = ANOVA p < 0.05

2.- Preparación de antígeno.

De 2 litros de medio de cultivo se obtuvieron 855 mg. de bacteria completa (peso húmedo), que proporcionó 4.3 mg de antígeno de C. pylori lo que representa un rendimiento del 0.5% de antígeno por bacteria ó 2.5mg de antígeno por litro de medio de cultivo.

2.1 SDS- poliacrilamida electroforesis.

En un gel de SDS-poliacrilamida al 10% se administraron los antígenos de C. pylori (2.5 µg) y C. jejuni (2.9 µg) previamente obtenidos, y se observaron algunas bandas proteicas con pesos moleculares similares en ambos. Las bandas encontradas en ambas preparaciones fueron de 61-66, 44, 32, 31, 29 y 26 Kd (fig. 1). Las bandas más importantes presentes unicamente en el antígeno de C. pylori fueron de 14 y 22 Kda aproximadamente (fig.1), y las presentes sólo en el antígeno de C. jejuni fueron de 12, 24 y 30 Kda aproximadamente (fig.1).

Las bandas proteicas observadas en el gel de SDS-poliacrilamida del antígeno de C. pylori son las mismas si el antígeno es obtenido de bacterias cosechadas de medio líquido o sólido.

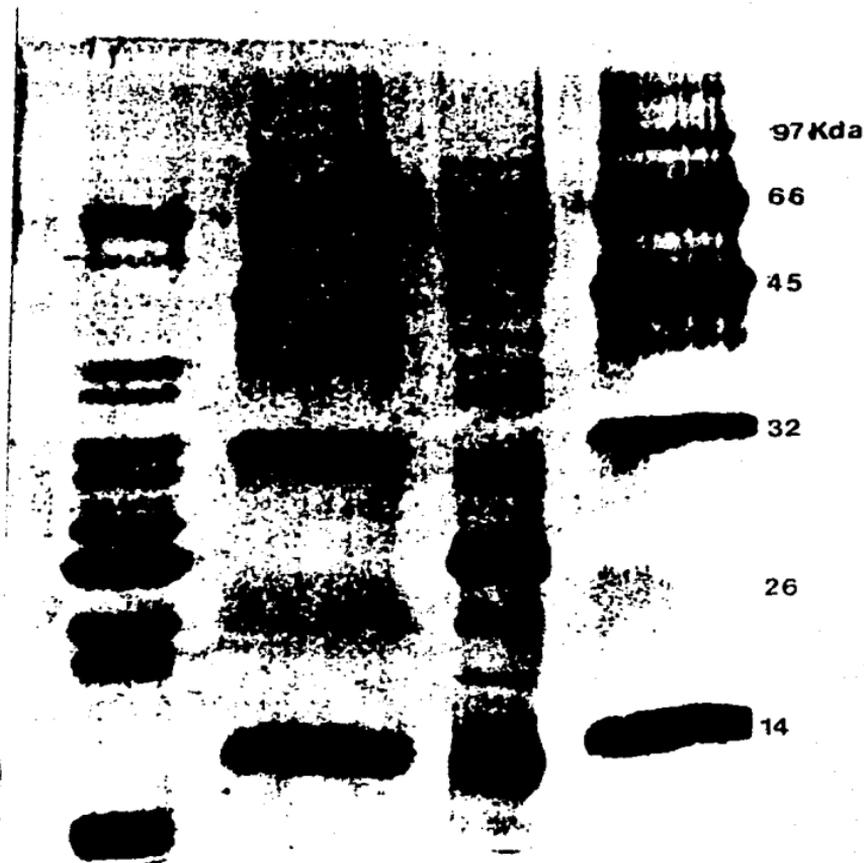


FIGURA 1 ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA 10% SDS
Columna 1 antígeno de C. jejuni (2.9 µg.); columna 2 pesos
moleculares estadares; columna 3 antígeno de C. pylori
(2.5 µg.); columna 4 pesos moleculares estadares.

3.- Preparación de suero de conejo hiperinmune contra C. pylori.

La valoración de anticuerpos contra C. pylori por el método de ELISA en los conejos Nueva Zelanda inmunizados en 4 semanas con bacteria completa formalinizada mostró un título final de anticuerpos de 1:3125.

3.1 Inmunotransferencia

A un papel de nitrocelulosa se realizó la inmunorreacción por electroinmunotransferencia con sueros homólogos y heterólogos de C. pylori y C. jejuni, indicándose que, el suero hiperinmune de C. pylori reconoce las bandas proteicas del antígeno de C. jejuni presentes en el papel de nitrocelulosa a nivel de 1 complejo de peso molecular de 61, 63 y 66 Kda (fig. 2) mientras que, el suero hiperinmune de C. jejuni sólo reacciona con las bandas proteicas del antígeno de C. pylori a un peso molecular de 62 Kda (fig. 2).

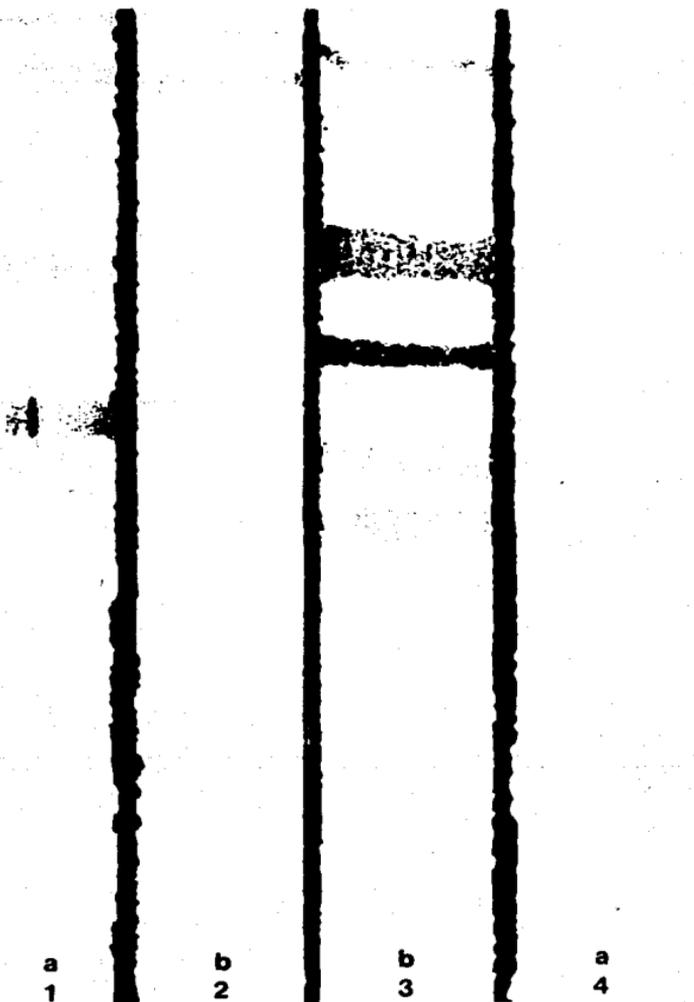


FIGURA 2 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA CON EL ANTIGENO DE C.pylori (a) y C.jejuni (b): columna 1 y 2 suero hiperinmune de conejo anti-C.pylori; columna 3 y 4 suero hiperinmune de conejo anti - C.jejuni.

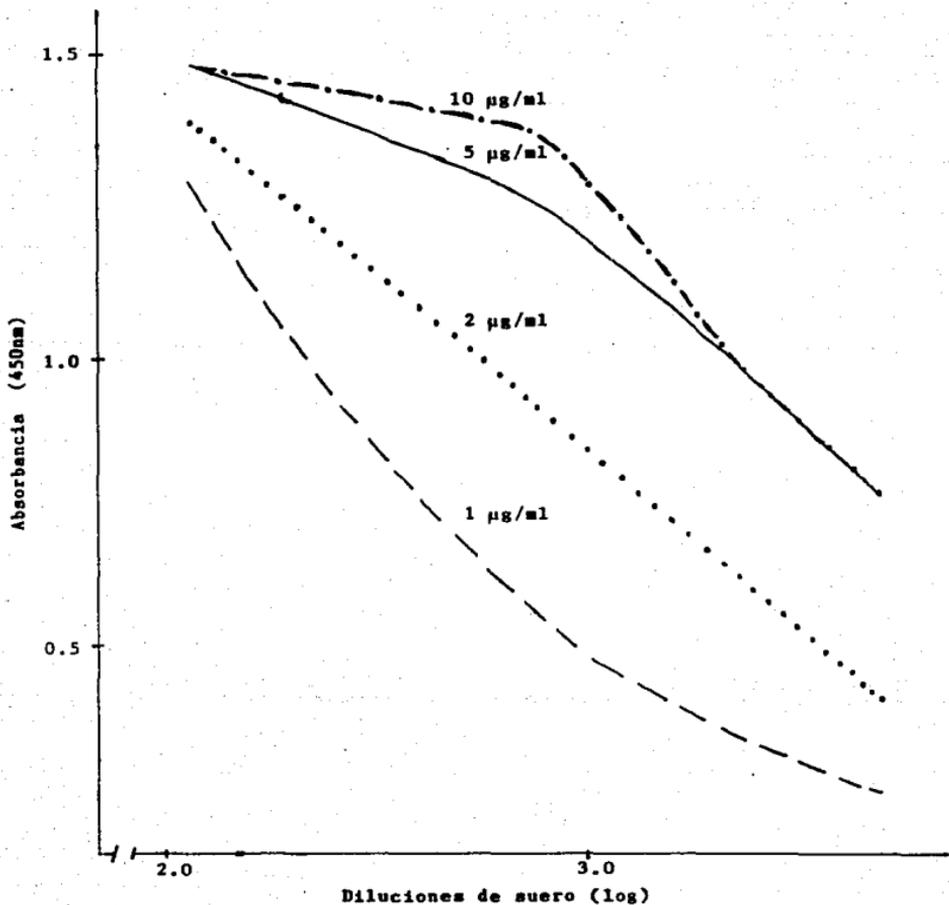
4.- Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

4.1 Estandarización.

Para la estandarización del ELISA se valoraron diferentes concentraciones de antígeno (1,2,5 y 10 µg/ml) a diferentes diluciones de un mismo suero positivo (1:125, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000).

Los resultados mostraron que la mayor lectura de absorbancia a 10 µg/ml de antígeno (máxima concentración empleada) fué de 1.5 U, y a 5 µg/ml (una concentración menor a la máxima) fué de 1.4 U. La menor lectura de absorbancia a 10 y a 5 µg/ml fué de 0.077 U. para ambas.

En la gráfica 2 se muestra las curvas que corresponden a diferentes concentraciones de antígeno al graficarse lecturas de absorbancia contra las diluciones de un mismo suero de un paciente con cultivo positivo a C. pylori, y se aprecia que el punto medio aproximado de la pendiente de las curvas de titulación corresponde a la dilución 1:1000 del suero valorado.



GRAFICA 2 Curvas de titulación a diferentes concentraciones de antígeno

4.2 Valoración de anticuerpos específicos contra C. pylori en 3 poblaciones.

Para valorar los títulos de anticuerpos contra C. pylori en poblaciones con diferentes riesgos de infección transmitida por exposición a productos animales, se valoraron 3 poblaciones diferentes: a) pacientes con cultivo positivo a C. pylori, b) trabajadores de rastro general y c) población general (donadores de sangre).

Empleándose una concentración de antígeno de 5 ug/ml y diluciones de suero de 1:1000 se determinaron los títulos de anticuerpos específicos contra C. pylori. Los promedios de las lecturas de absorbancia de las poblaciones "a" (0.877 ± 0.22) y "b" (0.823 ± 0.35) fueron mayores que el encontrado en el grupo "c" (0.585 ± 0.25) (tabla 4).

Empleando el ANOVA como prueba estadística se demostró que al menos una de las tres poblaciones tuvieron lecturas de absorbancia significativamente diferentes a un nivel de alfa de 0.01 ($p < 0.01$). Para determinar a cual de las poblaciones correspondía la diferencia se realizó la prueba de T para comparaciones múltiples (Bonferroni) y se encontró que la diferencia es a expensas de las lecturas de absorbancia en la población general, con una $p < 0.005$ ($Z_{real} = 4.19$)

TABLA 4
 Detección de anticuerpos contra *C. pylori* en
 individuos con diferente riesgo de exposición

Poblaciones	n	Abs (450 nm) ($\bar{X} \pm DE$)
1.- Trabajadores de rastro general	25	0.823 \pm 0.35
2.- Pacientes con aislamiento de <i>C. pylori</i>	25	0.877 \pm 0.22
3.- Personas captadas en banco de sangre	25	0.585 \pm 0.25

Abs = Absorbancia ANOVA = p < 0.01

4.3 Valoración de anticuerpos específicos contra C. jejuni.

Con objeto de determinar si los anticuerpos detectados fueron contra C. pylori y no contra C. jejuni (especificidad), y dada la importancia de las deducciones derivadas del punto anterior, se valoraron anticuerpos específicos contra C. jejuni en la población de trabajadores del rastro.

Empleándose una concentración de antígeno de 5 µg/ml y dilución de suero de 1:1000. El promedio de las lecturas de absorbancia de los sueros valorados fué de 0.970 ± 0.172 para, no existiendo una diferencia significativa al compararlas con las de C. pylori; y el índice de correlación de ambas lecturas de absorbancia (C. pylori y C. jejuni) fué de 0.046 con una varianza explicada por la correlación de 0.002 y una validez de la prueba de $p < 0.0001$ (probabilidad de que la correlación sea dada por el azar).

Análisis estadístico del control de calidad del ELISA

La reproducibilidad del ELISA se determinó mediante el coeficiente de variación interensayo (variación existente de un mismo suero entre placa y placa) y el coeficiente de variación intraensayo (variación de un mismo suero entre pozo y pozo de una misma placa).

El coeficiente de variación interensayo se calculó tomando las lecturas de absorbancia de un suero positivo y uno negativo en 11 diferentes ensayos, obteniéndose un valor del 11% para el suero positivo y 18% para el negativo. El coeficiente de variación promedio intraensayo se calculó de los valores obtenidos de los duplicados de los 25 sueros de trabajadores de rastro y este fué del 4.4%.

DISCUSION

Lo invasivo, costoso y tardado del diagnóstico por C. pylori ha estimulado a varios investigadores en el mundo al estudio de diferentes métodos serológicos para su detección; éstos han informado de la existencia de reacción cruzada con otros miembros del género *Campylobacter* (9,40) y de ahí la importancia de la estandarización de estos métodos, donde la infección por C. jejuni es muy frecuente. En la estandarización de estos métodos fué necesario obtener el antígeno, el cual se extrajo de grandes cantidades de C. pylori.

Para las obtención de cultivo masivo de C. pylori, que es de difícil crecimiento, fué necesario contar con un medio que permitiera el crecimiento y propagación de la bacteria .

De los medios de cultivo que fueron probados, el caldo BHI mostró ser el mejor para estos fines (como se muestra en la gráfica 1), ya que permitió el mayor crecimiento que en los otros medios. De esta gráfica se deduce además que las fases de adaptación en el medio líquido fué de las 0 a 24 hrs., la fase logarítmica de las 24 a 48 hrs., la fase estacionaria de las 48 a 72 hrs. y la fase de muerte bacteriana o lisis no se observó probablemente porque aún en el medio había suficientes nutrientes para continuar la fase estacionaria.

Otros autores han valorado el crecimiento de C. pylori en caldo brucella, indicando que la bacteria sólo crece en medio suplementado con suero de caballo y polienriquecimiento; además, la secuencia de las fases de crecimiento es similar a la descrita en este estudio (47,48).

El antígeno utilizado en el ELISA, se preparó por el método de extracción ácida con glicina, descrito por Mc Coy (45) en el cual al poner en contacto la glicina con la bacteria se desprenden la mayor cantidad de proteínas de la membrana externa; dado que no hay ruptura de la bacteria, el antígeno somático (antígeno 0) se encuentra en muy bajas concentraciones, menores al 10 %. Además se ha descrito que este antígeno tiene menor reacción cruzada con otros Campylobacter, y por lo tanto, es más específico y sensible, que cuando se emplean bacterias completas (39,40).

Nuestra producción de antígeno mostró alta reproducibilidad, dado que diferentes extracciones de antígeno de la misma cepa mostraron las mismas bandas en el gel SDS-poliacrilamida, con un porcentaje similar de antígeno. Algunas de estas bandas se encontraron también en preparaciones similares de antígeno de C. jejuni, sin embargo, estas bandas aún cuando son del mismo peso molecular y antigenicamente parecidas, no son las mismas proteínas; ya que las bandas de 61,63 y 66 Kda. del antígeno de C. jejuni que son reconocidas por su suero homólogo son reconocidas por anticuerpos de conejo específicos contra

C. pylori pero las mismas bandas en el antígeno de C. pylori no son reconocidas por anticuerpos de conejo específicos contra C. jejuni, exceptuando la proteína con un peso molecular alrededor de 62 Kda. que parece corresponder a una proteína común al género *Campylobacter* llamada " Flagelina " (40).

En la estandarización se pretendió determinar la concentración óptima de antígeno y la mejor dilución de suero para la detección de anticuerpos específicos contra C. pylori.

Como se observa en la gráfica 2, donde se grafica diluciones de suero contra absorbancia; las mejores curvas de titulación fueron la de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno; seleccionándose la de 5 $\mu\text{g/ml}$; por no presentar variación significativa con respecto a la de 10 $\mu\text{g/ml}$, es decir, que la mayoría de las diluciones de suero correspondieron a similares absorbancias en ambas concentraciones de antígeno; y la dilución óptima de suero fué de 1:1000, por ser el punto medio de la pendiente de la curva correspondiente a la concentración de antígeno seleccionado. Por lo que los sueros de las 3 poblaciones a estudiar fueron valorados bajo estas mismas condiciones.

Los resultados obtenidos en la detección de anticuerpos específicos contra C. pylori en las tres poblaciones muestran que en los pacientes con cultivo positivo de C. pylori y los trabajadores de rastro tienen similares títulos de anticuerpos,

siendo más altos que los evaluados en la población general ($p < 0.005$). Esto implica de alguna manera que los trabajadores del rastro están en contacto continuo con C. pylori. La determinación de anticuerpos contra C. jejuni en esta misma población mostró una no correlación con los títulos de anticuerpos contra C. pylori ($r = -0.046$), ésto indica que la detección de anticuerpos contra C. pylori es específica y que la reacción cruzada es muy pobre (1.8%) como han informado Goodwin y Newell (9,40). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la infección por C. pylori es transmitida por animales, para su comprobación , será necesario llevar a cabo otros estudios encaminados a determinar que animal o que animales son capaces de transmitirlo. La única manera de definir este último punto, será intentar aislar C. pylori en diversas especies, con las que el humano está en contacto frecuente; y comparar la prevalencia de infección en personas que tienen estos tipos de exposición, con la prevalencia de personas que no la tienen.

CONCLUSIONES

- 1.- El medio BHI fué el mejor de los medios de cultivo valorados para crecimiento y propagación de Campylobacter pylori.
- 2.- Los medios BRUC y ST también resultaron útiles para el crecimiento y propagación de C. pylori.
- 3.- La fase de adaptación de C. pylori en medio líquido se encontró a las 24 hrs.
- 4.- La fase de crecimiento logarítmico de C. pylori en medio líquido fué de las 24 a las 48 hrs.
- 5.- La fase estacionaria de C. pylori en medio líquido se encontró de 48 a 72 hrs.
- 6.- El tiempo óptimo para cosechar C. pylori en forma masiva de medio líquido fué a las 72 hrs.
- 7.- La obtención del antígeno de C. pylori por extracción con glicina ácida fué muy reproducible, con un rendimiento de bacteria del 0.5t.

- 8.- Los patrones electroforéticos en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas del antígeno de C. pylori y C. jejuni obtenidos por extracción con glicina ácida son diferentes; aunque comparten bandas proteicas de peso molecular de 61-66, 44, 32, 31 y 29.
- 9.- Mediante análisis de electroinmunotransferencia se encontró que anticuerpos contra C. jejuni mostraron reactividad cruzada con el antígeno de C. pylori en una banda proteica de peso molecular aproximado de 62 Kd.
- 10.- Análisis de electroinmunotransferencia de anticuerpos contra C. pylori mostraron reactividad cruzada con el antígeno de C. jejuni en el rango de peso molecular de 61-66 Kda.
- 11.- Los trabajadores de rastro estudiados presentaron títulos de anticuerpos séricos contra C. pylori significativamente más elevados en comparación a las personas no expuestas a estos animales, y similares a los pacientes infectados por esta bacteria.
- 12.- Los trabajadores de rastro están más expuestos a C. pylori que el grupo control.

- 13.- Los títulos séricos de anticuerpos contra C. pylori y contra C. jejuni de trabajadores de rastro no presentan correlación alguna.

- 14.- La detección de anticuerpos contra C. pylori por ELISA empleandose el antígeno extraído con glicina ácida es específica y la reacción cruzada con C. jejuni es muy baja.

- 15.- Se sugiere que la transmisión de C. pylori al humano sea a través de productos animales ya sea por manipulación o su ingesta.

- 16.- Son necesario otros estudios orientados a determinar la existencia del reservorio y la fuente de infección de C. pylori para el humano.

APENDICE

A) Reactivos y soluciones

1.- Preparación de antígeno

Solución buffer de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.2

Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M

Solución buffer de glicina pH 2.2

Agua destilada estéril

Reactivo de azul de Coomassie para determinar proteínas

Estandares de albúmina (100, 75, 50 y 25 ug.)

2.- SDS-poliacrilamida electroforesis

Solución stock Bis-Acrlamida

Acrlamida 30.0 %

N,N- metilen bis-acrlamida 0.8 %

Solución de corrimiento

Trizma base 15.21 g.

Glicina 71.90 g.

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 5.00 g.

Solución reguladora de gel inferior pH 8.8

Tris HCl (1.5 M)	23.7 ml.
Agua desionizada	100.0 ml.

Solución SDS 10%

Persulfato de amonio al 10%

N,N,N,N,tetrametiletilendiamina (TEMED).

Solución reguladora de muestra (buffer de disociación)

Solución reguladora de gel superior	2.0 ml.
Glicerol	2.0 ml.
2-mercaptoetanol (14M)	1.0 ml.
SDS 10%	4.6 ml.
Azul de bromofenol (0.1%)	0.4 ml.

Marcadores de peso molecular

Metanol absoluto

Nitrato de plata (solución de tinción).

Hidróxido de sodio	0.36 %
Hidróxido de amonio	14.80 M
Acido cítrico	1.00 %
formaldehido	38.00 %

3.- Inmunotransferencia

Solución Buffer Tris (TBS) pH 7.5

Tris base (20 mM)	4.84 g.
NaCl (500 mM)	58.40 g.
Agua desionizada	2.00 l.

Solución Buffer Tris Tween (TTBS) pH 7.5

Solución buffer tris	2.0 l.
Tween	1.0 ml.

Solución bloqueadora TBS gelatina al 3%.

Gelatina	3.0 g.
TBS	100.0 ml.

Solución de tranferencia pH 8.3

Tris base (25mM)	1.21 g.
Glicina (192mM)	57.60 g.
Metanol absoluto al 2%	800.00 ml.
Agua desionizada	3.20 l.

Sustrato

4-cloro-1-naftol	0.06 g.
Metanol absoluto frio	20.00 ml.
TBS	100.00 ml.
Peróxido de hidrógeno (30% en solución acuosa)	0.06 ml

4.- Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Solución reguladora $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ (0.05 M, pH 9.6)

Na ₂ CO ₃	0.159 g.
NaHCO ₃	0.293 g.
Agua desionizada	100.0 ml.

Solución reguladora de fosfatos (PBS)

NaCl	16.0 g.
KH ₂ PO ₄	0.4 g.
Na ₂ HPO ₄	5.8 g.
KCl	0.4 g.
Agua desionizada	2.0 ml.

Solución reguladora de fosfatos Tween (PBS-tween)

Solución PBS	2.0 l.
Tween 20	1.0 ml.

Solución buffer de citratos pH 5.6

Acido Citrico	0.730 g.
Na SO _{2 4}	1.18 g.
Agua desionizada	100.0 ml.

Sustrato:

p-ortofenilendiamina	0.005 g.
Buffer de citratos	10.0 ml.
peróxido de hidrógeno	5.0 µl.

B) Tinción de Plata

Se sumergió el gel durante 18 hrs. en una solución de metanol-agua al 50%, para la fijación de proteínas.

Se adicionó la solución de tinción de plata que está compuesta de las siguientes soluciones.

Solución A. se disolvieron 0.8 g de nitrato de plata en 4.0 ml de agua desionizada.

Solución B. se mezclaron 21 ml de hidróxido de sodio al 0.36% y 2.0 ml de hidróxido de amonio 14.8 M.

La solución A se adicionó gota a gota a la solución B en constante agitación para evitar precipitación, se completo a un volumen final de 100ml con agua desionizada, (debe utilizarse inmediatamente). Esta solución se deja en contacto con el gel durante 20 min. en agitación.

El gel con agua desionizada se mantuvo durante 5 min. en agitación.

El revelador se preparó mezclando 2.5 ml de ácido cítrico al 1% y 0.25 ml de formaldehído al 38%, completando un volumen final de 500 ml con agua. El gel se sumergió en esta solución hasta la aparición de bandas.

El gel se lavó con agua y la reacción se detuvo con metanol al 50%. El gel una vez teñido puede conservarse en una cámara húmeda.

BIBLIOGRAFIA

- 1 .- Blazer M.J; " Gastric Campylobacter-like organisms gastritis and peptic ulcers Disease "; Gastroent. 1987; 93: 371-83.
- 2 .- Bizzozero G; " Ueber die schlauchformigen drusen des magendarkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflache nepithel der shleimhaut; " Arch. F. mirkr. Anast. 1983;42:82 (Citado en I).
- 3 .- Salomon H; " Ueber das spirrillam des saugertiermagenes und sein uerhalten zu den Belegzellen "; Zentrablatt fut Bacteriologie 1986;19:433.
- 4 .- Doenges J.L.; " Spirochaetes in the gastric glands of Macacus rhesus and human without definite history of related disease " Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1938; 38: 536-38 (Citado en 7).
- 5 .- Steer H.W. Colin-Jones D.G.; " Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolane sodium "; GUT 1975;16:590-7.
- 6 .- Warren J.R., Marshall B.J. " Unidentified curved bacilli in on gastric epithelium in active chronic gastritis "; Lancet 1983;i:1273-75.

- 7 .- Marshall B.J., Warren J.R.; " Unidentified curved bacilli in the stomach of patientes with gastritis and peptic ulceration "; Lancet 1984;i:1311-4.
- 8 .- Lambert J.R., Dunn K.L, Eaves E.R. et al; " Pylogic CLO in the human stomach "; Med. J. Aust. 1985;143-174.
- 9 .- Goodwin S.C., Blincow E., Peterson G., et al; " Enzyme immunsorbent assay for Campylobacter pyloridis: correlation with presence of Campylobacter pyloridis in the gastric mucosa "; J. Infect. Dis. 1987;155;3:488-494.
- 10.- Buck E.G., Gourley K.W., et al; " Relation of Campylobacter pyloridis to gastritis and peptic ulcer "; J. Infect. Dis.1986;155;4:644-669.
- 11.- Anon; " Validation of the publication of New names and new combinations previously effectively published outside the IJSB " Inter. J. Syst. Bacteriol. 1985;35:223-5.
- 12.- Marshall B.J., Goodwin C.S.; " Revised nomenclature of Campylobacter pyloridis"; International J. Syst. Bacteriol. 1987; 37:68
- 13.- Vandamme P., De Ley J.; " Phylogenetic relationships in and of genus Campylobacter "; Abstracts of IV International Workshop on Campylobacter Infection. 1987; abst. 164.

- 14.- Jones D.M., Curry A., Fox A.J.; " An ultrastructural study of the gastric Campylobacter-Like Organism Campylobacter pyloridis "; J. Gen. Microbiol. 1985; 131:2335-2341.
- 15.- Megraud F., Bonnet F., et al; " Characterization of Campylobacter pyloridis by culture, enzymatic, profile and protein content "; J. Clin. Microbiol. 1985;22:1007-1010.
- 16.- Kasper G., Dickgiesser N.; " Isolation from gastric epithelium of Campylobacter-Like bacteria that are distinct from (Campylobacter) Campylobacter pyloridis "; Lancet 1985; i: 111-112.
- 17.- Weber A.F., Schmiegel E.F.; " Electron microscopic and bacteriologic studies of Spirilla isolated from the fundis stomach of cats and dogs "; Am. J. Vet. Res.1962;23:422-427.
- 18.- Brondson M. A.; " Pyloric Campylobacter isolated from non-human primates stomach: animal model study "; Abstracts of the IV International Workshop on Campylobacter infections.1987; Abst 27.
- 19.- Jones D.M. Eldridge J.; " Gastric Campylobacter-Like Organism (GCLO) from man (C. pyloridis) compared with GCLO strain from the pig, beboon and ferret "; Abstracts of the IV International Workshop on Campylobacter Infection 1987; Abst.:72.

- 20.- Jones D.M., Curry A.; " Ultrastructural study of gastric Campylobacter-like organisms (GULO) from man, baboon and ferret "; Abstracts of the IV International Workshop on Campylobacter Infection 1987; Abst.:73.
- 21.- Tompkins D.S., West A.P., et al.; " Characterization of Ferret Campylobacter-Like Organisms "; Abstracts of the IV Int. Workshop on Campylobacter Infection. 1987; Abst.:161.
- 22.- Fox J.G., Edmonds P., Taylor N.S.; " Comparison of the phylogenetic biochemical, phenotypic and morphological characteristics of gastric Campylobacter from humans and ferrets "; Abstracts of the IV Int. Workshop on Campylobacter infection. 1987; Abst.:184.
- 23.- Goodwin C.S., Mc Culloch R.K.M., et al.; " Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (Campylobacter pyloridis) from the human gastric mucosa "; J. Med. Microbiol. 1985;19:257-67.
- 24.- Goodwin C.S. Blincow E.D., Warren J.R. et al " Evaluation of cultural techniques from isolating Campylobacter pyloridis from endoscopic biopsies of gastric mucosa "; J. Clin. Pathol. 1985;38:1127-1131.
- 25.- Curtis M.A.; " Cellular fatty acid profile of Campylobacter "; Med. Lab. Sci. 1983;40:333-48.

- 26.- Mc Nulty CAM, Dent J. C. ; Rapid identification of Campylobacter pylori (C. pyloridis) by performed enzymes; J. Clin. Microb. 25:1683-1686.
- 27.- Thomas J.M., Poynter D., et al. " Gastric spiral bacteria "; Lancet 1984;ii:100.
- 27a.-Shousha S., Bull T.B., Parking R.A.; " Gastric spiral bacteria; Lancet 1984;ii:101.
- 28.- Thomas J.M. "Campylobacter-like organisms in gastritis; Lancet 1984;ii:1217.
- 29.- Hazell S.L., Lee A., et al.; "Campylobacter pyloridis and gastritis: association to an enviroment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium; J. Infect. Dis. 1986;153:658-63.
- 30.- Goodwin C. S. , Armstrong J. A. , Marshall B. J. ; "Campylobacter pyloridis, gastritis and peptic ulceration "; J. Clin. Pathol. 1986;39:353-65.
- 31.- Slomiany B.J., et al.; "Campylobacter pyloridis degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. Biochem. biophys. Res. Commun. 1988; Apr;14;144(1):307-14.
- 32.- Tricottet U., Bruneval P., et al.; " Campylobacter-like organisms and surface epithelium abnormalities in active, chronic gastritis in humans: an ultrastructural study; Ultrast. Pathol. 1986; 10:113-22.

- 33.- Bode G., et al.; " Pathogenetic implications of ultrastructural finding in C.pylori related gastroduodenal"; Scan. J. Gastroent. 1988;23 (suppl.142):25-39.
- 34.- Leach W.D., Lee A, Stubbs R.P.; " Localization of bacteria in the gastrointestinal spirochaetosis"; Infect. Immun. 1973;7:961- 972.
- 35.- Johnson W.N., Lior A.; " Production of heat labile citotoxin by Campylobacter pyloridis "; Abstracts of the Annual Meeting 1986; B-234:63.
- 36.- Villalobos J.; " gastroenterogía "; la edición; talleres de Francisco Mendez; México,1980;1:500-506.
- 37.- Jones D.M., Lessella A.M., Eldridge J.; " Campylobacter-like organism on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies; J. Clin. Pathol. 1984;37:1002-1006.
- 38.- Von Wulffer H., Heeseman J. Butzow G., et al.; " Detection of Campylobacter pyloridis in patients with antrum gastritis and peptic ulcer by culture, complement fixation test and immunoblot "; J. Clin. Microbiol. 1968;24;5:716-719.
- 39.- Mill S.D., Kurjnsnczyk L., Penner J.L.; " Identification of a common antigen among the Campylobacters "; Abstracts of the IV International Workshop on Campylobacters infections 1987;Abst.:106.

- 40.- Newell D.G.; " Identification of the outer membrane proteins of Campylobacter pyloridis and antigenic cross-reactivity between C. pylori and C. jejuni "; J. Gen. Micro. 1987;133:163-170.
- 41.- Perez-Perez G.I. and Blazer M.J.; " Conservation and diversity of Campylobacter pyloridis major antigens "; Infect. Immun. 1987;55:1256-1263.
- 42.- Ruiz-Palacios G.M., Calva J.J., López Vidal A.B.; " Cohort study of intestinal infection with Campylobacter in Mexican children "; Lancet 1988; 503-506.
- 43.- Krakowka S., Morgan R.D., Kraft G.N.; " Establishment of gastric Campylobacter pylori infection in the neonatal gnotobiotic piglet "; Infect Immun 1987; 55:2789-96.
- 44.- Baskerville A., Newell D.G.; " Gastritis associated with Campylobacter pyloridis infection in Rhesus monkey: A model for human disease "; Abstract of the International Workshop on Campylobacter infection 1987; abst 28.
- 45.- Mc. Coy E.C., Doyle D., Burda K et al; " Superficial antigens of Campylobacter (vibrio) fetus: Characterization of an antiphagocytic component; Infect.Immun.1975;11:517-525
- 46.- Bradford, M.; " A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-Dye Binding "; Anal biochem. 1976;72:248.

- 47.- Morgan D., Fredman R., Depew C., et al; " Growth of Campylobacter pylori in liquid media "; J. Clin. Microb. 1987; 25:2123-2125.
- 48.- Buck E. and Smith J.; " Medium supplementation for growth of Campylobacter pyloridis "; J. Clin. Microb. 1987; 25: 597-599
- 49.- Bell G.D., Weil J., Harrison G., et al ; " C - urea breath analysis, a non - invasive test Campylobacter pylori in the stomach "; Lancet. 1987; 1367-1368.