

24 62

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"LA PREPARACION RIBOSOMAL OBTENIDA DE
Salmonella typhimurium EMPLEADA COMO VACUNA
Y PROBADA CONTRA EL DESAFIO ORAL DEL
MICROORGANISMO VIRULENTO PARA PREVENIR
FIEBRE TIFOIDEA.

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA
MARINA GAVILANES RUIZ
PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

MEXICO, 1980.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAGINA
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	9
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSION	27
5. REFERENCIAS	30

A B R E V I A T U R A S

nm = nanómetros

ug = microgramos

mM = milimolar

ARN = Acido ribonucleico.

INTRODUCCION

Una de las enfermedades infecciosas importantes en México es la Fiebre Tifoidea. En la epidemia de 1972 se registró una tasa de mortalidad del 6.5% debido a este padecimiento producido por Salmonella typhi (Borunda, 1972).

Según la reacción de Gram, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium y otras enterobacterias, están consideradas como microorganismos Gram negativos. Las salmonelas son móviles, con flagelos peritricos, son no esporuladas, aerobias, se caracterizan por no fermentar la sacarosa, la lactosa y las salicilina; son resistentes a sustancias químicas como el verde brillante, el desoxicolato de Na y el tetratiónato de Na.

La patogenicidad de las salmonelas al hombre se debe a una serie de factores tales como: la posesión de endotoxinas, su capacidad para multiplicarse intracelularmente y a su capacidad invasiva, además de poseer una complicada estructura antigénica que comprende:

a) Antígenos flagelares, llamados antígenos "H". Son antígenos de naturaleza proteica que pueden ser inactivados por calentamiento a más de 60° C, por alcohol y por ácidos. Son aglutinados por anticuerpos IgG fundamentalmente.

b) Antígenos somáticos, llamados antígenos "O". Considerados endotoxinas. Se localizan en el soma bacteriano. Son lipopolisacáridos resistentes al calentamiento prolongado a 100° C, al alcohol y a los ácidos diluidos. Los anticuerpos para antígeno "O" son principalmente IgM.

c) Antígeno Vi. Se presentan en la parte más esférica del soma bacteriano. Son polisacáridos. Se destruye por calentamiento a 60°C durante una hora y por fenol y ácidos (Jawetz y cols., 1973).

En la fiebre tifoidea, una vez que son ingeridas las bacterias, llegan al intestino delgado, ingresando desde aquí a los vasos linfáticos intersticiales, invaden inicialmente órganos como el bazo e hígado, de donde se diseminan extensivamente al resto del organismo (Mackaness y cols., 1966).

Afortunadamente, la fiebre tifoidea producida en humanos por S. typhi, tiene un paralelo muy cercano en la fiebre tifoidea murina, producida por S. typhimurium. Esto proporciona un modelo cuyas aproximaciones experimentales, si bien son válidas, a veces proporcionan estimaciones drásticas, en el estudio de la protección inducida por diferentes tipos de vacunas, esto es, pasan por alto grados de infección considerados como subclínicos y que en humanos pueden ser muy importantes (Collins y cols., 1966). De cualquier manera, es la protección elevada la meta en el uso de cualquier inmunógeno y para esto, las aproximaciones son de buena utilidad.

Blanden, Mackaness y Collins (1966); Collins, Mackaness y Blanden (1966); Mackaness, Blanden y Collins (1966), hicieron estudios sobre la dinámica de la infección experimental y de las diferencias de esta dinámica cuando los ratones eran protegidos con vacunas elaboradas con bacterias muertas, o bien con vacunas hechas con bacterias vivas pero atenuadas en su virulencia.

Blanden, Mackaness y Collins (1966); Collins, Mackaness y Blanden (1966); Mackaness, Blanden y Collins (1966) y Germanier (1977), mostraron experimentalmente que las vacunas

hechas con bacterias muertas por calor, etanol o acetona, eran capaces de inducir una respuesta inmune específica a través de la formación de anticuerpos; la protección que proporcionaban era deficiente, a diferencia de las vacunas de bacterias vivas de virulencia atenuada que indujeron una mayor protección, debido a que no sólo desencadenaron la producción de anticuerpos, sino también la inmunidad mediada por células.

Youmans y Youmans, (1974a), reportaron haber encontrado una fracción de Mycobacterium tuberculosis a través del rompimiento de la bacteria con altas presiones y de subsecuentes procesos de separación por centrifugación diferencial. Tal preparación resultó ser inmunogénica para el ratón, por lo que iniciaron una caracterización exhaustiva del inmunógeno en los siguientes años, la que habría de incluir los aspectos físico-químicos e inmunogénicos primordialmente.

Se inició así una serie de investigaciones intensas acerca de preparaciones ribosomales obtenidas de diversos microorganismos patógenos, introduciéndose una idea innovadora en el campo de la Inmunología.

Algunos ejemplos de trabajos realizados con Fracciones Ribosomales (F. R.), se encuentran en los trabajos de:

Youmans y Youmans (1974a; 1964b; 1965; 1966; 1970) y Shepard y Youmans (1977), quienes reportaron diversos resultados sobre la Fracción Ribosomal de Mycobacterium tuberculosis.

Jensen, Pitkin y Actor (1972), Pitkin y Actor (1972), Guentzel y Berry (1974), Agarwall y Sundararaj (1976), trabajaron con preparaciones ribosomales de Vibrio cholerae.

Thompson y Snyder en 1971, publicaron los resultados obtenidos usando la Fracción Ribosomal de Diplococcus pneumoniae.

Shalla y Johnson en 1975 obtuvieron datos sobre la inmunogenicidad de ribosomas de Streptococcus pyogenes, mientras que Swendensen y Johnson, en 1976 lo hicieron sobre la F. R. de Streptococcus pneumoniae.

Molinari y Cabrera en 1974 y Molinari y cols. en 1975, indujeron inmunidad con fracciones ribosomales de Salmonella typhi.

Con Salmonella typhimurium se han llevado a cabo numerosas investigaciones enfocadas fundamentalmente a esclarecer tres aspectos: a) Naturaleza de los componentes inmunogénicos de las F. R. b) Identificación de los tipos de inmunidad que estos componentes inducen. c) Posibilidades de las F. R. de ser utilizadas en la Inmunoprofilaxis.

A continuación se amplía y especifica lo que de estos tres puntos se conoce con F. R. de S. typhimurium.

Inicialmente Venneman y Bigley en 1969 y Berry y Venneman en 1972, reportan que un ARN ribosomal purificado a partir de una preparación cruda de ribosomas, era la entidad responsable de la inmunidad inducida, afirmando que tal RNA no contenía proteínas, lípidos ni carbohidratos como contaminantes.

Johnson en 1973 y Misfeldt y Johnson en 1977, encontraron que la fracción proteica era inmunogénica, pues sólo obtuvieron protección con ratones inmunizados con proteínas ribosomales. Además la inmunidad que éstas inducían era es-

pecífica, pues no se inducía protección al desafío heterólogo realizado con Salmonella enteritidis y Salmonella cholerae-suis. Mientras que en las fracciones de ARN extraído de los ribosomas con fenol o guanidina, no se obtenía inmunidad de ningún tipo. Misfeldt y Johnson en 1978, mostraron que la fracción proteica inducía inmunidad en tres cepas puras de ratones y la fracción de ARN solo inducía en dos de ellas una respuesta inespecífica y temporal que duró solo 15 días. Con este trabajo se evidenció que el tipo de cepa de ratón usado por Venneman, no fue apropiado para estudiar el papel inmunológico de los componentes de la Fracción Ribosomal. Smith y Bigley en 1972 ya habían reportado que una fracción rica en proteínas era más inmunogénica que una fracción rica en ARN, pero que la primera tenía más actividad inmunogénica si contenía más de un 10% de ARN.

Hoops, Prather, Berry y Ravel en 1976 encontraron que el antígeno "O" estaba presente en la Fracción Ribosomal. Los experimentos que indujeron a esta aseveración fueron aquellos en donde ribosomas y endotoxina empleados como inmunógenos, fueron capaces de inducir tolerancia al desafío con endotoxina, con lo que probó que el antígeno "O" estaba como contaminante, posibilidad que fue también puesta en evidencia por la inmunización de ratones con ribosomas lavados con altas concentraciones de sales, los cuales carecían de poder inmunizante aunque eran funcionalmente activos en la síntesis de proteínas in vitro. Los experimentos de Eisenstein en 1975 dieron apoyo adicional a la presencia de antígeno "O" en las preparaciones ribosomales. En este trabajo se usaron cepas mutantes de S. enteritidis obtenidas por transducción, las cuales eran mutantes en la región del cromosoma que codifica para los antígenos "O", 4, 9 y 12. Estas cepas, de morfología rugosa, proporcionaron fracciones ribosomales que no fueron capaces de inducir inmunidad.

Acerca de los tipos de inmunidad inducidos por las preparaciones ribosomales, se sabe lo siguiente: los dos tipos de inmunidad conocidos, celular y humoral, son también inducidos por las F. R., aunque no se han identificado con precisión los componentes fundamentales que están involucrados en la inmunidad.

Johnson en 1973, encontró que la inmunogenicidad que ya había reportado para proteínas de la F. R., era de naturaleza específica y que la inmunidad inducida podría ser transferida pasivamente a través de células peritoneales. Sin embargo, cuando las proteínas eran coadyuvadas con ARN natural o sintético, la respuesta se volvía inespecífica.

Venneman y Berry en 1971 y Smith y Bigley en 1972, realizaron trabajos acerca de los mecanismos involucrados en la protección inducida por F. R.. Los primeros establecieron que en los mecanismos de inmunidad para los ribosomas íntegros estaban implicados tanto células peritoneales como suero, pero para el ARN sólo células peritoneales. Las evidencias que presentaron Smith y Bigley fueron con base en la correlación entre la inmunidad celular y el fenómeno de hipersensibilidad celular. Ellos encontraron que las fracciones de ARN extraídas de los ribosomas eran capaces de inducir las tres manifestaciones de la hipersensibilidad celular: respuesta positiva a la prueba en los cojinetes plantares de gato, captación de timidina tritiada por células de nódulo linfático, e inhibición de la migración de macrófagos por células del bazo. No obstante, encontraron que entre más proteína estaba presente en las preparaciones de ARN, más clara y mayor era la expresión de inmunidad celular.

La superioridad inmunogénica de la F. R. de S. typhimurium sobre la de las vacunas producidas con bacterias vivas atenuadas o muertas, hace pensar en la conveniencia de utilizar F. R. como inmunógenos en la prevención de la fiebre tifoidea. Molinari y Larralde en 1974, publicaron un trabajo muy completo que ilustraba la ventajas de las F. R. de S. typhimurium como inmunógenos, por ejemplo: duración de al menos tres meses del estado inmune, sobrevivencia del 95% en ratones desafiados con dosis tan altas como 100 DL₅₀ del microorganismo virulento y estabilidad de la potencia de la preparación ribosomal liofilizada y mantenida a 4°C durante tres meses. Molinari, Flisser y Cabrera en 1975 hicieron un estudio de la tolerancia en humanos con la F. R. de S. typhi observando la ausencia de efectos indeseables, a excepción de un proceso inflamatorio indoloro de 3.8 cm de diámetro en el sitio de inoculación.

En todos los estudios mencionados la vía de desafío empleada fue la parenteral. Se ha objetado a los estudios experimentales sobre inmunidad a fiebre tifoidea, la infección de ratón por ésta vía, ya que no es la ruta natural de infección en fiebre tifoidea.

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo, fue estudiar si las fracciones ribosomales obtenidas de Salmonella typhimurium, inoculadas en ratón por vía subcutánea inducían en éste animal inmunidad capaz de protegerlo contra el desafío del microorganismo virulento inoculado por vía oral.

En experimentos previos Molinari y Larralde, (1975); Molinari y Cabrera, (1974); Molinari, Flisser y Cabrera (1975), ya habían observado la protección inducida cuando el desafío se llevaba a cabo por vía intraperitoneal en animales inmunizados por vía subcutánea. Estos resultados eran una evidencia sólida

en favor de una inmunidad sistémica y parecía intrascendente la vía del reto para comprobar el estado inmunitario de los animales inmunizados con F. R.. Sin embargo, la respuesta debía ser experimental. Esto es lo que a continuación se presenta.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

OBTENCION DE LA FRACCION RIBOSOMAL.

Se inocularon 10 litros de caldo soya tripticasa con S. typhimurium str^S crecida durante la noche. Se incubó a 37°C durante 5 hs. al cabo de las cuales se centrifugó a 36,000 x g/15 min en una centrífuga Servall Mod. RC-2B refrigerada a 4°C. El sedimento se resuspendió en amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 7.2, conteniendo MgCl₂ 30 mM y Sacarosa 440 mM. Esta suspensión bacteriana se procesó en un fraccionador de células Ribí a una presión de 15,000 psi y luego se centrifugó a 36,000 x g/20 min. El sobrenadante se centrifugó a 40,000 x g/20 min en una Ultracentrífuga Beckman Mod. L5-65. El sobrenadante se centrifugó a 144,000 x g/3 hs. El sedimento se resuspendió cuidadosamente en amortiguador de fosfatos de Na 10 mM pH 7.2; se añadió una solución de Lauryl sulfato Na al 0.5% volumen a volumen. Se agitó suavemente durante una hora a temperatura ambiente y se dejó en refrigeración a 4°C durante 12 hs.

Posteriormente, se centrifugó a 46,000 x g/10 min, el sobrenadante se centrifugó a 144,000 x g/3 hs y el sedimento se resuspendió en solución amortiguadora. El material se filtró a través de membranas miliporo de 0.45 μ m esterilizadas previamente. Del filtrado se tomaron alícuotas para:

- Estudiar su espectro de absorción por espectrofotometría.
- Análisis por microscopía electrónica.
- Determinar concentraciones de ARN por estimación de su Absorbancia a 260 nm (1 UDO₂₆₀ = 50 ug de ARN). Se usó un espectrofotómetro Zeiss Mod. PMQ II. El resto del filtrado se envasó, liofilizó y almacenó a 4°C hasta su uso.

ANALISIS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Se siguió la técnica de tinción negativa según Brenner y Horne, (1959) y Valentine, (1959). La preparación de ribosomas se diluyó con agua hasta obtener una densidad óptica de 0.1. De esta dilución se transfirió una gota con pipeta Pasteur a una rejilla de cobre de 300 mesh, recubierta con película de carbón de 60 nm. Se dejó por 90 seg. y el exceso se eliminó con un papel filtro. Se permitió el secado al aire por 15 seg. y se cubrió con una gota de ácido fosfotúngstico al 2% en agua. Se eliminó el exceso de ácido y se esperaron 2 min para permitir el secado al aire. Se observó en un microscopio electrónico JEOL Mod. 100 V operado a 60 KU, obteniéndose los registros fotográficos necesarios.

PRUEBAS DE ESTERILIDAD

Se resuspendió el material de 5 viales de F. R. liofizada en 0.5 ml. de solución salina estéril 0.15 M, de donde se tomaron alícuotas de 0.1 ml con las que se inocularon los siguientes medios: gelosa sangre, eosina-azul metileno y tioglúcolato. Los medios se incubaron a 37°C durante 24 hs. al final de las cuales se inspeccionaron para verificar la ausencia de contaminación bacteriana en la Fracción Ribosomal.

INMUNIZACIONES

Se inmunizaron ratones blancos de ambos sexos con un peso de $21\frac{1}{2}$ g con Fracción Ribosomal resuspendida en solución salina. Las dosis administradas se estimaron con base en su contenido de ARN, las cuales fueron: 0.13 ug, 1.3 ug y 130 ug en volúmenes de 0.1 ml. Se inmunizaron grupos controles de ratones por vía subcutánea. Siete días después se realizó una inmunización de refuerzo.

TITULACION DE ANTICUERPOS.

Se inmunizaron 36 ratones por vía subcutánea con 130 ug de Fracción Ribosomal en dos ocasiones, con siete días de diferencia. Seis ratones se sangraron cada 48 hs por punción intracardiaca, sus sangres se mezclaron y se mantuvieron a 4°C, después se centrifugaron a 2,000 x g/20 min para separar el suero. El título de anticuerpos se efectuó siguiendo la técnica de Bass y Watkins (Batson, 1956).

CEPAS DE Salmonella typhimurium str^S y Salmonella typhimurium str^R.

La cepa de S. typhimurium str^S fue un obsequio del Dr. Leoncio Filloy del Hospital Infantil de la Cd. de México. A partir de esta cepa se obtuvo la cepa resistente a la estreptomycin mediante el siguiente procedimiento:

Se inocularon tubos de ensayo de 17 cm x 1.5 cm conteniendo 5 ml de caldo de soya tripticasa y sulfato de estreptomycin a una concentración de 1 mg/ml de medio, con S. typhimurium sensible al antibiótico. Los medios se incubaron a 37°C por 24 hs. Las bacterias crecidas en la presencia de estreptomycin se seleccionaron como cepas resistentes a este antibiótico.

PRESERVACION DE LA VIRULENCIA DE LA CEPA RESISTENTE A ESTREPTOMICINA.

Los desafíos con Salmonella typhimurium str^R se efectuaron con la cepa previamente pasada por ratón, para asegurar niveles adecuados de virulencia que hubieran podido ser decrementados entre uno y otro paso de resiembra. El procedimiento de paso por ratón fue el siguiente.

Se administró a cada ratón 50 ug de estreptomicina resuspendida en 100 ul mediante una cánula introducida hasta el estómago. Veinticuatro horas después se inocularon por la misma vía 6.1×10^5 UFC de Salmonella typhimurium str^B. Se sacrificaron los ratones 15 días después y en condiciones de asepsia se extrajo el bazo, el cual se trituró en mortero de donde se tomó material para inocular medio de cultivo a partir del cual a las 24 hs se tomó una alícuota para comprobar la resistencia de la cepa a la estreptomicina.

TITULACION DE LA VIRULENCIA.

Grupos de ratones de ambos sexos con peso de 21 g \pm 1 g se inocularon por vía intraperitoneal con dosis diversas de S. typhimurium str^F proveniente de un cultivo en fase logarítmica. Se registraron diariamente las muertes durante 14 días. Se determinó la DL₅₀ según el Método de Reed y Muench (Batson, 1956).

PRUEBAS DE INMUNIDAD.

Para obtener una población bacteriana adecuada para la infección experimental, se cultivó S. typhimurium str^F en caldo de soya tripticasa hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 1.5 U.D.O. a 550 nm correspondiente a un punto en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano. Las células bacterianas se obtuvieron con centrifugación a 8,000 x g/15 min y las bacterias sedimentadas se resuspendieron en una solución de Na Cl 0.85% en el volumen requerido para ajustar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) deseadas para el desafío en cada experimento. Con esta suspensión bacteriana se inoculó por vía oral 0.1 ml a través de una cánula.

R E S U L T A D O S

Esta inoculación se realizó un día después de la administración de 50 ug de estreptomycin por ratón y una semana después de la segunda dosis de inmunización. La estreptomycin se administró con el objeto de aumentar la sensibilidad a la infección de los sujetos experimentales.

Simultáneamente a la administración oral de la suspensión bacteriana, se tomó una alícuota de la que se partió para hacer diluciones progresivas en solución salina y de aquí se tomaron pequeñas muestras que se llevaron a tubos con agar suave mantenido a 55°C y cuyos contenidos se variaron a cajas con agar. Se dejaron solidificar y luego se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente se contó el número de UFC por caja por dilución y se calculó la dosis de reto administrada por ratón.

Para diferentes experimentos las dosis de desafío así verificadas fueron: 4.1×10^9 , 5.5×10^9 y 7.2×10^9 UFC.

Una vez hecho el desafío, se contabilizaron las muestras diariamente durante 14 días para evaluar el grado de inmunidad adquirido según las diferentes dosis de inmunógeno y las diferentes dosis de reto, expresándose la sobrevivencia en porcentajes y cifras absolutas. El nivel de significancia estadística de la protección se determinó por la prueba de χ^2 modificada por Yates (Spiegel, 1970).

También se determinó el Tiempo Letal 50 , así como la dosis efectiva 50 , según el Método de Miller y Tainter (Batson, 1956).

Los resultados que exponemos en este trabajo muestran ampliamente la capacidad inmunológica de la F. R. empleada al proteger a los animales desafiados oralmente contra altas dosis infectivas, registrándose incluso porcentajes del 100% de sobrevida.

Determinación de la DL_{50} . La DL_{50} para Salmonella typhimurium str^r resultó ser de 14×10^9 UFC por vía intraperitoneal.

En la tabla 1 están representados los resultados del experimento en el que los ratones se desafiaron con 5.5×10^9 UFC de S. typhimurium str^r. Es evidente que el porcentaje de sobrevida se ve incrementado al máximo con la dosis más alta de vacunación. Sin embargo aún con la dosis más pequeña de F. R. se tiene una diferencia de sobrevida del 37% con respecto a la del grupo control.

Por otro lado, el tiempo en el que se muere el 50% de los animales no inmunizados fue muy corto, lo que puede apreciarse en la Tabla 1, en comparación con el grupo inmunizado que no alcanzó el 50% de mortalidad post-desafío.

Para apreciar la evolución de la protección a través de los 14 días de observación, los resultados se emplearon para construir una gráfica que se muestra en la Fig. 1, en la que desde el primer día posterior al desafío puede encontrarse una protección óptima con la dosis de 130 ug de ARN. Esta protección disminuye en función de la dosis de inmunógeno, observándose que ni aún en la dosis más baja de inmunógeno, la mortalidad alcanzó el 50%. Es interesante que a partir del quinto día los niveles de inmunidad que se observan permanecen casi constantes durante el resto del tiempo de observación.

TABLA 1

Porcentaje de Supervivencia en ratones vacunados por vía subcutánea con 2 dosis de fracción ribosomal de Salmonella typhimurium str^S y desafiados por vía oral con 5.5×10^9 * UFC de Salmonella typhimurium str^F; siete días después de la 2a. inmunización.

Dosis de FR en ug de ARN	No. de sobrevivientes sobre total	Porcentaje de sobrevida	Tiempo Letal al 50% en días
0.13	6/11	55	14
1.3	3/4	75	14
130	5/5	100 ^a	14
controles sin inmunizar	2/11	18	4.5

* 1 DL₅₀ de S. typhimurium str^F, resultó ser de 7×10^4 vía ip.

a.- P > 0.01 Significancia de animales no inmunizados.

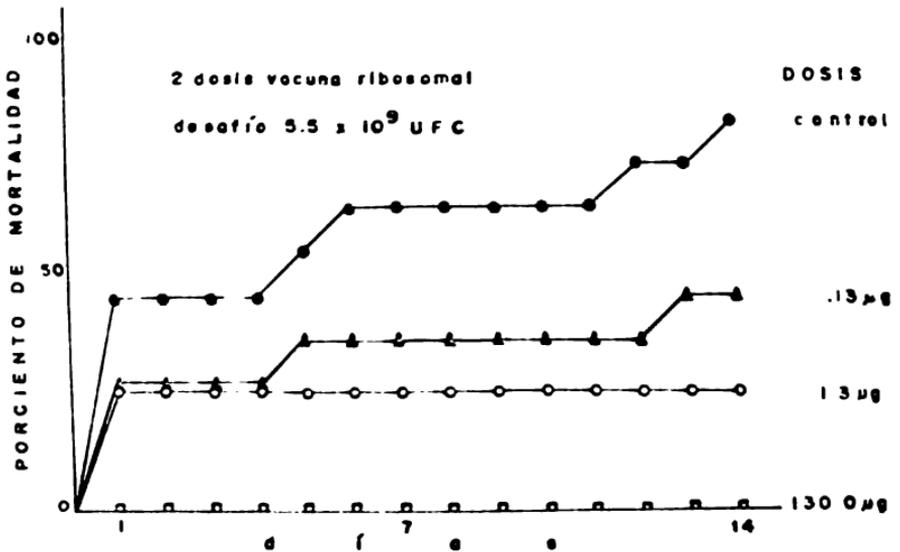


Fig. 1.- Protección inducida con diferentes dosis de vacuna ribosomal obtenida de S. typhimurium, inoculada por vía subcutánea; contra el desafío oral de 5.5×10^9 UFC de S. typhimurium.

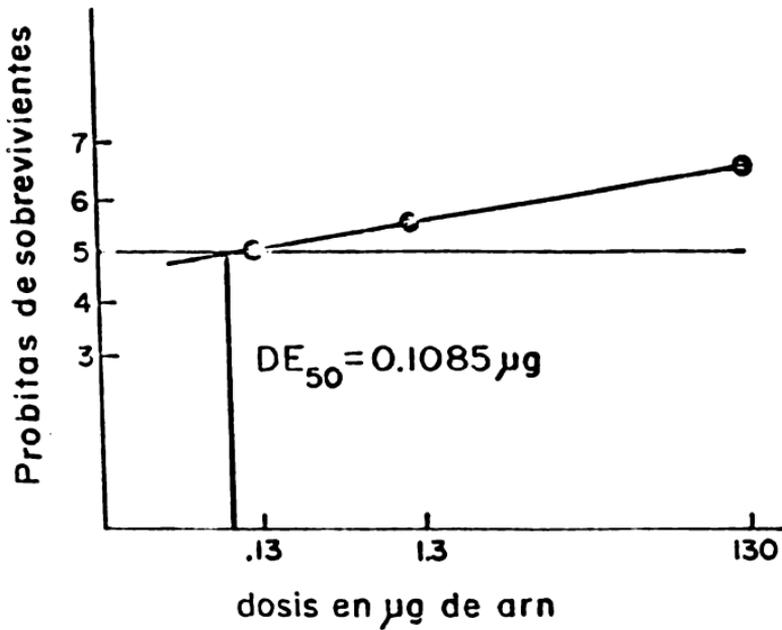


Fig. 2. Dosis efectiva al 50% de vacuna ribosomal, contra el desfo infeccioso de 5.5×10^9 de S. typhimurium.

La dosis efectiva al 50% en este ensayo, calculada por el método de Miller-Tainter (Batson, 1956) resultó ser de 0.1085 ug. Los resultados se graficaron en la Fig. 2.

En un segundo experimento se desafiaron ratones inmunizados con F. R. usando una dosis de reto mayor que la empleada en el experimento anterior. Los resultados están consignados en la Tabla 2 y en la Fig. 3. En donde puede observarse que la dosis de reto superó la inmunidad inducida por la F. R.

Aunque al final de este experimento, los porcentajes de sobrevivencia de los animales inmunizados no son significativos, se encuentra una notable diferencia en la dinámica de sobrevivencia, fundamentalmente entre las dosis de 1.3 y 130 ug y el grupo control, ya que el 50% de mortalidad se alcanzó abruptamente en menos de 24 hs en el grupo control; mientras que en los ratones inmunizados con las dosis mencionadas, el 50% de mortalidad se alcanza gradualmente hasta los días 9 y 11 respectivamente, como se muestra en la Fig. 3.

Cuando se desafió a los ratones con una dosis infectiva menor que las dos anteriores, se obtuvieron, como cabía esperar dados los grados de inmunidad con dosis mayores, resultados que pusieron en evidencia mayores niveles de inmunidad. Esto puede apreciarse en la Tabla 3, donde la dosis más baja de F. R. indujo una inmunidad de sobrevivencia elevada del 67%. Con las dosis de 1.3 y 130 ug de ARN, se tiene un porcentaje de sobrevivencia del 92 y 100% respectivamente.

Los resultados se compararon mediante un histograma (Fig. 4). Es evidente que una mayor protección inducida por la F. R. se encuentra con inóculos bajos de desafío, mientras que

TABLA 2

Porcentaje de sobrevivencia en ratones vacunados por vía subcutánea con 2 dosis de fracción ribosomal de Salmonella typhimurium str^S y desafiados por vía oral con 7.2×10^9 UFC de Salmonella typhimurium str^T, siete días después de la 2a. inmunización.

Dosis de F R en ug de ARN	No. de sobrevivientes sobre total	Porcentaje de sobrevivencia	Tiempo Letal al 50% en días
0.13	2/10	20	1.7
1.3	3/11	27	8.25
130.0	4/12	33	10.45
controles sin inmunizar	4/13	15	0.8

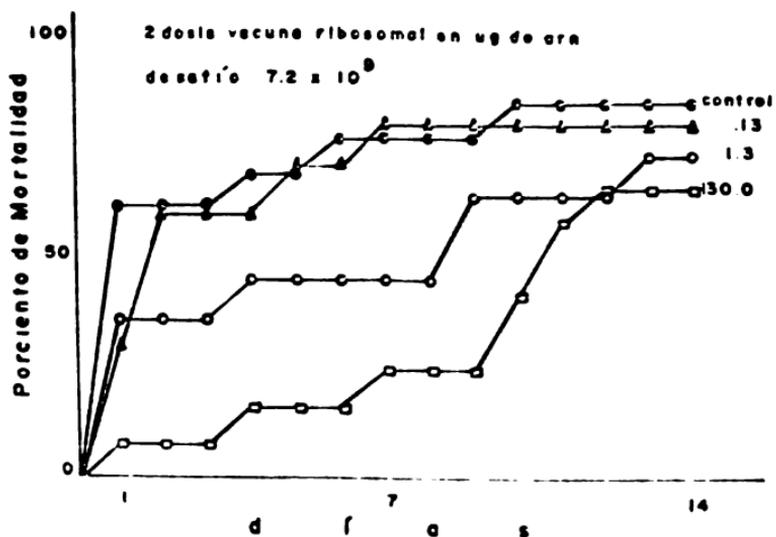


Fig. 3.- Protección inducida con diferentes dosis de vacuna ribosomal obtenida de S. typhimurium, inoculada por vía subcutánea; contra el desafío oral de 7.2×10^9 UFC de S. typhimurium.

TABLA 3

Porcentaje de Supervivencia en ratones vacunados por vía subcutánea con 2 dosis de fracción ribosomal de Salmonella typhimurium str^S y desafiados por vía oral con 4.1×10^9 UFC de Salmonella typhimurium str^T siete días después de la 2a. inmunización.

Dosis de F R en ug de ARN	No. de sobrevivientes sobre total	Porcentaje de sobrevivencia	Tiempo Letal al 50% en días.
0.13	4/6	67	16
1.3	12/13	92	16
130.0	6.6	100	16
controles sin inmunizar	5/11	45	16

cuando se tiene un alto índice de infección sólo la dosis de 130 ug es capaz de proteger significativamente.

Se determinaron los niveles de anticuerpos circulantes en ratones inmunizados con dos dosis de 130 ug de ARN en la F. R.. Los resultados que se muestran en la Fig. 5, indican que hasta dos días posteriores a la primera inmunización aparecen anticuerpos cuyos niveles aumentan después de la segunda inmunización, de una manera notable. Ambos patrones son las clásicas respuestas primaria y secundaria de producción de anticuerpos.

Por microscopía electrónica, Fig. 6, pudo verse que los ribosomas no eran los componentes únicos de la F. R., pues también se encontraron estructuras que pudieran ser restos de membranas o fragmentos de flagelos.

Cuando se hizo un espectro de absorción de la F. R., se registró un máximo de absorción a 260 nm la que corresponde a la presencia de ácidos nucleicos (Fig. 7).

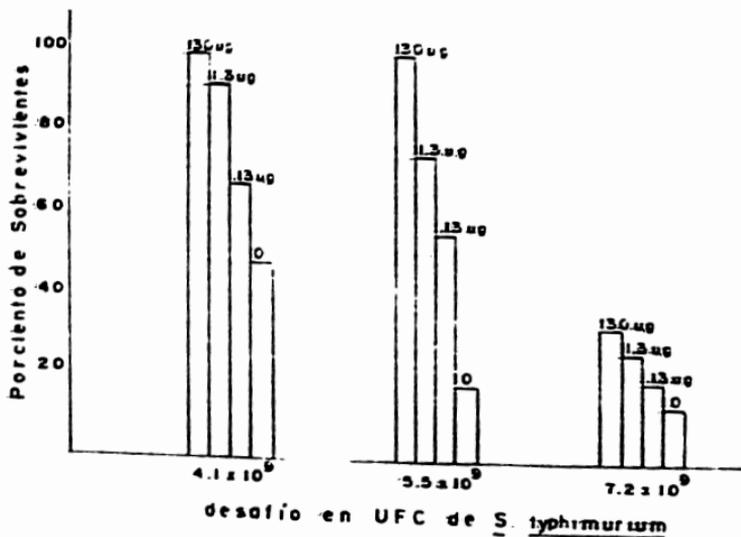


Fig. 4.- Comparación de Porcientos de Supervivencia en animales vacunados por vía subcutánea, con diferentes dosis de Fracción Ribosomal de *S. typhimurium* y desafiados con diferentes dosis de *S. typhimurium* por vía oral.

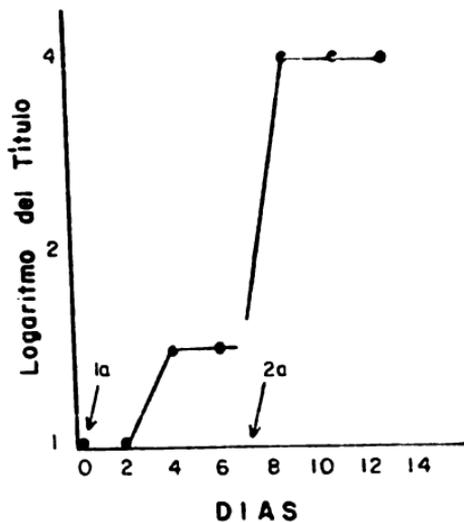


Fig. 5.- Titulación de anticuerpos en suero de ratones inmunizados con 130 ug de Fracción Ribosomal de S. typhimurium. Una 2a. inoculación fue hecha al 7o. día.



Fig. 6 . Micrografía electrónica de la
Fracción Ribosomal de *S. typhimurium*.

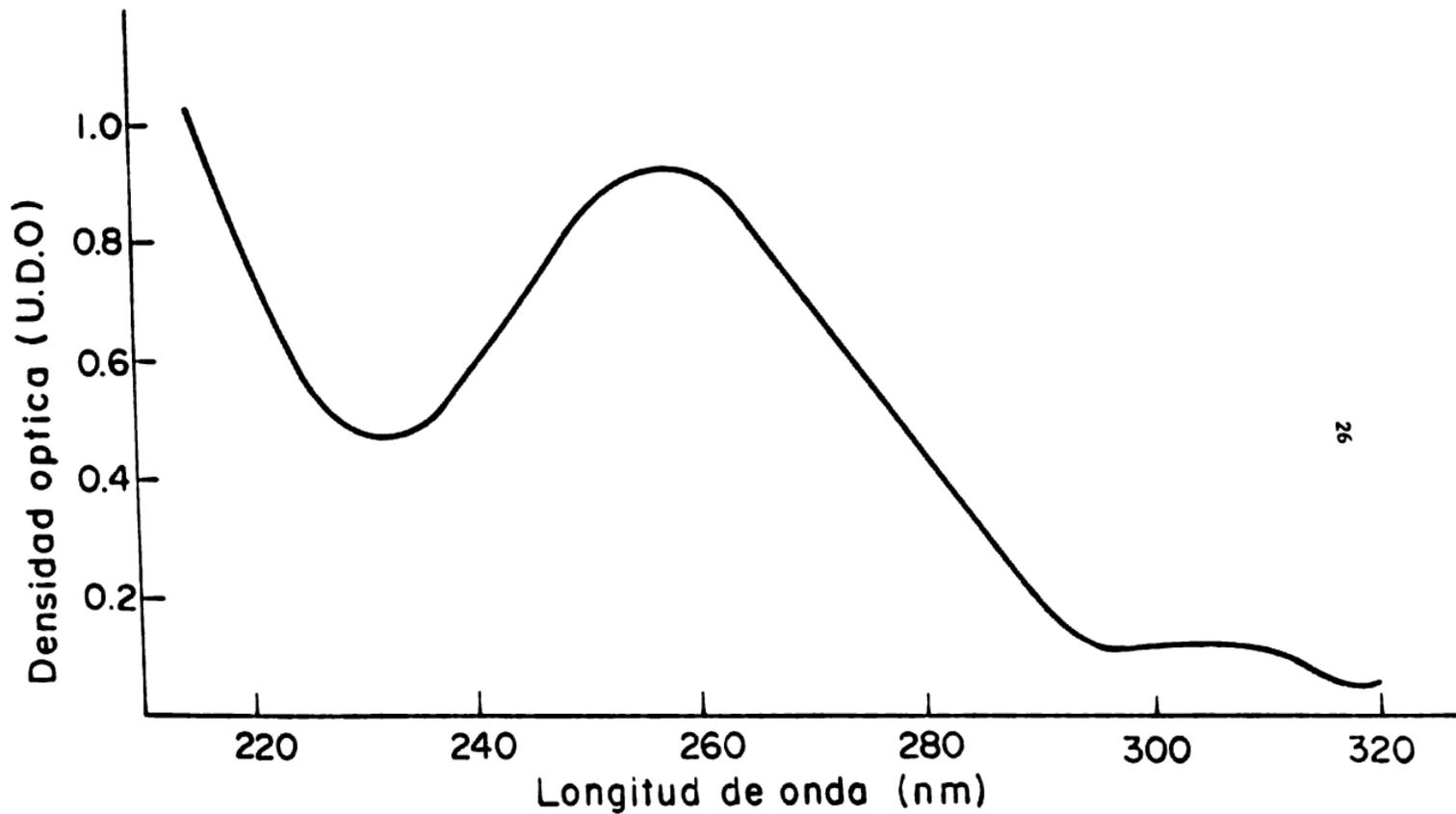


Fig. 7.- Espectro de Absorción de la Fracción Ribosomal.

DISCUSION

La hipótesis de la que se partió ha sido contrastada y probada. La teorización de que las fracciones ribosomales obtenidas de Salmonella typhimurium deben inducir en ratón un buen nivel de inmunidad contra el desafío del microorganismo virulento por cualquier vía de administración, ha sido explorada. En la literatura se encuentra que las usuales vías de reto en animales inmunizados con F. R. o subfracciones ribosomales, han sido la intraperitoneal y la endovenosa (Venneman y Bigley, 1969; Venneman y Berry, 1971; Johnson, 1973; Hoops y cols., 1976), con excelentes resultados. Sin embargo, tales vías se han objetado, en función de que en la Fiebre Tifoidea humana, murina, aviaria, etc., la vía de ingreso del parásito al huésped es la vía oral.

Los resultados que se presentan en este trabajo son altamente satisfactorios, pues muestran que los animales inmunizados con las fracciones ribosomales de S. typhimurium inoculadas por vía subcutánea, fueron protegidos contra el desafío del microorganismo virulento inoculado por vía oral. También muestran que la inmunidad fue dependiente de la dosis inmunizante y de la dosis de reto, como se observa en la Fig. 5. El hallazgo de una respuesta primaria y secundaria típicas en cuanto a producción de anticuerpos, se puede correlacionar con el nivel de protección inducida por las F. R.. No se exploró la presencia de inmunidad celular que ha sido reportada por otros autores (Venneman y Berry, 1971; Smith y Bigley, 1972).

El hecho de que las F. R. liofilizadas y almacenadas durante 90 días a 4°C hayan mantenido su potencia inmunogénica, igual que las F. R. frescas, es un resultado im-

portante en cuanto a la producción para su uso en seres humanos en un futuro.

Uno de los criterios que deben tomarse en cuenta con productos biológicos diseñados para uso humano, es el de inocuidad de estos productos, en este sentido la dosis de F. R. que protegió al 50% de los animales probados (DE_{50}) fué del orden de 0.1085 ug.

Si esta DE_{50} se correlaciona con las dosis máximas de inmunización usadas en el presente trabajo, puede decirse que en los animales inmunizados con esas dosis no se observaron signos de intoxicación, ni mucho menos muerte de esos animales; esto sugiere que dosis tóxicas deben estar en rangos muy elevados. Esta parte de la discusión está apoyada por los resultados reportados por Molinari y cols., en 1975.

Estos autores ensayaron dosis hasta de 4 mg de F. R. de S. typhi con el objeto de estudiar toxicidad. Ellos encontraron 100% de sobrevida durante un lapso de 14 días en los animales inoculados.

En las fotografías de la F. R. al microscopio electrónico, se observó que además de las partículas esféricas que probablemente son los ribosomas y que están en mayor número, había estructuras filamentosas de diversos tamaños que pudieran corresponder a flagelos fragmentados y también a estructuras que sugieren vesículas de membrana. Todos estos componentes deben estar involucrados en la inducción de inmunidad encontrada en los experimentos de este trabajo.

Esta teorización está apoyada en los hallazgos de antígeno "O" y antígeno "H", reportadas como contaminantes de

las F. R. por autores como Einseistein, (1975), Hoops y Prather, Berry y Ravel, (1976), Misfieldt y Johnson, (1977), Cofré, Calderón y Mora (1978).

En un trabajo previo, Molinari y Larralde (1974), estudiaron la composición química de las F. R., las cuales estaban constituidas por RNA, protefínas y carbohidratos. El comportamiento de estas F. R. sujetas a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa indicó la migración de la F. R. en un sólo pico agudo y bien definido parecido al pico obtenido con monosomas de mieloma usados como control.

El espectro de absorción de la F. R. que muestra un pico de absorbancia a 260 nm, es una evidencia más de la composición ribosomal de esta vacuna.

Con este trabajo se ha querido contribuir, a la ampliación de los conocimientos acerca de las F. R. de Salmonella typhimurium, de manera que puedan ser consideradas como una alternativa más en la prevención de Fiebre Tifoidea en México.

R E F E R E N C I A S

- Agarwall, C. S. and Sundararaj, T. 1976. Cell mediated immunity to Vibrio cholerae with ribonucleic acid protein fractions of V. cholerae L-form lysates. *Infect. Immun.* 14: 363-380.
- Batson, H. C. 1956. The Reed-Muench method of estimating 50 per cent end points. In "An introduction to Statistics in the medical sciences". Burgess Publ. Co. Minneapolis, Minnesota. p. 67-68.
- Berry, J.L. and Venneman, R. M. 1972. Immune response of mice to subcellular Antigens. "Lectures and Summaries of the Conference on Cellular Antigens". Alois Novotny ed. Springer-Verlag. New-York. p. 3-117.
- Blanden, R.V., Mackaness, G. B. and Collins, R. M. 1966. Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exp. Med.* 124: 585-600.
- Borunda, F. O. 1974. Datos estadísticos de la salmonelosis en los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Séptima Misión Médica. Colima.
- Brenner, S. and Horne, R. W. 1959. Negative stain electron microscopy of protein macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta* 34: 103
- Collins, F. M., Mackaness, G. B. and Blanden, R. V. 1966. Infection and immunity in experimental salmonellosis. *J. Exp. Med.* 124: 601-619.
- Cofré, G. Calderón, I. and Mora, G. 1978. Immunogenic capacity of ribosomes of Salmonella typhi interfered with by a flagellin-like material contaminant. *Infect. Immun.* 20: 161-166.
- Eisenstein, K. T. 1975. Evidence for "O" antigen as the antigenic determinants in ribosomal vaccines prepared from Salmonella. *Infect. Immun.* 12: 364-377.

- Germanier, R. 1973. Immunity in experimental salmonellosis. *Infect. Immun.* 6: 792-797.
- Germanier, R. andürer, E. 1975. Isolation and characterization of Gal E mutante Ty 21a of Salmonella typhi: A candidate strain for a live, oral, typhoid vaccine. *Infect. Immun.* 131: 553-558.
- Guentzel, M. N. and Berry, J. L. 1974. Protection of suckling mice from experimental cholerae by maternal immunization: comparison of the efficiency of whole cell, ribosomal derived and enterotoxin, immunogens. *Infect. Immun.* 10: 167-172.
- Hoops, P. Prather, N., Berry, J. L. and Ravel, M. J. 1976. Evidence of an extrinsec immunogen in effective ribosomal vaccines from Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 13: 1184-1192.
- Jawetz, E., Melnick, L. J. and Adelberg, A. E. 1973. Manual de microbiología médica. Ed. El Manual Moderno. México. p. 228-241.
- Jensen, R., Gregory, B., Naylor, J. and Actor, P. 1972. Isolation of protective somatic antigen from Vibrio cholerae (Ogawa) ribosomal preparations. *Infect. Immun.* 6: 156-161.
- Johnson, W. 1973. Ribosomal vaccines. II Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic acid and protein isolated from Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 8: 395-400.
- Kuapinski, J. B., G. 1972. Methodology of immunochemical and immunological research. Wiley Interscience. New York. p. 312.
- Mackness. G. B., Blanden, R. V. and Collins, F. M. 1966. Host parasite relations in mouse typhoid. *J. Exp. Med.* 124: 273-583.
- Misfeldt, M. and Johnson, W. 1977. Role of endotoxin contamination in ribosomal vaccines prepared from Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 17: 98-104.

- Misfeldt, M. and Johnson, W. 1978. Protective ability of Salmonella ribosomal protein and RNA in inbred mice *Infect. Immun.* 21: 286-291.
- Molinari, J. L. and Larralde, C. 1974. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with fractions of Salmonella typhimurium. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 16: 189-197.
- Molinari, J. L. y Cabrera, C. 1974. Inmunidad inducida con una preparaci3n ribosomal obtenida de Salmonella typhimurium Ty2. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 16: 199-204.
- Molinari, J. L., Flisser, A. y Cabrera, R. 1975. Inmunidad inducida con fracci3n ribosomal obtenida de Salmonella typhi contra diversas cepas de S. typhi. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 17: 149-156.
- Pitkin, D. and Actor, P. 1972. Immunity to Vibrio cholerae in the mouse. Passive protection of newborn mice. *Infect. Immun.* 5: 428-432.
- Shalla, O. W. and Johnson, W. 1975. Immunogenicity of ribosomal vaccines isolated from Group A type 14. Streptococcus pyogenes. *Infect. Immun.* 11: 1195-1201.
- Shepard, C. and Youmans, S. A. 1977. Lack of protection afforded by ribonucleic acid preparations from Mycobacterium tuberculosis against Mycobacterium leprae infections in mice. *Infect. Immun.* 15: 733-736.
- Smith, R. A. and Bigley, N. J. 1972(a). Ribonucleic acid-protein fractions of virulent Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 6: 377-383.
- Smith, R. A. and Bigley, N. L. 1972(b). Detection of delayed hypersensitivity in mice injected with ribonucleic acid-protein fraction of Salmonella typhimurium *Infect. Immun.* 6: 384-389.
- Spiegel, M. R. 1970. Teorias y problemas de Estadística MacGraw Hill de México, México. p. 64.
- Swendensen, C. L. and Johnson, W. 1976. Humoral immunity to Streptococcus pneumoniae induced by a pneumococcal ribosomal protein fraction. *Infect. Immun.* 14: 345-354.

- Thompson, W. C. and Snyder, S. I. 1971. Protection against pneumococcal infection by a ribosomal preparation. *Infect. Immun.* 3: 16-23.
- Valentine, R. C. 1959. The shape of protein molecules suggested by electron microscopy. *Nature.* 184: 1838.
- Venneman, R. M. and Berry, J. L. 1971. Cell mediated resistance induced with immunogenic preparation of Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 4: 381-387.
- Youmans, S. A. and Youmans, P. G. 1964. (a). Further studies on a labile immunogenic particulate substance isolated from Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol* 87: 278-285.
- Youmans, S. A. and Youmans, P.G. 1964. (b). Effect of mitochondrial stabilizers on the immunogenicity of the particulate fraction isolated from Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol.* 87: 1346-1354.
- Youmans, S. A. and Youmans, P. G. 1965. Nature of the labile immunogenic substance in the particulate fraction isolated from Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol.* 89: 1030-1037.
- Youmans, S. A. and Youmans, P. G. 1966. Effect of trypsin and ribonuclease on the immunogenic activity of ribosomes and ribonucleic acid isolated from Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol.* 91: 2146-2154.
- Youmans, S. A. and Youmans, P. G. 1970. Immunogenic Mycobacterial ribosomal and ribonucleic acid preparations, Chemical and physical characteristics. 2: 259-668.