

Tesis de Posgrado

Estudio de una fracción biológicamente activa obtenida del Escherichia coli 086:B7

Corti, Angel Alberto

1957

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Corti, Angel Alberto. (1957). Estudio de una fracción biológicamente activa obtenida del Escherichia coli 086:B7. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0929_Corti.pdf

Cita tipo Chicago:

Corti, Angel Alberto. "Estudio de una fracción biológicamente activa obtenida del Escherichia coli 086:B7". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0929_Corti.pdf

1 19.3

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

RESUMEN DE LA TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN QUIMICA

...

ESTUDIO DE UNA FRACCION BIOLOGICAMENTE ACTIVA AISLADA DEL

ESCHERICHIA COLI 086:B7.-

Mediante el empleo de distintos solventes, se ensayaron diversos métodos de extracción de antígenos de la bacteria nombrada.-

Usando ácido acético 0,1 N en caliente, se obtuvo una fracción soluble, compuesta en su casi totalidad por proteínas, a juzgar por su valor de nitrógeno (11,7%).-

No se lograron identificar hidratos de carbono en esta fracción, ni mediante la cromatografía sobre papel, ni valorando azúcares reductores en el hidrolizado, a pesar de dar una reacción de Molisch positiva.-

Tampoco se logró demostrar la presencia de lípidos en la fracción estudiada.-

Se han caracterizado, mediante cromatografía sobre papel, todos los aminoácidos que componen la fracción proteica, con excepción de cuatro.-

Se realizaron, también, pruebas inmunoquímicas con el objeto de aclarar la relación de la fracción estudiada, con los antígenos del Escherichia coli, 086:B7. De los re-

1930 2170111 925

sultados obtenidos parece surgir que se trata de un antígeno incompleto y relacionado al antígeno "0" (somático). Lo primero se deduce de que da solo precipitación parcial con el suero correspondiente a la bacteria nombrada. In cuanto a su relación con el antígeno somático, está de acuerdo con la reacción de Oudin (precipitación en medio sólido) y con las pruebas de antigenicidad en lauchas.-

Por inyección a conejo no pudo obtenerse un suero específico contra la bacteria, pero sí se logró demostrar la presencia de anticuerpos no precipitables en el suero.-

La fracción estudiada no es tóxica para el ratón y mediante su inoculación se obtiene una protección activa contra la inyección de 1,3 D150 de Esch. coli 086:B7.-

.

ANGEL ALBERTO CORTI
ANGEL ALBERTO CORTI

✓
FCEN
UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

• • • • •

ESTUDIO DE UNA FRACCION

BIOLOGICAMENTE ACTIVA OBTENIDA DEL

ESCHERICHIA COLI O86:B7

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN QUIMICA

por

ANGEL ALBERTO CORTI

•
Buenos Aires

-1257-

TESIS: 999

••

CONDA

PADRINO DE TESIS:

Doctor RAUL FERRANOLA

Mi agradecimiento a los Dres. RAUL
FERRAMOLA y OSVALDO PESO por su acertada di-
rección, y a las autoridades de la DIRECCION
NACIONAL DE LABORATORIOS DE OBRAS SANITARIAS
sin cuya colaboración habría sido imposible
la realización del presente trabajo.

I.- ANTECEDENTES.

En los últimos años han sido muchos los trabajos publicados sobre aislamiento de endotoxinas bacterianas al estado puro. Boivin efectuó uno de los primeros intentos para caracterizar endotoxinas derivadas de diferentes especies de bacterias Gram negativas (1-6), utilizando la extracción con ácido tricloroacético (1 y 4). Estas endotoxinas fueron identificadas serológicamente con los antígenos somáticos (antígenos "O"). Posteriormente Goebel y colaboradores han obtenido diferentes complejos de este mismo tipo.-

Los antígenos específicos de Shigella paradysenteria fueron extraídos a partir de la masa bacteriana desecada con acetona utilizando como solventes el etilene glicol (tres días a 37°C.) en un caso y piridina acuosa 50% en otro (24 horas a 37°C) (7). Los solventes se utilizaron en proporción de 1 litro por cada 100 g. de masa bacteriana seca. Las extracciones se repitieron 3 veces separando cada vez la masa remanente por centrifugación. Los extractos reunidos se filtraron por filtros Berkefeld y luego se dializaron. El antígeno fué precipitado con 5 volúmenes de acetona, centrifugado y secado. En el caso de la Shigella sonnei la técnica seguida fué muy parecida pero en este caso se extrajo previamente gran cantidad de material inerte con piridina acuosa 50% y luego se llevó a cabo la extracción del antígeno con glicerina acuosa 50% (8). El antígeno crudo fué igualmente purificado por precipitación con acetona fría.-

posteriormente Morgan y Partridge (9) intentaron con éxito la extracción de endotoxinas de bacterias disentericas utilizando fenol 90% como solvente y precipitándolas posteriormente con alcohol. En un trabajo posterior Davies, Morgan y Mosimann (10) extraen el antígeno somático

de Shigella dysenteria utilizando etilene glicol. En 1951 Webster, Landy y Freeman (11) lograron aislar y purificar el antígeno Vi de una cepa de Esch. coli-

La técnica seguida fué análoga a las ya descritas. Se partió de masa bacteriana desecada con acetona. Previamente se hicieron pruebas con diversos solventes: porciones de 1 g. de masa bacteriana seca se extrajeron durante media hora con 100 ml. de diferentes solventes (ClNa. 0,9%, ácido acético 0,1 N, etilene glicol, ClH 0, 1 N, piridina y fenol 90%) luego se centrifugó a 2.000 revoluciones por minuto durante media hora y los sobrenadantes decantados y dializados durante una noche en agua corriente renovada continuamente. Se demostraron como mejores la solución fisiológica 0,9% y el ácido acético 0,1 N. Luego de extraer el antígeno con solución fisiológica se fraccionó con alcohol y purificó por hidrólisis ácida.-

Lüderitz, Westphal y colaboradores utilizando una emulsión de fenol en agua, en caliente extrajeron diversos polisacáridos de bacterias Gram negativas incluyendo Esch. coli (12). Las propiedades de algunos de ellos figuran en el cuadro adjunto. N.1.-

Todas las endotoxinas aisladas consistían en complejos lípido-hidrato de carbono-proteína. Se trata de sustancias difícilmente solubles en agua pero muy fácilmente solubles en bicarbonato de sodio 0,05 M. dando soluciones debilmente opalescentes. Dan reacción de Biuret y Molisch positivas y son en general ópticamente activas. Goebel, Binkley y Perlman (7); Morgan y Partridge (9); Webster, Landy y Freeman (11) y otros han intentado degradar los complejos antigénicos por diversos métodos y aislar sus componentes para estudiar sus propiedades. Los métodos seguidos en estos casos han sido la digestión triptica, el tratamiento con ácido acético en caliente, y el tratamiento con álcali. En general la fracción proteica conserva las propiedades tóxicas. Las fracciones con poder antigénico purifica-

C u a d r o N. 1

C e p a	Hexosa mina	Galac tosa	Xilosa	Glucosa	Mannosa	Fucox sa	Ramno sa	Abc- quo- sa
Esch. coli	+	+		+				
" NC VI	-	+		+				
" 055	-	+		+				
" NO I	-	+		+	+			
" 086	+	+		+		+		
" 018	+	+		+			+	
" 08	+	+	+	+			+	
" 026	-	+		+			+	
" 0111	-	+		+				+

das demuestran aumentar en antigenicidad al disminuir su contenido en nitrógeno y en fósforo. En general el hidrato de carbono constituye un haptene con grupos aceto lábiles. El cuadro N.2 ha sido extractado del trabajo de Goebel y colaboradores "Studies on the Flexner group of Dysentery Bacilli" (7) y en él aparece la composición química de las diversas fracciones de un lipo-polisacárido-proteína aislado de Shigella paradysenteria.-

Estos complejos fosfolípido-hidrato de carbono-proteína tienen ciertas propiedades biológicas y fisiológicas en común (13): profundos disturbios vasomotores, hiperglucemia seguida de hipoglucemia y caída del glucógeno hepático, aumento de la lactacidemia, efecto pirogénico a veces seguido de hipotermia, leucopenia de polimorfonucleares seguida de leucocitosis y necrosis hemorrágicas. Con dosis subletales se produce un estado de resistencia contra la misma u otras endotoxinas análogas. Inmunológicamente se comportan como antígenos completos, y esa antigenicidad depende de la presencia del polisacárido y la proteína.-

Para comprender mejor la ubicación serológica de las endotoxinas bacterianas del Esch. coli, es necesario conocer la serología del grupo Coli. Esta ha sido perfectamente estudiada por Kauffman en su esquema (14). Aparte de los antígenos "O" (somáticos) y los antígenos "H" (flagelares) en las cepas móviles, existen otros tipos de antígenos conocidos genéricamente como antígenos "K". Algunos de éstos corresponden a verdaderas cápsulas, otros no presentan las características morfológicas de éstas ni dan el fenómeno de "swelling", pero presentan el fenómeno de "O" inaglutinabilidad, por lo que se los conoce como "antígenos de envoltura".-

Las propiedades de los tres tipos de antígenos "K" (A, B y L), se resumen en el Cuadro N.3.-

Como puede apreciarse en el cuadro, los anticuerpos "A" son termoresistentes, en cambio los "L" son fácil-

C u a d r o N. 2

PROPIEDADES DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DERIVADOS DEL ANTIGENO
ESPECIFICO DE SHIGELLE PARADYSINTERICA - TIPO "Z"

S u s t a n c i a	Grados	N %	P %	Aceti- lo	Glucosa- mina %	Azúcares reduc- tos %	Dosis le- tal para ratones mg
1) Antígeno completo	-	6.79	0.99	5.05	10.30	35.5	0.25
2) Id. tratado con al- cali.....	-	6.71	0.81	3.07	-	32.4	0.25
3) Haptene (natural)...	+26	3.15	0.27	12.10	18.60	63.1	> 20
4) Haptene (hydr.aci- da).....	+26	2.88	0.25	10.30	18.60	63.5	> 20
5) Haptene (hydr.alca- lina).....	+35	2.72	1.72	4.50	16.40	62.60	0.50
6) Haptene: (2) degra- dado con acido.....	-	2.20	0.16	5.83	-	62.5	> 20
7) Haptene degradado con alcali.....	-	2.20	0.32	5.94	-	63.0	> 20
8) Haptene degradado con acido.....	-	2.20	0.67	5.63	-	61.5	> 20
9) Proteína toxica.....	-52	11.80	1.27	-	-	0.0	0.50
10) Proteína no toxi- ca.....	-65	13.90	0.18	-	-	0.0	> 20
11) Fosfolípido.....	-	1.40	2.90	-	-	-	> 20

C u a d r o N.3PROPIEDADES DE LOS ANTIGENOS DE ENVOLTURA

Suspensión bacteriana utilizada		L	A	B
Bacteria formolada.....	a f p	+	+	+
Bacteria calentada 1 hora a 60° C.....	a f p	(-)	+	+
Bacteria calentada 2.1/2 horas a 100° C...	a f p	-	(+)	-

a: aglutinabilidad.-

f: fijación de aglutininas.-

p: producción de anticuerpos.-

+: no alterada.-

(+): disminuída.-

(-): no destruída completamente.-

- : destruída.-

.

mente destruidos por el calentamiento.-

Los anticuerpos "B" en cambio son más difíciles de destruir, siendo necesario recurrir a una ebullición prolongada, y aún así no pierden la propiedad de fijar aglutininas.-

Se ve claramente entonces que la fórmula antigénica completa de los Esch. coli es O:B:H para las cepas móviles y O:B para las inmóviles.-

Desde los trabajos de Kaufman, Vahlne y Knipschildt han sido muchos los tipos serológicos de Coli aislados: luego de las comunicaciones de Bray (1945) y de Giles y Sangster (1948), comenzaron a tenerse en cuenta como responsables de ciertas afecciones entéricas. Este primer tipo serológico descrito, se lo incluye dentro del esquema de Kaufman con la fórmula O111:B4.-

Más tarde Giles, Sangster y Smith (1949) y Smith (1949) y Smith, Galloway y Spiers (1950) describen el tipo O55:B2 también patógeno. Luego Orskov (1951) aisla el O26:B6 y Taylor y Charles describen el O86:B7.-

De aquí en adelante se suceden las comunicaciones y trabajos, describiéndose hasta hoy 8 nuevos tipos patógenos: O127:B3, O112a-112c:B11, O125:B15, O119:(B14?), O126:B16, O112a-112b:(B13?), O86a-86b:B9 y O127a-127b:B10.-

.

II.- PART E EXPERIMENTAL.-

A)- Obtención de la masa bacteriana:-

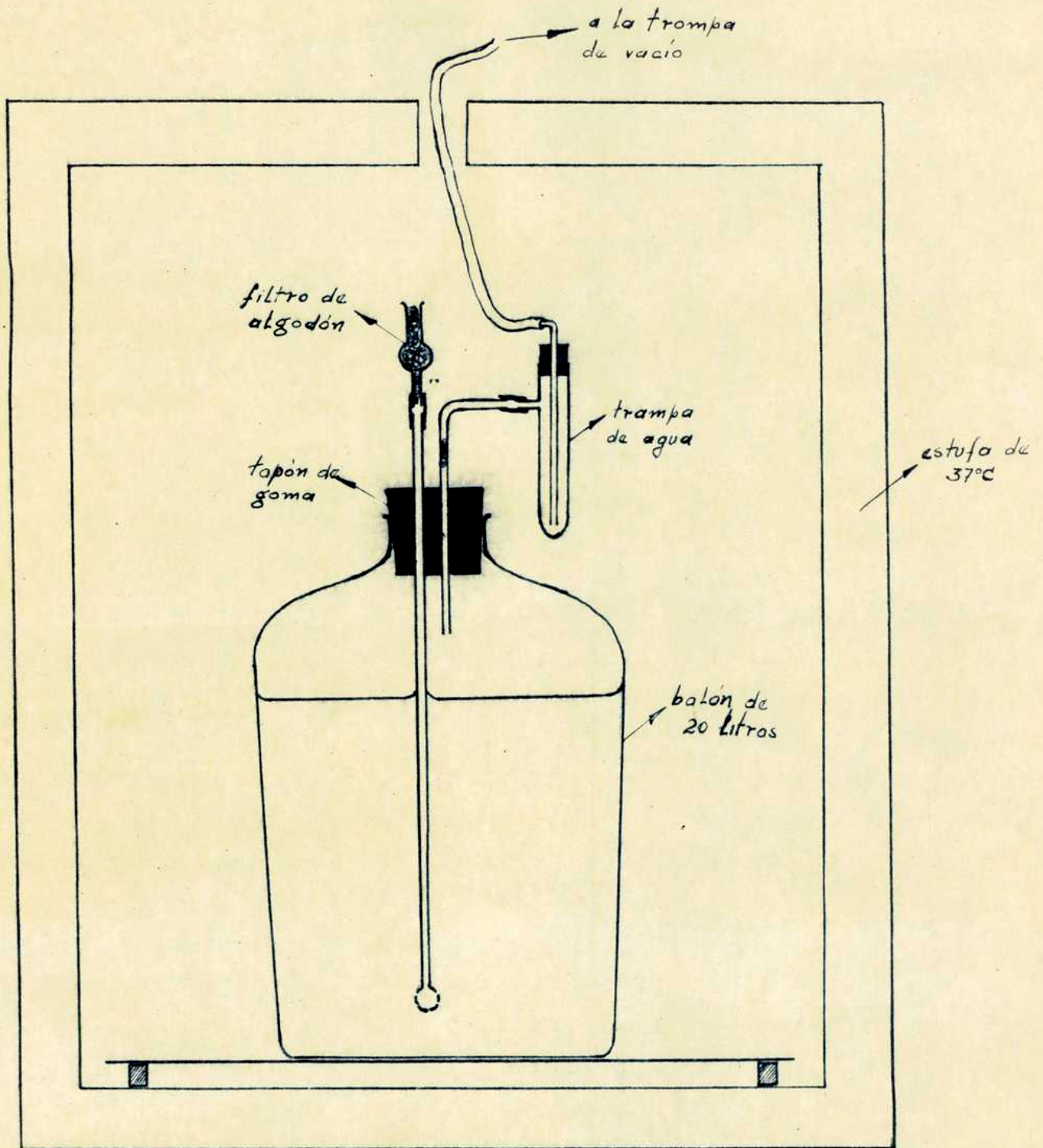
La cepa fué obtenida de la colección existente en el Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Obras Sanitarias de la Nación.-

Por sucesivas pasajes en placa se seleccionaron las colonias más ricas en antígeno "B". Se eligieron para ello las colonias opacas, y estas se probaron contra un suero 086 y otro 086:B7. Se eligieron las colonias que presentaban en mayor grado el fenómeno de "0" inaglutinabilidad (reacción negativa con el suero 086) y que aglutinaban con el suero 086:B7.-

Se utilizó como medio de cultivo, agar nutritivo glucosado al 1%.-

Utilizando estas colonias seleccionadas se prepararon inóculos de 100-150ml. en caldo nutritivo, que a las 24 horas de desarrollo a 37°C se emplearon para inocular botellones de 20 litros de capacidad, conteniendo 15 lts. del siguiente medio de cultivo:-

- | | |
|---------------------------|-------------------|
| 1) Bactopeptona..... | 150 g. |
| Fosfato disódico..... | 52.5 g. |
| Fosfato monopotásico..... | 22.5 g. |
| Agua corriente..... | 15 lt. |
| Se ajusta el pH a..... | 7.2-7.4 |
| Rojo fenol..... | hasta color rosa- |
| | do.- |
| 2) Extracto de carne..... | 150 g. |
| Agua corriente..... | 200 ml. |
| 3) G l u c o s a..... | 45 g. |
| Agua corriente..... | 150-200 ml. |



Esquema de la instalación utilizada en la
obtención de masa bacteriana

Fig. N°1

En el momento de utilizarse se agregó el extracto de carne al medio de cultivo contenido en los botellones Pyrex de 20 litros de capacidad.-

Se agregó el inóculo y se obturó con un tapón de goma doblemente perforado, atravesado por dos tubos de vidrio. Uno de ellos llegaba hasta el fondo del botellón y terminaba en una esfera perforada. El aire que entraba se filtraba por un filtro de algodón. El otro tubo, que no llegaba a tocar la superficie del líquido, estaba conectado a la bomba de succión (fig. N.1).-

Se incubó primero 24 horas a 37°C con burbujeo de aire. Se neutralizó con HONa IN estéril, llevándolo a pH 7.2 ± 0.2 y agregó la solución de glucosa estéril. Se continuó la incubación a 37°C por 24 horas más.-

Se mató el cultivo con 20 ml. de una solución de 90 g. de fenol en 100 ml. de éter y se centrifugó por una centrífuga continua tipo "Sharpless", aproximadamente a 22.000 revoluciones por minuto. La masa se suspendió en 100 ml. de agua destilada y se precipitó con 500 ml. de acetona. La acetona tiene por fin deshidratar las bacterias. Se filtró por Büchner con succión y colocó en desecador a vacío por 24 horas. La masa resultante se molió en un mortero. Se obtienen en cada operación de 8 a 12 g. de masa bacteriana seca.-

B)- DETERMINACIONES QUÍMICAS EFECTUADAS.-

a) Investigación de desoxiriboproteínas - Reacción de Dische (15).-

Se empleó la reacción de Dische, para la investigación de desoxiriboproteínas, usándola en forma cualitativa.

Para ello se preparan los siguientes reactivos:-

Reactivos A: Difenilamina..... 1 g.

Acido acético,glacial..... 100 ml.

Acido sulfúrico conc..... 2,75 ml.
 Reactivo B: Acido acético glacial... 100 ml.
 Acido sulfúrico conc.... 2,75 ml.

La determinación se efectuó agregando a sendos tubos de ensayo de 11x90 mm. las cantidades de reactivos y muestra que se indican en el cuadro N.4, y en el orden indicado.-

C u a d r o N.4

Volúmenes de reactivos y muestra empleados en la Reacción De Dische.-

Reactivos	Ensayo	Testigo	Blanco
Reactivo A.....	0,2 ml.	-	0,2 ml.
Reactivo B.....	-	0,2 ml.	-
Muestra.....	0,1 ml.	0,1 ml.	-
Agua dest.....	-	-	0,1 ml.

Se colocaron los tubos en baño maría hirviente durante 3 minutos. Se enfriaron bajo agua y leyeron los resultados a los 10 minutos.-

En los casos positivos, una coloración azul indica la presencia de mesoxiriboproteínas.-

b) Investigación cualitativa de hidratos de carbono.-
Reacción de Molisch.-

Se emplearon los siguientes reactivos:
 Reactivo A: Solución alcohólica de α -naftol al 5%.-

Reactivo B: Acido sulfúrico 8:9.-

En un tubo de ensayo se colocó 1 ml. de solución a ensayar y 9 ml. de reactivo B, mezclando y enfriando bajo agua. Se calentó luego el tubo en baño maría hirviente durante 3 minutos, luego de lo cual se enfrió y agregaron 0,2 ml. de reactivo A, dejándolo correr por las paredes del tubo de manera tal que se formaran dos capas.-

La reacción positiva se manifestó por la aparición de un anillo púrpura en la interfase, dentro de los 10 minutos de agregado el reactivo.-

c) Investigación cualitativa de proteínas.

Reacción de Biuret.-

Se emplean los siguientes reactivos:-

Reactivo A: Solución de HONa al 40%.-

Reactivo B: Solución de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%.-

En un tubo de ensayo se mezclaron 3 ml. de solución a investigar, conteniendo aproximadamente 1,5 mgr. de proteínas, con 1 ml. de solución A.-

Se vertieron luego, de modo de formar dos capas, unas gotas de reactivo B.-

La reacción positiva se manifestó por la aparición de un anillo violeta en la interfase.-

d) Investigación de azúcares reductores.-

Para la investigación cuantitativa de azúcares reductores, se determinaron por medio del microreactivo cúprico de Petersen, en los hidrolizados de 6, 12 y 24 horas.-

Se pesaron porciones de 2 mgr. de muestra aproximadamente, y colocaron en tubos con 2 ml. de ácido sulfúrico 1 N. Se cerraron luego los tubos a la lámpara y calentaron en baño maría de agua hirviente durante los tiempos indicados, con el fin de hidrolizar los hidratos de carbono que

podiera haber presentes. Una vez finalizado la hidrólisis, se abrieron los tubos y se transvasó cuantitativamente su contenido a sendos vasos de precipitados. Se agregó 1 ml. de solución de SO_4Zn al 2,5%, se mezcló bien y se precipitaron las proteínas por el agregado de HONa 1 N hasta pH. 8,3. Se centrifugó y en el sobrenadante se determinaron azúcares reductores mediante la técnica de Stiles, Petersen y Fred (16).-

Se emplearon los siguientes reactivos:-

Reactivo A: Microreactivo cúprico combinado.-

$\text{SO}_4 \text{ Cu. } 5 \text{ H}_2\text{O}$	5,0 g.
Acido tartárico.....	7,3 g.
$\text{CO}_3 \text{ Na}_2 \text{ anh.}$	40,0 g.
I K	10,0 g.
$\text{C}_2 \text{ O}_4 \text{ H}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	18,4 g.
Iodato de potasio.....	0,7 g.
Agua dest. hasta.....	1 litro

Reactivo B: SO_4H_2 1 N

Reactivo C: $\text{S}_2\text{O}_3 \text{ Na}_2$.0,005 preparado en el momento del uso a partir de una solución 0,1 N de la droga.-

En sendos tubos de ensayo se colocaron 5 ml. de reactivo A, agregándose luego a uno de ellos 5 ml. de agua destilada y al otro 5 ml. de la solución a investigar o una dilución apropiada de la misma, conteniendo aproximadamente 100-300 mgr. de azúcares reductores expresados en glucosa. Se tapan ambos tubos sin ajustar, con tapones de caucho, para evitar la reoxidación del cobre reducido, y se calientan durante 15 minutos en baño de agua hirviente.-

Se enfrían bajo agua y agregan a cada uno 5 ml. de reactivo B, agitando bien y dejando en reposo unos minutos.

Se titula luego con la solución de tiosulfato, utilizando almidón como indicador (solución de almidón soluble al 2%), que se agrega una vez que se ha aclarado el co-

lor del iodo, y la solución ha tomado un color pajizo. Se continúa la titulación hasta desaparición del color azul.-

La cantidad de glucosa presente en la muestra se establece mediante tablas, en función de la diferencia de volúmenes de solución de tiosulfato gastada en el blanco y en la titulación de la muestra.-

e) Determinación de lípidos.-

Se hidrolizan previamente alrededor de 25 mgr. de muestra con 2ml. de SO_4H_2 1 N en tubo cerrado a la llama, durante 6 horas a 100°C .-

Se transvasó entonces cuantitativamente el contenido del tubo a una ampolla de decantación y se extrajo con cloroformo previamente destilado. Se practicaron 6 extracciones, cada una con 5 ml. de solvente. Dichos extractos se mezclaron y llevaron a sequedad al baño maría, en una cápsula de porcelana previamente tarada.-

Se pesó el contenido de la cápsula hasta obtener constancia de peso. Paralelamente se practicó un blanco llevando a sequedad un volumen de solvente y pesando el residuo, el cual se dedujo de la pesada obtenida en los extractos.-

La diferencia permitió calcular el contenido en lípidos por ciento de muestra.-

f) Determinación de nitrógeno.-

Esta técnica se empleó en la investigación del contenido en nitrógeno de la fracción examinada y en la determinación de nitrógeno de anticuerpos de los ensayos inmunológicos efectuados.-

Se empleó para ello la técnica de micro Kjeldahl (15).-

Reactivo A: Acido sulfúrico con catalizador.-

Se saturó en sulfato de cobre, ácido sulfúrico concentrado.-

Reactivo B: Sulfato de potasio, cristalino, puro para análisis.-

Reactivo C: Solución saturada de ácido bórico.-

Reactivo D: Solución colorante.-

a) Solución saturada de rojo de metilo recristalizado, en alcohol etílico de 95%.-

b) Solución de azul de metileno al 1% en agua.-

c) 125 ml. de a) se mezclan con 15 ml. de b). Se utiliza como solución Stock.-

Reactivo E: Solución indicadora.-

Se agregan 5-10 ml. de solución C. a 2 litros de Reactivo C.-

Reactivo F: Solución de HCl N/70.-

Reactivo G: Solución concentrada de HONa.-

T E C N I C A :-

La muestra sólida o en solución, exactamente pesada o medida, se colocó en un recipiente de Kjeldahl de 100 ml., se agregaron 2 ml. de Reactivo A. y 1 g. aproximado de Reactivo B. hecho lo cual se procedió a su digestión, la cual se hizo lentamente tratando de eliminar previamente el agua y luego calentando en baño de arena de modo tal de ir quemando el carbono.-

Se calentó hasta decoloración del contenido del balón, insistiendo en un calentamiento de 30 minutos posteriores a ello en un calentador con resistencia eléctrica.-

Se cuidó en este punto, que en el cuello y paredes del recipiente, no existieran trozos de partículas sin atascar, las cuales en caso de estar presentes se arrastran con chorro de agua destilada, luego de enfriar el balón.-

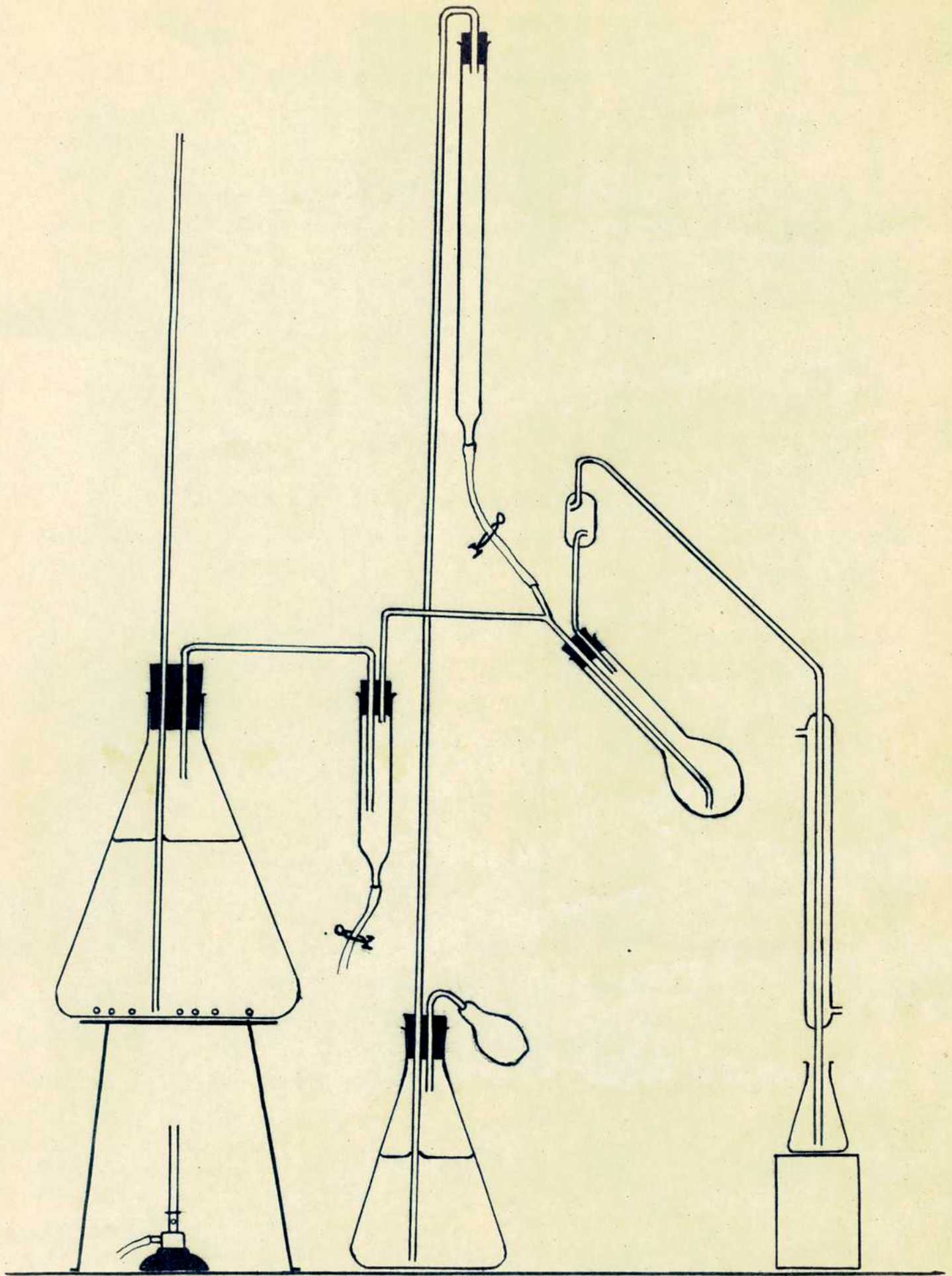


Fig. N°2

Una vez digerida la muestra, se procedió a destilar el amoníaco presente, en el aparato de la figura N.2.-

Antes de usar el aparato de destilación se purga durante 5 minutos, dejando pasar vapor con un baloncito conteniendo 10 ml. de agua destilada y 9 ml. de álcali. El agua contenida en el matríz generador de vapor, se acidula con unos ml. de SO_4H_2 con.-

Se llevan a cabo luego blancos sucesivos, en la siguiente forma: en un erlenmeyer de 125 ml. se colocan 5 ml. de la mezcla ácido bórico indicador y 5 ml. de agua destilada, colocándose bajo el refrigerante, con el extremo de éste pescando en el líquido. Se coloca un baloncito de Kjeldahl en el aparato, conteniendo 10 ml. de agua destilada, y se dejan caer 9 ml. de la solución concentrada de HONa . Se coloca nuevamente el mechero debajo del matríz generador de vapor y se deja destilar durante 6 minutos. Se baja el erlenmeyer y retira el mechero del generador, se enjuaga con piseta al extremo del refrigerante y espera hasta que toda el agua acumulada en la trampa de Kjeldahl, baje hasta el baloncito.-

Se destila durante 1 minuto más, sin que esta vez el refrigerante pesque en el líquido, con el fin de lavar el interior del refrigerante. Se repiten los blancos hasta obtener un color constante del indicador (es preferible que no exista viraje) tomando este color como punto final en las titulaciones subsiguientes. Se procede luego a la destilación de la muestra analítica para lo cual se coloca el erlenmeyer en el extremo del refrigerante, acconteniendo el indicador. Se ajusta el baloncito conteniendo la muestra y se coloca rodeándolo un baño de hielo. Luego se procede lentamente al agregado de los 9 ml. de álcali.-

Una vez que todo el álcali ha reaccionado, se retira el baño de hielo y se procede exactamente igual que cuando se llevaron a cabo los blancos. La destilación del amo-

niaco hace virar la solución indicadora del violeta al verde. Se titulan luego los destilados con HCl exactamente N/70. El cálculo se efectúa en la siguiente forma:-

$$\text{mg N} = \text{ml HCl N/70} \times 0,2$$

El error del método es aproximadamente $\pm 0,01$ mg N.

Se lleva a cabo además un blanco para los reactivos digiriendo 2 ml. de la solución sulfúrica del catalizador con 1 gr. de sulfato de potasio en la forma ya indicada destilándolo luego según la técnica descripta y titulando en la misma forma. Los valores obtenidos se restan a las determinaciones efectuadas.-

g) Cromatografía - Determinación de aminoácidos (17).-

Se procedió previamente a hidrolizar la muestra. Para ello se pesaron alrededor de 5 mg. de fracción en estudio en un erlenmeyer de 125 ml. se agregaron 10 ml. de HCl 6 N y se calentó a reflujo durante 18 horas. Luego de dicho tiempo el hidrolizado se llevó a sequedad al vacío, tomando con agua el residuo y repitiendo la operación hasta eliminación total del HCl.-

El residuo resultante de la última evaporación se disolvió en 1 ml. de alcohol isopropílico al 10% en agua. Esta solución de aminoácidos se empleó en las determinaciones cromatográficas. Para ellas se empleó papel Whatman N.1 y se corrió en forma ascendente bidimensional y en forma descendente monodimensional según los casos. Los solventes empleados fueron los siguientes:-

Solvente A: Butanol normal.....	40 ml.
Acido acético glacial.....	10 ml.
Agua destilada.....	50 ml.

Se mezcla y agita dejando decantar luego, empleando

la capa alcohólica. La capa acuosa se empleó para saturar la cámara.-

Solvente B: Fenol..... 80 ml.
 Agua destilada..... 20 ml.

Se funde el fenol y agrega el agua agitando continuamente. En caso que al enfriarse se separasen dos capas se agita el total antes de usarse, se toma la porción a utilizar y se entibia hasta disolución. A temperatura ambiente el sistema forma una solución homogénea. La cámara se saturó con el solvente y en el momento del corrimiento de la muestra se colocó en el piso de ella un vaso conteniendo solución acuosa de amoníaco al 0,3 % y otro con 100 mg. de cianuro de sodio disueltos en 5 ml. de agua destilada con el objeto de evitar la oxidación del fenol y la formación de un frente coloreado en el papel.-

En los cromatogramas monodimensionales descendentes se empleó un dispositivo como el que se indica en la figura 3.-

Se utilizaron tiras de papel de 2,5 x 40 cms. colocando la muestra en cantidades variables de 0,02 a 0,08 ml. sobre una línea horizontal trazada a unos 5 cms. del borde superior. En la cromatografía bidimensional ascendente se empleó una hoja de papel de 40 x 40 cms. colocándose la muestra en un ángulo distante 6 cms. de cada uno de los bordes. El papel se enrolló y los dos extremos se unieron mediante hilo de coser en tres puntos de tal modo de formar un cilindro. Este se colocó parado en un cristizador apropiado donde se colocó el solvente oportunamente. El sistema se cubrió con la misma campana utilizada en la otra experiencia. En ambos casos se saturaba el sistema con el solvente y equilibraba el papel con el ambiente 24 hs. antes de agregar el solvente en la cubeta. En forma compa-

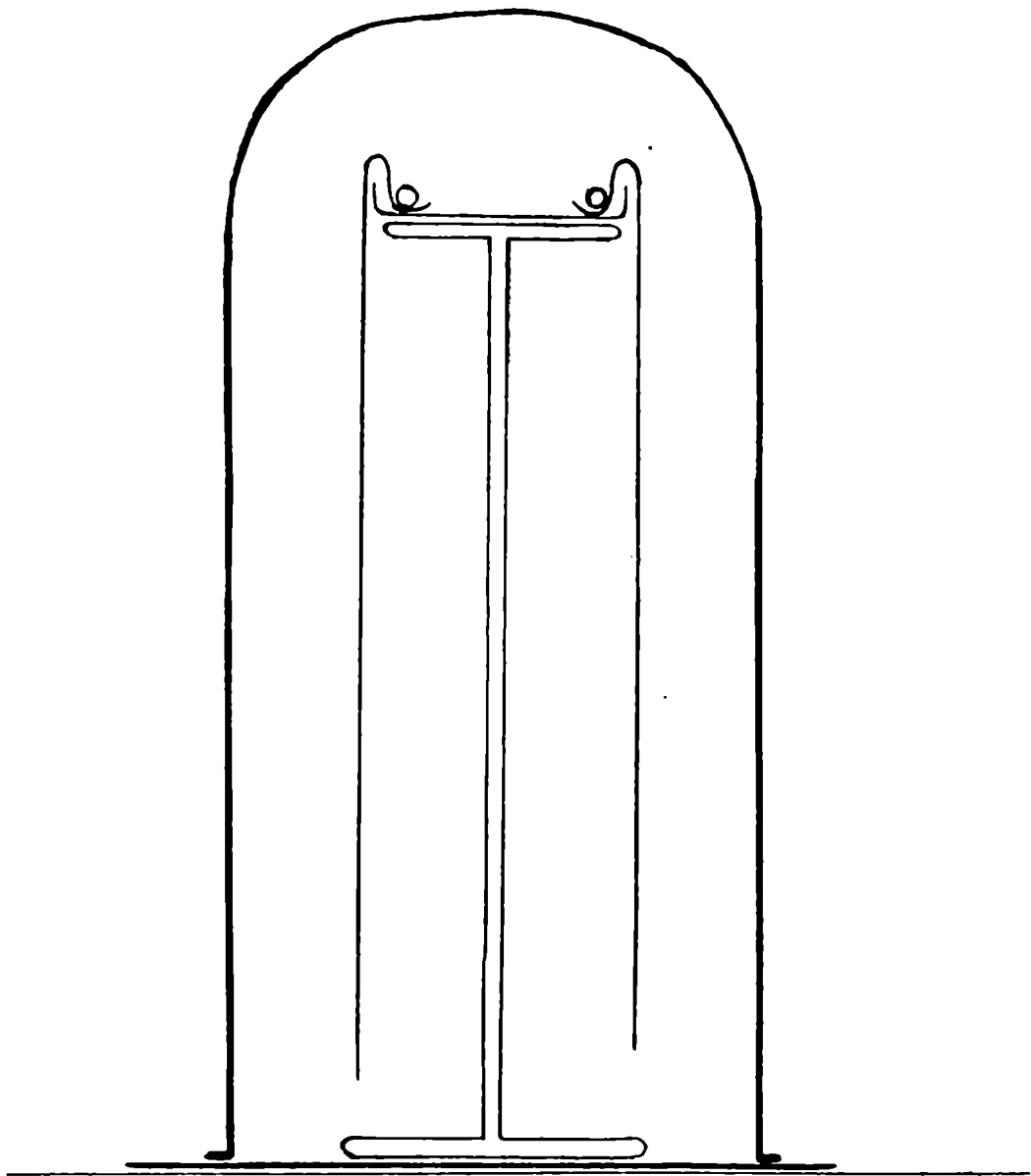


Fig. N°3

rativa se corrieron también aminoácidos puros para lo cual se prepararon soluciones de los mismos en alcohol isopropílico al 10% en agua y conteniendo 5 mg. de aminoácido en 2 ml. Mediante ellas se determinaron los Rf correspondientes a cada uno para los solventes y condiciones de trabajo empleados. Para revelar los cromatogramas se empleó la siguiente solución:-

Reactivos C: solución de ninhidrina 0,15% en butanol normal.-

C)- DETERMINACIONES INMUNO-QUIMICAS.-

a) Obtención de sueros específicos:-

Los sueros específicos se obtuvieron por inoculación a conejo de suspensiones bacterianas. Se hicieron aislamientos sucesivos por estría en placas de Petri. El medio utilizado fué agar nutritivo glucosado 1%. Se seleccionaron las colonias más opacas por sucesivos pasajes y se estrilaron en tubos de agar inclinados con el mismo medio. Luego el desarrollo de cada tubo se suspendió en 3 ml. de solución fisiológica 0,4% formolada. Se inoculó esta suspensión por vía endovenosa a un conejo, en dosis crecientes, utilizando para ello la vena marginal de la oreja. Comenzó por inocularse una dosis de 0,1 ml. de una dilución 1:10 de la suspensión bacteriana y se llegó hasta una dosis de 2 ml. de la suspensión directa, dejando tres días de intervalo entre dos inoculaciones. Se efectuaron sangrías de prueba por la oreja antes de sangrar el conejo y se probó el suero contra suspensiones de bacterias formoladas y calentadas o no a 100°C durante 2.1/2 horas. Cuando ambas pruebas resultaron positivas en la técnica de aglutinación rápida en placa de vidrio, se procedió a sangrar el

conejo por carótida. Se aseguró el conejo a una pequeña mesa, se dejó al descubierto la carótida, se ligó en dos puntos distantes 1 cm. entre sí, se aplicó una cánula a la rama proveniente del corazón y se soltó su ligadura recogiendo la sangre estérilmente en un erlenmeyer. Se dejó coagular y colocó 2 horas en estufa de 37°C. y luego 24 horas en heladera para facilitar la retracción del coágulo.-

Se decantó el suero y centrifugó, se ajustó el pH a 7.05 se calentó en baño maría durante media hora a 56°C para descomplementarlo y luego se agregó 1 ml. de solución de fenol en éter al 90% por cada 60 ml. de suero.-

Se filtró por papel y conservó en heladera en frasco de 100 ml. de tapa esmerilada. Para obtener el suero B7 puro se procedió por absorción de los anticuerpos 086 mediante suspensión de bacterias 086:B9 calentada a 100°C. durante 2.1/2 horas para destruir el antígeno B.-

Para llevar a cabo la absorción se sembraron 25 placas de Petri con agar nutritivo glucosado con 1 ml. cada uno de cultivo de 24 horas en caldo nutritivo y diluido luego en agua de peptona, se incubaron durante 24 horas a 37°C., y se suspendieron cada una con 2 ml. de solución fisiológica 0.4% formolada. Se centrifugó, lavó y suspendió en 5 ml. de suero 086:B7 incubándose durante 24 horas a 45°C.-

Se centrifugó y probó el suero con suspensión espesa de la bacteria homóloga. Siendo positiva la reacción se procedió a absorber el suero con más masa 086:B9 calentada, incubando 2 horas a 45°C., y luego 48 horas en heladera.-

b) Determinación de nitrógeno de anticuerpos en los sueros específicos (15).-

1)- Nitrógeno de aglutininas.- Se absorbieron los anticuer

pos de los sueros con masa bacteriana obtenida en la forma que sigue. Se prepararon cultivos en caldo nutritivo, que se incubaron durante 24 horas a 37°C., a partir de una colonia bien opaca. Se sembraron placas de Petri con agar nutritivo glucosados, en superficie, con 1ml. cada una, del cultivo en caldo. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y se suspendió el desarrollo en solución fisiológica formolada al 0,4%. Se centrifugó y lavó varias veces con agua destilada. Se suspendió en agua destilada, se tomó 1 ml., se llevó a sequedad al baño maría y luego hasta peso constante en estufa de 105°C. Se ajustó la suspensión a 10 mg. de masa bacteriana seca por ml. utilizando solución fisiológica 0,4% formolada. El tratamiento de la masa bacteriana depende del tipo de anticuerpos a determinar. Para el caso de los anticuerpos "0" se calienta previamente la suspensión durante 2.1/2 horas a 100°C antes de proceder al lavado. En el caso de determinar aglutininas OK se empleó la suspensión formolada y lavada. Para la determinación de nítrógeno de anticuerpos se preparan en sendos tubos de 8 x 100 mm. y por duplicado, las cantidades de suero y de solución fisiológica que se indican en el cuadro N.5.-

C u a d r o N.5

R e a c t i v o s	T u b o s		
	1	2	3
Suero específico.....	1 ml.	-	1 ml.
Sol. fisiológica.....	0,5 ml.	1,5ml.	e.s.p. volumen final igual a tubos 1 y 2.-

A los tubos 1 y 2 se agregaron 0.5 ml. de suspensión bacteriana conteniendo 10 mg. de masa seca de bacterias y se incubaron los 3 tubos a 37°C en baño de agua. Al cabo de 1 hora se investigó la presencia de aglutininas en el tubo 1 y en caso positivo se agregaron 0.5 de la misma suspensión bacteriana incubando una hora más. Se practicó entonces otra prueba de aglutinación y si el sobrenadante permanecía límpido debido a la aglutinación de las bacterias agregadas se agregó otro volumen de 0.5 ml. de suspensión y se continuó la incubación. Se procedió de la misma forma hasta obtener un sobrenadante turbio debido al exceso de bacterias agregadas. De esta manera se obtuvo la seguridad de haber agregado un exceso de antígeno, de modo tal que todo el nitrógeno de anticuerpos específicos estuviera en el precipitado. Se incubó 1 hora a 37°C luego del último agregado y 48 horas más a 0-5°C.-

2)- Nitrógeno de precipitinas.- Se hace la salvedad que se acepta la identidad entre precipitinas y aglutininas, pero se emplea el término precipitinas debido al distinto estado de dispersión del antígeno empleado en su determinación. En efecto, en este caso el antígeno está soluble a diferencia de la suspensión bacteriana.-

En regla general, la técnica empleada fué la misma que en el caso de las aglutininas excepto que se usaron una serie de tubos con cantidades crecientes de antígeno. Se trató de no tener un exceso grande de anticuerpos, para evitar el conocido efecto disolvente en la zona de anticuerpo en exceso (15).-

En el cuadro N.6 figura el esquema de las determinaciones efectuadas.-

Se utilizó una solución de antígeno conteniendo 250 γ /ml., previamente centrifugada. Se prepararon prime-

C u a d r o N.6

R e a c t i v o s	T u b o s					
	1	2	3	4	5.	6
Suero específico..	1 ml.	1 ml.	1 ml.	1 ml.	-	1 ml.
Solución fisioló- gica.....	2.5 ml.	2 ml.	1 ml.	-	3 ml.	3 ml.
Solución antige- no.....	0.5 ml.	1 ml.	2 ml.	3 ml.	1 ml.	-

ro los tubos 1, 2, 5 y 6 e incubó 2 horas a 37°C. Al observarse precipitación en los tubos 1 y 2 se prepararon los tubos 3 y 4 e incubaron todos 2 horas más. Luego se pasó a heladera 48 horas.-

3)- Determinación de Nitrógeno de anticuerpos no precipitables.-

En determinado momento del trabajo se decidió de acuerdo con (18) investigar la presencia de anticuerpos no precipitables y complejados de tal forma que permaneciesen solubles en el suero. Se sigue la técnica indicada en (18) y que se detalla a continuación; a 5 ml. de suero se agregó 1 ml. de suspensión bacteriana conteniendo 1 mg. de masa seca y se dejó 11 días en la heladera. Se ajustó entonces el pH a 12 y a los 6 minutos se neutralizó nuevamente. A 4 ml. del suero así tratado se agregó suspensión bacteriana y se dejó 11 días en la heladera. Un volumen igual se colocó en iguales condiciones pero sin el agregado de suspensión bacteriana. A los tiempos indicados se determinó nitrógeno en los precipitados previa separación y lavado de los mismos tal como se indica en 4). El precipitado en el suero sin tratar con masa bacteriana, corresponde a anticuerpos solubles.-

4)- Tratamiento de los precipitados obtenidos.- Luego de la incubación de los tubos en las condiciones establecidas en cada caso se procedió a centrifugarlos durante 45' a 3.000 revoluciones por minuto y a 5°C. Se decantaron los sobrenadantes y conservaron con el fin de observar detenidamente si eran perfectamente lípidos. Los tubos con los precipitados aglomerados se invirtieron sobre un papel de filtro y luego se colocaron en un baño de agua helada. Se mantuvieron en frío mientras se lavaban éstos, primero con 4 gotas de

solución fisiológica fría, que se dejaron deslizar por las paredes del tubo, y en cuyo volumen se suspendieron. Luego se agregaron 2 ml. de solución fisiológica para completar el lavado y se dejaron actuar 5' en frío. Se centrifugaron nuevamente en iguales condiciones que anteriormente y repitió el lavado. Al decantar el líquido debe cuidarse especialmente el tubo con masa bacteriana pues tiene tendencia a escurrir. Luego de centrifugado por tercera vez se suspendieron los precipitados en agua destilada y transvasaron cuantitativamente a un baloncito de Kjeldahl. Se agregaron 2 gotas de solución de HONa concentrado, para lavar bien las paredes del tubo ayudándose de una varilla de vidrio se diluye con agua y transvasa al baloncito de Kjeldahl. Luego se sigue según la técnica indicada en B-f: determinación de nitrógeno.-

o) Técnica de precipitación en medio sólido: (Oudin) (19).

Se basa en la formación de bandas de precipitación por acción del antígeno soluble que avanza por difusión a través de un gel que contiene anticuerpos específicos en concentración constante. Esta es la técnica llamada de "simple difusión" por Oudin. El antisuero se mezcló con el agar fundido y enfriado a 40-45°C y se colocó en un tubo de 6 mm. de diámetro y 12 cms. de largo cerrado con parafina en uno de sus extremos. Para llenarlo con agar se utilizó una pipeta Pasteur que se introducía hasta el fondo del tubo. Se llenó hasta una altura de 8 cms. Como preservativo se agregó merthiolate al agar en concentración de 1:5.000. Luego se colocó sobre la columna de agar-antisuero solidificada una solución conteniendo el antígeno. En el presente trabajo se utilizaron 3 diluciones diferentes de suero: 1/2 1/4 y 1/8 con sueros 086:B7 y 086:B9 y se colocó en la parte superior una solución del antígeno en

estudio. Los tubos se parafinaron para evitar la evaporación y se incubaron a temperatura ambiente (20°C) observándose cada 24 horas durante una semana. El antígeno avanza por difusión a través del gel, la concentración de este es pues mayor en la superficie de contacto y disminuye a medida que avanza. En la zona donde la concentración antígeno/anticuerpo, sea la óptima se observará una banda de precipitación. Si se obtienen varias bandas se tratará de un antígeno compuesto. La distancia a la cual se produce la banda es inversamente proporcional al poder antigénico. La densidad de precipitación dependerá de la concentración de anticuerpos.-

D)- Determinaciones biológicas.-

a) Valoración de toxicidad:- Se ensayó la toxicidad de la fracción activa por inyección intraperitoneal en ratones blancos de 25 g. Se utilizaron 3 lotes de 5 ratones cada uno. Cada lote se inyectó con una dilución diferente. Se observaron durante una semana. En general las muertes se produjeron a las 48 horas.-

b) Protección activa:-Las lauchas sobrevivientes inyectadas con la fracción activa se inyectaron luego de 5 días con la bacteria viva para determinar el grado de protección conferido. Se observaron durante una semana.-

c) Determinación del poder patógeno de Esch. coli 986.87.-

Con el objeto de determinar el poder patógeno de la bacteria estudiada se empleó un cultivo de 18-20 horas a 37°C en caldo nutritivo. Se hicieron sendas diluciones decimales en solución fisiológica y se inyectó con cada u-

na un lote de 5 ratones de 20-25 g. por vía intraperitoneal empleando 0.5 ml. en cada inyección. Se observaron durante una semana. Simultáneamente se hizo un recuento de las bacterias contenidas en el caldo original, sembrando 1 ml. de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} por duplicado en cajas de Petri y con agar nutritivo. Luego de incubar 24 horas a 37°C se practicó el recuento.-

Con dichos datos se conocía el número de bacterias inyectadas. Se calculó la DL50 aplicando el método de Reed y Muench (20).-

d) Poder antigénico:- Se inyectó un conejo por vía endovenosa con una solución de la fracción activa siguiendo uno de los siguientes esquemas de vacunación.-

1)- Solución pura de la fracción:- Las inoculaciones efectuadas se detallan en el cuadro adjunto.-

C u a d r o N.7

Inoculación	Días	Dilución	Volúmen inoculado
1a.	0	10 δ /ml.	0.1 ml.
2a.	3	10 δ /ml.	0.5 ml.
3a.	6	10 δ /ml.	1.5 ml.
4a.	10	100 δ /ml.	1.5 ml.
5a.	14	250 δ /ml.	1.2 ml.

2)- Empleo del alumbre de potasio como adyuvante - Se preparó una solución de alumbre de potasio al 1% y se disolvieron 7.5 mg. de fracción activa en 5 ml. de esta solución. Se agregó la cantidad teórica de HONa N/10 necesaria para precipitar cuantitativamente el hidróxido de aluminio y se continuó la inoculación del mismo conejo.-

C u a d r o N.8

Inoculación	Días	Dilución	Volúmen inoculado
6a.	17	1.5mgr/ml.	0.5 ml.
7a.	21	1.5mgr/ml.	1.0 "
8a.	24	1.5mgr/ml.	1.0 "

3)- Solución de la fracción conteniendo un complejo lipopolisacárido:- Se preparó una solución conteniendo 2 mg. de fracción activa y 5 de complejo antigénico lípido-proteína-hidrato de carbono proveniente del Esch.coli 0111:B4 en dos ml. de solución fisiológica formolada 0.4% y se inocularon al mismo conejo a los 10 días de la última inyección.-

e)- Antigenicidad en lauchas:- Las lauchas sobrevivientes del ensayo de toxicidad se sangraron por el corazón, y el "pool" de sueros se probó en aglutinación rápida con la bacteria homóloga en suspensión formolada calentada o no a 100°C durante 2.1/2 horas.

E)- TECNICAS DE AISLAMIENTO ENSAYADAS.-

a) Elección del solvente:-Se hicieron ensayos de extracción de fracciones biológicamente activas sobre lg. de masa bacteriana seca con el fin de decidir cual era el mejor solvente a utilizar. Se probaron los siguientes solventes:-

- 1)- Solución fisiológica (ClNa9 o/oo).-
- 2)- Acido acético 0,1 N.-
- 3)- Piridina 50%.-
- 4)- Etilene glicol.-
- 5)- Fenol 90%.-
- 6)- Acido tricloroacético 0,1 N.-
- 7)- Hidróxido de sodio 0,1 N.-
- 8)- Acido tricloroacético 4 N.-

Se colocó 1 gr. de masa bacteriana en sendos erlenmeyer de 250 ml. y se agregaron 100 ml. de solvente a ensayar. Se extrajeron por agitación durante 5.1/2 horas a temperatura ambiente en un "whistle shaker". Los sobrenadantes se centrifugaron a 2.500 revoluciones por minuto durante media hora, obteniéndose en algunos casos soluciones opalescentes. Dichos sobrenadantes se dializaron en bolsitas de celofán contra agua destilada a 4°C con cambio del agua cada 24 horas y hasta reacción negativa del solvente en el líquido dializado. Durante el desarrollo del trabajo se ensayó una técnica de extracción de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos previos mencionados más arriba. Sin embargo, tal como se indicará en el capítulo de resultados obtenidos dicha técnica fracasó por lo cual se intentó un segundo aislamiento que se mencionará también en esta sección.-

b) Obtención de fracciones activas:-

Extracción 1: Se suspendieron 50 gr. de masa bacteriana se-

ca en 300 ml. de solución fisiológica y se extrajo por agitación en una licuadora durante una hora tomando precauciones para evitar el excesivo calentamiento del líquido. Al cabo de dicho tiempo se centrifugó y el residuo se volvió a extraer en las mismas condiciones. Los extractos obtenidos mezclados se concentraron a vacío a temperatura no mayor de 70°C. Se filtraron luego por bujía Chamberland L2.-

Extracción 2:- Se tomaron 6 grs. de masa bacteriana residual de la extracción anterior y llevaron a 50 ml. con ácido acético 10% calentando a reflujo 10-16 horas. Se dializó y centrifugó a 3.000 revoluciones por minuto. Al residuo se le hizo una coloración de Gram. con el objeto de ver si había bacterias sin destruir. Como esto fué positivo se volvió a extraer en iguales condiciones. Se mezclaron los extractos y se precipitó con 1/2 vol. de acetona fría. Se centrifugó y al sobrenadante se agregaron 1.1/2 volúmenes de acetona. El precipitado se redisolvió en 50ml. de agua destilada y 10 ml. de bicarbonato de sodio 0,05 M. y se agregaron 60 ml. de acetona a 0°C. Se dejó 24 horas a esa temperatura y se centrifugó.-

El sobrenadante se trató con 60 ml. de acetona en frío, no observándose formación de precipitado, por lo cual se concentró al vacío obteniéndose una fracción que se rotuló F1b.-

.

III.- RESULTADOS OBTENIDOS.-A). Elección de solvente - Resultados.-

Los extractos obtenidos según E-a se titularon frente al suero 086:B7 en prueba de precipitación lenta, empleando volúmenes iguales de suero diluido 1/10 y sobrenadante, e incubando 2 horas a 37°C y luego 2½ horas de heladera a 5°C. practicando entonces las lecturas. En el Cuadro N.9 figuran los valores obtenidos.-

C u a d r o N.9

Títulos obtenidos con los extractos frente a un suero

086:B7

<u>S o l v e n t e</u>	<u>T í t u l o</u>
Acido acético 0,1 N.....	1/16
Acido tricloroacético 0,1 N.....	1/16
Etilene glicol.....	1/16
Piridina 50%.....	1/2
Hidróxido de sodio 0,1 N.....	1/356
Solución fisiológica.....	1/64
Fenol 90%.....	1/4
Acido tricloroacético ¼ N.....	1/4

El hidróxido de sodio se deshechó por disolver la masa bacteriana casi totalmente y por la alteración que e-

llo traía aparejado. Por lo tanto el solvente que se imponía era la solución fisiológica al 9%. y él se usó empleando la técnica indicada en E-b-1. No se obtuvieron los resultados esperados pues en éste caso el extracto no resulta antigénico.-

B). Fracción obtenida por tratamiento con ácido acético en caliente. Caracterización química.-

Esta fracción se obtuvo como se indicó en E-b-2, rotulándose F1b. La cantidad obtenida fué de 160 mg. Se efectuó la reacción de Dische resultando negativa (ausencia de nucleoproteínas). El extracto seco era parcialmente soluble en agua dando una solución opalescente. Centrifugando sedimentaba un pequeño residuo. La fracción soluble representaba el 84,6% del total (F1c). Con ésta se efectuaron todas las pruebas químicas.-

Se tituló frente a suero O86:B7 diluido al 1/10, obteniéndose precipitación hasta una dilución de 7,8 γ /ml.-

En el Cuadro N.10 figuran los resultados de las determinaciones químicas efectuadas.-

Como de los datos químicos surgiría que la fracción aislada era una proteína, se trató de identificar cuantitativamente, cuales aminoácidos la constituían. Para ello se practicó cromatografía en papel, del hidrolizado obtenido tal como se indicó en la parte experimental.-

Con el objeto de obtener los valores de Rf en nuestras condiciones de trabajo se corrieron también soluciones puras de aminoácidos. Estos valores figuran en el Cuadro N. 11.-

En el cuadro N.12 figuran los valores de Rf obtenidos al correr el hidrolizado con los dos solventes que se indican en la parte experimental. De ellos, y por comparación con los valores del Cuadro N.11 se ha podido identi-

C u a d r o N. 10

Reacción de Molisch	Reacción de Biuret	Lípidos (1)	Nitrógeno	Azúcares (2)
Positiva (x)	Positiva	No contiene	11.7%	No contiene

- (1) Material hidrolizado 2.1/2 horas con SO_4H_2 1N en tubo cerrado a 100°C .-
- (2) Material hidrolizado 6, 12 y 24 horas en iguales condiciones.
- (x) Comparar con columna 5.-

C u a d r o N.11

Valores de Rf de aminoácidos puros obtenidos con dos sistemas de solventes (Monodimensional, ascendente).-

Aminoácido	Fenol- agua	Buñanol- acético	Color al revelar con ninhidrina.
Glicocola.....	0,36	0,16	Lila
Arginina.....	0,60	0,11	Violeta
Acido glutámico	0,27	0,17	Violeta
Cisteína.....	0,59	0,23	Rojo
Cistina.....	0,10	0,05	Rojo
Alanina.....	0,53	0,20	Violeta
Fenilalanina...	0,79	0,57	Violeta
Guanina.....	0,84	0,53	Violeta
Prolina.....	0,90	0,22	Amarillo
Hidroxiprolina.	0,64	0,14	Amarillo
Histidina.....	0,67	0,07	Violeta
Tirosina.....	0,58	0,35	Violeta
Treonina.....	0,45	0,17	Violeta
Asparagina.....	0,40	0,08	Violeta
Metionina.....	0,80	0,42	Violeta
Lisina.....	0,50	0,06	Violeta
Serina.....	0,32	0,13	Violeta
Leucina.....	0,84	0,63	Violeta
Isoleucina.....	0,84	0,60	Violeta
Norleucina.....	0,84	0,65	Violeta
Triptofano.....	0,76	0,56	Violeta

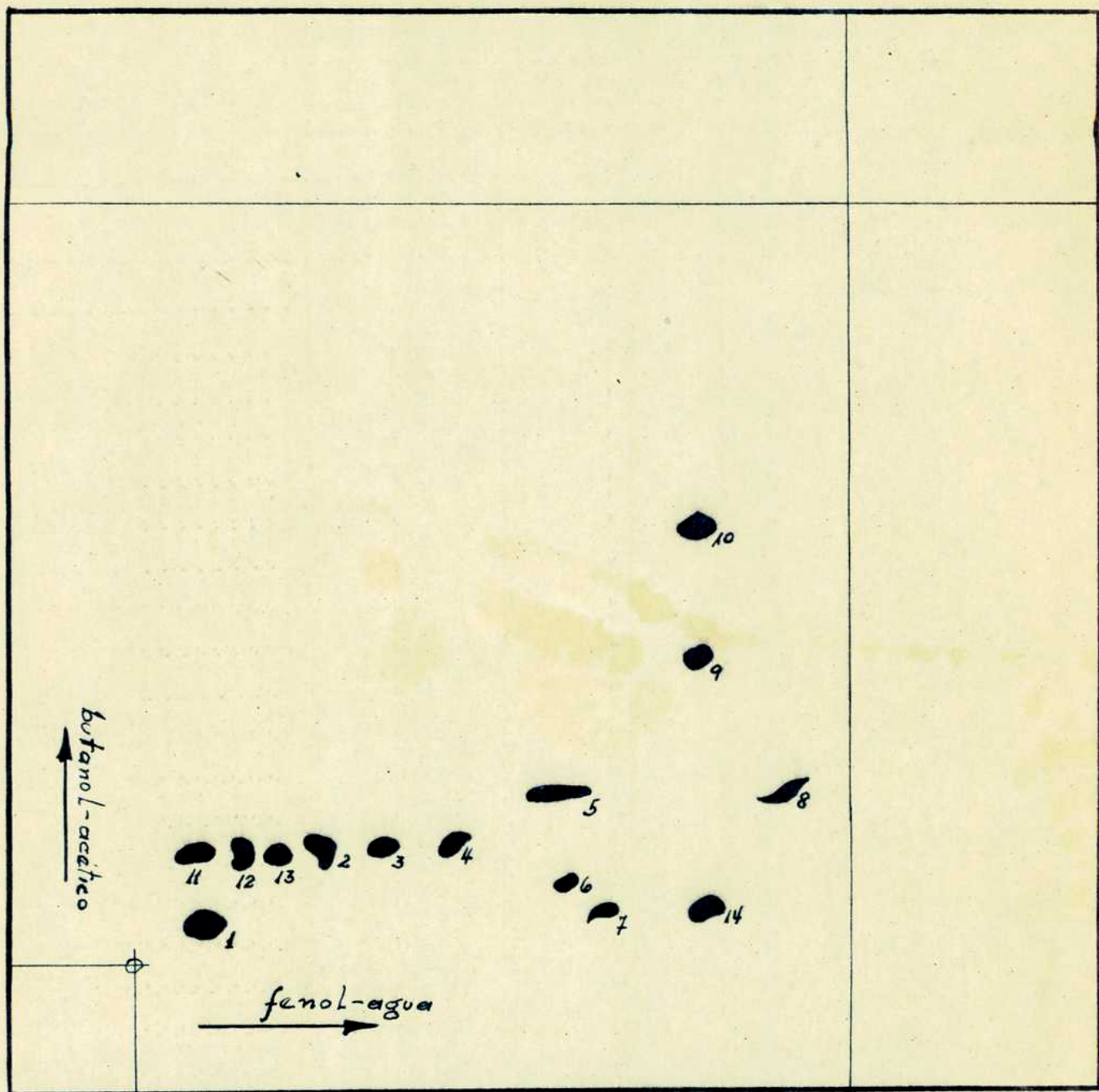


Fig. N°4

car 10 aminoácidos sobre un total de 14.-

En todos los casos los valores de los Rf se han obtenido por promedio de por lo menos 2 determinaciones. Las diferencias mayores obtenidas fueron del orden de 0,04 Rf.-

La figura N.4 presenta el cromatograma correspondiente.-

C). Resultados de las determinaciones inmunológicas efectuadas.-

En el cuadro N.13 figuran los valores de nitrógeno de anticuerpos de un suero 086:B7, determinado con Esch. coli 086:B9 calentado a 100°C durante 2 horas (titulación de anticuerpos "0") y una mezcla de Esch. coli 086:B7 formolado y Esch. coli 086:B9 calentado como se indicó.-

Se puede observar que el suero titulado contenía 0,112 mg/ml. de nitrógeno de anticuerpos para el antígeno B7. Con el mismo suero se practicó una valoración con cantidades variables de F1c. Los valores correspondientes figuran en el Cuadro N.14.-

A pesar de la incertidumbre que hay implícita en la determinación, por la imposibilidad de determinar si ha quedado F1c sin precipitar, los datos permiten asegurar que F1c es un antígeno incompleto.-

Para completar el estudio de F1c se practicó la reacción de Oudin en medio sólido, tal como se indicó en la parte experimental. La figura N.5 es una representación de lo obtenido con los dos sueros 086:B7 y 086:B9 diluidos al medio con agar, empleando este último para ver si F1c está relacionado al antígeno "0". De ello puede concluirse que la F1c está al parecer homogéneamente relacionada al antígeno "0" y es poco activa, lo que robustece la idea de que es un antígeno incompleto.-

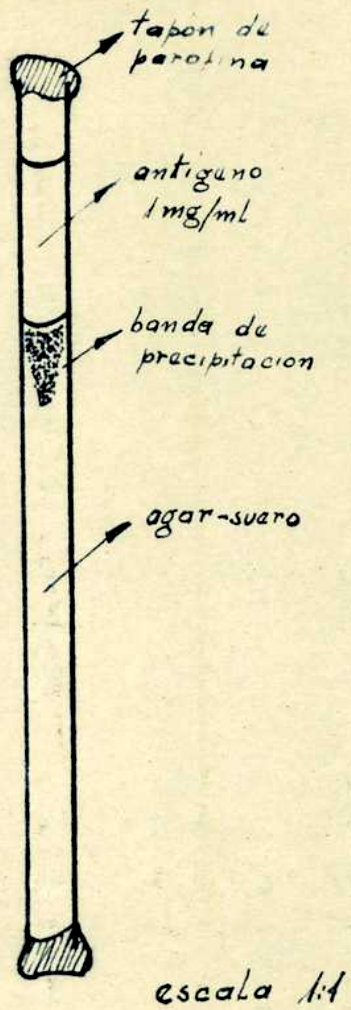


Fig. N°5

C u a d r o N.12

Resultado obtenido en la cromatografía bidimensional del hidrolizado de Fic

Mancha N	Rf fenol-agua	Rf Butanol-acético	Color con ninhidrina	Aminoácido
1	0.10	0.05	Rojo	Cistina
2	0.26	0.17	Violeta	Acido glutá- mico
3	0.36	0.16	Lila	Glicocola
4	0.44	0.17	Violeta	Treonina
5	0.60	0.23	Rojo	Cisteína
6	0.60	0.11	Violeta	Arginina
7	0.67	0.07	Violeta	Histidina
8	0.91	0.22	Amarillo	Prolina
9	0.80	0.40	Violeta	Metionina
10	0.79	0.57	Violeta	Fenil-alani- na
11	0.08	0.15	Rojo	-
12	0.17	0.15	Rojo	-
13	0.22	0.15	Rojo	-
14	0.83	0.08	Violeta	-

C u a d r o N. 13

Contenido de nitrógeno de anticuerpos de un suero 086:B7

A n t í g e n o s	Nitrógeno de Anticuer- pos mg/ml.
<u>Esch. coli 086:B9</u> calentado 2 horas a 100°C.....	0.194
<u>Esch. coli 086:B9</u> calentado 2 horas a 100°C y <u>Esch.</u> <u>coli 086:B7</u> formo lado.....	0.306

C u a d r o N. 14

Nitrógeno de anticuerpos precipitado por el F10 de
un suero 086:B7.

Antígeno agregado	Nitrógeno de antígeno agregado	Nitrógeno total precipitado
125 δ	14,67 δ	34 δ (x)
250 δ	29,25 δ	30 δ (x)
500 δ	58,5 δ	26 δ (x)
750 δ	87,75 δ	- (x)

(x) Todos los sobrenadantes aglutinaron a Esch. coli 086:B7 formolado o calentado a 100°C durante 2 horas.-

D). Resultados obtenidos en las pruebas biológicas.-

En el cuadro N.15 figuran los resultados de la prueba de toxicidad de F10. Como puede observarse, ésta es nula.-

C u a d r o N.15Toxicidad de F10 para el ratón

mg. de F10 inyectados	Ratones muertos sobre inyectados
1.0	0/5
0.5	0/5
0.05	0/5

En el cuadro N.16 se indican los resultados obtenidos al titular el poder patógeno de Esch. coli 086:B7 y el cálculo de la D150 correspondiente.-

Conocido el D150 del Esch. coli 086:B7 se procedió a realizar una prueba de vacunación activa a ratones. Para ello se vacunan por vía intraperitoneal con las dosis que se indican en el Cuadro N.17, donde también figuran los resultados obtenidos al infectar dichas lauchas con 1,3 D150 al cabo de 5 días de vacunarlas.-

La vacunación activa en ratón, si bien obtenida con una dosis elevada de F10 (1 mg.) indica que aún tratándose de un antígeno incompleto puede tener acción vacuante.-

Esto que es cierto para el ratón parece no serlo

C u a d r o N. 16

Poder patógeno del Esch. coli 086:B7

Dosis inyectadas millones de bacterias	Ratones		Ratones		% mortalidad
	vivos	muertos	vivos	muertos	
2	5	0	11	0	0,0
20	4	1	6	1	14,3
200	2	3	2	4	66,6

50 = %mortalidad dosis menor

$$\begin{aligned} \text{distancia proporcio} &= \frac{50 - \%mortalidad \text{ dosis menor}}{\text{diferencia \% mortalidad}} \\ &= \frac{50 - 14,3}{66,6 - 14,3} = 0,8738 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log. D150 &= \log. \text{ dosis menor} + \text{dist. prop.} \times \log. \text{ factor dil.} \\ &= \log. 20 + 0,8738 \times \log. 10 \\ &= 1,3010 + 0,8738 = 2,1748 \end{aligned}$$

D150 = 149,5 millones.-

para el conejo, en el cual no fué dable obtener un suero específico, aún probando distintas técnicas de inmunización. Sin embargo y para reforzar la idea del antígeno in completo, al aplicar la técnica de determinación de anticuerpos no precipitables según se indicó en C-b-3 se obtuvo un valor de 56 \times de nitrógeno de anticuerpos por ml. de suero.-

C u a d r o N. 17
Vacunación activa de ratones con F1c.-

mg. de F1c inyectados	N. de ratones muertos sobre inyec- tados, al infectar los vacunados con D150 de <u>Esch. coli</u> 086:B7
1.0	0/5
0.5	1/4
0.05	3/5

Por otra parte el ratón se computó como mejor sujeto para la obtención de sueros específicos para F1c ya que los animales inyectados con 0,5 mg. de dicha fracción, sangrados por el corazón a los 6 días de inyectados, permitió obtener un suero que no aglutinaba a Esch. coli 086:B7 viva pero lo hacía fuertemente con la misma bacteria calenta da a 100°C durante 2 horas. Esta es otra prueba que F1c se encuentra relacionada al antígeno "0".-

.

IV.- D I S C U S I O N . -

El primer hecho que se debe comentar es el fracaso práctico del solvente seleccionado en pruebas previas: es te es la solución de cloruro de sodio al 9%.-

Si bien los dos procesos, el previo y el de extrac ción, fueron realizados en forma distinta, ya que uno lo fué agitando suavemente y el segundo mediante una licuado ra, no creemos que este haya sido el motivo de la no ex- traacción del antígeno. Tal vez, y sólo como hipótesis, po- demos suponer que ha habido una degradación del antígeno por el calentamiento de la masa al ser tratada con la li- cuadora.-

La obtención de la F1b y sus características es na tural, si se tiene en cuenta que el tratamiento es muy drástico. Ello ha llevado a una ruptura evidente del antí geno del cual sólo hemos recuperado la fracción proteica. Esto siempre y cuando admitamos que el antígeno del 036:B7 es un complejo lípido-hidrato de carbono-proteína. Desde luego que tampoco fué dable obtener ninguno de los otros dos componentes, de los cuales, el hidrato de carbo no, hubiera aparecido durante el proceso de purificación de extracto acético. También podemos suponer que la F1b constituye una fracción externa de envoltura de la bacte ria y la primera que puede separarse por tratamiento quí- mico. La F1b constituye una fracción evidentemente impu- ra, ya que fué posible separarla en dos: F1c soluble y un residuo.-

La F1c, de acuerdo al Cuadro N.10, constituye evi- dentemente una proteína sin ninguna contaminación de áci- dos nucleicos. En esta parte podemos hacer un comentario sobre la reacción de Molisch, que nos dió positiva a pe- sar que el producto (F1c) hidrolizado en distintas condi-

ciones y analizado por cromatografía y dosaje de hidratos de carbono reductores, no demostró contener ningún azúcar. Por otra parte el contenido de nitrógeno, transformado en proteínas, no aporta el 100% de F1c. De acuerdo a nuestras determinaciones no podemos concluir sobre el casi 30% restante.-

La composición química de F1c, analizada por cromatografía, da una composición de aminoácidos corrientes.- Las cuatro manchas no identificadas pueden ser o bien péptidos pequeños o aminoácidos no identificados.-

Por lo que respecta a las determinaciones inmunológicas y biológicas podemos decir que el suero empleado (086:B7) contenía 0,112 mg. de nitrógeno de anticuerpos específicos para el factor B7, hecho que suge del Cuadro N.13. A pesar de ello, F1c ha sido incapaz de absorber totalmente los anticuerpos del suero, pues del Cuadro N. 14 podemos concluir que hay sólo una precipitación parcial, no sabemos de que anticuerpos, si los específicos para el "O" o para el "B", pero el hecho real es que F1c es un antígeno incompleto. El análisis según Oudin realizado en comparación con dos sueros, uno obtenido con 086:B9, que tiene anticuerpos B9, no relacionados al B7, y otro 086:B7, dió el mismo cuadro, lo que casi llevaría a suponer que F1c está asociado al antígeno "O" y que es poco reactivo, ya que la zona se ha formado en la interfase de las capas antígeno y suero.-

Es notable además el hecho de la poca toxicidad para el ratón (Cuadro N.15). La prueba del poder antigénico para el conejo fué negativa, aún cuando se inyectó F1c con un adyuvante como el hidróxido de aluminio y luego en presencia de un complejo lípido-hidrato de carbono-proteína, que aumenta la antigenicidad de las proteínas. Es por ello que no se pudo obtener un suero específico para ella. Sin embargo fué posible determinar la presencia de

anticuerpos no precipitables, lo que indicaría un poder antigénico real, pero limitado, de F1c.-

La vacunación activa fué un hecho promisorio. Ratoncillos inyectados con 1 mg. de F1c resistieron la posterior inyección de 1,3 D150 de Esch. coli 086:B7. Lamentablemente, la poca cantidad de F1c, no permitió ampliar este estudio y probar a dichos animales con dosis infectantes más elevadas de Esch. coli 086:B7.-

.

V.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.-

- 1). Se han ensayado distintos métodos de extracción de antígenos bacterianos.-
- 2). Se ha obtenido una fracción soluble, F1c, compuesta en su mayor parte por proteínas.-
- 3). No se han identificado lípidos ni hidratos de carbono en F1c, a pesar de dar reacción de Molisch positiva.-
- 4). Se han caracterizado, excepto 4, todos los aminoácidos que constituyen la F1c.-
- 5). Se han realizado pruebas inmunoquímicas con el objeto de aclarar la relación de F1c con los antígenos del Esch.coli 086:B7. De ellas parece surgir que se trata de un antígeno incompleto, relacionado al antígeno "O".-
- 6). Por inyección al conejo produce anticuerpos no precipitables.-
- 7). No es tóxica para el ratón y lo protege contra la inyección con 1,3 D150 de Esch. coli 086:B7.-

.

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

- 1).. A. BOIVIN y L. MESROBEANU, Compt. Rend. Soc. Biol.,
113, 490. (1933).-
- 2).. A. BOIVIN y L. MESROBEANU. Rev. Immunol., 1, 553.
(1935).-
- 3).. A. BOIVIN y L. MESROBEANU. Rev. Immunol., 2, 113.
(1936).-
- 4).. A. BOIVIN y L. MESROBEANU, Compt. Rend. Soc. Biol.,
128, 5. (1938).-
- 5).. A. BOIVIN.- Ann. Inst. Pasteur. 61, 426, (1938).-
- 6).. A. BOIVIN.- Rev. Immunol., 6, 86, (1940).-
- 7).. M. F. GOEBEL, F. BINKLEY y E. PERLMAN, J. Exp. Med.,
81, 4, 315. (1945).-
- 8).. E. E. BAKER, W. F. GOEBEL y E. PERLMAN. J. Exp. Med.,
89, 3, 325. (1949).-
- 9).. W. T. MORGAN y S. M. PARTSIDGE, Biochem. J., 35, 10
y 11, 1140, 1163 (1941).-
- 10).. D. A. L. DAVIES, W. T. J. MORGAN y W. MOSMANN. Biochem.
J., 56, 4, 572. (1954).-
- 11).. MARION E. WEBSTER, MAURICE LANDY y MONDIE E. FREEMAN.
J. Immunol., 69, 2, 135. (1952).-
- 12).. O. WESTPHAL y O. LÜDERITZ, Angewandte Chem., 66,
13/14, 407-417. (1954).-
- 13).. L. THOMAS.- Ann. Rev. Phys., 16, (1954).-
- 14).. F. KAUFFMAN.- J. Immunol., 57, 1, 71. (1947).-
- 15).. ELVIN A. KABAT y M. MANFRED MAYER.- Experimental Im-
munochemistry. C. Thomas Publisher.-
Springfields, Ill. U.S.A.-
- 16).. A. R. STILES, W. H. PETERSEN y E. D. FRED.- J. Bat.,
12, 427. (1926).-
- 17).. R. J. BLOCK, R. LE STRANGE y G. ZWEIG. Paper Chromto-
graphy. Londres, Chapman & Hall. Ltd.-

: . . . : : : . . . :

- 18).. LUDWIG R. STERNBERG, S.F. FEINBERG, M.E. CLARKE.-
J. Exp. Med., 103, 523. (1956).-
- 19).. ELMER L. BECKER.- Federation Proceedings, 12, 717,
(1953).-
- 20).. L. J. REED and H. MUEHCH.- Ann. J. Hyg., 27, 493.
(1938).-

*Financ**C. Alberto Costa*

.....