



(16) IS (17) (18)

NUMERO	447.313	(19) A1
FECHA DE PRESENTACION	25-4-76	

1 JUL 1977

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMEROS: 57.200	(32) FECHA: 25-4-75	(33) PAIS: ESTADOS UNIDOS
--	------------------------	------------------------------

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	---	--

(64) TITULO DE LA INVENCIÓN
UN PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE PILOS DE N. GONORRHOEAE.

(71) SOLICITANTE (S)
BACTEX, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
4307 Bigelow Blvd. Pittsburgh, Pa. 15213, U.S.A.

(72) INVENTOR (ES)
CHARLES C. BRINTON, JOHN C. McMICHAEL, ambos de nacionalidad estadounidense.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan productos en barra sencilla y cristalinos derivados de los pilos de los organismos Neisseria gonorrhoeae Tipo 1 y Tipo 2. Se proporcionan métodos de cultivo de estos organismos para producir el máximo rendimiento de pilos y procedimientos para purificar estos pilos y producir el material cristalino citado. Además se dan métodos de utilización de dichos pilos para determinar la presencia, en un sistema infectable por organismos N. gonorrhoeae, de anticuerpos de los pilos de dichos organismos y métodos para serotipificar dichos pilos. También se proporciona una forma de utilización de dicho material cristalino para obtener un grado sustancial de inmunización a la infección por N. gonorrhoeae en sistemas mamíferos susceptibles a dicha infección.

15 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La infección causada por el organismo Neisseria gonorrhoeae, comúnmente conocida como gonorrea, es una enfermedad venérea extraordinariamente extendida entre los seres humanos. La enfermedad habitualmente se manifiesta por una descarga visible en los varones pero frecuentemente no es detectada y es indetectable por síntomas externos en las hembras infectadas con ella. Hasta ahora, la única forma fiable de detección de la infección ha sido cultivar las descargas o humores mucosos que se cree que contienen el

1 organismo. Estos cultivos tardan más de un día en crecer.
Debido al oprobio social unido a la enfermedad y la reluctan-
cia de muchas personas infectadas con ella a volver a la clí-
nica de análisis, hace tiempo que se desea obtener un método
5 de selección que pueda dar una indicación fiable de posible
infección o no infección en un tiempo durante el cual sea
razonable pedir al sujeto analizado que permanezca en la
clínica.

Además, hasta ahora no se ha desarrollado ningún
10 método de inmunización contra la infección por el organismo
de N. gonorrhoeae en los seres humanos. Uno de los mayores
problemas asociados con la investigación en este campo ha
sido el hecho de que el organismo aparentemente solo infecta
al hombre y a los chimpancés y, aunque existe un grado razo-
15 nable de relación entre los resultados obtenidos en los
chimpancés y en los seres humanos, esta relación no es abso-
luta. Los chimpancés, aunque razonablemente satisfactorios
como modelo de investigación, son extraordinariamente costo-
sos como sujetos de investigación.

20 Se han caracterizado cuatro variantes coloniales
distintas de Neisseria gonorrhoeae. Estas cuatro variantes
caen dentro de dos categorías distintas. Las variantes T₁
y T₂ producen una infección experimental en voluntarios huma-
nos mientras que no se sabe que los tipos T₃ y T₄ produzcan
25 infección. El primer grupo puede distinguirse del segundo en

1 la observación de que el primer grupo posee estructuras
filamentosas sobre la superficie de las variantes colonia-
les mientras que el segundo grupo está desprovisto de es-
tas estructuras filamentosas. Estos filamentos son denomi-
5 nados pilos gonocócicos (en adelante pilos G.C.). En 1973,
se publicaron dos trabajos que mostraban el aislamiento de
pilos T₁ y T₂ de N. gonorrhoeae y además indicaban la for-
mación de una respuesta anticuerpo a los mismos (Buchanan
y colaboradores, J.Clin.Invest. 52, 2896-2909 (1973) y
10 Punsalang y Sawyer, Infect. Inmun. 8, 255-263 (1973)).
Véase también: Buchanan y colaboradores, J.Clin.Invest. 51,
17A (1972). En la referencia 41 del trabajo de 1973, se
indica que el método básico utilizado por Buchanan ha sido
puesto a punto por Charles C. Brinton, uno de los presentes
15 inventores (C.C. Brinton, Trans. N.Y. Acad. of Sci. 27,
1003 (1965)), así como por Punsalang y Sawyer.

El método de Brinton fué puesto a punto para
el estudio de los pilos de E. coli. Los solicitantes han
intentado repetir el trabajo de Buchanan y colaboradores
y han encontrado que los procedimientos allí indicados no
20 permiten de ninguna forma obtener pilos de N. gonorrhoeae.
Se ha preparado un estudio detallado estableciendo compara-
ciones entre el trabajo de Buchanan y el trabajo de los so-
licitantes descrito y reivindicado aquí, que está listo pa-
25 ra su publicación.

1 Comparando los métodos utilizados por Buchanan
y colaboradores con los métodos utilizados por los soli-
citantes de esta invención, se observa que los métodos
de Buchanan y los de Punsalang y Sawyer están de hecho
5 excelentemente proyectados para separar los pilos G.C.
del producto obtenido por este procedimiento y que si, por
casualidad, se consigue una respuesta inmunológica al mate-
rial piloso alegado con el producto de Buchanan, esta de-
be considerarse debida a los artefactos o a defectos del
10 método tal como se pretendía realizar.

Los solicitantes creen saber que en el momento
de presentar esta solicitud de patente, Buchanan ha recono-
cido los defectos de su trabajo, aunque hasta la fecha no
se ha publicado ninguna retracción.

15

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se refiere a la provisión de pilos
purificados de organismos Neisseria gonorrhoeae tipo T₁ y
T₂ así como a las subvariantes T_R de los mismos, si se de-
sea, en forma cristalina (en adelante cristales de pilos GC).

20

Los pilos GC se aíslan de un cultivo superficial o
de un cultivo en un líquido profundo del organismo corres-
pondiente. El método de cultivo superficial y profundo de
células de N. gonorrhoeae es prácticamente convencional. En
una modificación del método de cultivo profundo, para favore-
25 cer la purificación, se agrega al cultivo un medio inerte de

1 reacción, de gran superficie específica. Se ha encontrado adecuada una tierra de diatomeas como el Celite.

5 En el caso del crecimiento superficial, todo el crecimiento, es decir, las células y los pilos se retiran del medio de cultivo y se suspenden en un medio acuoso a un pH predeterminado inferior a 9,2. Cuando se desea aislar solamente pilos T_2 , es adecuado cualquier pH superior a 5,5 e inferior a 9,2. Cuando se desea aislar pilos T_1 solos o en presencia de pilos T_2 , se requiere un pH inferior a 10 7,7, adecuadamente alrededor de 7,0. En el caso del desarrollo en cultivo profundo, no es necesaria esta operación de suspensión.

15 También se ha encontrado que los cristales de pilos son solubles por debajo de 4,5 y son esencialmente reconstituibles cuando el pH se eleva de nuevo por encima de este valor, siempre que no se haya reducido por debajo de alrededor de 2,5.

20 Después las partes de estas suspensiones que son solubles se separan de las partes de la suspensión que son insolubles. Aunque puede utilizarse la filtración para esta separación, en general se prefiere centrifugar. El líquido que sobrenada en la centrifugación (y el filtrado en el caso de la filtración) se desprecia y el residuo se retiene. En la siguiente etapa del proceso de purificación, las porciones constituyentes de los pilos GC se pasan a disolución 25

1 y se separan del material restante. En el caso del cultivo
superficial, este material comprende células completas y
residuos y en el caso del cultivo profundo, contiene además
el material de elevada superficie específica, tal como
5 Celite.

La disolución de los cristales de pilos GC puede
conseguirse mediante dos métodos diferentes pero estrechamen-
te relacionados. La disolución del material de los cristales
de pilos GC depende de la ruptura de los enlaces no covalen-
tes entre las barras de pilos en los que está implicado el
10 material péptido que constituye una porción principal de los
pilos, mientras que los enlaces covalentes quedan intactos.
Es decir, se utiliza un agente solubilizante que no desnatur-
aliza el péptido sino que simplemente desagrega los crista-
les en barras de pilos sencillas. Estos agentes pueden ser
15 independientes del pH, tales como urea acuosa, agua suficien-
te para reducir la concentración iónica de un medio suspen-
sor acuoso por debajo de 0,002M, sal suficiente, adecuadamen-
te sales de metales alcalinos o alcalino-térreos y los anio-
nes de ácidos minerales para elevar la fuerza iónica por
20 encima de 4,4, urea hasta una concentración comprendida apro-
ximadamente entre 3M y 5M y sacarosa suficiente para elevar
la concentración por encima de alrededor del 50 % en peso/vol-
lumen. Los cristales de pilos son reprecipitados aumentando
25 la fuerza iónica por encima de alrededor de 0,05 mediante

1 la adición de sales de aniones de ácidos minerales y meta-
les alcalino y alcalino-térreos; la adición de agua sufici-
ciente para reducir la concentración de sal por debajo de
una fuerza iónica de 0,5, solución reguladora suficiente,
5 adecuadamente solución salina regulada con Tris, para obte-
ner un medio con una fuerza iónica de 0,05 a 0,5 aproximada-
mente a un pH de 4,5 a 9,2 aproximadamente y agua suficien-
te para reducir la concentración de sacarosa por debajo del
40 % en peso, respectivamente. Los agentes también pueden
10 ser sensibles al pH, tales como soluciones reguladoras bási-
cas como el tampón Tris que eleva el pH a un nivel de 9,3
a 11 aproximadamente para los pilos T₂ y de 7 a 8,6 aproxima-
damente para los pilos T₁. Este intervalo está determinado
por la iniciación de la solubilidad en el extremo inferior
15 y por el comienzo de peligro de desnaturalización en el
extremo superior. Sin embargo, se ha observado que incluso
cuando la estructura de los pilos es desnaturalizada por
estos u otros métodos hasta el punto de que los pilos ya
no recristalizan, sus características antigénicas aparente-
mente no son afectadas en lo esencial.

20 Después de la adición del medio solvatante al re-
siduo sólido antes mencionado, la porción soluble e insolu-
ble de esta segunda suspensión se separa de nuevo. Como
antes, esta separación puede realizarse por filtración o
25 centrifugación, adecuadamente por centrifugación.

1 El método de centrifugación puede ser sencillo o
modificado. En el método de centrifugación sencillo, la
suspensión se trata en una centrífuga a baja velocidad,
se retiene el líquido que sobrenada y se deja a un lado el
5 residuo. Cuando se desea aumentar el rendimiento, el residuo
se suspende de nuevo, se centrifuga otra vez, se despreja
el nuevo residuo y el líquido que sobrenada se combina con
el líquido sobrenadante inmediatamente anterior. Los líqui-
dos sobrenadantes combinados se someten después a una cen-
10 trifugación a gran velocidad para separar las últimas tra-
zas de pequeños desechos en el residuo y el líquido que so-
brenada se deja después a un lado para uso en la sucesiva
etapa de precipitación.

15 En la forma modificada del proceso de centrifugación,
los pilos solubilizados, es decir, las suspensiones a pH ele-
vado o las que se encuentran en un medio acuoso que rompe
los enlaces no covalentes, como la urea, se mezclan con una
solución acuosa de cloruro de cesio. Como el método del gra-
diente de cloruro de cesio implica una centrifugación, no
20 es necesaria la separación completa de los desechos; sin
embargo, se obtiene un resultado más limpio utilizando una
filtración o una centrifugación previas. La mezcla en cloru-
ro de cesio se somete después a centrifugación en la forma
convencional para las separaciones de cloruro de cesio y
25 se mide la absorción a diversos niveles del gradiente de

1 densidad. La localización del pico principal, adecuadamente
medido a 280 nm, indica la situación de la solución de
pilos.

5 Utilizando cualquiera de los métodos de centrifuga-
ción, después las fracciones acuosas que contienen las so-
luciones de pilos se tratan de una forma que conduzca a
la precipitación de los cristales de pilos. Esto puede ha-
cerse reduciendo el pH cuando este último ha sido elevado o
separando el agente de ruptura de los enlaces no covalentes,
10 el cloruro de cesio o, alternativamente, por adición de un
agente precipitante tal como sulfato amónico. Las condicio-
nes de precipitación pueden conseguirse por diálisis o por
adición directa.

15 Al reducir el pH y separar el agente que rompe los
enlaces, se forman cristales de pilos GC. Después se sepa-
ran los cristales de pilos GC del medio acuoso por filtra-
ción o, más adecuadamente, por centrifugación a baja velo-
cidad. Se separa el líquido que sobrenada y los cristales
de pilos GC así obtenidos se secan a presión reducida, si
20 se desea, o se almacenan en un medio acuoso adecuado. Aunque
es conveniente mantener los cristales a temperaturas reduci-
das en un medio estéril, no parece que esto sea esencial
para su estabilidad en ausencia de contaminación bacteriana.

25 Debe observarse que los cristales de pilos son, de
hecho, aglomeraciones de barras sencillas de pilos con un

1 elevado peso molecular. Así, cuando el medio que contiene
los pilos solubilizados ha sido purificado por centrifuga-
ción a gran velocidad, si se desea con esterilización a tra-
vés de un filtro miliporo (adecuadamente alrededor de 0,45
5 micras), las barras individuales de pilos pueden ser preci-
pitadas por ultracentrifugación, adecuadamente por encima
de 40 KG.

También se ha encontrado que cuando no se requieren
pilos de pureza muy grande, resulta bastante satisfactorio
10 un proceso de purificación conveniente y rápido. En este
proceso, todo el cultivo gonocócico se transfiere a una solu-
ción reguladora a pH elevado, adecuadamente un tampón de eta-
nolamina a un pH superior al punto de disolución de la varian-
te en cuestión (T_1 o T_2), preferiblemente alrededor de pH
15 10,0 para garantizar la disolución total, se separan los sól-
idos por filtración o centrifugación y se hace bajar el pH,
adecuada pero no esencialmente por diálisis.

En realidad, controlando el pH, por ejemplo, a
8,6 en el primer caso cristalizan los cristales de pilos T_2
20 y mediante un nuevo descenso del pH a 7,7, por ejemplo 7,
cristalizan los cristales de pilos T_1 . Esto indica en una
sola etapa la naturaleza del crecimiento variante en cues-
tión. Esto último es simplemente confirmatorio ya que un
bacteriólogo competente puede diferenciar entre las dos for-
25 mas mediante el examen de sus colonias.

1 Alternativamente, los cristales de pilos pueden
ser precipitados por adición de sulfato amónico. Una con-
centración aniónica comprendida entre 4% y 7 % de la satu-
ración aproximadamente (a la temperatura ambiente) precipi-
5 ta los pilos T_2 en forma de cristales mientras que los pi-
los T_1 son precipitados entre el 5 y el 10 % de la satu-
ración.

Los pilos GC han sido sometidos a electroforesis
en gel de poliacrilamida SDS y presentan una banda princi-
10 pal y una banda menor. La banda principal, denominada pilina
GC, contiene el material fosfoglicoproteico.

También se ha demostrado que la pilina GC T_2 contie-
ne una porción péptida de 200 ± 9 aminoácidos, entre dos y
15 tres grupos fosfato y entre uno y dos azúcares de hexosa y
es esencialmente soluble en medios acuosos a un pH superior
a 10,1 y esencialmente insoluble en medios acuosos a un pH
inferior a 8,6, ambos valores medidos a 20°C.

La parte principal de los pilos GC T_2 , a saber la
20 pilina GC T_2 , tiene un peso molecular, determinado por elec-
troforesis en gel de acrilamida SDS de 21.500 ± 1000 daltons.

Los pilos GC aislados de un cultivo de N. gonorrhoeae
tipo T_1 son extraordinariamente similares desde el punto de
vista inmunológico a los aislados del N. gonorrhoeae tipo T_2 .

25 Los pilos GC tipo T_1 son esencialmente solubles en
medios acuosos por encima de un pH 8,5 aproximadamente y esen-

1 cialmente insolubles en medios acuosos a un pH inferior a 7,7, ambos valores medidos a 20°C. La pilina GC tipo T₁ tiene un peso molecular de 22.000 ± 1000 determinado por electroforesis en gel de acrilamida SDS.

5 Se han aislado pilos GC de cultivos de más de 20 cepas diferentes de N. gonorrhoeae. Cuando se inyectan en animales experimentales, los cristales de pilos GC así como los pilos de un barrá sónica y el eluato de la electroforesis en gel de acrilamida SDS producen la formación de anticuerpos en el suero de los animales experimentales.

10 Cuando los cristales de pilos GC se tratan, solos o suspendidos en un cierto medio, con suero que contiene anticuerpos de aquéllos, los cristales se aglutinan. La forma más adecuada de observar fácilmente esta aglutinación es en un microscopio de campo oscuro pero también es observable por otros medios y constituye un ensayo sencillo e inmediato de la presencia de los anticuerpos de pilos en un suero experimental.

15 Entre las aplicaciones del ensayo pueden mencionarse la selección de gonorreas para seleccionar individuos para el ensayo de cultivo, identificación de individuos de alto riesgo distinguiendo las infecciones nuevas de las antiguas en un individuo particular, identificación de la cepa responsable de un epidemia local y de las cepas responsables de ciertos síntomas particulares.

1 Debe observarse que aunque este ensayo es útil
para la determinación de la presencia de anticuerpos de
los pilos GC en una muestra de ensayo, no es posible de-
terminar directamente si el sujeto del cual se ha tomado
5 el suero padece de gonorrea activa o ha sido infectado en
el pasado y es simplemente un portador de anticuerpos.
Además debe observarse que es posible que un sujeto muy re-
cientemente infectado (es decir, en los dos o tres días
anteriores) no dé una respuesta positiva ya que puede no
10 haber habido tiempo suficiente para que el organismo cree
una concentración de anticuerpos suficiente para dar un
título detectable.

 Se ha observado que los pilos de los organismos
N. gonorrhoeae contienen uno o más determinantes inmunológi-
15 cos seleccionados entre un grupo de por lo menos cuatro de
estos determinantes. Así, la reacción de aglutinación por
anticuerpos ocurrirá entre los pilos y un suero conteniendo
anticuerpos contra por lo menos uno de estos determinantes
inmunológicos. La intensidad de la respuesta dependerá de
20 la concentración de anticuerpos en la muestra de suero de
ensayo e igualmente del número de determinantes inmunológicos
interactuantes sobre los pilos y en el suero.

 Así es posible, dadas por ejemplo cuatro muestras
diferentes de pilos GC que se sabe que contienen por lo me-
25 nos uno de los determinantes antes citados, determinar rápi-

1 damente la presencia de los correspondiente anticuerpos de
los pilos GC en cualquier suero de ensayo.

5 Análogamente, cuando se dispone de una fuente de
organismos y puede ser fácilmente cultivada, los pilos de
estos organismos son aislables. Como se dispone de sueros
normalizados que contienen anticuerpos contra un determi-
nante cualquiera predeterminado de los cuatro determinantes
antigénicos de los pilos GC, como resultado de esta inven-
ción, los pilos de la fuente de ensayo desconocida son sero-
10 tipificables en cuanto a la identidad y el número de estos
determinantes sobre ellos. Este procedimiento ayudará con-
siderablemente al trabajo epidemiológico destinado a se-
guir la pista de la infección de gonorrea.

15 Los pilos pueden ser absorbidos sobre diversos por-
tadores conocidos en los ensayos inmunológicos tales como
látex, glóbulos rojos lavados, carbón vegetal, poliacrilami-
da, agarosa y similares, para formar los substratos para los
ensayos de aglutinación de suero o plasma.

20 La disponibilidad de pilos también proporciona la
base de los ensayos de hemoaglutinación e inhibición de la
hemoaglutinación. Ambos ensayos están basados en el princi-
pio de que los pilos contienen centros de combinación espe-
cíficos que interaccionan con los glóbulos rojos de la
sangre. Así, cuando los pilos y los glóbulos rojos se incu-
25 ban juntos, los glóbulos rojos forman un perdigón aglutina-

1 do difuso por sedimentación por la acción de la gravedad.
Si en el medio de ensayo no hay pilos, los glóbulos rojos
sedimentan formando un perdigón claramente definido por la
acción de la gravedad. Esto constituye un medio de ensayo de
5 la presencia de los pilos en una solución.

En el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación,
se agrega un suero de ensayo del que se cree que contiene
anticuerpo de los pilos, GC a una solución que contiene una
cantidad determinada de pilos y la mezcla se incuba y centrifuga.
10 fuga. Los pilos que interaccionan con sus anticuerpos precipitarán.
El líquido que sobrenada se agrega después a los glóbulos rojos.
Cuando todos los pilos han reaccionado con los anticuerpos del material de ensayo, se obtiene un perdigón neto (es decir, no hay aglutinación). Los expertos en
15 esta técnica entenderán que este ensayo tiene significado cuando se realiza frente a controles (es decir, sin anticuerpos) y a diluciones predeterminadas.

La precisión de este ensayo aumenta si el suero se trata primero con glóbulos rojos lavados (es decir, antes
20 de la adición de los pilos). Este procedimiento elimina los factores del suero que producirían aglutinación de los glóbulos rojos independientemente de la presencia de pilos.

Hasta ahora no se ha conseguido de ninguna forma un método de inmunización de los seres humanos contra N.gonorrhoeae. Se ha encontrado que cuando unos voluntarios huma-
25

1 nos se inyectan con una cantidad suficiente de cristales
de pilos GC, adecuadamente de alrededor de 2 a 100 microgra-
mos de dichos pilos por kg de peso corporal para elevar el
nivel de anticuerpos de sus sueros hasta un título PAT (En-
5 sayo de Aglutinación de Pilos) de 100 como mínimo, se obtiene
un cierto grado de protección de por lo menos 1,6 log ciclos.
Es decir, que el sujeto es capaz de resistir a la infección
por un número dado de organismos de la cepa de la que deri-
van los cristales de pilos GC inyectados, de aproximadamente
10 1,6 órdenes de magnitud mayor que el requerido para producir
la infección en sujetos de control en estado no inmunizado.
No se ha observado ningún efecto tóxico atribuible a los pi-
los cuando se han inyectado cristales de pilos GC. Los sujetos
humanos con un título de hasta 200 resultan inafectados y
15 unos primates experimentales (monos Rhesus) han sido some-
tidos a unos títulos de aproximadamente 10.000 en el ensa-
yo PAT sin que se observara ningún efecto perjudicial de
ningún tipo. Además se ha observado que parece aconsejable
que las inyecciones de cristales de pilos GC, en un medio
20 vehículo adecuado, se realicen durante un periodo de tiempo
algo prolongado, adecuadamente un periodo de hasta unas 5 se-
manas. La administración puede estar comprendida entre 1 y 5
partes alícuotas de cristales de pilos GC, pilos de una sola
barra, o cualquier fuente adecuada de pilina G.C. Aunque
25 útil, no es esencial un régimen de administración extendido.

1 Este régimen de administración permite la acumulación gradual de anticuerpos en el sistema.

5 Se observará además que no se ha advertido ninguna reacción adversa local contra los cristales en el punto de inyección cuando las inyecciones se realizan en un sujeto al que ya se han administrado los cristales con anterioridad en otro punto.

10 A la vista de la existencia de varios determinantes de anticuerpos como se ha mencionado antes, es conveniente administrar los cristales de pilos, los pilos de una sola barra u otras fuentes de pilina G.C. que contienen cada uno de los determinantes conocidos con objeto de obtener la máxima protección.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

15 Preparación de los cristales de pilos GC

Crecimiento de un cultivo superficial de organismos

N. gonorrhoeae

20 La Neisseria gonorrhoeae se encuentra en cuatro formas de colonias arbitrariamente denominadas tipos T₁, T₂, T₃ y T₄. Sin embargo, esta denominación ha sido generalmente aceptada. Los organismos de los tipos T₁ y T₂ son los organismos causantes de la enfermedad denominada gonorrea en los seres humanos y solamente estas formas poseen pilos. Los procedimientos establecidos a continuación son aplicables a los
25 crecimientos de organismos de tipo T₁ y tipo T₂. Debe obser-

1 varse que las cepas de N. gonorrhoeae son aislables de las
secreciones corporales tomadas de pacientes humanos. Estas
secreciones contienen habitualmente no solo los tipos T₁ o
T₂ deseados sino también los tipos T₃ y T₄ carentes de pilos.
5 Además, debe observarse que un cultivo que comienza como,
por ejemplo, un tipo T₂ bastante puro a su debido tiempo,
mediante subcultivo, produce tipos T₃ y T₄ carentes de pi-
los así como tipos T₁.

10 En el cultivo de las variantes coloniales T₁ y T₂,
se ha observado una tercera variante provista de pilos,
arbitrariamente denominada T_R. Esta variante tiene un aspect-
to áspero y aunque está completamente caracterizada se cree
que está estrechamente relacionada con los tipos T₁ y T₂
ya que estos tipos se obtienen por subcultivo de colonias
15 T_R. El rendimiento de pilos a partir de los tipos T_R es el
mismo que a partir de cultivos T₂.

Con objeto de que la producción de pilos T₂ o T₁
sea máxima, deben seguirse ciertos procedimientos prelimi-
nares.

20 Las muestras originales se cultivan sobre placas
de Thayer Martin (T-M) que permiten el crecimiento de
N. gonorrhoeae inhibiendo el crecimiento de la mayor parte
de las otras bacterias. Como las placas T-M no son adecua-
das para distinguir los tipos coloniales, las colonias de
25 las placas T-M se depositan formando rayas sobre un medio

1. de cultivo adecuado (medio GC, Difco número de catálogo
0289-1, por ejemplo). Después se prepara una sucesión
de subcultivos a partir de colonias únicas sobre el medio
(en adelante denominado medio GC) hasta que las colonias
5 están constituidas por más de alrededor del 90 % del tipo
descado. Aunque el procedimiento puede ser utilizado tanto
para el tipo T_1 como para el tipo T_2 y, como se ha demostra-
do, el tipo T_1 y T_2 son inmunológicamente similares, se
prefiere mantener la separación de los tipos. En adelante,
10 trataremos del tipo T_2 . Salvo en los casos en que se indi-
quen específicamente las diferencias, los procesos de desa-
rrollo de T_2 son igualmente aplicables al T_1 . Cuando el cre-
cimiento sobre una placa presenta más del 90 % de colonias,
por ejemplo, T_2 , se retira el cultivo de la placa y se sus-
15 pende en un medio de congelación adecuado, por ejemplo BSA-
glutamina, se divide en partes alícuotas y se almacena a
temperaturas reducidas, adecuadamente del orden de -70°C
a -196°C .

20 Debe observarse que, como se ha dicho antes, las mues-
tras con una proporción inicialmente alta de T_2 tienen ten-
dencia, por subcultivo, a volverse inestables y formar canti-
dades menores de T_2 . Por lo tanto, al formar los cultivos,
debe tenerse cuidado por una parte de garantizar una eleva-
da proporción inicial de organismo T_2 y, por otra parte,
25 debe tenerse cuidado de utilizar una cepa suficientemente

1 "joven", es decir, que no haya sido excesivamente subcul-
tivada con frecuencia, para defenderse de la posibilidad
de inestabilidad. Cuando se desea producir pilos T_1 , es
incluso más importante que en el caso de los pilos T_2 uti-
5 lizar un inoculum que contenga más del 90 % de T_1 .

El inoculum para la producción de pilos se prepara
depositando una tira de partes alícuotas primarias, adecua-
da pero no necesariamente congeladas, sobre una placa Petri
de medio GC e incubando durante 12 a 24 horas. De 12 a 15 ho-
10 ras para las cepas con los tipos T_2 más inestables y de 12 a
24 horas para las cepas con los tipos T_2 más estables. Se
prefiere cultivar el inoculum a una temperatura comprendida
entre 35 y 37°C, aunque se considera preferible una tempe-
ratura de 35°C. También se consideran deseables unas condi-
15 ciones de gran humedad. A humedades inferiores al 70 %, se
ha observado que el rendimiento de pilos es menor que a hume-
dades mayores. Por lo tanto, se considera deseable operar a
una humedad comprendida entre el 70 y el 90 %. Aunque no se
conoce bien el efecto de la atmósfera sobre el crecimiento y
20 los cultivos de N. gonorrhoeae más viejos crecen sin adición
de dióxido de carbono, se ha encontrado muy adecuada una atmós-
fera que contiene entre 5 y 10 % de dióxido de carbono junto
con 90 a 95 % de aire.

Después de la inoculación inicial, la placa se cubre
25 con alrededor de 50 a 75 % del cultivo y a continuación se re-

1. tira el cultivo de la misma. En un procedimiento adecuado,
se agrega una pequeña cantidad de solución de casaminoácidos
estéril a la placa de inoculum y el cultivo se rasca con
una espátula de vidrio estéril. Se ha encontrado adecuado
5 utilizar entre 5 y 6 ml de solución por placa y de 2 a 3 ml
de la suspensión así preparada y son suficientes para inocu-
lar las bandejas mayores de medio GC. Después las bandejas
se incuban durante un período de tiempo del mismo orden, ba-
jo las mismas condiciones que en las placas Petri de inoculum
y se recogen los pilos producidos.
10

En este momento del proceso, ya no es necesario uti-
lizar técnicas estériles aunque naturalmente, como en todos
los procedimientos, es conveniente utilizar un equipo limpio,
unos reactivos puros y realizar todas las operaciones a la
15 temperatura más baja posible para inhibir un crecimiento bac-
teriano indeseable.

El cultivo gonocócico se recoge utilizando una solu-
ción reguladora adecuada. Aunque la naturaleza química de la
solución reguladora no es crítica, el intervalo de pH es im-
20 portante. Por razones que resultarán evidentes, cuando se
purifican los pilos T_2 , la solución reguladora no debe ser
utilizada a un pH superior a 9,3. Se prefiere operar dentro
de un intervalo de pH de 5,5 a 9,2, todavía mejor de 7,0 a
8,6. Cuando se ha empleado un cultivo predominantemente T_1 ,
25 el pH no debe pasar de 7,7 pero debe estar comprendido entre

1 5,5 y 7,5, adecuadamente entre 7,0 y 7,2. Estos intervalos garantizan el mantenimiento de todo el material piliado en estado agregado. Como solución reguladora más adecuada, podemos mencionar la solución salina de Tris.

5 En el procedimiento preferido, la solución reguladora de lavado se coloca sobre la superficie del medio de cultivo, se rasca el cultivo para separarlo del medio con un instrumento adecuado y la suspensión acuosa se retira de forma adecuada, por ejemplo con una pipeta o una trompa de agua. Si se desea, puede realizarse un segundo lavado de la misma manera, recogiendo todas las suspensiones líquidas.

10

Para aumentar el rendimiento, puede realizarse un tercer lavado con una solución reguladora a pH alto. Es decir, una solución reguladora con un pH superior a 9,3, adecuadamente entre 10,1 y 10,3. El uso de esta solución reguladora producirá la disolución de todo el material pílico residual. Cuando se trata de aislar los pilos T_1 , solamente es necesario que el pH pase de alrededor de 8,6, pero no hay ningún inconveniente en utilizar valores más altos. Esta suspensión básica no se reúne con las primeras aguas de lavado sino que se deja aparte para una fase posterior de la purificación. Debe observarse que cuando se ha producido un buen crecimiento de pilos, el cultivo tiene un color naranja/ro-

15

20

25

sado característico o un color rosa cálido y el medio de cul-

1 tivo presenta un olor similar al de un guisado. Se observa
que el cultivo está aglomerado en agregados acordonados pe-
gajosos y que se desliza fácilmente para separarse del me-
dio de cultivo cuando se tira con un instrumento adecuado,
5 por ejemplo una espátula de vidrio.

Aunque son aconsejables los procedimientos anterio-
res cuando se desean altos rendimientos de pilos de gran
pureza, se obtienen resultados bastante aceptables median-
te un procedimiento considerablemente abreviado. En este pro-
cedimiento, no se utilizan el primero y el segundo lavados
10 antes indicados. Todo el cultivo se trata con una solución
reguladora a pH esencialmente alto, adecuadamente un tampón
de etanolamina de acuerdo con los procedimientos del tercer
lavado. Además de los pilos disueltos, el medio de lavado
15 contendrá muchas impurezas que de otra forma se habrían se-
parado; sin embargo, se ha encontrado que estas impurezas
pueden ser retenidas en solución por precipitación del mate-
rial píllico en la forma descrita más adelante.

Cultivo profundo de organismos de N. gonorrhoeae

20 El cultivo profundo de los organismos de tipos T₁ y
T₂ en un medio líquido se lleva a cabo de forma convencional,
utilizando un medio y un ambiente idénticos a los utilizados
para el cultivo superficial a excepción de que el medio no
contiene agar como agente solidificante. Se ha observado que
25 los organismos crecen y producen pilos continuamente. Así, un

1 medio de cultivo profundo contendrá gran cantidad de material
pílico en suspensión. Cuando se desarrollan cultivos de tí-
po T₂, como el pH es normalmente inferior a 9,3, no se pro-
duce una solubilización indeseable de los pilos. En el cul-
5 tivo de organismos T₁, el pH puede ascender por encima de
7,7, por ello, antes del tratamiento que se describirá más
adelante, el pH debe ser ajustado dentro de unos límites
de 5,5 a 7,7, preferiblemente de 7,0 a 7,2. Aunque no es
crítico, se prefiere realizar este ajuste algunas horas,
10 por ejemplo 8-20 horas, antes del tratamiento para asegurar
la cristalización de los pilos T₁ parcialmente solubilizados.

Tanto en los cultivos T₁ como en los T₂, es conve-
niente, pero en modo alguno esencial, llevar a cabo el culti-
vo en un medio suavemente agitado y en presencia de una pe-
15 queña cantidad de tierra de diatomeas, tal como Celite. La
cantidad de, por ejemplo, Celite debe estar comprendida ade-
cuadamente entre 0,1 y 0,5 % aproximadamente, por ejemplo
alrededor de 0,3 % del peso del medio de cultivo.

Purificación de los pilos

20 Separación de los cristales de pilos del medio de cultivo

Debe observarse que el lavado del crecimiento super-
ficial de los organismos N. gonorrhoeae contiene material so-
luble que no tiene interés en el aislamiento de los cristales
de pilos GC. Esto mismo se cumple en los cultivos líquidos
25 profundos. En el caso de los lavados del cultivo superficial

1 (solamente los dos primeros lavados), la cantidad de líquido
do relativa a la cantidad de cultivo es relativamente pe-
queña. Se prefiere centrifugar todas las aguas de lavado a
velocidades relativamente pequeñas. La velocidad de cen-
5 trifugación y el tiempo no son críticos en modo alguno.
Sin embargo, se ha encontrado conveniente centrifugar entre
1000 G y 12.000 G aproximadamente (en adelante expresado co-
mo 1 KG y 12 KG), durante alrededor de 5 a 30 minutos, prefe-
riblemente a unos 3 KG durante 10 a 15 minutos aproxima-
10 damente. El residuo en el perdigón contiene material celular
y píllico, conservándose ambos en esta fase y despreciando el
líquido que sobrenada. El líquido que sobrenada contiene
cantidades sustanciales de impurezas así como pequeñas can-
tidades de pilos que no merece la pena recuperar.

15 Cuando la forma de cultivo utilizada es el crecimien-
to profundo, el volumen de líquido es bastante importante y,
por lo tanto, la centrifugación puede resultar algo moles-
ta. Se ha encontrado útil el uso de un filtro emparedado de tierra de
diatomeas para concentrar el crecimiento de los cultivos
20 profundos. En este procedimiento, se deposita un papel de
filtro muy grosero sobre la capa filtrante, adecuadamente
una superficie de vidrio sinterizado o del tipo Buchner, se
coloca sobre ella una capa de tierra de diatomeas, adecuada-
mente Celite con un espesor de 2 a 5 mm aproximadamente y
25 se cubre con un segundo papel de filtro grosero. El Celite

1 sirve como medio de filtración real mientras que el papel
de filtro superior sirve simplemente para preservar la super-
ficie. El caldo de cultivo, cuyo pH ha sido comprobado para
asegurarse de que los pilos se encuentran en forma cristalina,
5 se filtra a través de la capa filtrante y se desprecia el
filtrado. Los residuos combinados se recogen, por ejemplo,
en una solución reguladora de pH alto similar a la utilizada
para el tercer lavado del cultivo superficial y esta suspen-
sión se centrifuga aproximadamente entre 1 KG y 12 KG. Natural-
10 mente, se observará que en este caso el perdigón contiene la
tierra de diatomeas y los desechos celulares y el material
pílico se encuentra en el líquido que sobrenada.

Es conveniente en este momento separar los pilos GC
de los desechos celulares y, en el caso del cultivo profundo,
15 también de la tierra de diatomeas.

En el caso del perdigón del cultivo superficial,
centrifugado a partir del lavado de pH bajo, esto puede ha-
cerse agregando un medio acuoso que rompe los enlaces no co-
valentes entre las barras de pilos del sistema mientras que
20 los enlaces covalentes quedan intactos, disolviendo así los
cristales de pilos para formar pilos solubilizados de una so-
la barra. Este medio puede requerir la elevación del pH o
puede permitir que el pH permanezca inalterado. Cuando la so-
lubilidad se ha de realizar mediante un cambio del pH, se
25 agrega al residuo un regulador del pH adecuado, a pH modera-

1 damente alto. Es conveniente que el regulador presente un
pH comprendido entre 9,3 y 11, preferiblemente entre 10,0
y 10,4. Cuando se utilizan valores más altos del pH, se co-
rre el riesgo de desnaturalización de péptidos. Este nivel
5 de pH solubilizará a los cristales de pilos T_1 y T_2 .

Cuando se desea separar los pilos T_1 de los pilos
 T_2 en el perdigón sólido original, el pH de la solución re-
guladora es inicialmente superior a 7,7 aproximadamente pero
inferior a 9,3 aproximadamente. Después se centrifuga la sus-
10 pensión y el líquido que sobrenada puede dejarse a un lado
o despreciarse de acuerdo con las necesidades del procedi-
miento. Si se cree que el perdigón sólido original contiene
cantidades sustanciales de pilos del tipo T_2 , se agrega so-
lución reguladora limpia a pH más alto, a saber, por encima
15 de alrededor de 9,3, que proporciona una fase disolvente que
contiene dichos pilos T_2 pero está exenta de pilos T_1 . La
composición efectiva de la solución reguladora utilizada
en esta fase no es crítica, sin embargo se prefiere especial-
mente una solución reguladora salina Tris.

20 En las dos modificaciones anteriores, se añade a
los sólidos totales un volumen de solución reguladora apro-
ximadamente igual a tres veces el volumen de los sólidos. De
nuevo, esta cantidad no es crítica pero se ha encontrado que
es suficiente para disolver el material píllico sin utilizar
25 volúmenes excesivos del medio acuoso. Si los pilos proceden

1 de un cultivo superficial y dicho cultivo superficial se
somete a una tercera fase de lavado a pH elevado con una
solución reguladora similar, este agua de lavado puede ser
agregada en este momento. Después se suspende el perdigón
5 en el medio acuoso. El método de llevar a suspensión el
perdigón no es crítico, y puede utilizarse una sonificación
suave y breve, agitación magnética prolongada, pipeteado
manual, mezclado manual, formación de remolinos o agitación
mecánica.

10 Se ha encontrado preferible utilizar una agitación
mecánica durante algunos segundos. Aunque el método de sus-
pensión no es crítico, es importante que, cualquiera que sea
el método utilizado, las células no se rompan ya que la ruptu-
ra de las células introduce un material indeseable en la ca-
15 pa acuosa. La ruptura de células se manifiesta en forma de
una capa rosada sobre blanco en la centrifugación subsi-
guiente. El material suspendido se centrifuga después. El méto-
do de centrifugación no es crítico; sin embargo, se ha encontra-
do que son adecuadas las condiciones antes establecidas para
20 la primera operación de centrifugación. En lugar de centrifu-
gar, es posible filtrar.

25 Los pilos disueltos se encuentran en el líquido que
sobrenada o en el filtrado, de los que pueden ser precipita-
dos reduciendo el pH. El grado de reducción del pH dependerá
naturalmente del tipo de pilos, T_1 o T_2 , utilizado. Alterna-

1 tivamente, la precipitación puede conseguirse agregando
sal amónica suficiente, adecuadamente una sal de un ácido
mineral tal como el sulfato, preferiblemente en forma de
solución acuosa, para formar un sulfato amónico, a una
5 concentración comprendida aproximadamente entre 4 % y
10 % de la saturación. Sin embargo, para aumentar el rendi-
miento y el grado de pureza, se ha encontrado conveniente
introducir operaciones intermedias antes de la precipita-
ción.

10 Para realizar estas operaciones intermedias de ren-
dimiento adicional y purificación, se conservan el líquido
que sobrenada y el perdigón procedente de la centrifugación
o filtración a pH elevado. El perdigón de la fase de centri-
fugación a pH elevado se suspende de nuevo, adecuadamente
15 en el mismo medio acuoso, al mismo pH y de la misma manera
y la suspensión se centrifuga otra vez de la misma forma.
Después de esta centrifugación, se despreca el perdigón y
se combinan y centrifugan de nuevo los líquidos que sobre-
nadan procedentes de las dos centrifugaciones a pH elevado.

20 El objeto de la nueva centrifugación es eliminar
las impurezas residuales en suspensión. Por lo tanto, la
centrifugación se realiza a una velocidad mayor que antes.
Dan buenos resultados unas velocidades comprendidas entre
25 12 KG y 70 KG durante alrededor de 30 a 60 minutos. Sin em-
bargo, en general se prefiere centrifugar entre unas 27 KG

1 y 40 KG durante 60 minutos aproximadamente. Se desprecian los perdigones y se retienen los líquidos que sobrenadan.

5 En esta fase, habitualmente es conveniente esterilizar la solución de pilos, esto es exigido por ciertas reglas de la FDA para ciertos fines. Esta esterilización puede ser conseguida fácilmente haciendo pasar la solución de pilos, inmediatamente antes de la precipitación, a través de un filtro miliporo, habiéndose encontrado que es especialmente adecuado un filtro de 0,45 micras. Después, naturalmente, los materiales deben ser manipulados en condiciones asépticas, si se desea mantener la esterilidad.

10 Bajo ciertas circunstancias puede ser conveniente aislar los pilos en forma de barras individuales en lugar de en forma cristalina. En este caso, el líquido que sobrenada se centrifuga de nuevo en una ultracentrífuga entre 15 60 y 166, adecuadamente 106 KG, durante 2 a 4 horas, con lo que los pilos son granulados en forma de barras individuales.

20 Los pilos son reprecipitados reduciendo el pH del líquido que sobrenada por debajo de 9,1. Se ha encontrado que los mejores resultados en cuanto a la naturaleza del material cristalino se obtienen por diálisis frente a un tampón adecuado de pH bajo. Se ha encontrado conveniente utilizar un tampón con un pH inicial comprendido entre 8,3 y 8,6, para los pilos T₂; aunque la naturaleza química del tampón 25 no es crítica, se ha encontrado adecuada la solución salina

1 reguladora Tris. La diálisis se lleva a cabo adecuadamente
utilizando un exceso comprendido entre unas 30 y unas 60 ve-
ces, adecuadamente unas 40 veces. La diálisis se realiza
con agitación magnética del medio dializante externo du-
5 rante un periodo de unas 12 a 18 horas. Se prefiere efec-
tuar la diálisis a temperatura reducida, es decir, a una tem-
peratura ambiente comprendida entre 0° y 10°C aproximada-
mente. Este intervalo de temperatura más bajo reduce la
incidencia de contaminación bacteriana indeseable. También
10 debe observarse que el pH de la solución reguladora o tam-
pón depende de la temperatura. Por lo tanto, si la tempera-
tura del tampón se mide después de que el sistema se ha en-
friado hasta su temperatura de operación, puede encontrarse
que el pH ha aumentado hasta 9,1. Sin embargo, todavía se
15 obtienen resultados satisfactorios. Además debe observarse
que en general no es necesario cambiar el tampón cuando se
utiliza un exceso de tampón dentro de los intervalos aquí
establecidos. Después la suspensión cristalina se trata pa-
ra separar los cristales de pilos. La separación más ade-
20 cuada se realiza mediante centrifugación a velocidad mode-
rada. Se ha encontrado adecuada una centrifugación de alre-
dedor de 3 KG a 8 KG durante unos 60 minutos. Después se
desprecia el líquido que sobrenada.

25 Cuando se desea purificar más los cristales de pi-
los, puede repetirse dos o tres veces el ciclo de disolu-

1 ción-centrifugación a gran velocidad-diálisis-recentri-
fugación.

5 Si los cristales de pilos no han de ser utiliza-
dos inmediatamente, independientemente de esterilizar por
filtración, se ha encontrado que es útil agregar un pre-
servativo. Es conveniente que el preservativo no sea agre-
gado a los cristales de pilos propiamente dichos o a una so-
lución que los contenga sino al tampón de diálisis utiliza-
do para reducir el pH de la solución. En el caso de que el
10 preservativo agregado sea incompatible con el tampón, en-
tonces, después de que se ha producido la cristalización
de los cristales de pilos, puede separarse el tampón incom-
patible por diálisis frente a un tampón compatible y reali-
zarse una nueva diálisis utilizando el preservativo más el
15 nuevo tampón. Entre los preservativos que pueden ser utili-
zados se encuentran el formaldehído, el mertiolato y la
azida. Se utilizan en proporciones de 0,02 a 0,05 % apro-
ximadamente.

20 Todos los preservativos citados presentan ciertos
efectos perjudiciales. El formaldehído produce la reticu-
lación entre las barras de pilos. De esta manera, no pue-
den ser disueltas de nuevo como antes. El mertiolato no ejer-
ce ningún efecto reticulante y los cristales pueden ser for-
mados de nuevo; sin embargo, estos cristales nuevamente
25 formados presentan menor capacidad de aglutinación en pre-

1 sencia de los anticuerpos de los pilos. No obstante, la
antigenicidad no es afectada. Es decir, cuando se inyectan
en sujetos experimentales, producen la formación de anticuer-
pos aparentemente normales de los pilos. La azida es un pre-
5 servativo muy satisfactorio ya que no afecta a la estructura
cristalina ni a la antigenicidad ni aglutinación. Desgracia-
damente, es tóxica y no puede ser empleada cuando se consi-
dera la inyección de los cristales de pilos en sujetos hu-
manos. La preparación de cristales es adecuadamente conser-
10 vada a temperaturas bajas, es decir, alrededor de 1-4°C. Sin
embargo, cuando se considera un almacenamiento prolongado,
es preferible disolver los cristales en un tampón apropiado
de pH elevado, filtrar a través de un filtro miliporo y guar-
dar en solución en condiciones estériles. Cuando los pilos
15 se requieren en forma cristalina, es preferible reconstituir-
los reduciendo el pH hasta el valor de cristalización apro-
piado para los pilos T_1 o T_2 , según el caso. Puede hacerse
uso de esterilización y de un preservativo cuando se desea
conseguir las mejores condiciones posibles de preservación.

20 Purificación de pilos por disolución a pH constante

La técnica utilizada para purificar los pilos a
pH constante es esencialmente similar a la utilizada ante-
riormente empleando diferentes niveles de pH.

25 Como agentes solubilizantes pueden utilizarse las
soluciones acuosas de, por ejemplo, sales, adecuadamente

1 sales de metales alcalinos y alcalino-térreos con los
aniones de los ácidos minerales, a una fuerza iónica supe-
rior a 0,5, adecuadamente entre 4,0 y 5,0 aproximadamente,
de preferencia alrededor de 4,4, urea a una concentración
5 comprendida entre 3M y 5M, sacarosa a una concentración
superior al 50 % en peso y finalmente agua donde la fuerza
iónica de la solución se reduce por debajo de 0,002M.

En una modificación de esta realización de la inven-
ción, en lugar de suspender el primer perdigón centrifugado
10 que está constituido por células, pilos y desechos, en un
medio de pH elevado, se utiliza cualquiera de los agentes
anteriores en los medios indicados. La suspensión se centri-
fuga después a baja velocidad como antes. Si se desea un ma-
yor rendimiento, se deja aparte el líquido que sobrenada en
15 la centrifugación a baja velocidad, los perdigones se sus-
penden de nuevo en un medio similar, se centrifugan otra
vez y el líquido que sobrenada así producido se combina con
el líquido sobrenadante anterior y se centrifuga a gran ve-
locidad. Los perdigones de la centrifugación a gran veloci-
20 dad se desechan y el líquido que sobrenada se dializa fren-
te a un tampón adecuado para separar el medio solvatante.

Así, cuando el agente solvatante es una sal o saca-
rosa a gran concentración, la fuerza iónica se reduce por
debajo de 0,5 para la sal y por debajo del 40 % para la sa-
25 carosa. En el caso de la urea, esta última se dializa fren-

1 te a un tampón adecuado, por ejemplo solución salina re-
regulada con Tris, para obtener una fuerza iónica comprendida
entre 0,05 y 0,3 a pH 7,0 o pH 8,3 según se estén tratando
pilos T₁ o T₂; análogamente, cuando el agente solvatante
5 es agua, se utilizan procedimientos similares para elevar
la fuerza iónica hasta 0,05 como mínimo.

Los tampones utilizados para este fin son los mis-
mos utilizados en el método de purificación a pH diferen-
cial y, además, se utilizan de la misma manera.

10 Purificación de pilos GC por centrifugación con gradiente
de densidad

La centrifugación con gradiente de densidad se reali-
za sometiendo una mezcla de pilos y cloruro de cesio acuoso
a centrifugación y se utiliza la densidad óptica a una lon-
15 gitud de onda dada para indicar la porción del tubo que
contiene los pilos.

Aunque la centrifugación puede realizarse a un pH
inferior a 9, se obtienen mejores resultados efectuando la
centrifugación a un pH de 10,0 a 10,4, adecuadamente a pH
20 10,1. En este procedimiento, el perdigón crudo que contiene
materiales celulares, pilos y desechos, se suspende en un
tampón de alto pH, como se ha descrito anteriormente, y se
agrega una cantidad adecuada de cloruro de cesio. Por ejem-
plo, se ha encontrado adecuado preparar un medio que con-
25 tiene alrededor de 2 a 5 g de cloruro de cesio seco por ca-

1 da 10 ml de medio acuoso. Así, se ha encontrado que lo más
adecuado es utilizar alrededor de 7,5 g de cloruro de cesio
por cada 20 ml de medio acuoso.

5 La mezcla se centrifuga después a unas 110-250 KG,
adecuadamente alrededor de 200 KG durante unos 30 a unas 60
horas, adecuadamente durante unas 42 horas y se mide la
densidad óptica de las fracciones en un punto dado del tubo.
Las medidas de densidad óptica a 280 nm muestran un pico
10 único. Las fracciones de densidad por debajo de este pico
se separan y dializan frente a un tampón a pH bajo para for-
mar los cristales de pilos de la misma manera que se ha des-
crito antes. El intervalo de densidad efectivo de las frac-
ciones en solución recogidas en este punto a 20°C está com-
prendido entre 1,35 a 1,33 a pH 10,1.

15 Ensayo de aglutinación de pilos para los anticuerpos de
N. gonorrhoeae

20 La capacidad básica de los cristales de pilos GC o
de barras sencillas de pilos de aglutinarse en presencia de
anticuerpos de N. gonorrhoeae es la base del ensayo PAT. En
este ensayo, se mezcla el suero de la sangre de sujetos sos-
pechosos de haber estado expuestos a N. gonorrhoeae con cris-
tales de pilos GC o barras sencillas de pilos y se observa
la aglutinación en la mezcla de los cristales o barras.

25 Con objeto de que este ensayo sea evaluado en su
verdadero valor, deben considerarse tres factores importan-

1 tes. En primer lugar, el ensayo no se destina a sustituir
el ensayo de "cultivo" normal pero puede servir como selec-
ción para determinar la exposición a N. gonorrhoeae. Por
lo tanto, el ensayo será positivo tanto para los sujetos
5 que han padecido de una infección activa durante más de
algunos días como para los sujetos que han sido expuestos
a la enfermedad pero que desde entonces se han curado. El
tercer factor es que los sujetos muy recientemente infecta-
dos pueden no haber desarrollado anticuerpos suficientes
10 para dar una lectura positiva. Los sujetos que presentan un
resultado positivo en el ensayo deben ser sometidos al ensa-
yo de cultivo tradicional. Como se describirá más adelante,
se ha encontrado que los pilos de formas infecciosas de
N. gonorrhoeae poseen un número de determinantes inmunoló-
gicos específicos. Los pilos de ciertas cepas poseen uno o
15 más de estos determinantes. Por lo tanto, para que una selec-
ción sea efectiva, debe realizarse utilizando cristales de
pilos que cubran el espectro de determinantes inmunológicos.

20 Los cristales de pilos GC utilizados en el ensayo
se preparan en la forma descrita anteriormente.

El ensayo puede realizarse empleando suero o plas-
ma del sujeto experimental. Las referencias dadas aquí al
suero o plasma, por lo tanto, pueden considerarse intercam-
25 biables para los fines del ensayo. La cantidad de suero o
plasma requerida es extraordinariamente pequeña. Se ha en-

1 contrado satisfactorio pinchar el dedo de los sujetos pa-
ra obtener algunas gotas de sangre y centrifugar estas en
un pequeño tubo de centrifuga (alrededor de 250 µl) para
dar entre 10 y 20 µl de plasma que resultan adecuados para
5 realizar el ensayo.

 Es costumbre efectuar los ensayos de esta naturale-
za a diversos niveles de dilución. Por lo tanto, el suero
se diluye de manera predeterminada (habitualmente dilucio-
nes seriadas) con un diluyente adecuado previamente deter-
minado. La naturaleza del diluyente no es crítica siempre
10 que no interfiera con la marcha del ensayo. Puede utilizar-
se cualquier tampón acuoso tal como la solución salina re-
gulada con fosfato o la solución salina regulada con Tris,
a un pH comprendido entre 7,0 y 7,5. Se prefiere la solución
15 salina regulada con Tris a un pH de 7,2. En la realización
del ensayo, la suspensión de pilos se agrega al suero di-
luído para dar una concentración final comprendida entre
10 y 50 microgramos por mililitro de cristales en la suspen-
sión. Se ha encontrado que los mejores resultados se obtie-
nen a la menor concentración de cristales de pilos; por ello,
20 para los fines de normalización de los niveles de anticuer-
pos de pilos en los sueros experimentales, se ha tomado co-
mo patrón la concentración arbitraria con fines comparati-
vos de 20 microgramos de cristales de pilos por mililitro
25 de suero (o plasma) diluido.

1 Después de mezclar los cristales de pilos con los
sueros diluídos, se incuba la mezcla. El tiempo de incuba-
ción no es crítico y puede ser desde solamente 15 minutos
5 hasta incluso 48 horas, siendo despreciables las variacio-
nes de las lecturas. En una forma rápida del ensayo EAT,
la mezcla de suero-pilos se agita a mano en una placa du-
rante 1 a 3 minutos, obteniéndose resultados similares pe-
ro con cierta pérdida de sensibilidad. La temperatura a la
cual se mantiene la mezcla tampoco tiene importancia siem-
10 pre que esté comprendida entre 0° y unos 45°C, a excepción
de que parece preferible mantener la mezcla a una temperatu-
ra comprendida entre 22° y 40°C, adecuadamente a unos 22°
durante 15 minutos como mínimo. Al parecer, almacenando la
mezcla a continuación a temperaturas de solamente 4°C duran-
15 te hasta 24 horas no se producen cambios significativos del
título. Se han obtenido resultados satisfactorios por incuba-
ción durante 30 minutos a 37°C. Una vez terminado el periodo
de incubación, se coloca una parte alícuota sobre un micros-
copio de campo oscuro y se observa y puntua la aglutinación.
20 La puntuación se realiza en la forma relativa arbitraria ha-
bitual para los ensayos de esta naturaleza, a saber: 4+,
3+, 2+, 1+, =, + y -. Para determinar el título de una mues-
tra dada, se toma como lectura final la última dilución
que da una glutinación 1+. La puntuación 1+ es la puntuación
25 que presenta la aglutinación mínima observable sobre una mues

1 tra de control patrón.

Como las lecturas del título pueden variar de un lote a otro de cristales de pilos de acuerdo con su estado, es conveniente controlar el ensayo, cuando se realiza, valorando los cristales frente a antisueros de título PAT conocido además de frente a los controles habituales contra el diluyente sin suero y el diluyente con suero normal.

5
10 Se ha encontrado que bajo las condiciones utilizadas, el ensayo es reproducible dentro de una lectura de títulos de un factor 2 (x 2).

Serotipificación de N. gonorrhoeae

Hasta ahora, no ha sido posible serotipificar los organismos de N. gonorrhoeae en un sistema útil y significativo. No es desusado que organismos de cepas diferentes de la misma especie den diferentes respuestas anticuerpo. Estas respuestas anticuerpo caracterizan a las cepas y la identificación de estas características constituye una ayuda sustancial en los estudios epidemiológicos del progreso y origen de un brote particular de la enfermedad. Es especialmente interesante en las enfermedades venéreas ya que la eliminación de la enfermedad depende con mucha frecuencia de seguir la pista del contacto persona a persona. Por lo tanto, si la fuente de una infección puede ser identificada por serotipificación, este tipo de seguimiento de la pista puede ser considerablemente favorecido.

1 Examinando 21 cepas procedentes de fuentes bien dis-
tribuidas por todos los Estados Unidos, se ha encontrado
que hay por lo menos cuatro determinantes inmunológicos
presentes en los pilos de estas cepas. En cada cepa hay uno
5 o más de estos determinantes. Por lo tanto, si pueden iden-
tificarse las características determinantes de una muestra
particular, puede ser descubierto más fácilmente el origen
de la infección.

10 Cuando los organismos de N. gonorrhoeae derivan de
un sujeto infectado y se cultivan para producir cristales
de pilos, los determinantes inmunológicos presentes en los
cristales de pilos procedentes del sujeto pueden ser fácil-
mente descubiertos sometiéndolos al ensayo PAT con los sue-
ros tipificadores antes mencionados que se sabe que contie-
15 nen anticuerpos para solamente un determinante. Así, puede
establecerse el perfil serológico de cualquier organismo
de muestra dado.

Vacuna contra la gonorrea - Seguridad y potencia

20 Se han inyectado cristales de pilos GC y pilos de
una sola barra en sujetos experimentales in vivo y se ha
encontrado que no ejercen ningún efecto tóxico de ningún
tipo. Los únicos efectos negativos fueron observados con
embriones de pollo inyectados intravenosamente. Se adminis-
traron tres inyecciones subcutáneas de 100 a 200 microgramos
25 por kilogramo a unos ratones experimentales, dando una dosis

1 total de 300 a 600 microgramos por kilogramo; análogamente
se inyectaron unas ratas dos veces a razón de 8000 microgramos
por kilogramo, con una dosis total de 16.000 microgramos
por kilogramo. Los monos Rhesus recibieron tres inyecciones
5 de 100 microgramos por kilogramo, intramuscularmente y las
personas recibieron inyecciones de 2-10 microgramos por
kilogramo, seguidas de una inyección de 50 microgramos por
kilogramo intramuscularmente. Ninguno de los animales exper-
imentales murió ni presentó ningún efecto tóxico local ni
10 sistémico, presentando los embriones de pollo una DI_{50} de
60 microgramos por libra. Las reacciones en sujetos humanos
variaron entre ningún efecto sistémico de ningún tipo y ca-
tarros transitorios y fiebre en uno de los sujetos sometido
a prueba. El título PAT en conejos llegó a 1000-8000 y en
15 monos Rhesus llegó a 10.000+. El título PAT en humanos va-
rió entre 100 y 200.

La dosis requerida para infectar al 50 % de los suje-
tos experimentales (DI_{50}) es del orden de $5,0 \times 10^2$ orga-
nismos. Unos experimentos preliminares indican que la DI_{50}
20 de un sujeto humano con un título PAT de 100-200 es $2,0 \times$
 10^4 organismos. Esto representa 1,6 log ciclos de protec-
ción o, dicho de otro modo, un sujeto humano con un título
PAT de 100-200 tiene solamente una probabilidad del 0,86 %
de ser infectado después de un contacto mientras que una
25 persona no inmunizada corre un riesgo de alrededor del 30 %.

1 A la vista de estos hallazgos, con objeto de conseguir un nivel aceptable de protección en los seres humanos, al sujeto humano debe administrársele una cantidad suficiente de cristales de pilos GC, adecuadamente contra
5 todos los factores determinantes conocidos, para elevar el nivel PAT contra cada uno de estos determinantes hasta 100 como mínimo, preferiblemente hasta 200 como mínimo. Estos niveles se obtienen administrando entre alrededor de 2 y
10 100 microgramos por kilogramo de peso corporal de cristales de pilos GC de cada determinante. Sin embargo, debe observarse que puede alcanzarse un título de 100 solamente con 1 µg/kg. La forma de administración dependerá de la sensibilidad del sujeto, si presenta alguna, pero pueden administrarse adecuadamente entre una y cinco dosis a lo largo
15 de un periodo de tiempo de hasta 8 semanas.

Los cristales de pilos GC, las barras de pilos sencillas u otras fuentes de pilina GC pueden ser administrados en cualquier medio adecuado para la inyección intramuscular.

TRABAJO EXPERIMENTAL

20 Fuentes de N. gonorrhoeae utilizadas

Se aislaron 21 cepas de N. gonorrhoeae de personas que padecían gonorrea, que fueron designadas como sigue:

Pittsburgh 1-2	CDC M-2	Seattle 1-2
Pittsburgh 3-2	CDC T-2	Seattle 3-2
25 Pittsburgh 4-2	CDC F62-2	Seattle 9-2

1 Pittsburgh 6-2 Atlanta 4-2 Norfolk 2-2
 Pittsburgh 7-2 Atlanta 6-2 Norfolk 7-2
 CDC B-2 Atlanta 9-2 Dayton 8-2
 CDC C-2 Atlanta 10-2 CDC 005-2

5 En todos los ejemplos siguientes, se hace referen-
cia específica a la cepa Pittsburgh 3-2. Cuando los otros
organismos citados se someten a los mismos procedimientos
que la cepa Pittsburgh 3-2, se obtienen resultados simi-
lares.

10

EJEMPLO 1

Purificación de la cepa

15

20

Los cultivos primarios de la cepa Pittsburgh 3-2 se
depositan sobre placas Thayer-Martin conteniendo agar Thayer-
Martin (Manual of Clinical Microbiology, segunda edición,
Amer.Soc.Microbiol., Lenette y colaboradores (Ed.) 1974,
pág. 920). Las placas se incuban durante unas 18 horas a
35°C a una humedad de 90 %, en una atmósfera constituida
por 95 % de aire y 5 % de dióxido de carbono. Se examinan
las placas y las colonias que se parecen a la forma T₂
altamente pilada se depositan formando rayas sobre medio
GC. Después de incubar bajo las condiciones anteriores, se
recogen las colonias tipo T₂ y se vuelven a depositar for-
mando rayas sobre un medio GC.

25

Siguiendo el procedimiento anterior, pero cuando
se desea el cultivo del tipo T₁ de este organismo, se de-

1 positan de la misma forma unas colonias con preponderancia
del tipo T₁ menos piliado.

EJEMPLO 2

Preparación del medio de cultivo GC

5 a) Preparación de suplemento DSF

 Se prepara una solución acuosa de cocarboxilasa
(0,2 % en peso) en agua destilada a la temperatura ambiente
y se esteriliza por filtración a través de un filtro mili-
poro de 0,45 micras. Se calienta en un autoclave a 121°C,
10 con una presión de 16 psi (1,1 kg/cm²) durante 10 minutos,
una solución acuosa constituida por 40 g de glucosa, 1,0 g
de glutamina, 10 ml de nitrato férrico al 0,5 % en peso en
agua destilada y 90 ml de agua destilada y después se en-
fría la solución. A esta solución tratada en autoclave se
15 agrega 1 ml de la solución de cocarboxilasa anteriormente
preparada para formar la solución DSF.

 b) Preparación del medio de cultivo

 En una vasija adecuada se agitan suavemente 10,8 g
de Bacto GC Medium Base (Difco Manual 19th. Ed., pág. 122)
20 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) y 300 ml de agua
destilada y la mezcla se trata en autoclave en la misma
vasija a 121°C con una presión de 16 psi (1,1 kg/cm²) duran-
te 15 minutos. Se saca la vasija del autoclave y se enfría
entre 50 y 60°C y se agrega a la misma el suplemento DSF
25 (3 ml) antes preparado.

1

EJEMPLO 4

Producción de pilos GC por cultivo superficial

5

10

Los discos Petri del Ejemplo 3 conteniendo el crecimiento T_2 se lavan con una solución acuosa de casaminoácido (5 ml, 0,7 % en peso). El crecimiento se rasca para separarlo del medio con una espátula de vidrio estéril, la suspensión del crecimiento en la solución de casaminoácido se pipetea desde la placa y se divide en dos bandejas de crecimiento de unas 14 x 10 pulgadas (356 x 254 mm), habiendo sido preparadas estas bandejas en la forma antes descrita. La suspensión se extiende uniformemente sobre la superficie y las bandejas se incuban a 35°C y 90 % de humedad en una atmósfera de 5 % de dióxido de carbono y 95 % de aire, durante 20 horas.

15

Recogida del crecimiento del cultivo superficial

20

25

Se prepara una solución de reserva de solución salina regulada con Tris disolviendo 510 g de cloruro sódico, 363 g de Tris, también conocido como tri(hidroximetil)aminometano y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado junto con agua destilada suficiente para producir una solución de reserva con un volumen de 10 litros. El pH se ajusta al valor normal de trabajo de 8,5 mediante la adición de más ácido clorhídrico concentrado. Cuando se requiere un ajuste del pH hacia arriba, se agrega solución acuosa concentrada (10N) de hidróxido sódico. Antes de utilizarla, la solución

1 de reserva se diluye hasta 1/6 de la concentración original.
La solución salina regulada con Tris (denominada en adelante
TBS) tiene un pH inicial de 8,5. Se colocan 10 ml de la solu-
ción TBS sobre la superficie de crecimiento de la bandeja
5 de producción, se rasca el crecimiento con un rascador de vi-
drio y la suspensión se pipetea a un depósito. El lavado y el
rascado se repiten con un segundo lote (10 ml) de TBS y se
reunen ambas aguas de lavado. La superficie de crecimiento
se lava una tercera vez con 10 ml de solución reguladora de
10 etanolamina (pH 10,1) y la suspensión se conserva pero no
se reúne con las anteriores. (El tampón de etanolamina se
prepara a partir de 37,3 ml de etanolamina líquida, 147,0 ml
de ácido clorhídrico acuoso 1N y agua destilada hasta 1 litro) .

15 De acuerdo con el procedimiento anterior, cuando se
cultivan pilos T_1 en lugar de T_2 , el pH de la TBS está com-
prendido entre 7,0 y 7,2.

20 En una buena operación de producción, el crecimen-
to tiene el característico color naranja/rosado o rosa cál-
ido y presenta un olor similar al de un guiso. El crecimiento
se aglomera en agregados acordonados pegajosos y se desliza
fácilmente fuera de la superficie de agar del medio cuando
se tira de ellos con una espátula de vidrio.

25 Las bandejas que contienen el medio de crecimiento
se limpian después, se lavan y esterilizan en la forma antes
descrita y se recargan con más medio de crecimiento.

1

EJEMPLO 5

Crecimiento en cultivo profundo de pilos GC

5

De acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 4, utilizando el mismo medio de crecimiento y el mismo suplemento nutriente pero excluyendo el agar y sustituyendo el almidón insoluble por almidón soluble, se carga el inóculo en el medio de crecimiento y se incuba en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂ a 35-37°C, en presencia de hasta 0,5 % (calculado sobre el volumen del medio líquido) de Celite, durante 18 horas, con agitación suave.

10

Después se filtra el medio de cultivo a través de una capa filtrante en forma de emparedado, sobre un embudo de vidrio sinterizado grosero. La capa filtrante está constituida por un papel de filtro grosero, una capa de 5 mm de Celite y un nuevo papel de filtro grosero.

15

El filtrado se desprecia y el residuo se trata de acuerdo con el tercer procedimiento de lavado (tampón de etanolamina) del Ejemplo 4, y después se trata de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 6, párrafo iii, infra y siguientes.

20

EJEMPLO 6

Separación de pilos de las células y desechos

25

i) Las suspensiones TBS producidas en los ejemplos anteriores se cargan en tubos de centrifuga (el volumen de los tubos depende del número de operaciones de producción

1 combinadas) y se centrifugan durante 15 minutos a 3 Kg. Se
desprecia el líquido que sobrenada y se conserva el per-
digón.

5 ii) Al perdigón se añade la suspensión en etanolami-
na procedente del tercer lavado de la bandeja de crecimiento
y tampón de etanolamina adicional a un pH de 10,1, hasta un
volumen de aproximadamente tres veces el volumen observado
del perdigón en el tubo de centrifuga. La capa líquida se
10 agita rápidamente durante 5 segundos con un agitador mecá-
nico para pasar a suspensión la porción soluble del material
aglutinado.

15 iii) Después se centrifuga la suspensión durante
15 minutos a 3 KG, se decanta el líquido que sobrenada para
separarlo del perdigón y se conserva. Después se suspende
de nuevo el perdigón en tres veces su volumen de tampón
de etanolamina a pH 10,1 como antes y se centrifuga de nue-
vo durante 15 minutos a 3 KG. Se decanta el líquido que
sobrenada y se reúne con el líquido sobrenadante de tampón
de etanolamina procedente de la etapa inmediatamente ante-
rior y se desprecia el perdigón.
20

25 Los líquidos sobrenadantes de tampón de etanolami-
na combinados se centrifugan a 31 KG durante 60 minutos.
Se decanta el líquido que sobrenada y se conserva y el perdi-
gón se desprecia.

1

EJEMPLO 7

Cristalización de pilos GC

Preparación de tubos de diálisis y solución salina regulada con Tris

5

Un rollo de tubos de diálisis (100 pies, 30 metros, Fisher Scientific Catalog núm. 8-677 B) se hierve consecutivamente en: a) agua destilada (dos veces, 4 litros cada vez), b) solución acuosa de bicarbonato sódico (dos veces, agua destilada, 4 litros, conteniendo dos cucharaditas de bicarbonato sódico cada lavado), c) etilendiaminotetraacetato disódico acuoso (dos veces, agua destilada, 4 litros, dos cucharaditas de NaEDTA cada vez), d) etanol acuoso (dos veces, etanol/agua 1:1, 4 litros cada vez), e) agua destilada (dos veces, 4 litros cada vez). El tubo de diálisis se conserva después en agua destilada conteniendo trazas de ácido benzoico (agua destilada 4 litros, ácido benzoico una cucharadita). Se diluye con agua destilada la solución salina regulada con Tris (TBS) preparada de acuerdo con el

10

15

20

Diálisis de la solución de pilos GC

Se dializan 100 ml de tampón de etanolamina conteniendo pilos GC en solución, producidos en los ejemplos anteriores, frente a 4 litros de TBS (pH 8,5 medido a

25

1 20°C), utilizando el tubo de diálisis preparado como se
ha dicho y empleando TBS diluída preparada como antes.
La diálisis se realiza en un laboratorio frío (temperatu-
ra ambiente alrededor de 4°C). La solución tampón externa
5 de diálisis se agita magnéticamente. La diálisis se reali-
za durante 18 horas. Se observa un aumento del pH hasta
casi 8,7 en el medio de diálisis. Al final del periodo de
diálisis se forma un precipitado birrefringente turbio, azul/-
blanco, de cristales de pilos GC. El material así precipitado
10 se centrifuga a 7,5 Krpm durante 60 minutos y el líquido
que sobrenada se desprecia para dejar los cristales de pi-
los GC de N. gonorrhoeae cepa Pittsburgh 3-2 como perdigón.
De acuerdo con los procedimientos anteriores, pero para
aislar pilos T₁ en lugar de T₂, el pH inicial de la TBS
15 es 7,0-7,2.

EJEMPLO 8

Nueva purificación de los pilos

20 El perdigón del Ejemplo 7 se suspende en unas 30 ve-
ces su volumen de tampón de etanolamina (pH 10,1). Se hacen
girar suavemente los tubos para disolver el perdigón y la
suspensión se centrifuga durante 60 minutos a 31 Kg. El lí-
quido que sobrenada se separa por decantación y el perdigón
se desprecia. El líquido que sobrenada se dializa frente a
TBS de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 7 y el ma-
25 terial cristalino así obtenido se aísla por centrifugación

1 también de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 7.
El perdigón se suspende una vez más en etanolamina por los
procedimientos anteriores, se filtra a través de un filtro
de 0,45 micras si se desea esterilizar y análogamente se
5 vuelve a centrifugar y a dializar como antes y aislar por
centrifugación.

De acuerdo con los procedimientos anteriores, cuando
los cristales de pilos GC así formados han de ser almace-
nados durante un periodo de tiempo moderado, se agrega un
10 preservativo a la solución TBS dializante donde el preser-
vativo es compatible con ella. Los preservativos compati-
bles que pueden ser utilizados de acuerdo con este procedi-
miento son un 0,05 % en peso/volumen de formaldehído acuoso
neutro, un 0,01 % en peso/volumen de mertiolato o un 0,02 %
15 en peso/volumen de azida sódica.

De acuerdo con el procedimiento anterior, cuando
el preservativo no es compatible con el TBS después de
que han cristalizado los pilos, se separa el tampón Tris
por diálisis frente a solución salina (solución acuosa
20 0,15M de cloruro sódico, 18 horas). El preservativo se
agrega a un lote limpio de dicha solución salina y se diali-
za frente a la suspensión de cristales de pilos GC durante
18 horas. Los cristales se almacenan en este medio a 40°C.
Alternativamente, el medio que contiene los cristales pue-
25 de ser congelado y almacenado a -70°C.

1 Rendimiento

 El rendimiento de cristales de pilos GC de las cepas de N. gonorrhoeae citadas en el Ejemplo 1, donde los inóculos contienen como mínimo un 90 % de tipos coloniales T₂, está comprendido entre 5 y 15 microgramos/cm² de superficie de crecimiento.

 Se obtienen rendimientos similares pero algo menores para los tipos coloniales T₁.

EJEMPLO 9

10 Aislamiento de pilos GC por gradiente de densidad con cloruro de cesio

 Un mililitro de las aguas de lavado TBS (pH 8,5) conteniendo la suspensión de cristales de pilos GC del Ejemplo 6 de diluye hasta 20 ml con tampón Tris a pH 8,5, se ajusta el pH a 10,1 por adición de solución acuosa de hidróxido sódico (0,1N) y se añaden 7,5 g de cloruro de cesio seco. La solución se centrifuga a 200 KG en el rotor SW41 de una centrifuga Beckman L-265, durante 42 horas. Se recogen las fracciones del tubo y se mide la densidad óptica a 280 nm y el índice de refracción para cada muestra. El índice de refracción está relacionado con la densidad del cloruro de cesio a la que se convierten las lecturas del índice de refracción. El número de la fracción se representa en el eje de las X frente a la densidad de la solución en el eje de las Y y la densidad óptica en un segundo

1 eje Y. Se localiza en ζ (densidad flotante) un solo pico principal correspondiente a los pilos GC a $1,3422 \pm 0,0038$. Las fracciones cuyos picos son iguales a 1,35-1,33 se combinan, se dializan y purifican para dar cristales de pilos GC
5 de acuerdo con los procedimientos de los Ejemplos 7 y 8.

EJEMPLO 10

Electroforesis de gel de los pilos GC (Método de Ornstein y Davis - Disc Electrophoresis 1961 - Distillation Products Industries, Rochester, N.Y.)

10 Se preparan unos cilindros patrón de gel de acrilamida al 10% (9,7% de acrilamida y 0,3% de N,N'-metilen-bis-acrilamida se polimeriza con TEMED) y persulfato amónico y se disponen entre tampones de gel y depósito que contenga hidrocloreuro de Tris a pH 8,0 y 0,1% de SDS. La superficie superior del gel se carga con una carga constituida por 50 microgramos de cristales
15 de pilos T₂, 20 microgramos de reactivo de Cleland (0,01M), 1 mg de SDS, 20 λ (microlitros) de glicol y 20 λ (microlitros) de azul de bromofenol (0,002%). Antes de cargarlos, los pilos se calientan con el SDS y el reactivo de Cleland durante 2
20 minutos a 100°C. La electroforesis se realiza a 5 ma (alrededor de 170 v) hasta que el azul de bromofenol ha recorrido 6 cm. Se retiran los geles y se corta a través de la banda decolorante y dos geles se manchan con una mancha de azul de Coomassie (0,2%) para formar dos bandas: una banda principal
25 y una banda secundaria.

1 Los geles no manchados se congelan y se cortan unas
bandas cuya posición corresponde a la de las bandas man-
chadas.

5 La banda principal se extrae con el tampón de re-
serva a 37°C en un separador giratorio durante 24 horas,
se expulsa el tampón y se evapora casi a sequedad. Volvien-
do a tratar el producto, se obtiene una sola banda del
mismo valor Rf. Este material se denomina pilina GC.

Ensayo de antigenicidad de la pilina GC

10 El gel que contiene la banda principal se homoge-
neiza con alrededor de 10 ml de solución salina y se inyec-
ta en 3 conejos experimentales, subcutáneamente. Los anima-
les experimentales P_I y P_{II} reciben 3,1 ml de suspensión
y los P_{III} solamente reciben 2 ml de la suspensión.

15 Se realizan una segunda y una tercera inyecciones
alrededor de 15 y 30 días más tarde. Los materiales de la
segunda y tercera inyecciones se preparan por extracción
de la proteína principal en el tampón de reserva (0,8 ml)
a 37°C durante 24 horas. El tampón extraído se combina
20 después con un volumen igual de coadyuvante incompleto de
Freund y se inyecta un tercio de cada mezcla en cada co-
nejo.

25 Una semana después de la última inyección, todos
los conejos presentan títulos superiores a 1000 en el ensa-
yo PAT frente a los pilos Pittsburgh 3-2 tipo T₂, como
muestra la siguiente tabla.

ENSAYO PCA UTILIZANDO 50 Y/ml DE BILIOS "3-2"

Conejo	PI	PI	PI	PII	PII	PII	PII	PIII	PIII	PIII	PIII	Consejo pre-immune
Toma de sangre: día número	1	15	29	1	15	29	1	15	29	15	29	-204
Ensayo realizado: día número	16	16	35	16	16	35	16	16	35	16	35	35
Dilución	±	+ / ++	3+	3+	3+	4+	±	4+	3+	4+	3+	0
1/2	±	+	3+	3+	5+	5+	0	5+	3+	3+	3+	0
1/4	0	±	3+	3+	5+	5+	0	5+	3+	3+	4+	0
1/8	0	0	3+	3+	5+	5+	0	5+	4+	4+	4+	0
1/16	0	0	3+	3+	5+	5+	0	5+	4+	4+	4+	0
1/32	0	0	3+	4+	4+	4+	0	4+	4+	±	4+	0
1/64	0	0	+	4+	4+	4+	0	4+	0	0	0	0
1/128	0	0	+	4+	4+	4+	0	4+	0	0	++	0
1/256			+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
1/512			+	+	+	+	+	+	+	±	±	0
1/1024			+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
1/2048			0	0	0	0	0	0	0	+	+	0
1/4096			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Punto final	< 2	4	1024	32	> 128	> 4096	< 2	16	2048	16	2048	< 2
3586 (22)												

1

ENSAYO PCA UTILIZANDO 50 γ/ml DE PII

5

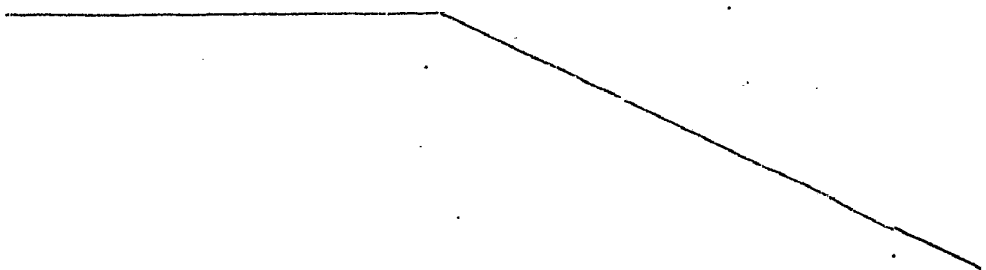
10

15

20

25

Conejo	PI	PI	PI	PII	PII	PII
Toma de sangre: día número	1	15	29	1	15	29
Ensayo realizado: día número	16	16	35	16	16	35
Dilución						
1/2	±	+ / ++	3+	3+	3+	4+
1/4	±	+	3+	3+	5+	5+
1/8	0	±	3+	3+	5+	5+
1/16	0	0	3+	3+	5+	4-
1/32	0	0	3+	±	4+	4+
1/64	0	0	+	0	4+	3+
1/128	0	0	+	0	4+	3+
1/256			+			3+
1/512			+			++
1/1024			+			++
1/2048			0			+
1/4096			0			+
Punto final	< 2	4	1024	32	>128	>4096
3586 (22)						



ENSAYO PCA UTILIZANDO 50 γ /ml DE PILOS "3-2"

PI	PI	PI	PII	PII	PII	PIII	PIII	PIII	Conejo pre- inmune
1	15	29	1	15	29	1	15	29	-204
16	16	35	16	16	35	16	16	35	35
+	+/++	3+	16	3+	4+	±	++	3+	0
+	+	3+	3+	5+	5+	0	3+	3+	0
0	±	3+	3+	5+	5+	0	3+	4+	0
0	0	3+	3+	5+	4+	0	++	4+	0
0	0	3+	+	4+	4+	0	±	4+	0
0	0	+	0	4+	3+	0	0	0	0
0	0	+	0	4+	3+	0	0	++	0
		+	0		3+			+	0
		+			++			±	0
		+			++			+	0
		+			+			+	0
		0			+			0	0
		0			+			0	0
< 2	4	1024	32	>128	>4096	< 2	16	2048	<2



1 La electroforesis en placa de gel frente a mioglobi-
na, quimotripsinógeno y gamma-globulina humana dan a la frac-
ción principal un peso molecular de 20.500 a 21.500 y a la
5 proteína secundaria un peso molecular de 28.000 aproximada-
mente.

EJEMPLO 11

Análisis de hidratos de carbono - Ensayo con fenol-ácido sulfúrico

10 Se prepara una curva patrón por tratamiento de una
solución de glucosa de reserva con una solución acuosa de
hidróxido sódico 0,1N y midiendo la absorción UV a 485 nm.
Las operaciones con pilos Pittsburgh 3-2 y los pilos CDC
B-2 indican un contenido esencialmente igual de hidratos de
15 carbono, es decir, $1,49 \pm 0,56$ % correspondiente a restos
de 1,2-hexosa por sub-unidad proteica.

EJEMPLO 12.

Análisis de fósforo

(Método de Chen y colaboradores, Anal.Chem., 28, 1756(1956))

20 Los pilos se digieren en ácido sulfúrico y se ana-
lizan frente a una solución de dihidrógeno-fosfato potásico
en agua por el ensayo de molibdato amónico-ácido ascórbico.
El valor medio para las cepas de pilos Pittsburgh 3-2 es
0,332 \pm 0,026 % y para los pilos de la cepa CDC B-2, 0,366 \pm
25 0,048 %, indicando la presencia de 2,5 y 2,3 átomos de fós-
foro por sub-unidad de proteína, respectivamente.

1

EJEMPLO 13

Análisis de aminoácidos de los cristales de pilos tipo T₂

(Método modificado de Spackman y colaboradores, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)).

5

El análisis se realiza en una analizador de aminoácidos Beckman Spinco modelo 120B utilizando como patrón interno la norluceína y el ácido 2-amino-3-guanidinopropiónico. La muestra de proteína (10 mg) se hidroliza con ácido clorhídrico concentrado a temperaturas elevadas (6N, 110°C), durante 24 horas, en viales evacuados (0,025 mm Hg). El análisis de triptófano se estima por el método espectral de Bence y colaboradores (Anal.Chem. 29, 1193 (1957)).

10

aspártico + asparagina	26	isoleucina	9
alanina	23	arginina	9
glutámico + glutamina	21	tirosina	7
lisina	20	prolina	6
glicina	17	triptófano	4-5
valina	17	histidina	3
serina	14	1/2 cistina	2
leucina	12	metionina	2
treonina	9	fenilalanina	2

15

20

Indice de aminoácidos - 200 ± 9; P.M. 21.500 ± 1000 daltons.

25

EJEMPLO 14

Propiedades físicas

Solubilidad

1
5 Los cristales de pilos, que aparecen en un microscopio electrónico como haces de barras de pilos, se encuentran en estado cristalino a pH aproximadamente 5,5 y pH aproximadamente 9,3. Los cristales de las variantes T₂ comienzan a separarse en barras sencillas de pilos entre pH 9,3 y 10,1. Alrededor de pH 10,1 existen como simples
10 barras de pilos. Análogamente, los cristales de pilos T₁ comienzan a separarse en barras sencillas a pH 7,7 y se encuentran en forma de barras por encima de pH 8,6; es decir, los cristales están totalmente desagregados. Por encima de alrededor de pH 11,0, las barras de pilos T₂ se
15 desintegran en unidades oligoméricas más pequeñas con una constante de sedimentación de 5,5 aproximadamente.

Los cristales de pilos son solubles a pH 8,5 en solución acuosa 4M de cloruro sódico, sacarosa acuosa al
20 50 % y solución acuosa saturada al 20 % de cloruro sódico (ambas en peso). Los cristales también son solubles en urea 3M y más concentrada. Sin embargo, por tratamiento con urea 3,5M o más durante más de 2 días se produce la desnaturalización de los pilos GC.

Ultracentrifugación

25 Se forma un preparado de pilos GC (1 mg/ml) en tam-

1 pón de etanolamina (fuerza iónica 0,147, pH 10,1). La so-
lución se centrifuga a 20 Krpm en una ultracentrífuga
Beckman Spinco modelo E utilizando un rotor AN-D. La velo-
5 cidad de sedimentación sin corregir S es igual a 37
svedbergs.

Dimensiones de las barras de pilos

Los cristales de pilos GC se recogen en tampón
de etanolamina a pH 10,0 con barras de disco apiladas de
proteína TMV negativamente manchadas y se examinan en un
10 microscopio electrónico. El diámetro medio de los pilos GC
es $83,4 \pm 2,3 \text{ \AA}$

EJEMPLO 15

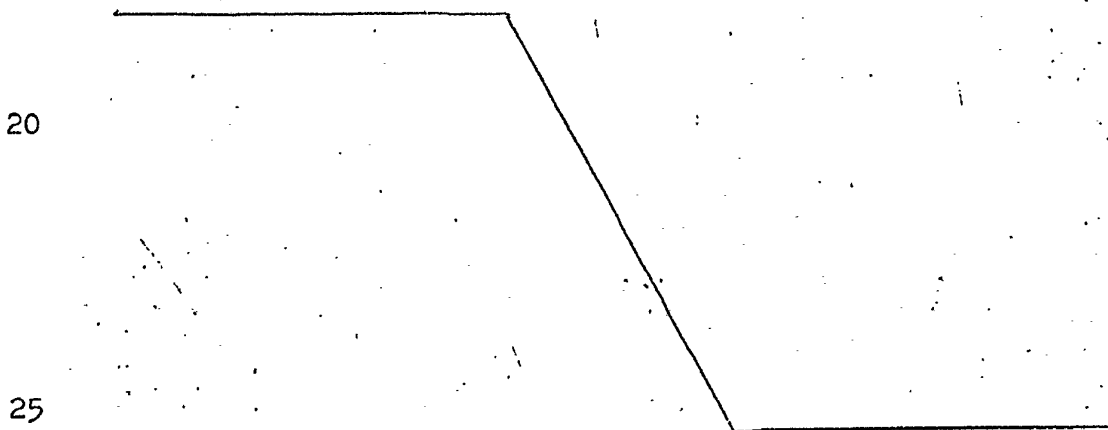
Ensayo PAT

Los cristales de pilos se suspenden en TBS a pH 7,0,
15 a una concentración comprendida entre 30 y 60 $\mu\text{g/ml}$. Se uti-
liza un suero de ensayo no enturbiado. Cuando el suero de
ensayo es turbio, se centrifuga a 30 KG durante 30 minutos
y se utiliza el líquido que sobrenada. Se preparan dilucio-
nes seriadas del suero y 0,025 ml de las muestras de suero
20 y 0,025 ml de la suspensión de cristales de pilos se car-
gan en cada una de las depresiones de una placa de micro-
valoración y la mezcla se agita durante 30 minutos a la
temperatura ambiente. Después se examinan las depresiones
para determinar el arracimamiento de cristales en un micros-
25 copio de campo oscuro.

1 A continuación las depresiones se clasifican sobre la base de la dilución máxima que da una aglutinación de cristales observablemente mayor que la del control.

Ensayo de la muestra

5 Unas conejas blancas de Nueva Zelanda, con un peso de 4 a 6 libras (1,8 a 2,7 kg) se inyectan subcutáneamente con unos preparados de pilos purificados de cepas CDCM-2, Pittsburgh 3-2, CDCT-2, CDC005-2 y Pittsburgh 4-2, mezclado
10 1:1 con coadyuvante incompleto de Freund y emulsionado agitando la mezcla con una jeringa. Se administran alrededor de 100 a 200 µg/kg de pilos en tres inyecciones a intervalos de 2 semanas y las conejas se sangran una a dos semanas después de la tercera inyección. Se deja que la sangre coagule y se retira el suero en la forma habitual. Los tres primeros sueros de ensayo se tratan después con los pilos de
15 21 cepas de N. gonorrhoeae y los resultados están indicados en la siguiente tabla.



1

TABLA I

Títulos de aglutinación de los cristales de pilos de 21 cepas diferentes frente a sueros prepa-

rados con pilos de 3 cepas diferentes

Piloso-suero, cepa	Pilos, cepa			Pittsburgh 6-2			CDC B-2			CDC M-2		
	Pittsburgh 3-2	Pittsburgh 4-2	Pittsburgh 6-2	Pittsburgh 4-2	Pittsburgh 6-2	Pittsburgh 8-2	CDC B-2	CDC C-2	CDC M-2	CDC B-2	CDC C-2	CDC M-2
CDCM-2	16	256	16	16	8	84	8	32	128	8	32	128
Pittsburgh 3-2	256	16	16	8	8	64	512	<8	8	512	<8	8
CDC-T-2	4	16	16	<4	<4	<4	8	32	16	8	32	16
Pilos-suero, cepa	Piloso, cepa											
CDC T-2	CDC T-2	Atlanta 4-2	Atlanta 6-2	Atlanta 8-2	Atlanta 10-2	Seattle 1-2	Atlanta 10-2	Atlanta 10-2	Atlanta 10-2	Atlanta 10-2	Atlanta 10-2	Atlanta 10-2
CDCM-2	8	16	<8	8	16	32	32	32	8	32	32	8
Pittsburgh 3-2	8	16	64	8	16	16	32	32	8	32	32	8
CDC-T-2	512	32	8	32	64	64	16	16	128	16	16	128

15

20

25

1

TABLA I

Títulos de aglutinación de los cristales de pilos de 21 cepas di
 rados con pilos de 3 cepas diferentes

		Pilos, cepa			
		Pittsburgh 3-2	Pittsburgh 1-2	Pittsbu 4-2	
5	Pilos-suero, cepa				
	CDCM-2	16	256	16	
	Pittsburgh 3-2	256	16	8	
	CDC-T-2	4	16	< 4	
		Pilos, cepa			
		CDC T-2	Atlanta 4-2	Atlanta 6-2	Atlanta 9-2
10	Pilos-suero, cepa				
	CDCM-2	8	< 8	8	
	Pittsburgh 3-2	8	64	8	
	CDC-T-2	512	32	8	32

15

20

25

TABLA I

de los cristales de pilos de 21 cepas diferentes frente a sueros prepara-
dos con pilos de 3 cepas diferentes

cepa	Pittsburgh 3-2	Pittsburgh 1-2	Pittsburgh 4-2	Pittsburgh 6-2	CDC B-2	CDC C-2	CDC M-2
16		256	16	84	8	32	128
256		16	8	64	512	<8	8
4		16	<4	<4	8	32	16

cepa	CDC T-2	Atlanta 4-2	Atlanta 6-2	Atlanta 9-2	Seattle 1-2	Seattle 3-2	Atlanta 10-2	CDC (Kellog) F62
8		16	<8	8	16	32	32	8
8		16	64	8	16	16	32	8
512		32	8	32	64	16	18	128

TABLA I (continuación)

Piloso suero, cepa	Piloso, cepa				
	Pittsburgh 7-2	Norfolk 2-2	Norfolk 7-2	Dayton 8-2	Seattle 9-2
CDCM-2	16	64	8	16	16
Pittsburgh 3-2	128	64	16	64	128
CDC T-2	16	32	8	8	16

* 005 es una cepa CDC aislada de un paciente con infección AC diseminada.

1

5

10

15

20

25

1

TABLA I (continuación)

Pilos, cepa		Pittsburgh	Norfolk	Norfolk	Day
Pilos suero, cepa		7-2	2-2	7-2	8-
CDCM-2		16	64	8	
Pittsburgh 3-2		128	64	16
CDC T-2		16	32	8

5

* 005 es una cepa CDC aislada de un paciente con infección GC dis

10

15

20

25

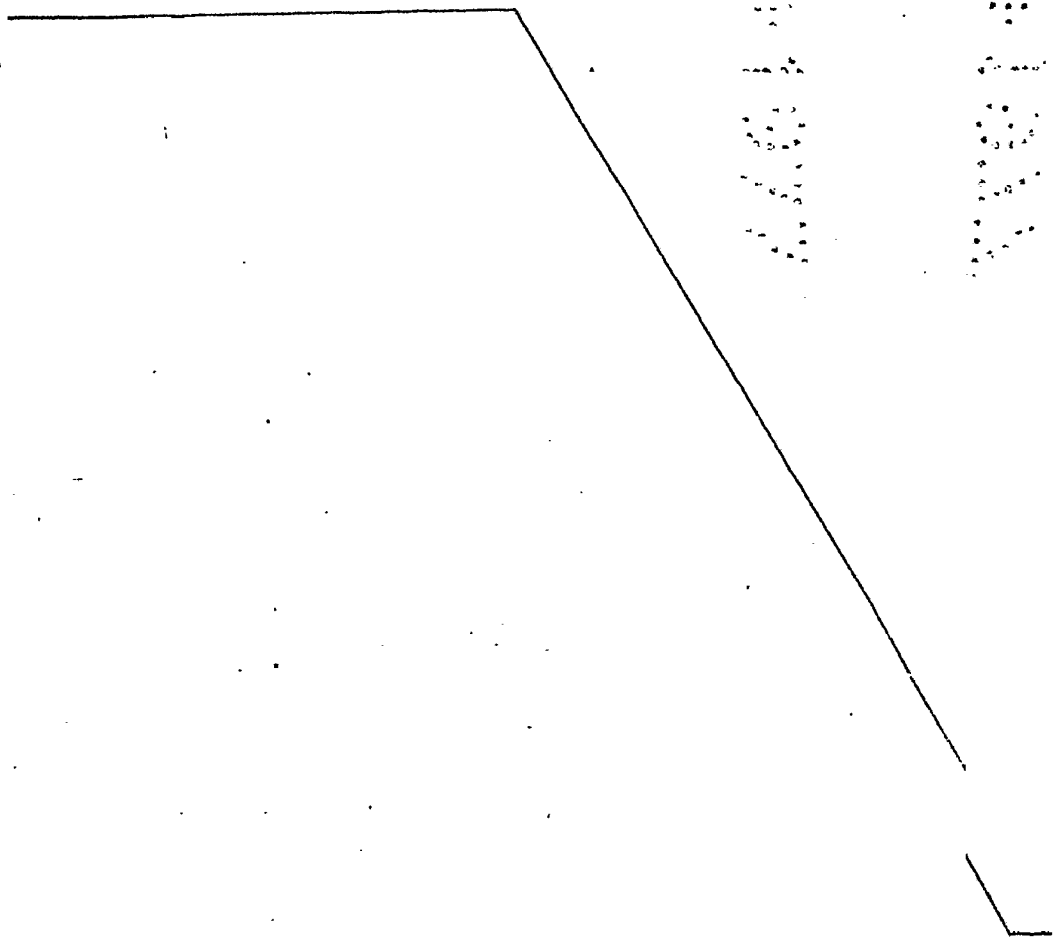
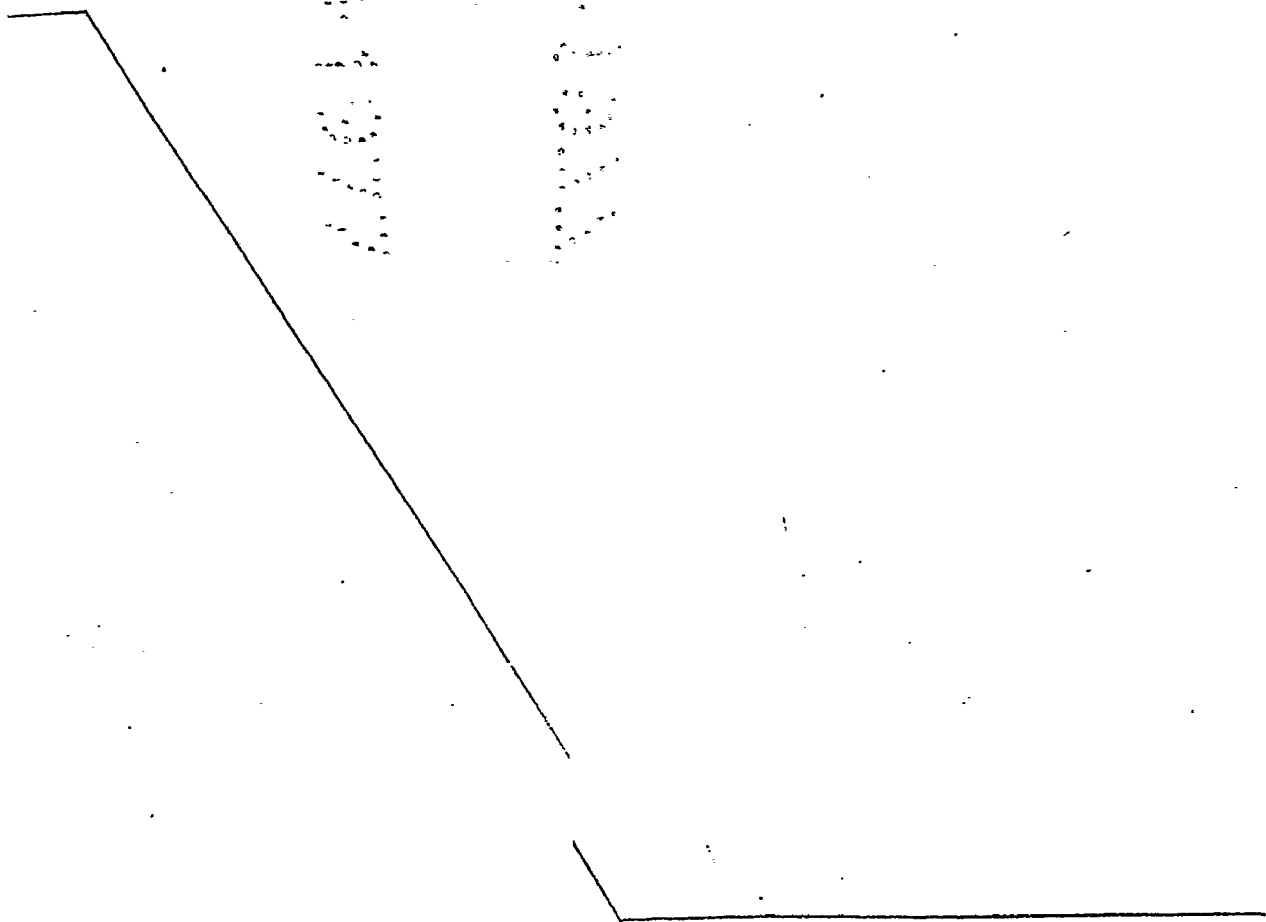


TABLA I (continuación)

epa	Pittsburgh 7-2	Norfolk 2-2	Norfolk 7-2	Dayton 8-2	Seattle 9-2	CDC *005-2
	16	64	8	16	16	32 a 64
	128	64	16	64	128	128
	16	32	8	8	16	64

ada de un paciente con infección SC diseminada.



1

De acuerdo con el procedimiento anterior se lleva a cabo una prueba de aglutinación de pilos de serotipo 7x7 usando los pilos y sueros derivados de siete cepas designadas. Para facilitar la interpretación de los resultados establecidos en la siguiente tabla, las lecturas de la reacción cruzada (pilos contra sueros de la misma cepa) se normalizan a 100 y las otras lecturas se ajustan correspondientemente.

5

10

15

20

25

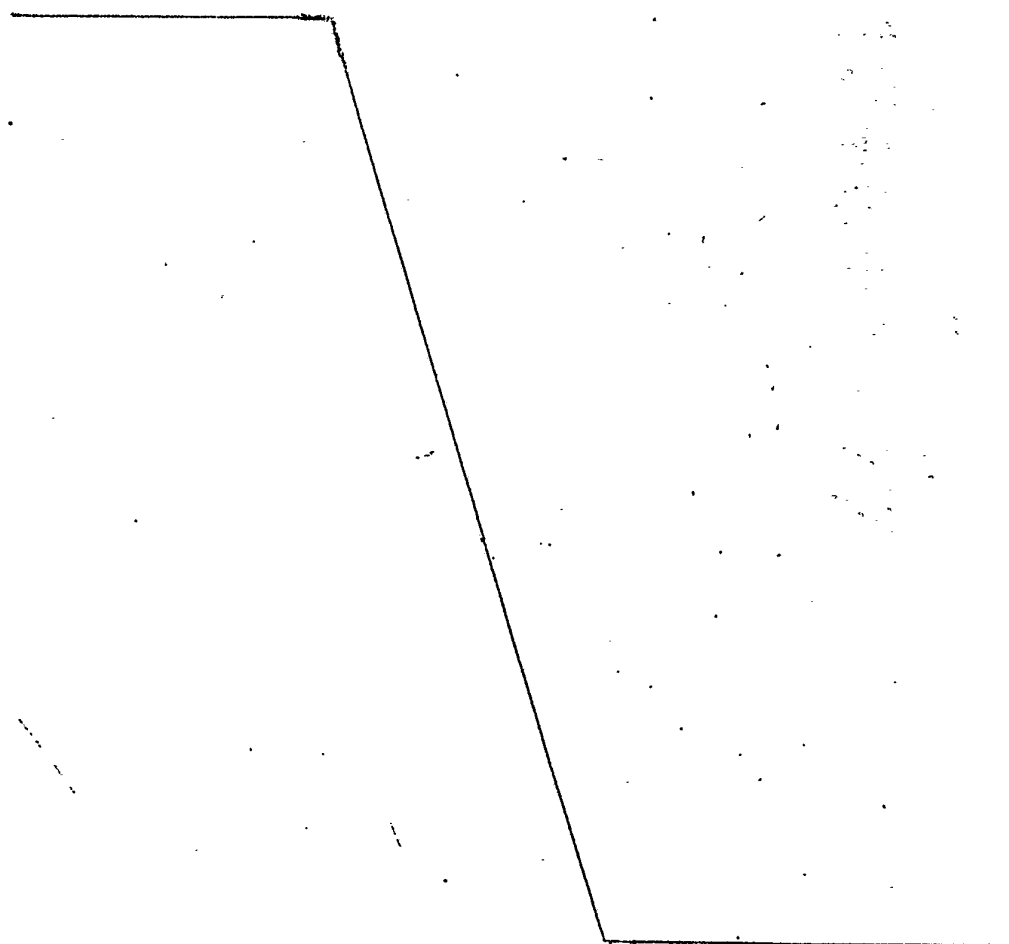


TABLA 1a

SUERO CEPA	Pitts- burgh 3-2	Pitts- burgh 4-2	CDC M-2	CDC T-2	CDC 339-2	CDC C-2	Norfolk 2-2
PILOS CEPA							
Pittsburgh 3-2	100	3,1	8,3	0,17	1,5	<0,008	0,52
Pittsburgh 4-2	0,16	100	<4,2	0,086	0,20	<0,008	0,065
CDC M-2	<0,039	<0,024	100	<0,02	0,20	0,13	0,016
CDC T-2	<0,31	<0,024	<4,2	100	0,20	<0,008	0,032
CDC 339-2	2,5	<0,024	<4,2	<0,02	100	0,016	0,260
CDC C-2	<0,0039	<0,78	<4,2	0,17	0,10	100	0,065
Norfolk 2-2	<0,31	0,78	<4,2	0,04	0,78	<0,008	100

1

5

10

15

20

25

TABLA 1a

SUERO CEPA	Pitts- burgh 3-2	Pitts- burgh 4-2	CDC M-2	CDC T-2	CDC 339-2
Pittsburgh 3-2	100	3,1	8,3	0,17	1,6
Pittsburgh 4-2	0,16	100	4,2	0,036	0,20
CDC M-2	<0,039	<0,024	100	<0,02	0,20
CDC T-2	<0,31	<0,024	4,2	100	0,20
CDC 339-2	2,5	<0,024	4,2	<0,02	100
CDC C-2	<0,0039	<0,78	4,2	0,17	<0,10
Norfolk 2-2	<0,31	0,78	4,2	0,04	0,78

1

5

10

15

20

25

TABLA 1a

Pitts- burgh 3-2	Pitts- burgh 4-2	CDC M-2	CDC T-2	CDC 339-2	CDC C-2	Norfolk 2-2
100	3,1	8,3	0,17	1,6	<0,008	0,52
0,16	100	<4,2	0,086	0,20	<0,008	0,065
<0,039	<0,024	100	<0,02	0,20	0,13	0,016
<0,31	<0,024	<4,2	100	0,20	<0,008	0,032
2,5	<0,024	<4,2	<0,02	100	0,016	0,260
<0,0039	<0,78	<4,2	0,17	<0,10	100	0,065
<0,31	0,78	<4,2	0,04	0,78	<0,008	100

1

EJEMPLO 16

Serotipificación

5

Los ensayos PAT del Ejemplo 15 indican que tres o cuatro cepas contienen pilos que llevan solamente un determinante. Esto fué confirmado tratando sueros derivados de pilos de 4 cepas seleccionadas frente a los pilos correspondientes. Los resultados se encuentran en la siguiente tabla. La respuesta máxima ha sido normalizada a 100 para ajustar los diferentes títulos.

10

Pilos	Antisueros				Determinante antigénico
	Pittsburgh 3-2	CDC M-2	CDC T-2	Pittsburgh 4-2	
Pittsburgh 3-2	100	3	2	1	a
CDC M-2	3	100	1	2	b
CDC T-2	0,4	2	100	2	c
Pittsburgh 4-2	2	2	1	100	d

15

Serotipificación de cepas de composición determinante desconocida

20

Se cultivan pilos de las cepas bajo ensayo y se tratan frente a antisueros frente a los pilos que llevan los determinantes únicas a, b, c, d, e, f y g. En el ensayo PAT los pilos presentan aglutinación con una o más determinantes sencillos como demuestra la siguiente tabla.

25

	<u>Cepa</u>	<u>Serotipo</u>
1	Pittsburgh 3-2	a - - -
	CDC M-2	- b - -
	CDC T-2	- - c -
5	Pittsburgh 4-2	- - - d
	Norfolk 7-2	- - - d
	CDC B-2	- b - -
	Pittsburgh 6-2	- b - -
	CDC C-2	- - - - e
10	CDC 005-2	a b c d
	Norfolk 2-2	- - - - - f
	Seattle 1-2	- - c
	Seattle 3-2	a - -
	Dayton 8-2	- b c d
15	Atalanta 4-2	- b - -
	Atlanta 6-2	- b -
	Atlanta 10-2	a b -
	Atlanta 9-2	- b - d
	CDC 339-2	- - - - - g

EJEMPLO 17

Hemoaglutinación por preparados de pilos GC

Métodos generales

Se obtiene de un banco de sangre una sangre humana tipo O conteniendo IDTA como anticoagulante. Se preparan recientemente unos glóbulos rojos lavando una parte alícuota de sangre cuatro veces con 15 volúmenes de solución sa-

1 lina regulada con fosfato 0,01M a pH 7,3 y preparando una
suspensión al 3 % en volumen en el mismo tampón.

5 Se preparan soluciones de 1,0 mg/ml de pilos Pitts-
burgh 3-2 y CDC M-2 empleando la absorbancia ultravioleta de
los preparados a 280 nm, corregida para la dispersión, como
medida de la concentración. Unas partes alícuotas (50λ) de
las soluciones de 1,0 mg/ml de pilos se colocan en la prime-
ra depresión de una placa de microvaloración Cooke con fon-
do en forma de U, colocando 25λ de solución salina regula-
10 da con Tris + 0,02 % de azida en todas las demás depresiones
y los pilos se diluyen con un microdiluidor manual de 25λ
hasta la duodécima depresión.

15 A cada depresión de ensayo se agregan 25λ de solu-
ción salina regulada con Tris o de solución salina y 25
de una suspensión al 3 % de glóbulos rojos, se agita la
placa suavemente para mezclar y se coloca a 4°C. Los resul-
tados se leen al cabo de 1 o 2 horas con ayuda de una caja
luminosa.

Resultados

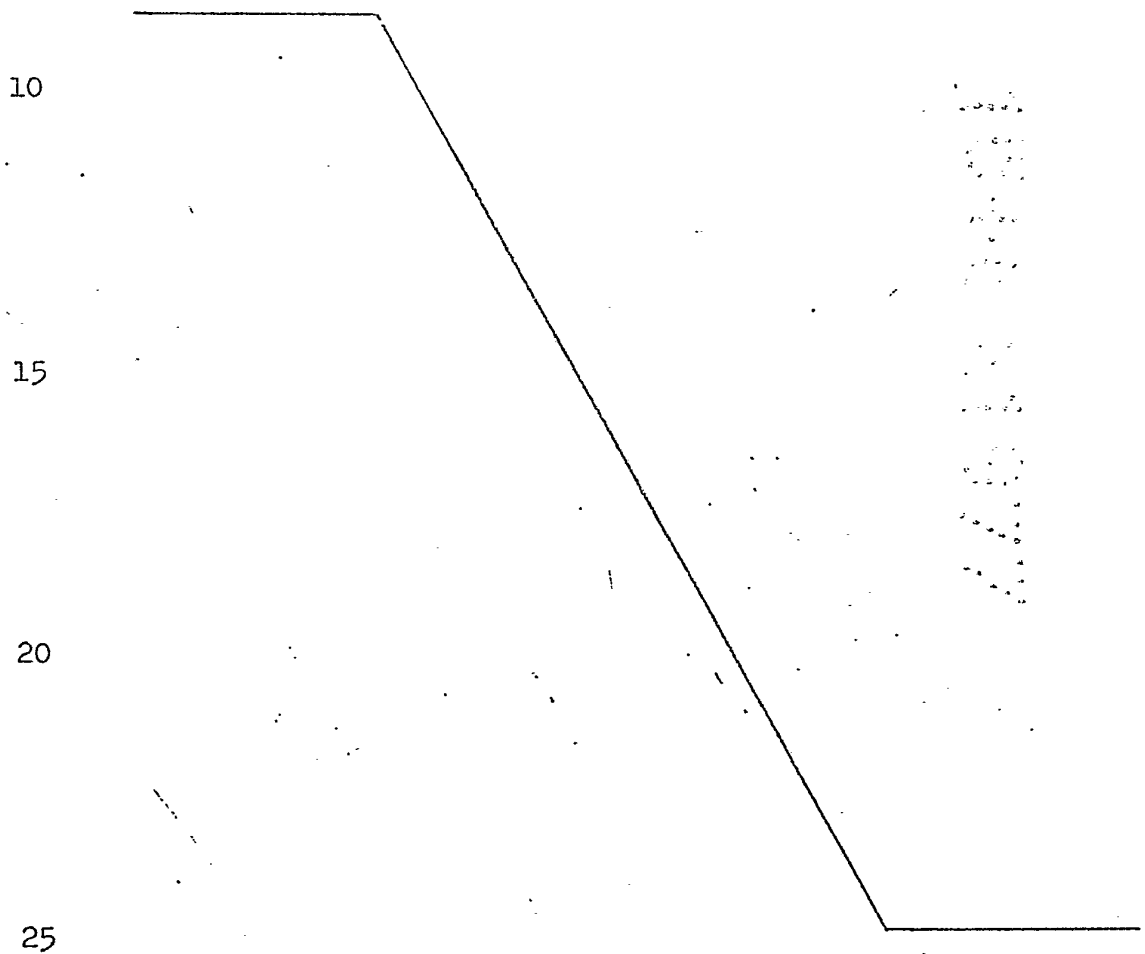
20 Los grados de hemoaglutinación observados son:

5+ No hay perdigón ni coágulos de células; color ro-
jo uniforme en la depresión

4+ Trazas de perdigón de células

25 3+ Pequeño perdigón de células con un borde muy
claro de racimos de células

- 1 2+ Perdigón de células claro con un reborde de un número moderado de racimos
- + Perdigón de células claro con algunos racimos hacia los lados de la depresión.
- 5 Los títulos de los pilos CDC M-2 y Pittsburgh 3-2 se realizaron en dos ocasiones diferentes, encontrándose en la siguiente tabla y constituyen los ensayos de control.



RESULTADOS DE HEM. AGLUTINACIÓN

Depresión n.º	Primera operación		Segunda operación	
	Concentración final de pilos 3-2 y M-2 en la depresión	Grado de aglutinación Pilos 3-2 M-2	Concentración final de pilos 3-2 en la depresión	Grado de aglutinación Pilos 3-2 M-2
1	333 γ/ml	5+	450 γ/ml	5+
2	166,6 γ/ml	4+	225 γ/ml	5+
3	83,3 γ/ml	3+	112,5 γ/ml	5+
4	41,6 γ/ml	2/3+	56 γ/ml	4+
5	20,8 γ/ml	±	28 γ/ml	+
6	10,4 γ/ml	0	14 γ/ml	±
7	5,2 γ/ml	0	7 γ/ml	0
8	2,6 γ/ml	0	3,5 γ/ml	0
9	1,3 γ/ml	0	1,75 γ/ml	0
10	0,6 γ/ml	0	0,88 γ/ml	0
11	0,3 γ/ml	0	0,44 γ/ml	0
12	0,15 γ/ml	0	0,22 γ/ml	0

1

RESULTADOS DE HEMOAGLUTINACION

5

10

15

20

25

Depresión n°	Concentración final de pilos 3-2 y M-2 en la depresión	Primera operación		Concentración final de pi- los 3-2 en la depresión	Gr ti
		Grado de aglutina ción			
		Pilos 3-2	Pilos M-2		
1	333 γ/ml	5+	5+	450 γ/ml	
2	166,6 γ/ml	4+	4+	225 γ/ml	
3	83,3 γ/ml	3+	4+	112,5 γ/ml	
4	41,6 γ/ml	2/3+	4+	56 γ/ml	
5	20,8 γ/ml	±	3+	28 γ/ml	•••••
6	10,4 γ/ml	0	3+	14 γ/ml	•••••
7	5,2 γ/ml	0	2+	7 γ/ml	•••••
8	2,6 γ/ml	0	±	3,5 γ/ml	•••••
9	1,3 γ/ml	0	0	1,75 γ/ml	•••••
10	0,6 γ/ml	0	0	0,88 γ/ml	•••••
11	0,3 γ/ml	0	0	0,44 γ/ml	•••••
12	0,15 γ/ml	0	0	0,22 γ/ml	•••••

RESULTADOS DE HEMOAGLUTINACION

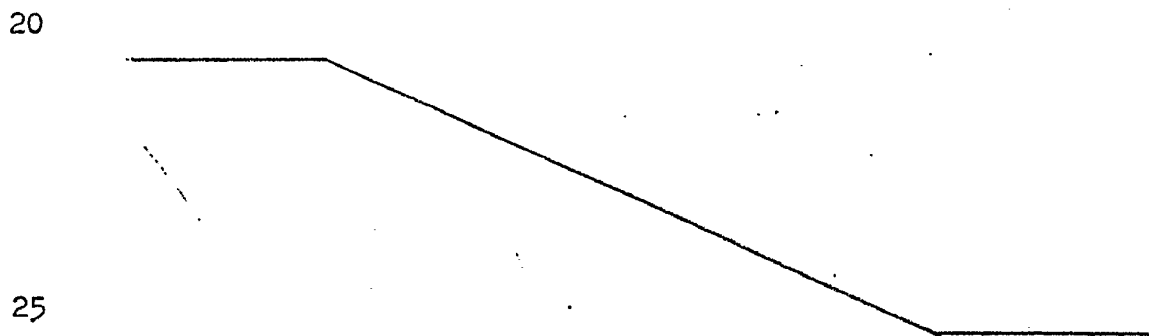
al 2	Primera operación		Concentración final de pi- los 3-2 en la depresión	Segunda operación		
	Grado de aglutina- ción			Grado de aglu- tinación, pi- los 3-2	Concentración final de M-2 en la depresión	Grado de aglu- tinación, pi- los M-2
	Pilos 3-2	Pilos M-2				
	5+	5+	450 γ/ml	5+	92 γ/ml	5+
	4+	4+	225 γ/ml	5+	46 γ/ml	5+
	3+	4+	112,5 γ/ml	5+	23 γ/ml	5+
	2/3+	4+	56 γ/ml	4+	11,5 γ/ml	4+
	±	3+	28 γ/ml	+	5,8 γ/ml	+
	0	3+	14 γ/ml	0	2,9 γ/ml	±
	0	2+	7,8 γ/ml	0	1,4 γ/ml	0
	0	±	3,5 γ/ml	0	0,7 γ/ml	0
	0	0	1,75 γ/ml	0	0,35 γ/ml	0
	0	0	0,88 γ/ml	0	0,17 γ/ml	0
	0	0	0,44 γ/ml	0		0
	0	0	0,22 γ/ml	0		0

1 Inhibición de la hemoaglutinación: separación del complejo
Ab-Ag de las mezclas de antisuero-pilos antes de la titu-
lación de la hemoaglutinación

Métodos:

5 Para eliminar la hemoaglutinación de fondo por el
suero solo, se añaden 0,1 ml de glóbulos rojos lavados no
diluídos (RBCs) a porciones de 1 ml de antisueros en tubos
de centrifuga de vidrio, de fondo redondo. Los tubos se
tapan fuertemente con parafilme y se colocan de pie en
10 una gradilla sobre un rotator Yankee a 4°C. Al cabo de
una hora y diez minutos, los sueros se centrifugan a
2400 rpm en un centrifuga refrigerada International. Se
determina su capacidad de hemoaglutinación. Después los
sueros se clarifican por centrifugación a 12.000 G en una
15 centrifuga Sorvall RC-2.

La absorción de los factores de hemoaglutinación
de fondo a diversas diluciones antes y después del trata-
miento con glóbulos rojos del antisuero se encuentra en
la siguiente tabla.



	<u>Depresión</u>	<u>Dilución del suero</u>	<u>Pre-adsorción</u>	<u>Post-adsorción</u>
1	1	1/2	4+	2+
	2	1/4	3+	+
	3	1/8	3+	+
5	4	1/16	3+	0
	5	1/32	2+	0
	6	1/64	+	0
	7	1/128		
	8	1/256		0
10	9	1/512		0
	10	1/1024		0
	11	1/2048		0
	12	1/4096		0

15 Separación de los complejos Ab-Ag:

Se preparan en solución salina unas diluciones seriadas de sueros pre-inmunes y anti-CDCM-2 de conejo adsorbidos en RBC. Se agregan unas partes alícuotas de 0,1 ml de cada dilución a 0,1 ml de 100 γ /ml de pilos M-2 en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Los tubos se incuban de pie en un rotator Yankee durante una hora a 37°C. Después se centrifugan durante un minuto en la microcentrífuga Beckman. Se retira algo más de la mitad del líquido que sobrenada y se introducen en cada una de las dos depresiones de una placa de microtitulación

20

25

1 50λ de cada dilución de antisuero. Se agrega una parte alícuota de 25λ de RBCs al 3 % en solución salina regulada con fosfato, se agita la placa suavemente para mezclar y se deja a 4° durante una hora.

5 Los resultados se encuentran en la siguiente tabla. Cuando se utilizan otros pilos en lugar de los pilos CDC-M-2, se obtienen resultados similares con sueros que contienen anticuerpos contra dichos pilos.

Concentración de suero frente a pilos CDC M-2, durante la incubación con 50γ/ml de pilos M-2	Títulos de hemoaglutinación en hileras duplicadas	
	G	H
1/10	+	+ *
1/20	0	0
1/40	0	0
1/80	±	±
1/160	+	+
1/320	2+	2+
1/640	3+	3+
1/1280	2+	2+
1/2560	2+	2+
1/10 suero de conejo pre-inmune	2+/3+	2+/3+

20 * Obsérvese que el suero anti-CDC M-2 solo tiene una hemoaglutinación + a una dilución de 1/8.

25

1

EJEMPLO 18

Ensayo en seres humanos

5

Se preparan cristales de pilos T₂ a partir de organismos Pittsburgh 3-2, preservados con 0,01 % de mertiolato y emulsionados con coadyuvante incompleto de Freud. La suspensión de pilos se inyectó en hombres voluntarios como sujetos experimentales. El sujeto B recibió tres inyecciones de 2,2 µg/kg, 2,2 µg/kg y 55 µg/kg a intervalos de 2 semanas. El sujeto R recibió tres inyecciones de 11 µg/kg, 11 µg/kg y 55 µg/kg a intervalos iguales. Los títulos PAT de ambos sujetos ascendieron a 100 después de la primera inyección y a más de 200 durante los 4 meses siguientes.

10

15

Los sujetos fueron atacados por introducción intra-uretral de un número predeterminado de organismos de la misma cepa, cuya virulencia había sido previamente ensayada. El mismo organismo fué administrado a 3 sujetos de control no inmunizados: T, S y M.

20

Los resultados del ensayo se encuentran en la siguiente tabla:

25

1 Dosis de resistencia e infección de gonococos Pittsburgh
3-2 para sujetos humanos inmunizados con pilos y no inmu-
nizados

	4 Sujetos originales	* Inmunizados	
5	<u>Dosis infec-</u> <u>ciosa</u>	<u>Sujetos infec-</u> <u>tados</u>	<u>Sujetos resis-</u> <u>tentes</u>
	8×10^1	T	B*, R*, S
	3×10^2		B*, R*, S
	8×10^3	S	B*, R*
10	3×10^4	B*, R*	
	<u>Un sujeto adicional</u>		
	8×10^1		M
	3×10^2		M
	8×10^2		M
15	1×10^3	M	

De acuerdo con los procedimientos anteriores, en lugar de utilizar simplemente pilos con un solo determinante, puede utilizarse una dosis compuesta de pilos conteniendo todos los determinantes.

20 Análisis de los resultados

El análisis de probabilidades de los resultados anteriores indica que la DI_{50} de un sujeto no inmune es 50×10^2 organismos y de $2,0 \times 10^4$ para sujetos inmunes.

25 Otro trabajo experimental ha demostrado que la probabilidad de que un macho sea infectado por una hembra

1 es alrededor del 30 %, producida por unos 250 organismos
introducidos en el tracto uretral del macho durante la re-
lación.

5 Los resultados de los ensayos de esta invención
indican que la probabilidad de infección de un macho por
una hembra infectada durante sus relaciones desciende des-
de el 30 % al 0,86 % como resultado de la inmunización has-
ta un título PAT de 100 a 200.

10 Habiendo descrito la invención, se considera co-
mo una novedad y, por lo tanto, declaramos como de nuestra
propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

- 15 1. Un procedimiento de aislamiento de pilos de
N. gonorrhoeae que comprende las operaciones consecutivas
de:
- a) disolver los pilos para separarlos de una mezcla acuosa
heterogénea que los contiene.
 - b) separar la solución que los contiene y
 - c) precipitar los pilos de la solución,
- 20 donde los reactivos de la etapa (a) están seleccionados en-
tre el grupo formado por:
- i) agua suficiente para reducir la fuerza iónica de la sal
por debajo de 0,002,
 - ii) cantidad suficiente de sal de un anión ácido mineral y
- 25 un metal alcalino o alcalino-térreo para elevar la fuer-

- 1 za iónica por encima de 4,4,
- iii) reducir el pH de la mezcla acuosa por debajo de 4,5
 pero por encima de 2,5,
- 5 iv) sacarosa suficiente para elevar la concentración de
 sacarosa por encima del 50 % en peso
- v) base suficiente para elevar el pH por encima de 10.
 Los reactivos de la etapa (c) están seleccionados
 respectivamente entre el grupo formado por:
- 10 i) sales suficientes de aniones de ácidos minerales y
 de metales alcalinos o alcalino-térreos para elevar
 la concentración iónica de la sal hasta una fuerza
 iónica superior a 0,05,
- ii) agua suficiente para reducir la fuerza iónica de la
 sal a menos de 0,5,
- 15 iii) solución salina regulada con Tris suficiente para pro-
 porcionar un medio de fuerza iónica 0,05 a 0,5 a un
 pH comprendido entre 4,5 y 9,2,
- iv) agua suficiente para reducir la concentración de saca-
 rosa por debajo del 40 % en peso.
- 20 v) (i) iones de amonio suficientes para precipitar los
 pilos
- (ii) ácido suficiente para reducir el pH hasta entre
 9,2 y 4,5.

25 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que
 comprende la etapa inicial preparativa adicional de

- 1 d) suspender el cultivo de células *N. gonorrhoeae* piliados
 en un medio acuoso a un pH por debajo de pH 9,2 y por
 encima de pH 4,5.
- β) separar las porciones solubles e insolubles de dichas
5 suspensiones una de la otra para proporcionar una mezcla
 de pilos y residuos celulares que se separan adicionalmen-
 te según la etapa a) de la reivindicación 1.

 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, para
 la preparación de cristales de pilos procedentes de *N. gonorrhoeae*
10 que comprende las operaciones de:

- a) suspender el cultivo de células piliadas de *N. gonorrhoeae*
 en un medio acuoso a un pH inferior a 9,2 y superior a 5,5,
 b) separar las partes solubles e insolubles de dichas suspen-
 siones unas de otras,
- 15 c) suspender la parte insoluble de la etapa (b) en un medio
 acuoso con un pH comprendido entre 7,7 y 11,0
 d) separar la parte insoluble de la soluble de la suspensión
 de la etapa (c) una de otra,
 e) reducir el pH de la parte soluble obtenida en la etapa
20 (d) por debajo de 9,2 y por encima de 4 para formar cris-
 tales de pilos y
 f) separar los cristales de pilos así formados del citado
 medio acuoso.

 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde
25 el método de separación de las etapas (b), (d) y (f) es una

1 filtración donde la parte insoluble de la suspensión se
mantiene sobre la superficie del medio filtrante y la par-
te soluble de la suspensión atraviesa el medio filtrante
como filtrado.

5 5. Un procedimiento según la reivindicación 3, don-
de el método de separación en las etapas (b), (d) y (f) es
una centrifugación en la que la parte insoluble de la sus-
pensión se comprime en forma de perdigón y la parte soluble
de la suspensión es un líquido que sobrenada sobre dicho per-
10 digón y que puede separarse de este último.

6. Un procedimiento según la reivindicación 5, don-
de la suspensión de la etapa (a) contiene un cultivo del ti-
po T_2 y es

- 15 b) centrifugada en una centrífuga de poca velocidad para
formar un perdigón y un líquido que sobrenada,
c) el perdigón de la etapa (b) se suspende en un medio acuo-
so a un pH comprendido entre 9,3 y 11,0,
d) la suspensión de la etapa (c) se centrifuga en una centri-
20 fuga de poca velocidad para formar un perdigón y un líqui-
do que sobrenada,
e) el pH del líquido que sobrenada de la etapa (d) se reduce
hasta un valor inferior a 9,2,
f) el producto de la etapa (e) se somete a centrifugación
a poca velocidad y el líquido que sobrenada así formado
25 se desprecia para dar los cristales de pilos en el per-

1 digón residual así formado.

 7. Un procedimiento según la reivindicación 6, donde el perdigón de la etapa (d) es

- i) suspendido de nuevo en el medio de la etapa (c),
- 5 ii) la nueva suspensión se somete a una centrifugación a poca velocidad para formar un líquido que sobrenada y un perdigón y el líquido que sobrenada se combina con el líquido que sobrenada en la primera centrifugación de la etapa (d) y

10 los líquidos sobrenadantes combinados se someten a centrifugación a gran velocidad para dar un líquido sobrenadante de la centrifugación a gran velocidad que se somete a los procedimientos de la etapa (e).

15 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, donde las células de N. gonorrhoeae son del tipo T₂,

- a) el cultivo de células piliadas se suspende en un medio a un pH 8,0-8,9,
 - b) la centrifugación de la etapa (b) se realiza entre 1 KG y 12 KG,
 - 20 c) la resuspensión de la etapa (c) se lleva a cabo en un medio acuoso a un pH comprendido entre 10,0 y 10,4,
 - d) la centrifugación a poca velocidad se realiza entre 1 KG y 12 KG,
 - I) el re-suspendido de la etapa (d) tiene un pH comprendido entre 10,0 y 10,4,
- 25

1 II) la centrifugación del re-suspendido se realiza entre
1 KG y 12 KG y

III) los líquidos sobrenadantes combinados se centrifu-
gan a gran velocidad entre 12 KG y 70 KG

5 e) se reduce el pH de los líquidos sobrenadantes combinados
procedentes de la centrifugación a gran velocidad por
diálisis frente a un tampón con un pH a 20°C de 8,2 a
8,7,

f) el dializado se somete a centrifugación entre 1 KG y 10
10 KG para dar un líquido sobrenadante y un perdigón de
cristales de pilos.

9. Un procedimiento según la reivindicación 5, don-
de la suspensión de la etapa (a) contiene un cultivo del
tipo T₁ y es

15 b) centrifugada en una centrífuga de poca velocidad para
formar un perdigón y un líquido sobrenadante,

c) el perdigón de la etapa (b) se suspende en un medio acuo-
so a un pH comprendido entre 8,6 y 11,0,

d) la suspensión de la etapa (c) se centrifuga en una cen-
20 trífuga a baja velocidad para formar un perdigón y un
líquido que sobrenada,

e) el pH del líquido sobrenadante de la etapa (d) se redu-
ce a un valor inferior a 7,7,

f) el producto de la etapa (a) se somete a centrifugación
25 a poca velocidad y el líquido que sobrenada así formado
se desprecia para dar los cristales de pilos en el per-

1 digón residual así formado.

 10. Un procedimiento según la reivindicación 9,
donde el perdigón de la etapa (d) es

i) suspendido de nuevo en el medio de la etapa (c)

5 ii) la re-suspensión se somete a centrifugación a poca velo-
 cidad para dar un líquido sobrenadante y un perdigón y
 el líquido sobrenadante se combina con el líquido sobre-
 nadante, de la primera centrifugación de la etapa (d) y

 los líquidos sobrenadantes combinados se someten a
10 centrifugación a gran velocidad para dar un líquido so-
 brenadante de la centrifugación de gran velocidad que
 se somete a los procedimientos de la etapa (e).

 11. Un procedimiento según la reivindicación 10,
donde

15 a) el cultivo celular piliado se suspende en un medio a pH
 7,0-7,7

b) la centrifugación de la etapa (b) se realiza entre 1 KG
y 12 KG,

20 c) la re-suspensión de la etapa (c) se realiza en un medio
 acuoso a un pH comprendido entre 8,6 y 10,4,

d) la centrifugación a poca velocidad se realiza entre 1 KG
y 12 KG,

I) el re-suspendido de la etapa (d) tiene un pH compren-
dido entre 8,6 y 10,4,

25 II) la centrifugación del re-suspendido se realiza entre

- 1 1 KG y 12 KG y
- III) los líquidos sobrenadantes combinados se centrifugan a gran velocidad entre 12 KG y 70 KG,
- e) se reduce el pH de los líquidos sobrenadantes combinados de la centrifugación a gran velocidad por diálisis
- 5 frente a un tampón con un pH de 5,5 a 7,7 a 20°C,
- f) el dializado se somete a centrifugación entre 3 Krpm y 10 Krpm para dar un líquido sobrenadante y un perdigón de cristales de pilos.
- 10 12. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde en la etapa (a) el pH se reduce hasta por debajo de 7,7 pero por encima de 5,5 con lo que los cristales de pilos derivados de los organismos tipo T₁ y tipo T₂ se mantienen en la fase insoluble.
- 15 13. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde en la etapa (a) el pH se reduce a un valor no inferior a 8,6, con lo que los cristales de pilos derivados de los organismos del tipo T₁ permanecen en la parte soluble.
- 20 14. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde en la etapa (e) el pH se reduce por debajo de 7,7 pero por encima de 5,5, con lo que precipitan los cristales de pilos derivados de los organismos del tipo T₁ y del tipo T₂.
- 25 15. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde en la etapa (e) el pH se reduce a un valor no inferior a 8,6 con lo que precipitan los cristales de pilos derivados

1 solamente de los organismos del tipo T₂.

16. Un procedimiento según la reivindicación 1, para la preparación de cristales de pilos procedentes de N. gonorrhoeae que comprende las operaciones de:

- 5 a) suspender un cultivo de un tipo piliado de células de N. gonorrhoeae en un tampón acuoso de pH superior a 10,
b) separar las células de dicha suspensión,
c) agregar iones amonio con lo que precipitan los cristales de pilos.

10 17. Un procedimiento según la reivindicación 16, que comprende además la operación de separar los cristales así precipitados.

18. Un procedimiento según la reivindicación 17, donde

- 15 a) el tampón es un tampón de etanolamina y
b) los iones amonio derivan de sulfato amónico.

19. Un procedimiento según la reivindicación 18, donde la concentración de sulfato amónico es superior al 3 % del peso del medio acuoso.

20 20. Un procedimiento según la reivindicación 18, donde la concentración de sulfato amónico está comprendida entre 3 y 6 % del peso del medio acuoso.

21. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

25 UN PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE PILOS DE N. GONORRHOEAE.

1

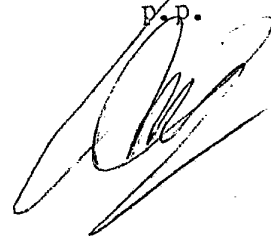
Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de ochenta y siete páginas mecanografiadas.

Madrid 23 de abril de 1976

BERNARDO UNGRIA

p.p.

5



10

15

20

25