

11261
(2e)
26

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

"PROTEINAS AISLADAS DE Salmonella typhimurium
INVOLUCRADAS EN LA INMUNIDAD"

TESIS QUE PRESENTA
ANDRES GUILLERMO VELASCO DELGADO
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA MICROBIOLOGIA

México, 1987

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

ABREVIATURAS-----	2
INTRODUCCION-----	3
ORGANIGRAMA-----	17
MATERIAL Y METODOS-----	18
RESULTADOS-----	28
DISCUSION-----	46
RESUMEN-----	53
BIBLIOGRAFIA-----	54

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

d	daltones
DEAE	Dietil amino etil
DL ₅₀	Dosis Letal al 50%
LPS	Lipopolisacárido
mA	mili Amperios
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	nanómetros
PbA	Acetato de Plomo
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N', Tetrametiletilendiamina
U.F.C.	Unidades Formadoras de Colonias
ug	microgramos
um	micrómetros

INTRODUCCION

La salmonelosis es un término médico que se emplea para designar una infección con cualquier especie de Salmonella. Los bacilos entéricos constituyentes del grupo Salmonella, son patógenos en mayor o menor grado e incluyen al bacilo de la tifoidea y a los de la paratifoidea. La naturaleza infecciosa de la fiebre tifoidea fue descrita por William Budd en 1856; este autor, con base en datos epidemiológicos, sugirió que el padecimiento era transmitido por agua contaminada con desechos y que la fuente del agente infeccioso eran las heces humanas. El bacilo de la tifoidea fue identificado por Eberth en 1880, en los ganglios mesentéricos y en el bazo de personas muertas de fiebre tifoidea: Con este reporte se abre un capítulo que sigue teniendo gran importancia dentro de la historia de la infectología. En 1884, Graffky cultivó Salmonella typhi de casos de fiebre tifoidea. En 1885 Salmon y Smith, aislaron S. cholera-suis. Más tarde en 1888, Gaertner cultivó una salmonela de heces de enfermos sin fiebre tifoidea, a la que denominó Salmonella enteritidis. Poco tiempo después, Duham y Noble aislaron Salmonella typhimurium. En 1920, Schetza hizo un primer intento de ordenarlas y clasificarlas. Y en 1925, White sentó las bases, que continuaría posteriormente Kauffman, para la creación del esquema Kauffman-White, que en la actualidad es fundamental para el estudio e identificación de las salmonelas. (Freeman, 1983).

Los bacilos de la fiebre tifoidea y paratifoidea, productores de salmonelosis, son importantes agentes patógenos de la familia Enterobactraceae. Son bacilos gramnegativos, móviles, no forman esporas, son aerobios no estrictos crecen muy bien a 37°C en los medios de cultivo ordinarios. Se tiñen fácilmente con los colorantes de uso común, como azul de metileno y fenol-fucsina. El grupo se caracteriza bioquímicamente por no fermentar lactosa ni la salicina y por no licuar la gelatina, ni producir indol. La fermentación de azúcares generalmente se acompaña de producción de gas, aunque se han descrito cepas anaerógenas de Salmonella typhimurium, S. enteritidis y S. paratyphi. La fermentación de azúcares sin producción de gas es una característica de Salmonella typhi. (Jawetz, 1983; Davis, 1984).

Salmonella posee una endotoxina, que es un complejo polisacárido-polipéptido-lípido, que se extrae de la membrana externa de la pared celular. Su toxicidad es inespecífica, y las respuestas más evidentes son fiebre y alteraciones de la permeabilidad capilar. Esquemáticamente una salmonela esta compuesta de tres grupos de antígenos que fueron descritos por Smith y Reagh (1903); posteriormente Weil y Felix los llamaron: antígeno somático (denominado antígeno "O"), antígeno de superficie (conocido como antígeno "Vi") y antígeno flagelar al que se le conoce comúnmente como antígeno "H" (Freeman, 1983).

La infección por Salmonella puede dar lugar a tres entidades clínicas diferentes; Gastroenteritis; Fiebre Paratifoidea y Fiebre Tifoidea:

Gastroenteritis. Se atribuye a ciertas especies de Salmonella, se presenta después de ingerir alimentos contaminados frecuentemente cuando los gérmenes ya se han multiplicado y alcanzado números muy elevados. El periodo de incubación es de 8 a 48 horas y los síntomas incluyen náuseas, vómitos, diarrea, postración y ligero aumento de la temperatura; la recuperación suele lograrse en pocos días. Se han aislado varias cepas de Salmonella entre ellas S. typhimurium y S. enteritidis. (Carpenter, 1979; Pelczar y Chan, 1984).

Fiebres Paratifoideas. Se parecen a la tifoidea, pero siguen un curso más leve, se caracterizan por un comienzo brusco, después de un periodo de uno a 10 días, con escalofríos y la mayor parte de los síntomas que presenta la tifoidea, pero en menor grado. El curso suele ser más breve y la mortalidad media más baja. El único medio seguro para distinguir la tifoidea, de la paratifoidea es aislando e identificando el organismo causal. (Brock, 1986).

Fiebre Tifoidea: La infección se adquiere por vía oral con S. typhi, el organismo atraviesa los tejidos linfoides de la faringe (amígdalas) o del intestino (placas de Peyer). pasando al torrente sanguíneo de donde es captado

por células del sistema reticuloendotelial: en hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y médula ósea; así como, fagocitos, debido a que es un organismo intracelular, permanece vivo y se multiplica dentro de éstas células, a las que luego destruye y sale de ellas, al cabo de 10 a 14 días, se difunde una vez más por el torrente circulatorio. Este es el final del periodo de incubación y señala el comienzo de la enfermedad clínica, el principio de los síntomas puede ser insidioso con fiebre moderada, malestar general, anorexia y dolor de cabeza. Posteriormente, la fiebre se eleva 39 a 40°C con pulso lento, se establece dolor abdominal intenso y diarrea fluída y acuosa, ocasionalmente con sangre y moco, las náuseas y el vómito son frecuentes, estos síntomas están relacionados de alguna manera a las endotoxinas. También es común encontrar distensión abdominal, así como, apatía. El curso de la enfermedad es generalmente grave y la enfermedad puede durar varias semanas. Es común que al invadir algunos tejidos y órganos, tales como la vesícula biliar, la médula ósea y el bazo; *S. typhi*, de lugar a una septicemia con características particulares según el tejido u órgano infectado, ocasionando desde una neumonía, úlcera laríngea, cistitis, osteomielitis, hasta una meningitis (Carpenter, 1979; Pelczar y Chan, 1984; Volk & Weeler, 1984).

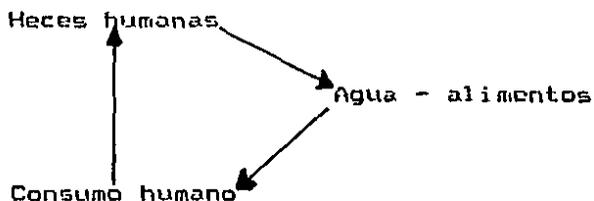
En la fiebre tifoidea el hemocultivo, suele ser positivo antes que el cultivo de heces, el diagnóstico por este medio es posible solo durante la primera semana; ya que,

entre el séptimo y octavo días el bacilo desaparece de la circulación. Es entonces cuando se puede cultivar el bacilo a partir de las heces. Aproximadamente en el 25% de los casos de fiebre tifoidea se puede obtener S. typhi de cultivo de orina.

En la mayoría de los casos de Salmonelosis, al quinto día de haberse iniciado la enfermedad se inicia la producción de anticuerpos, los que se evidencian mejor son las llamadas aglutininas, que confirman el diagnóstico. A esta prueba se le conoce como reacción de Widal (Fuerst, 1981).

Las infecciones por Salmonella, se encuentran ampliamente distribuidas en casi todos los países, si bien es cierto que su incidencia es mayor en países y zonas de pobres recursos; donde el nuestro, no es la excepción. La fuente de infección es casi siempre la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas. En casos de epidemia la contaminación masiva del agua potable es frecuentemente la fuente más importante de infección. Los casos endémicos se deben al mal manejo de los alimentos, falta de higiene personal, así como animales inferiores reservorios de salmonelas (Davis, 1984).

Para realizar un adecuado control de la enfermedad debe romperse el siguiente ciclo:



El control de las enfermedades producidas por salmonela depende principalmente de las siguientes medidas: Cocinar adecuadamente los alimentos de procedencia animal. Refrigeración de los alimentos. Exclusión de los portadores humanos de la preparación de los alimentos. Protección de los alimentos ante la contaminación por roedores, moscas y otros animales. Pasteurización de la leche. Inspección periódica de los que manipulan alimentos. Métodos adecuados de producción y elaboración de alimentos. Adecuada salud sanitaria y buenas prácticas higiénicas. Control sanitario público del agua de consumo. Eliminación adecuada de las aguas residuales. (Jawetz, 1983; Pelczar y Chan, 1984; Brock, 1986).

Una estrategia para la prevención de la fiebre tifoidea es la vacunación de huéspedes susceptibles. Se han estudiado diferentes inmunógenos para determinar su capacidad inmunizante para su uso en humanos.

En el curso de los últimos cien años se han introducido vacunas contra diversas enfermedades bacterianas. La mayoría de ellas han estado en uso desde entonces sin modificaciones significativas. Algunas son bien toleradas e inducen una protección sólida y duradera, mientras que otras causan reacciones adversas y tienen eficacia limitada y temporal.

La inmunización en el hombre contra la fiebre tifoidea se inició en el año de 1896, por R. Pfeiffer y W. Kolle y por A.E. Wright; los dos grupos trabajaron en forma

independiente. Ambos, lograron vacunas obtenidas de S. typhi muertas por calor y conservadas en fenol. Pfeiffer y Kolle, observaron que los cobayos eran protegidos con una dosis letal de bacilos tifoídicos. Wright vacunó a 4000 voluntarios de la armada de la India, los cuales presentaron reacciones locales generalizadas serias, también inoculó a tropas inglesas que se embarcaron para combatir en Sud-Africa observándose sin embargo, una incidencia alta de fiebre tifoidea. Durante la Primera Guerra Mundial, 97% de las tropas inglesas y francesas, fueron vacunadas y no obstante la incidencia de la morbilidad de la fiebre tifoidea, fue considerable durante los 4 años siguientes.

En 1916, se comenzó a usar una vacuna combinada; tifoidea-paratifoidea (TAB), la cual incrementó la gravedad de las reacciones tanto en el sitio de inoculación como las generalizadas, resultado poco aceptable. En 1919, Besredka; sugirió que había que inducir la protección por el sitio donde se lleva a cabo la infección natural. Por lo que en 1920, se administró por vía oral una vacuna tifoídica inactivada. En muchos países fue aplicada esta vacuna, se intentaba suplir con ella a la vacuna parenteral. Una de las razones por las cuales no se continuó su aplicación, fue porque los niveles de anticuerpos que se inducían por esta vía eran muy bajos. (Germanier, 1984).

En 1960, bajo los auspicios de la OMS (Organización Mundial de la Salud), se llevaron a cabo en diversos países

pruebas de campo para probar la eficacia de la vacuna parenteral. La preparación de 2 vacunas estuvo a cargo del Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS, donde se preparó una vacuna inactivada por acetona (vacuna K) y la vacuna inactivada por calor-fenol (vacuna L). Ambas fueron preparadas a partir de una cepa de S. typhi Ty2. La preparación de estas vacunas y sus características, fueron descritas por la División de Inmunología del Instituto de Investigaciones Walter Reed de la Armada de los Estados Unidos (1964). Los estudios de campo se realizaron en Yugoslavia por la Comisión de Tifoidea Yugoslava (1964); en Guyana por el Departamento Técnico de Cooperación para la tifoidea del Reino Unido (1964); en Polonia por el Comité Polaco para la Tifoidea (1965) y en la URSS, por Hejfec et al., (1966). Estos resultados fueron revisados y reportados con gran detalle por Cvjetanovic y Uemura (1965). Una de estas vacunas confirió una protección altamente significativa (Vacuna K, 79-93% de efectividad) mientras que la Vacuna L mostró una eficacia del 51-77%.

Se han llevado a cabo pruebas con vacunas orales, una de estas consistió en tabletas conteniendo 10×10^{10} bacterias de S. typhi muertas por acetona. Un grupo de voluntarios tomó 6 tabletas y otro grupo tomó 12, se encontró en ambos grupos una efectividad de 7 y 30% respectivamente Horninck et al., (1970).

Dentro de los estudios de vacunas experimentales

realizados en varios laboratorios del mundo se ha utilizado al ratón y varias cepas de Salmonella son patógenas naturales de esta especie (Jenkin y Rowley, 1963). Así la infección murina con su patógeno natural Salmonella typhimurium es el modelo más ampliamente aceptado para experimentación ya que Salmonella typhi, que es el agente causal de la fiebre tifoidea, es solamente virulenta para el hombre y el chimpancé (Mackaness, 1971; Collins, 1979; Einsenstein, 1984).

En consecuencia, el modelo murino para la fiebre tifoidea se ha utilizado para probar; la eficiencia de varias preparaciones inmunizantes no viables, la eficacia de vacunas constituidas por organismos atenuados y la contribución de la inmunidad humoral y celular en la defensa del huésped contra la infección sistémica ocasionada por especies de Salmonella (Angerman, 1980; Killion, 1984; Killar, 1986).

Desde el punto de vista experimental, Youmans y Youmans (1965), aislaron un componente ribosomal de Mycobacterium tuberculosis con capacidad inmunogénica posteriormente Venneman y Bigley (1969), mostraron que los ribosomas aislados de Salmonella typhimurium proporcionaban inmunidad en ratones, cuando se infectaba con el organismo virulento.

Johnson (1972), reportó que las proteínas ribosomales obtenidas de Salmonella typhimurium eran eficaces en inducir inmunidad en ratones contra el desafío de organismos homólogos. La inmunización de ratones con dosis de 25 ug de

proteína ribosomal, indujo una protección significativa, alcanzándose una completa protección a dosis de 100 ug de proteína ribosomal. Este mismo investigador encontró en 1973 que la respuesta inmune inducida por las proteínas ribosomales era específica, ya que ratones inmunizados con proteínas de Salmonella typhimurium no mostraron protección contra el desafío con Salmonella cholerae-suis o Salmonella enteriditis.

Smith y Bigley (1972 a) estudiaron el papel de los componentes protéicos contenidos en fracciones de ARN, obtenidos de Salmonella typhimurium cepa SR-11 en la inducción de inmunidad contra la infección con Salmonella. Al inocular grupos de ratones con fracciones que contenían diferentes cantidades de ARN y proteínas, se observó que, mientras más rica en proteínas era la preparación mejor era la inmunidad inducida y que las que contenían más del 6% de ARN, eran buenos inmunógenos. Estas últimas preparaciones estaban constituidas por al menos 25 proteínas. Más tarde estudiaron la hipersensibilidad tardía en ratones inmunizados con fracciones de esta Salmonella, las cuales contenían concentraciones altas de proteínas (Smith y Bigley, 1972-b).

Misfeldt y Johnson (1978-b) purificaron proteínas ribosomales de Salmonella typhimurium SR-11, las cuales fueron probadas como inmunógenos en tres cepas de ratones. Las proteínas aisladas protegieron tres cepas al ser

desafiadas con el organismo homólogo a diferencia del ARN de donde no indujo inmunidad protectora, sino resistencia inespecífica en dos de estas cepas.

Venneman (1971) reportó que las fracciones ribosomales y la de ácido ribonucleico (ARN) obtenidas de Salmonella typhimurium indujeron en ratones una inmunidad comparable con la de las cepas atenuadas del microorganismo virulento, sugiriendo que la respuesta inmune celular y humoral fueron inducidas selectivamente por diversos componentes de la célula bacteriana, y que la respuesta antisalmonella era mediada por células.

Muchos investigadores han tenido éxito en inducir niveles de inmunidad protectora en ratones contra subsecuentes dosis letales de Salmonella sp, sin embargo la naturaleza de los antígenos que confieren protección han ocasionado controversias (Killion y Morrison, 1986). Algunos resultados dada la diversidad de antígenos usados, sugirieron que solo las vacunas vivas o atenuadas son capaces de inducir inmunidad celular y proteger a los ratones contra el desafío letal de Salmonella según Blanden 1966, Mackaness 1966, Collins 1969. Sin embargo, datos más recientes no han confirmado estas conclusiones. A este respecto un número de vacunas que carecen de células de Salmonella viables ha sido empleado por diferentes laboratorios y han inducido una excelente protección contra la infección de Salmonellas virulentas. (Svenson 1979, Misfeld 1978).

Otros estudios, han sugerido que antígenos aislados como el LPS o LPS-Proteína son efectivos en la protección contra la infección con Salmonella (Eisenstein, 1978-1984).

El interés por estudiar las proteínas obtenidas de Salmonella typhimurium por su atributo de ser buenos inmunógenos ha sido reportado por Kussi et al., (1979-1981), quienes purificaron proteínas de membrana externa de S. typhimurium llamadas "porinas" que indujeron en el ratón un alto grado de inmunidad contra el organismo virulento, estas "porinas" contenían cantidades considerables de lipopolisacárido (LPS) y lipoproteína (LP). Estas proteínas libres de sus contaminantes (LPS), (LP) perdían su poder de protección y Schelcht y Bhatnager (1985, a-b) obtuvieron proteínas libres de polisacárido de una cepa rugosa de S. typhimurium que mostraron ser buenos inmunógenos.

Actualmente, existe en México sólo una vacuna reconocida oficialmente para prevenir la enfermedad y ésta es producida con bacterias completas muertas por el calor. Esta vacuna tiene varios inconvenientes como son: el de inducir inmunidad de corta duración, por lo que es necesario reinmunizaciones cada dos o tres años; la vacunación requiere la aplicación de dos inyecciones subcutáneas o intramusculares y produce efectos adversos debido a la presencia de endotoxina. No se recomienda su aplicación en niños pequeños ni es para uso general Garza Ramos et al. (1986).

En el laboratorio donde se desarrollo el presente trabajo se ha tratado de encontrar antígenos obtenidos de Salmonella typhi y Salmonella typhimurium con capacidad protectora que reemplacen a las células completas como inmunógenos y a partir de proteínas aisladas. Como antecedentes a este objetivo Molinari y Larralde en (1974), probaron una vacuna constituida principalmente por ribosomas de S. typhimurium con la que protegieron al 100% de los ratones desafiados contra 100 DLe₅₀ de S. typhimurium virulenta. Molinari y Cabrera (1974) valoraron la potencia de una preparación ribosomal obtenida de Salmonella typhi Ty2, usando como estándar de referencia una vacuna elaborada con Salmonella typhi Ty2, inactivada por calor-fenol. Los resultados mostraron que el grado de protección inducido en los animales inmunizados con la preparación ribosomal, fue significativamente más alto, que el de los ratones inmunizados con la vacuna de referencia. Posteriormente Molinari et al., (1975) encontraron que preparaciones ribosomales obtenidas de Salmonella typhi Ty2 que protegieron al ratón contra el desafío de la Salmonella virulenta con un margen de seguridad muy alto por su baja toxicidad en el ratón. Más tarde Tato y Molinari (1979) aislaron complejos inmunogénicos de Salmonella typhimurium y S. typhi Ty2 preparados por el método de polvos acetónicos. Estos complejos, estaban formados al menos por 25 proteínas las que indujeron un alto grado de inmunidad contra el organismo virulento homólogo. El complejo obtenido de S.

typhi Ty2 indujo mayor protección en los animales inmunizados, que la vacuna estándar de la Secretaría de Salud. Molinari et al., (1981), obtuvieron del complejo inmunogénico de S. typhi a través de una columna de DEAE-Celulosa con 19 fracciones, seis de las cuales resultaron ser buenos inmunógenos, una de las fracciones (4) constituida por 3 proteínas indujo en ratones un alto grado de protección. Finalmente una ribonucleoproteína se purificó de esta fracción con un peso molecular de 8,500 daltones, resulta inmunogénica ya que protegió a ratones contra el desafío de 10 D.L. de S. typhi.

Hipótesis

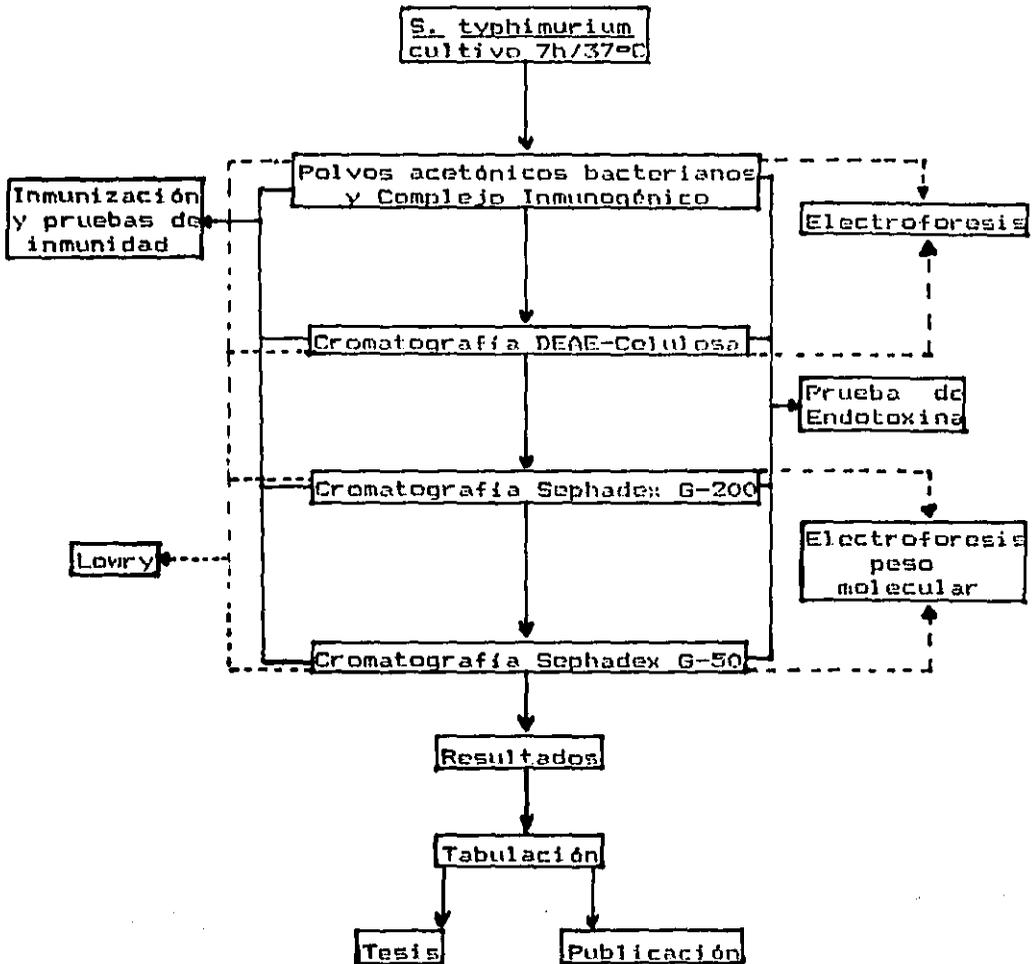
Extractos de proteínas obtenidas de Salmonella typhimurium han sido estudiadas por diferentes investigadores cuyos resultados apuntan a que son muy buenos inmunógenos, sin embargo no se ha purificado todavía una proteína involucrada en la inmunidad. Por lo tanto, (Hipótesis) debe haber proteínas que funcionen como inmunógenos, pero es importante purificarlas con el objeto de estudiar su papel en la inducción de inmunidad.

Objetivos

El objeto del presente trabajo es la purificación de proteínas a partir de extractos protéicos obtenidos de Salmonella typhimurium, y probarlas para detectar aquellas que posean capacidad de inmunizar al ratón contra la infección del bacilo virulento.

ORGANIGRAMA

De la purificación de proteínas de Salmonella typhimurium



MATERIAL. Y METODOS

BACTERIA:

La cepa de Salmonella typhimurium que se utilizó en este trabajo fué obsequiada por el Dr. Leoncio Filloy del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México de la Secretaria de Salud fue aislada de un caso clínico y retipificada en el laboratorio mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

OBTENCION DEL COMPLEJO INMUNOGENICO DE "S. TYPHIMURIUM"

Con el propósito de obtener antígenos de Salmonella typhimurium, se siguió el método de Fessenden, et al. (1967) Los polvos acetónicos obtenidos fueron procesados de acuerdo al método de Tato et al. (1979), se inocularon 10 litros de caldo de soya trypticasa con 200 ml de un cultivo de 12 hr de S. typhimurium que se incubaron durante 7 hr a 37°C. Las células bacterianas se cosecharon por centrifugación a 7,000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B. Las células bacterianas se resuspendieron en 20 ml de acetona fría, previamente deshidratada con cloruro de calcio, la suspensión se agitó durante 10 minutos y se pasó a través de un filtro de vidrio usando una bomba de vacío, repitiendo este paso hasta que la acetona salió clara, se añadió cloroformo frío para eliminar la acetona y el material se dejó secar durante 72 hr en una cámara al vacío. Los polvos acetónicos se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.2, conteniendo cloruro de magnesio

0.012 M, sacarosa 0.25 M, desoxicolato de sodio 0.4% y cloruro de potasio 0.1 M. Se añadió desoxirribonucleasa a una concentración final de 20 ug/ml y se incubó durante 1 hora a 38°C con agitación continua. El material se dializó durante 3 días contra amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.2, conteniendo cloruro de magnesio 0.012 M y cloruro de potasio 0.1 M con cambios frecuentes. El material dializado se centrifugó a 17,500 rpm, durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente, se esterilizó por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 um, se liofilizó y se almacenó a 4°C.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Se determinó la concentración de proteínas del Complejo Inmunogénico; en Fracciones DEAE-Celulosa, Fracciones de Saphadex G-200 y G-50, por el método de Lowry, et al. (1951).

El método se resume de la siguiente manera:

Preparación de los reactivos:

Reactivo A

El reactivo A es una mezcla de tres soluciones patrón (A-1, A-2, A-3) que se combinan poco antes de su uso. El reactivo debe ser utilizado dentro de las 24 hrs desde el momento de su preparación.

Reactivo A-1

Tartrato de sodio y/o potasio.....2.0 gr
Agua destilada hasta.....100.0 ml

Reactivo A-2

Sulfato de cobre hidratado..... 1.0 gr
Agua destilada hasta.....100.0 ml

Reactivo A-3

Carbonato de sodio..... 2.0 gr
Hidróxido de sodio 0.1 N hasta..... 1.0 lt

Se preparó el reactivo de la siguiente manera:

Reactivo A-1.....1 parte
Reactivo A-2.....1 parte
Reactivo A-3.....100 partes

Reactivo de Fenol (Folin-Ciocalteu) se diluyó 1:1

Tratamiento

1. Se ajustaron con agua volúmenes de 0.4 ml: las muestras con concentración desconocida de proteínas de Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium y las fracciones obtenidas por cromatografía en DEAE-Celulosa, Sephadex G-200, Sephadex G-50 (50 y 100 ug de peso seco de cada muestra), los estándares de proteína que incluyeron concentraciones de 12.5, 25.0, 50.0 y 100 ug de albúmina sérica de bovino (Sigma) y los blancos contenidos todos ellos por duplicado.

2. Una vez ajustado el volumen de cada muestra a 0.4 ml se añadieron 2 ml del reactivo A. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.

3. Después se añadieron 0.2 del reactivo B a todos los tubos. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

4. Se determinó la densidad óptica a 500 nm en un espectrofotómetro ZEISS modelo M4 QIII.

5. Usando el promedio de la densidad óptica obtenida para cada muestra de proteína no conocida, se determinó su concentración a partir de la curva de calibración que proporcionaron las lecturas de los estándares.

CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

Se resuspendieron 210 mg de proteína del Complejo Inmunogénico en 30 ml de amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 8.0 y se hizo cromatografía en una columna de 1.5 x 56 cm, de DEAE-Celulosa (Bio-Rad, Richmond, Calif), equilibrada previamente con amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 8.0, el material fue eluido aplicando un gradiente discontinuo a concentraciones crecientes de NaCl desde 0.01 M, hasta 1.0 M. El material eluido se colectó en alícuotas de 3.0 ml y la salida de proteínas se estimó por absorbancia a 280 nm en un monitor ISCO AU-5 conectado a un graficador automático. El material de cada pico se mezcló, dializó contra agua continua y liofilizó.

CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200

Las fracciones de DEAE-Celulosa con mayor

inmunogenicidad (3,4 y 5) se resuspendieron en 8 ml de amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.2 y se pasaron por una columna de Sephadex G-200, de 1.5 x 84 cm. la cual se equilibrio previamente con amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.2. El material se eluyó con el mismo amortiguador, se colectaron alícuotas de 3.0 ml y la salida de proteínas se estimó por absorbancia a 280 nm en un monitor ISCO AU-5 conectado a un graficador automático. El material de cada pico se mezcló, dializó y liofilizó.

CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-50

La fracción 6 del cromatografo en Sephadex G-200 que resultó ser altamente inmunogénica se resuspendió en 7 ml de amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.2 y se paso por una columna de Sephadex G-50 de 1.5 X 30 cm equilibrada previamente con amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.2. El material se eluyó con el mismo amortiguador, se colectaron alícuotas de 3.0 ml y la salida de proteínas se estimó por absorbancia de 280 nm en un monitor ISCO AU-5 conectado a un graficador automático. El material de cada pico se mezcló, dializó, y liofilizó.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

Las fracciones inmunogénicas de DEAE-Celulosa (3, 4 y 5), se estudiaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de acuerdo al método descrito por Scheele (1975). Se usó un gradiente de poliacrilamida del 6 al 18%.

Las muestras se solubilizaron en un amortiguador que contenía; 5% B-mercaptoetanol, 2% de SDS, 0.01 M Tris HCl, pH 6.8, 0.001 azul de bromofenol, y 10% de glicerol. La electroforesis se realizó aplicándole una corriente de 200 voltios, el gel se fijó en ácido acético al 7% durante toda la noche y se tiñó con una solución al 0.1% de azul de Comassie, en una mezcla de 0.5 lt de metanol, 0.5 lt de agua destilada, y 0.1 lt de ácido acético glacial. Se destiñeron con una solución preparada con 0.5 lt de agua destilada, 0.5 lt de metanol y 0.1 lt de ácido acético glacial.

DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

El peso molecular de las proteínas del complejo inmunogénico así como de sus fracciones en Sephadex G-200 y G-50 se estimó de acuerdo al método de Weber y Osborn (1969). Los geles se prepararon con una solución de 22.2 de acrilamida y 0.6 de metilbisacrilamida en 100 ml de agua bidestilada y con amortiguador del gel conteniendo 7.8 de fosfato monosódico, 38.6 gr de fosfato disódico, 7 H₂O y 2 gr de SDS, por litro en tubos de 7.5 X 0.5. La electroforesis se realizó en un aparato Bio-Rad, con el amortiguador disuelto 1:1 y aplicándole una corriente de 8 mA/tubo durante 5 hr, a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron durante toda la noche con una solución de azul de Comassie al 0.25% en una mezcla de 454 ml de metanol al 50% y 46 ml de ácido acético glacial, se destiñeron con una

solución que contenía 75 ml de ácido acético glacial, 50 ml de metanol y 875 ml de agua. La movilidad de las proteínas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{MOVILIDAD: } \frac{\text{Distancia de Migración de la Proteína}}{\text{Longitud del gel después de teñirse}}$$

X

$$\frac{\text{Longitud del gel antes de teñirse}}{\text{Distancia de Migración del Colorante}}$$

Se usaron los siguientes estándares de peso molecular (Sigma); lactoalbúmina (14,200 d). Inhibidor de tripsina (20,000 d). tripsinógeno (24,000 d). anhidrasa carbónica (29,000 d). Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (36,000 d). Ovoalbúmina bovina (66,0000 d) y Galactosidasa (116,000 d).

INMUNIZACIONES

Grupos de 10 ratones de la cepa CD-1, pesando 18 ± 2 gr, se inmunizaron por vía subcutánea con 20 ug del Complejo Inmunogénico de S. typhimurium y de cada una de las subfracciones obtenidas en los pasos sucesivos de fraccionamiento de DEAE-Celulosa, Sephadex G-200 y Sephadex G-50, resuspendidos en 0.1 ml de solución salina fisiológica 0.15 M, una segunda dosis se inoculó 7 días después en las mismas condiciones.

PRUEBAS DE INMUNIDAD

Los ratones inmunizados se desafiaron 7 días después de la última inmunización con $X \text{ DL}_{50}$ de S. typhimurium (Ver

resultados) creciendo en fase logarítmica. La titulación de virulencia se realizó simultáneamente con cada prueba de inmunidad de acuerdo al método de Reed y Muench (1938). En todas las pruebas se incluyeron testigos S. typhimurium, se cultivó en infusión cerebro-corazón agar durante 12 hrs. a 37°C, las células se cosecharon usando solución salina estéril 0.15 M, esta suspensión bacteriana se ajustó a 1.0 Unidad de Densidad Óptica a 560 nm en un espectrofotómetro Zeiss M4 Q III. En reportes anteriores Tato et al., (1979) y Molinari et al., (1981) han estimado que una suspensión de Salmonella cuya absorbancia es de 1.0 UDO aproximadamente equivale a 3.8×10^8 UFC/0.1 ml aproximadamente. Los ratones se desafiaron por vía intraperitoneal con una suspensión bacteriana en un volumen de 0.1 ml de solución salina estéril 0.15 M. Los animales se observaron durante 21 días después del desafío y la protección se reportó como el número de animales que sobrevivieron al reto, sobre el número de animales probados.

OBTENCION DEL ANTIGENO "O", LIPOPOLISACARIDO

Para obtener el lipopolisacárido de S. typhimurium, se siguió el método de Westphal (Kwapinski, 1972). Se cultivó S. typhimurium en infusión de cerebro-corazón agar en cajas de Petri durante 24 hrs. a 37°C. Las células bacterianas se cosecharon con 20 ml de agua bidestilada estéril, se añadieron 31 ml de fenol al 75%, la mezcla se dejó en

agitación durante 30 min a 5°C, se centrifugó a 6,000 rpm durante 15 min, la fase acuosa se colectó y el material remanente se volvió a lavar con 20 ml de agua bidestilada estéril, se agitó y se centrifugó nuevamente. Los dos sobrenadantes se mezclaron y se dializaron contra agua corriente durante 3 días y un día más contra agua bidestilada. Posteriormente, el material se centrifugó a 7,000 rpm por 15 min, el sobrenadante se redujo a un volumen de 20 ml, se le agregó un volumen de alcohol etílico al 95% frío para precipitar ácidos nucleicos, el precipitado formado se separó por centrifugación a 6,000 rpm por 15 min. Al sobrenadante se le añadieron 6 volúmenes más de alcohol frío y el lipopolisacárido precipitante se separó por centrifugación a 7,000 rpm por 15 min, el sedimento se resuspendió en agua bidestilada y liofilizó.

La concentración de LPS de Salmonella typhimurium, se determinó usando el método de Antrona (Putman 1957). Este método consistió en agregar 0.2 ml de una solución al 0.2% de Antrona (Merck) en ácido sulfúrico a tubos de 1.1 x 10 cm conteniendo 1.0 ml de muestra con 800 ug ó 1000 ug de peso seco. Los tubos se calentaron en baño maría a 90°C durante 16 min y enfriaron a temperatura ambiente, la concentración se determinó en un espectrofotómetro Zeiss M4 QIII a 625 nm de longitud de onda, se incluyó curva estándar de dextrosa y blancos.

PRUEBAS DE ENDOTOXINA

Esta prueba tuvo por objeto estimar la presencia de LPS en el Complejo Inmunogénico, sus fracciones y subfracciones cromatográficas. La inyección intravenosa de acetato de plomo incrementa la sensibilidad de la rata a la endotoxina de varias bacterias Gram-Negativas aproximadamente 100,000 veces arriba de lo normal (Selye et al. 1966).

A grupos de 4 ratas de la cepa Wistar, pesando 200 ± 5 gr se les inyectaron por vía intravenosa 0.1 ml de una solución que contenía 20 ug de proteína, del Complejo Inmunogénico, y de cada una de sus subfracciones y 5 mg de acetato de plomo; se incluyeron 3 grupos testigos a uno al que se le inoculó 5 mg de acetato de plomo, otro al que se le aplicó 2 ug de LPS de Salmonella typhimurium, y al último se le inyectaron 2 ug de LPS mezclados con 5 mg de acetato de plomo.

RESULTADOS

El resultado del fraccionamiento del Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium en columna de DEAE-Celulosa se observa en la Figura 1 donde se puede ver que se obtienen 12 fracciones.

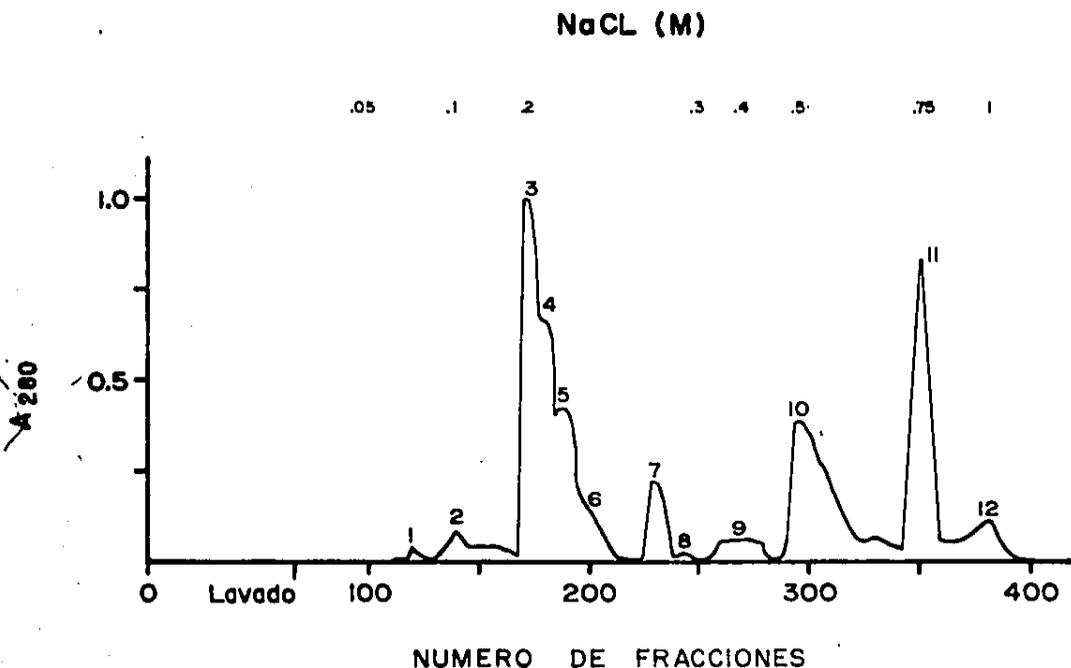


Figura 1. Fraccionamiento del Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium en una columna de DEAE-Celulosa. Se eluyó por pasos incrementando la concentración de NaCl en un amortiguador de fosfatos de sodio 0.02 M, pH 8.0 y se colectaron alícuotas de 3.0 ml.

Estas 12 fracciones y el Complejo Inmunogénico se utilizaron para realizar pruebas de inmunidad. En un primer experimento de inmunidad se probaron las fracciones 2,3,4,5,7,10 y 11 los ratones inmunizados con estas fracciones, se desafiaron con 50 DL₅₀ por vía intraperitoneal los resultados se resumen en el Cuadro 1, donde se observó que las fracciones 3 y 4 inducen inmunidad en el 80% de los ratones, y las fracciones 5 y 7 un 90% de inmunidad igual al observado con el Complejo Inmunogénico. En la figura 2 podemos observar la sobrevida post-desafío en función del tiempo, se nota que el 50% de los testigos habían muerto a los 7 días (Tiempo letal al 50%) mientras que en los grupos de ratones inmunizados con el Complejo Inmunogénico y los picos 3, 4, 5 sólo se observaron del 10 al 20% de muertes en los primeros días. En la Figura 3 se graficó la sobrevida en función del tiempo, de la prueba de inmunidad de los picos 7, 10 y 11. El 50% de los testigos había muerto a los 7 días mientras que en los grupos de ratones inmunizados con el Complejo Inmunogénico y el pico 7 solo murió un ratón en cada grupo, los días 12 y 13 respectivamente.

CUADRO 1

Porcentaje de sobrevivencia de ratones desafiados con 50 DL₅₀ (1.7×10^6 U.F.C.) del microorganismo virulento por vía intraperitoneal previamente inmunizados con 20.0 ug del Complejo Inmunogénico de *S. typhimurium* y de algunas de sus fracciones obtenidas en DEAE-Celulosa. Estudio electroforético

FRACCION INMUNIZANTE	% DE SOBREVIVIDA	VALOR DE P	NUMERO DE BANDAS EN ELECTROFORESIS
COMPLEJO INMUNOGENICO	90	<.001	15
2	30	>.10	8
3	80	<.001	14
4	80	<.001	17
5	90	<.001	10
7	90	<.001	8
10	50	>.001	
11	60	>.001	
TESTIGO	0	--	--

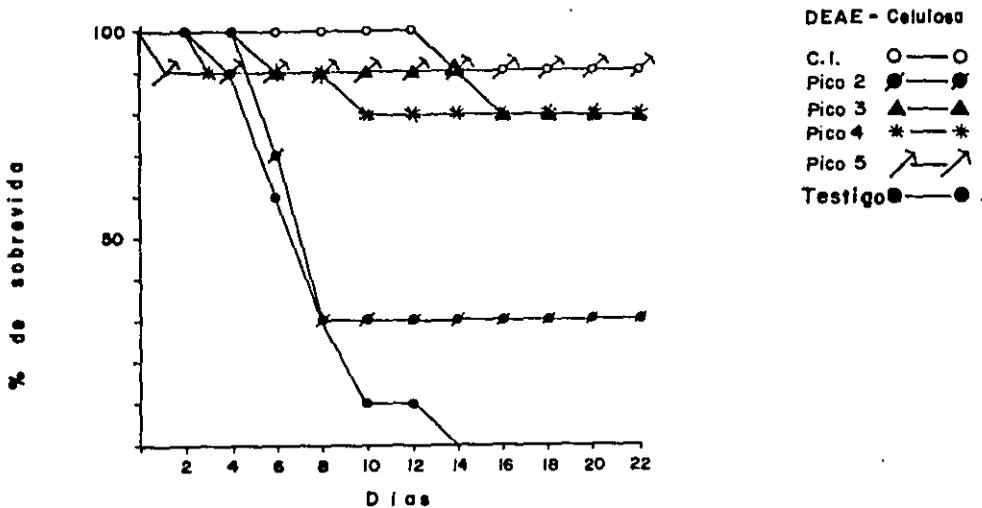


Figura 2. Sobrevida de ratones desafiados con 50 DL₅₀ (1.97 X 10⁶ U.F.C.) del microorganismo virulento por via intraperitoneal testigos e inmunizados previamente con 20 ug del Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium o de algunas de sus fracciones de DEAE-Celulosa.

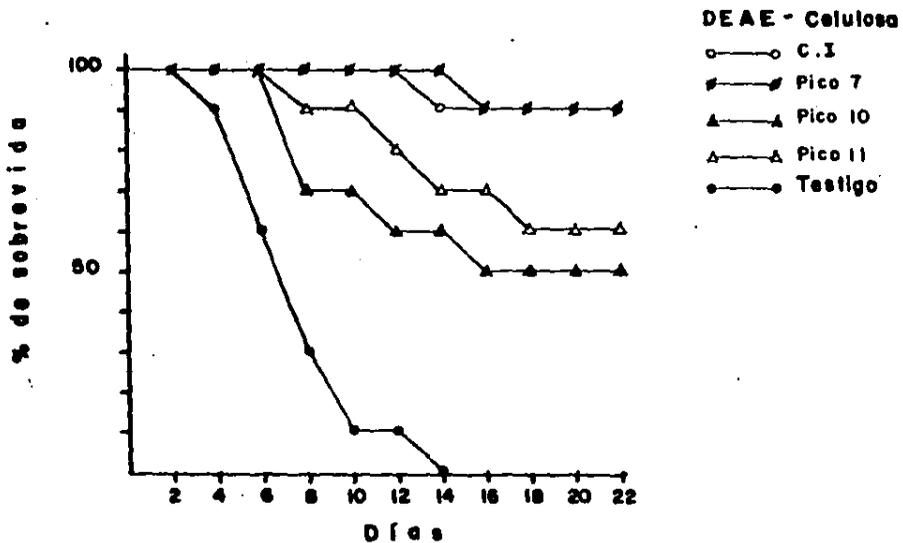


Figura 3. Sobrevida de ratones desafiados con 50 DL₅₀ (1.97×10^6 U.F.C.) del microorganismo virulento, por vía intraperitoneal previamente inmunizados con 20.0 ug del Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium y de algunas de sus fracciones de DEAE-Celulosa.

Las fracciones 3,4 y 5 obtenidas en el fraccionamiento de DEAE-Celulosa mostraron elevada inmunogenicidad, se decidió mezclarlas y cromatografiarlas en Sephadex G-200.

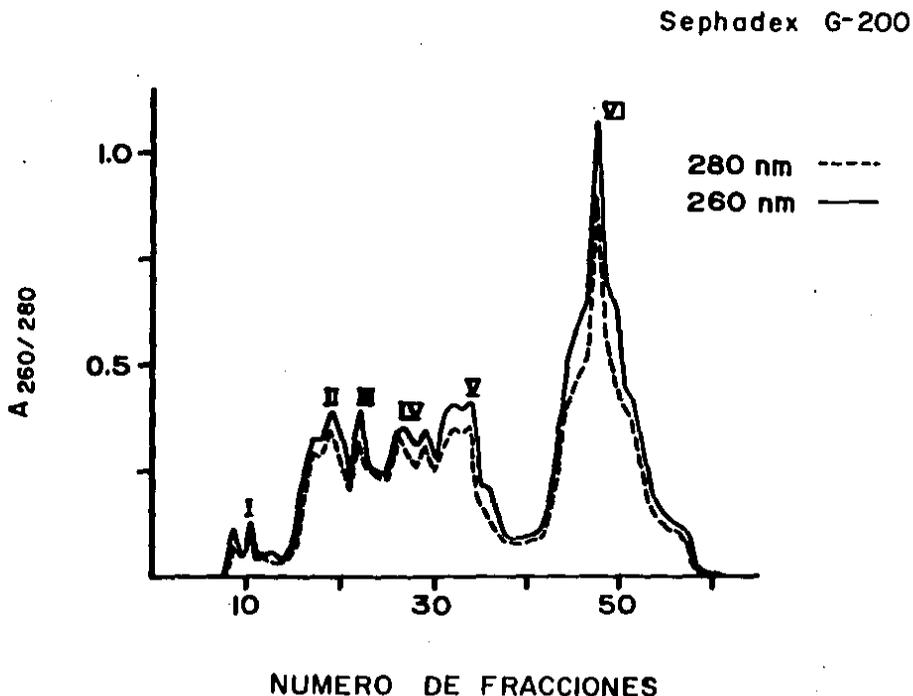


Figura 4. Cromatografía en Sephadex G-200 de las fracciones 3,4 y 5 obtenidas en el fraccionamiento de DEAE-Celulosa. Se eluyó con un amortiguador de fosfatos de sodio 0.02 M, pH 8.0 y se colectaron alícuotas de 3.0 ml cada una.

Se obtuvieron fracciones que se agruparon y denominaron del I al VI como se muestra en la fig. 4. Con estas fracciones y el Complejo Inmunogénico se realizaron pruebas de inmunidad, los resultados se resumen en el Cuadro 2, donde se observa que los picos II, III y VI indujeron un alto grado de inmunidad ($p < 0.001$). En la Figura 5 se registra la sobrevida en función del tiempo, se observa que el 50% de los testigos habían muerto al 70. día (T.L.₅₀) mientras que en el grupo inmunizado con el Complejo Inmunogénico solo se registraron 4 muertes; durante los primeros 12 días los picos II y III indujeron un alto grado de inmunidad (90 y 100% de sobrevida respectivamente).

La figura 6 muestra el porcentaje de sobrevida de ratones inmunizados con los picos IV, V y VI obtenidos de Sephadex G-200. Solo el pico 6 mostró un alto grado de inmunogenicidad (90% de sobrevida).

CUADRO 2

Porcentaje de sobrevivencia de ratones desafiados con 40.5 DL₅₀ (1.7 x 10⁸ U.F.C.) del microorganismo virulento, por vía intraperitoneal previamente inmunizados con 20.0 ug del Complejo Inmunogénico de S. typhimurium y de algunas de sus fracciones obtenidas en Sephadex B-200. Estudio electroforético.

FRACCION INMUNIZANTE SEPHADEX G-200	% DE SOBREVIDA	VALOR DE P	NUMERO DE BANDAS EN ELECTROFORESIS
COMPLEJO INMUNOGENICO	60	>.05	19
I	30	>.5	-
II	90	>.001	5
III	100	<.001	6
IV	20	-	-
V	30	>.5	-
VI	90	>.001	-
TESTIGOS	20	-	-

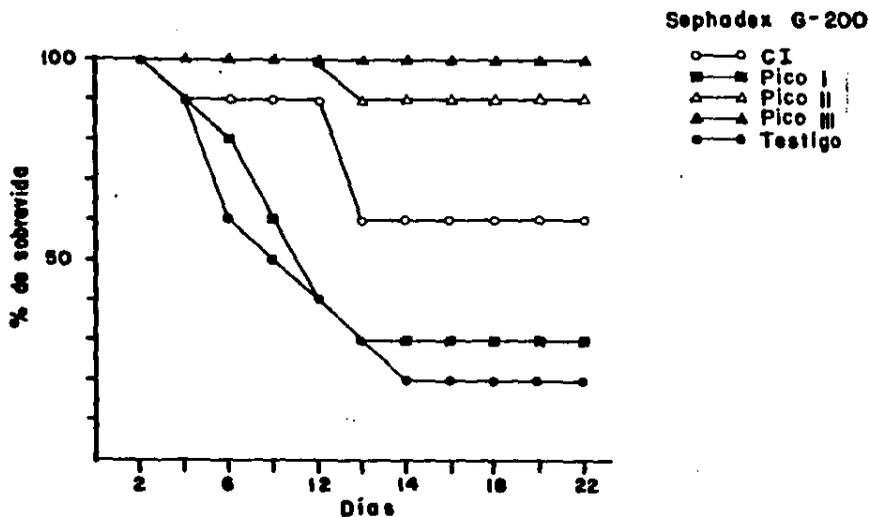


Figura 5. Sobrevida de ratones testigos e inmunizados con 20.0 ug del Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium y de algunas de sus fracciones de Sephadex G-200 y desafiados con 40.5 DL₅₀ (1.7×10^6 U.F.C.) del microorganismo virulento por vía intraperitoneal.

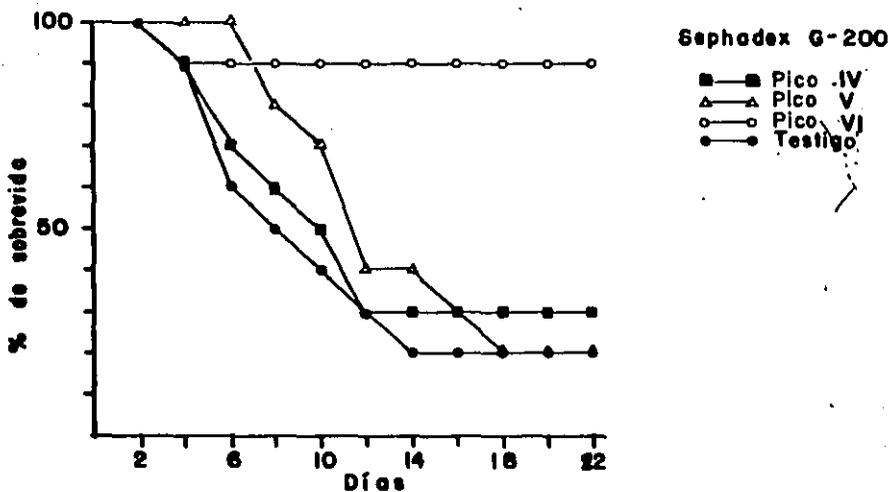


Figura 6. Sobrevida de ratones testigos e inmunizados con 20.0 ug del Complejo inmunogénico de Salmonella typhimurium y de algunas de sus fracciones de Sephadex G-200 y desafiados con 40.5 DL₅₀ (1.7×10^6 U.F.C.) del microorganismo virulento por vía intraperitoneal.

Se decidió subfraccionar el pico VI de Sephadex G-200. La figura 7 muestra el perfil de elución en Sephadex G-50 de donde se obtuvieron 3 componentes denominados picos A, B y C, los cuales se utilizaron para inmunizar ratones. Los resultados de la prueba de inmunidad, se resumen en el cuadro 3 y figura 8. Solo el pico A mostró una elevada potencia inmunogénica 80% de sobrevivida después del desafío con 65 DL₅₀ del microorganismo virulento.

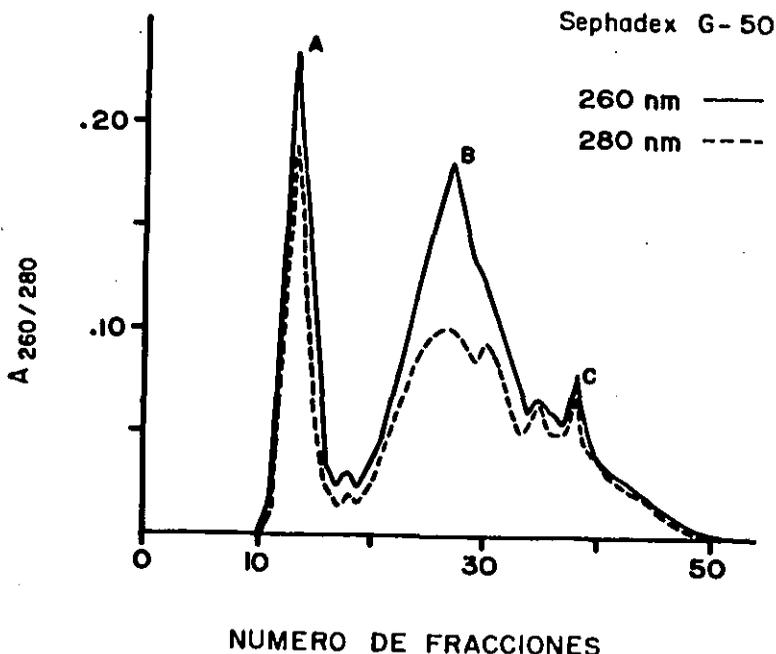


Figura 7. Cromatografía en Sephadex G-50 de la fracción VI de la cromatografía en Sephadex G-200. Se eluyó con un amortiguador de fosfatos de sodio 0.02 M, pH 8.0 y se colectaron alícuotas de 3.0 ml

CUADRO 3

Porcentaje de sobrevivencia de ratones desafiados con 65 DL₅₀ (2.6×10^7 U.F.C.) del microorganismo virulento por vía intraperitoneal inactivados previamente con 20.0 ug del Complejo Inmunogénico de S. typhimurium y de las fracciones obtenidas en Sephadex G-50. Estudio electroforético.

FRACCION INMUNIZANTE SEPHADEX G-50	% DE SOBREVIVIDA	VALOR DE P	NUMERO DE BANDAS POR ELECTROFORESIS
COMPLEJO INMUNOGENICO	100	<.001	19
A	80	<.001	1
B	20	-	-
C	20	-	-
TESTIGOS	20	-	-

Los análisis practicados para detectar la presencia de endotoxina (LPS; Lipopolisacárido o Antígeno "O"), revelaron que las fracciones 2,4,5,7,10 y 11 del fraccionamiento en DEAE-Celulosa las fracciones II, III y VI de Sephadex G-200 y la fracción A obtenida en Sephadex G-50, no contenían lipopolisacárido LPS. Estos resultados se presentan en los Cuadros 4 y 5.

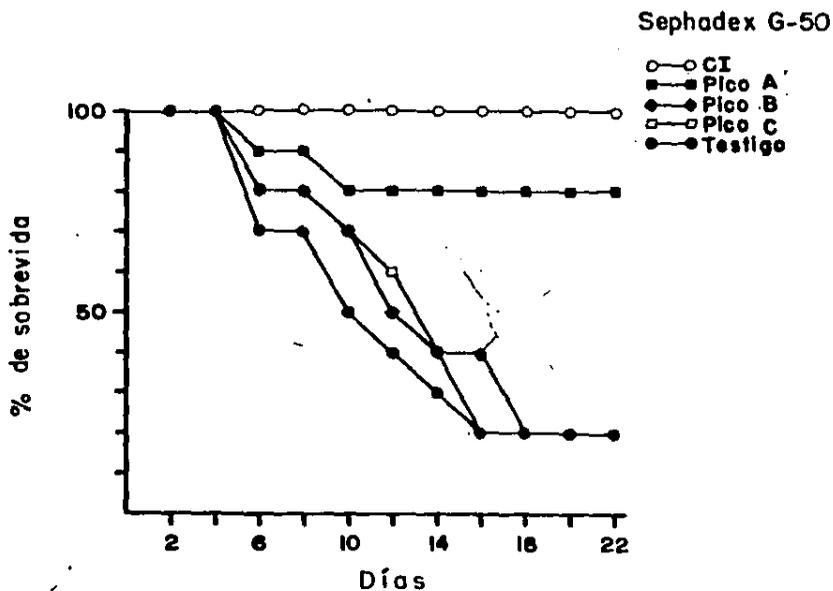


Figura 8. Sobrevida de ratones testigos e inmunizados con 20.0 ug del Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium y de algunas de sus fracciones de Sephadex G-50 y desafiados con 65 DL₅₀ (2.6×10^8 U.F.C.) del microorganismo homólogo por vía intraperitoneal.

CUADRO 4

Prueba para detección de endotoxina en el Complejo Inmunogénico y en algunas de las fracciones obtenidas en DEAE-Celulosa, en ratas inoculadas con 20.0 ug de cada fracción mezcladas con 5 ug de acetato de plomo.

FRACCIONES DEAE-CELULOSA	NUMERO DE RATAS	MUERTE %
COMPLEJO INMUNOGENICO	4	75
2	4	0
3	4	25
4	4	0
5	4	00
7	4	0
10	4	0
11	4	0
LPS# 2 ug/ratón	4	0
LPS 2 ug/ratón+AcP 5ug/ratón	4	100
PbA* 5 ug/ratón	4	0

#LPS Lipopolisacárido; *PbA Acetato de Plomo.

CUADRO 5

Prueba para detección de endotoxina en el Complejo Inmunogénico y en algunas de las fracciones obtenidas en Sephadex G-200 y Sephadex G-50, en ratas inoculadas con 20.0 ug de cada fracción mezcladas con 5ug de acetato de plomo.

FRACCION	NUMERO DE RATAS	% DE MUERTE
COMPLEJO INMUNOGENICO	4	75
FRACCION II (Sephadex G-200)	4	0
FRACCION III (Sephadex G-200)	4	0
FRACCION VI (Sephadex G-200)	4	0
FRACCION A (Sephadex G-50)	4	0
LPS# 2 ug/ratón	4	0
LPS 2 ug/ratón+AcP 5ug/ratón	4	100
PbA* 5 ug/ratón	4	0

#LPS Lipopolisacárido; *PbA Acetato de Plomo

Estos resultados mostraron que hay aproximadamente 1.6 ug de LPS en 20 ug de C I, estimado en base a que 2 ug de LPS + 5 ug de AcP letales para el 100% de ratas inoculadas. Solo la fracción 3 mostró toxicidad para un 25% de ratas. El resto de las fracciones mostró inocuidad, lo que sugiere que estaban exentas de LPS. Las subfracciones obtenidas de Sephadex G-200 y G-50 también mostraron estar exentas del lipopolisacárido.

El análisis electroforético del Complejo Inmunogénico y de algunas de sus fracciones en DEAE-celulosa, reveló 15 bandas de proteína para el Complejo Inmunogénico, 8 bandas para la fracción 5, 14 bandas para la fracción 3 y 17 bandas para la fracción 4 (Fig. 9). Estas dos últimas fracciones fueron las más ricas en proteínas presentan casi las mismas bandas del Complejo Inmunogénico, las 8 bandas que presenta la fracción 5, las encontramos en la fracción 3 y 4. En el Cuadro 1 se resume el número de bandas.

Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS del Complejo Inmunogénico, y de las fracciones II, III de Sephadex G-200, y la fracción A de Sephadex G-50 (Fig. 10). Se evidenciaron 19 bandas de proteína para el Complejo Inmunogénico, sus pesos moleculares se estimaron entre 125,000 a 18,000 daltones. La fracción II (Sephadex G-200) mostró 5 bandas cuyos pesos moleculares fluctúan entre 71,000 a 13,000 daltones. La fracción III (Sephadex G-200) evidenció 6 bandas con pesos moleculares entre 71,000 a 32,000 daltones. La fracción A (Sephadex G-50) solamente mostró 1 banda de proteína cuyo peso molecular aproximado fue de 71,000 daltones.

La figura 11 muestra la curva de los estándares de peso molecular que se utilizaron para estimar el Peso Molecular de las proteínas del Complejo Inmunogénico y de sus fracciones y subfracciones.

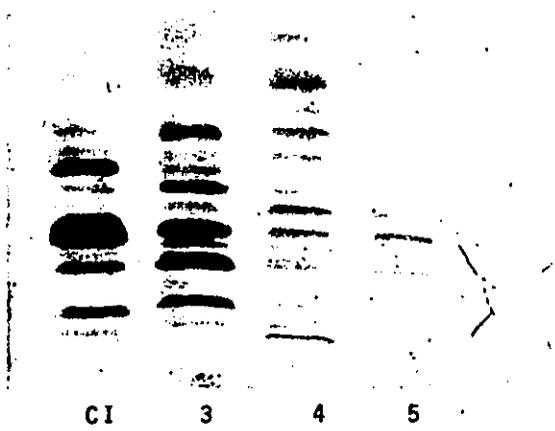


Figura 9. Electroforesis del Complejo Inmunogénico de Salmonella typhimurium y alguna de sus fracciones en DEAE-Celulosa.

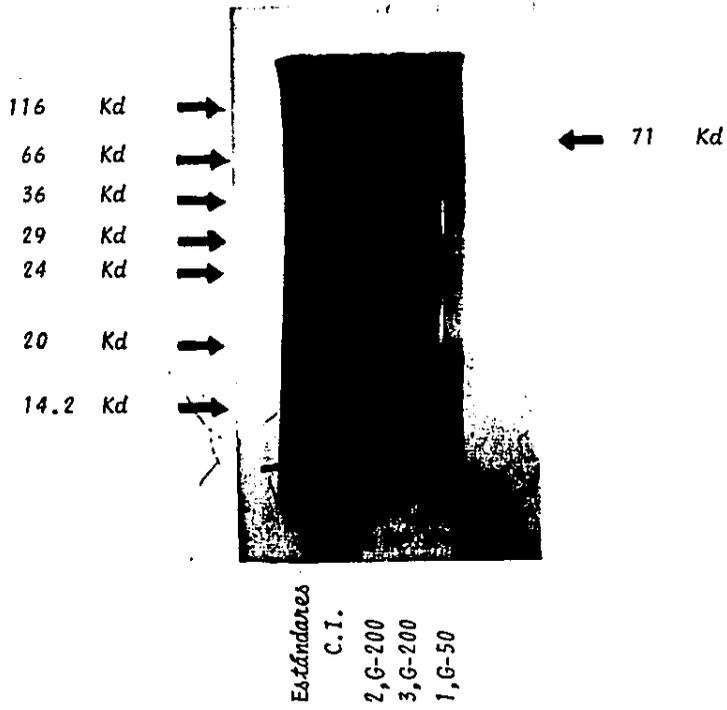


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS del Complejo Inmunogénico, de las fracciones II y III de Sephadex G-200, de la fracción A de Sephadex G-50 y de los estándares de peso molecular.

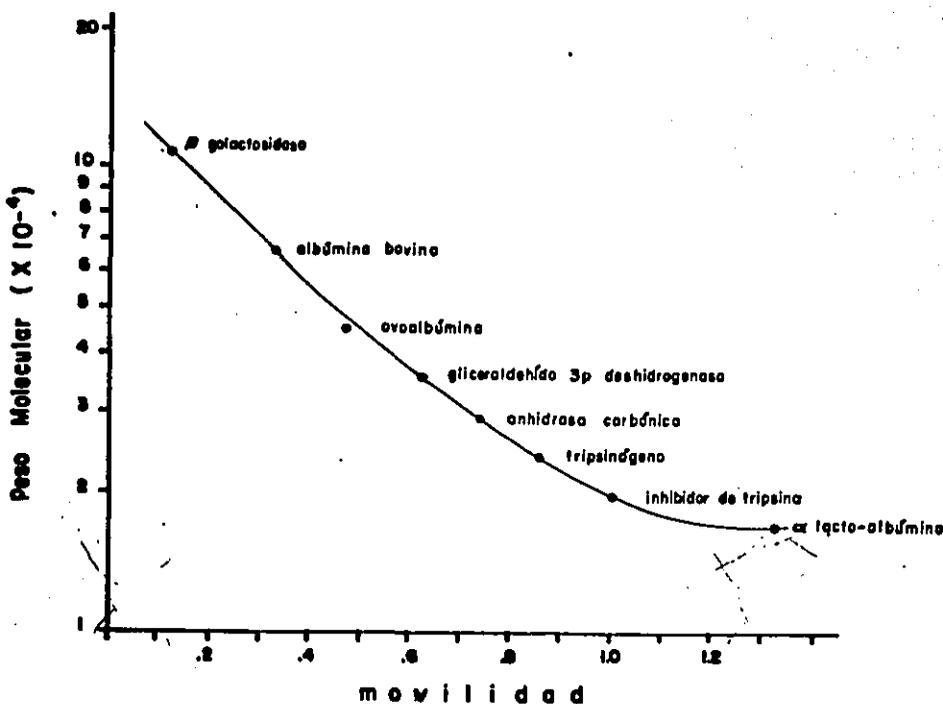


Figura 11. Curva de los estándares de pesos moleculares que se utilizó para estimar el Peso Molecular de las proteínas contenidas en el Complejo Inmunogénico, así como de las proteínas contenidas en las subfracciones y en la proteína purificada.

DISCUSION

Barber y Eylan (1974, 1975, 1976) han enfatizado la importancia de las proteínas de Salmonella en el desarrollo de la inmunidad contra la infección experimental.

Schlecht y Bhatnagar (1985) obtuvieron proteínas libres de lipopolisacárido de una cepa rugosa de Salmonella typhimurium que indujeron inmunidad altamente significativa en ratones, contra el desafío de S. typhimurium. Esta protección fue proporcionada por proteínas de peso molecular bajo, las cuales fueron obtenidas de un extracto crudo. Anteriormente Kuusi *et. al.*, (1979, 1981) habían aislado proteínas de membrana externa (denominadas porinas) a partir de una cepa rugosa de S. typhimurium y mostraron que estas proteínas protegieron a ratones contra el desafío del organismo homólogo, sin embargo al liberar estas proteínas del lipopolisacárido y de la lipoproteína que se copurificaban con ellas perdían su capacidad inmunogénica, pero al reconstruirlas con el LPS se restauraba la capacidad protectora de estas proteínas.

Los resultados de este trabajo muestran que algunas proteínas aisladas de Salmonella typhimurium indujeron un alto nivel de protección contra el desafío con el microorganismo virulento. Estas proteínas estaban carentes de antígenos tales como el lipopolisacárido (LPS).

La purificación por cromatografía por pasos permitió el aislamiento de fracciones ricas en proteínas. Dos de estas fracciones fueron obtenidas a partir del segundo paso

cromatográfico y consistían de 5 y 6 proteínas respectivamente (fracciones II y III de Sephadex G-200). Dichas fracciones indujeron inmunidad con un alto grado de significancia estadística ($P < 0.001$). A partir de la fracción inmunogénica número VI obtenida de la columna de Sephadex G-200 en un paso cromatográfico posterior con Sephadex G-50 se separa ésta en 3 componentes, uno de los cuales, (fracción A) indujo inmunidad altamente significativa ($P < 0.001$). Esta fracción mostro solo una banda de proteína al ser analizada por electroforesis, la que tenía un peso molecular estimado en 71 Kd. Esta proteína apareció en la electroforesis de las fracciones 2 y 3 de Sephadex G-200.

Las pruebas de endotoxina revelaron que esta proteína no contenía lipopolisacárido y su peso molecular (71 Kd) indica que es una proteína diferente a las aisladas por Kuusi et al., (1979,1981) ya que estas tienen un peso molecular de (34,35 y 36 Kd) además, dichas proteínas las copurificaron con LPS.

Sin embargo, con los datos experimentales y analíticos del presente trabajo no se puede conocer cuál es el origen o la estructura de donde proviene esta proteína inmunogénica.

Es de pensarse que esta proteína es la responsable de la inmunidad inducida por estas fracciones. No obstante debe estudiarse si las otras proteínas de estas fracciones tienen algún papel en la inducción de la inmunidad, por lo que consideramos pertinente realizar la purificación de ellas así como el estudio de su participación en la inducción de inmunidad contra la fiebre tifoidea murina.

Otros autores como Johnson (1972, 1973), Misfeldt y Johnson (1978) han aislado proteínas ribosomales de S. typhimurium involucradas en la inmunidad contra el microorganismo virulento, cuando estas preparaciones de proteínas ribosomales fueron tratadas con pronasa y tripsina, se produjo una gran reducción en la protección, así mismo se encontraron que la respuesta inmune inducida por la proteína ribonuclear era específica. Molinari et al., (1976) encontraron que la fracción ribosomal empleada como vacuna e inoculada por vía subcutánea protegió al ratón contra el desafío de S. typhimurium administrada por vía oral creciendo en su fase logarítmica y con dosis de desafío tan altas como 5.5×10^7 UFC. Este resultado supera lo que pudo haber sido una objeción importante, puesto que en la mayoría de las investigaciones que usan el modelo de salmonelosis murina, excepto en las investigaciones de Collins (1970) y Germanier (1972), la ruta de desafío ha sido intraperitoneal o intravenosa. Y esto, argumentan los que objetan este tipo de experimentos no ocurre en la naturaleza, ya que la infección natural ocurre por vía oral. Molinari et al., (1981) lograron purificar una ribonucleoproteína de Salmonella typhi con un peso molecular de 8,500 d, altamente inmunogénica en el ratón contra el desafío del bacilo virulento. Todos estos antecedentes sugieren que el origen de algunas de las proteínas reportadas en el presente trabajo podrían ser ribosomales, pero esto tendrá que ser comprobado experimentalmente.

El método de Tato et al., (1979) el cual fue empleado en este trabajo para obtener extractos antigénicos ricos en proteínas parece ser muy adecuado para la purificación de proteínas ya que su rendimiento por litro de cultivo es muy eficiente (210 ug peso seco/litro), lo que nos hace pensar que otros métodos reportados en la literatura por Nisfeldt y Johnson 1978, Johnson 1972, 1973, Kuusi 1979, 1981, Schlecht 1985), para obtener proteínas inmunogénicas deben de ser de baja eficiencia para obtener una buena cantidad de proteínas que permita la purificación de algunas de ellas.

En el campo de las vacunas bacterianas hay dos tendencias básicas que pueden reconocerse; una es la búsqueda de antígenos protectores necesarios para reemplazar las células completas por componentes purificados; muchas reacciones adversas causadas por componentes irrelevantes a la respuesta protectora pueden entonces ser eliminados. La otra tendencia surge del concepto de que la protección óptima contra algunas infecciones bacterianas puede ser alcanzada solo usando copas vivas atenuadas para la vacunación. Por lo que la aplicación de técnicas de ADN-recombinante podrá permitir el desarrollo de mutantes genéticamente estables que podrían ser empleadas como vacunas vivas (Germanier 1984).

Algunas vacunas vivas orales atenuadas han sido usadas en trabajos de campo por Germanier (1971, 1975). Dos tipos de estas vacunas, de copas avirulentas han sido probadas en humanos, una cepa atenuada dependiente de estreptomycin y

otra cepa mutante Ty21a galactosa-epimerasa. Dos estudios realizados con la vacuna de la cepa mutante de Salmonella typhi dependiente de estreptomycinina en adultos voluntarios, por Reitman (1967) y Mel et al., (1974) en los que se dieron múltiples dosis conteniendo una cantidad superior a 10×10^{10} bacterias viables mutantes 27v a 179 voluntarios sin mostrar reacciones adversas. Las vacunas también fueron toleradas cuando se administraron concomitantemente con 1 g de estreptomycinina oral después de la administración de 2 g de bicarbonato de sodio para lograr la neutralización gástrica. La eficacia de esta vacuna fue mayor que la proporcionada por vacunas liofilizadas 66 - 78% contra 10 - 28% respectivamente. La vacuna obtenida de una cepa mutante galactosa - epimerasa de Salmonella typhi Ty21a fue seleccionada en base a los resultados obtenidos por Germanier y Furor (1971, 1975), en varias cepas mutantes de S. typhimurium en experimentos en ratones. Para establecer la seguridad de esta vacuna se llevaron a cabo tres estudios; uno con voluntarios en los Estados Unidos, los cuales ingirieron de 5 a 8 dosis conteniendo $3-10 \times 10^{10}$ de bacterias viables de la mutante Ty21a. La vacuna fue ingerida mezclándola en un vaso de leche después de haber tomado 2 g de bicarbonato de sodio, se administró con intervalos de 3 a 4 días durante 4 semanas y se observó un 87% de eficacia. En estudios de campo llevados a cabo en Egipto se aplicaron 47,037 dosis de vacunas conteniendo 1.8×10^9 bacterias viables de la mutante ty21a a 32,388 niños en edad escolar y se realizaron observaciones en tres periodos que abarcaron de 1978 a 1981 estimando una

protección del 95%, así mismo se observaron casos de fiebre tifoidea en aquellos niños que tomaron solo una o dos dosis. También se realizó un estudio piloto en Chile en 1980, donde a 338 niños en edad escolar se les dieron 3 dosis de la vacuna de la mutante Ty21a a la mitad del grupo, la vacuna les fue administrada en forma oral en cápsulas con capa entérica y la otra mitad de niños la recibió suspendida en 150 ml de leche y en ninguno de los dos grupos se observaron efectos indeseables. Germanier (1984) propone que de acuerdo a los avances de las modernas técnicas genéticas sería posible construir cepas de S. typhi Ty21a que expresen determinantes antigénicos de otras bacterias o virus, lo que podría conducir a una cepa vacunal polivalente.

Estos resultados nos muestran una vacuna muy eficaz aunque técnicamente muy complicada, su aplicación en poblaciones muy grandes debido a la gran cantidad de dosis, al manejo de una bacteria viable y su traslado en forma adecuada y rápida a regiones alejadas, así como a la gran cantidad de bacterias que se aplican por dosis y el costo de su producción.

La investigación de vacunas en México es actualmente una prioridad bien definida que esta siendo llevada a cabo por las principales instituciones del país, entre ellas la UNAM, el Instituto Politécnico Nacional, el Instituto Mexicano del Seguro Social y los Institutos Nacionales de Higiene y Virología de la Secretaría de Salud. Garza Ramos et al (1986)

Por nuestra parte propondríamos el uso de cepas no enteropatógenas de bacterias como Escherichia coli expresaran antígenos de S. typhi que para fines como el que trata el presente trabajo; existen antecedentes en la literatura que esto se ha logrado en rotavirus por Arias et al., (1984, 1986) una glicoproteína de membrana externa del rotavirus SA11 fue sintetizada en E. coli con la fusión del polipéptido B-Galactosidasa. Esta proteína híbrida fue capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus. La síntesis de esta proteína en forma inmunogénica puede establecer la facilidad de la producción de una vacuna de antígenos de rotavirus sintetizados en células bacterianas. Otro aporte debido a Wirtz et al., 1987, que lograron un inmunógeno de una proteína del circumsporozoito, construido en Escherichia coli, contra Plasmodium falciparum causante de la malaria humana.

El desarrollo de vacunas constituidas por extractos de proteínas obtenidas de Salmonella que inducen niveles significativos de protección contra la infección de Salmonellas virulentas y además eliminan reacciones locales y generalizadas (Tato et al 1979) es nuestra propuesta, en este momento en lugar de la vacuna obtenida con Salmonellas muertas por calor y conservadas en fenol que se ha usado desde hace 90 años y que se continúa aplicando, a pesar de las reacciones locales y generalizadas a veces muy desagradables que causa su aplicación.

R E S U M E N

El objetivo de este trabajo fué aislar proteínas de Salmonella typhimurium con un alto grado de inmunogenicidad.

Salmonella typhimurium (cepa del Hospital Infantil de la Ciudad de México), se cultivó en caldo de Soya Trypticasa a 37°C durante 8 hrs. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y la pasta se procesó de acuerdo al método de Tato et al. para la obtención de un extracto antigénico. Este material se fraccionó en pasos sucesivos hasta la purificación de proteínas. DEAE-Celulosa se usó para el primer fraccionamiento, Sephadex G-200 para un segundo y Sephadex G-50 para un último paso de purificación. Las fracciones obtenidas de cada fraccionamiento se usaron para inocular ratones y probar su inmunogenicidad. Estas fracciones se analizaron por electroforesis para conocer su grado de purificación. De las subfracciones de Sephadex G-50, la primera resultó altamente inmunogénica, conteniendo una sola proteína de aproximadamente 71,000 daltones, libre de endotoxina. Las pruebas de inmunidad finales dieron los siguientes resultados: Complejo Inmunogénico 100% de protección ($P < 0.001$), Proteína G-50 (71,000 daltones) 80% de protección ($P < 0.001$) a ratones inmunizados (2 dosis) y desafiados con 65 DL₅₀ (2.6×10^8 U.F.C.).

BIBLIOGRAFIA

- Arias C. F., López S., Bell J.R., y Strauss J.H., (1984) Primary Structure of the Neutralization Antigen of Simian Rotavirus SA11 as Deduced from cDNA Sequence. JOURNAL OF VIROLOGY 50: 657-661.
- Arias C.F., Ballado T., y Plobański M., (1986). Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in Escherichia coli. GEN 01760: 1-8
- Angerman C.R. and Einsenstein T.K., (1980) Correlation of the and Magnitude of Protection Against Salmonella Infection Afforded by Various Vaccines with Antybody Titers. INFECTION AND IMMUNITY 27(2): 435-443.
- Barber, G., & Eylan E., (1979) The Proteins from S. enteritidis; their protective role in mice and the antibodies induce during infection with the homologous strain Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 1974, 226 A. 331-335.
- Barber, C. & Eylan E., (1975) Confirmation of the protective role of proteins from S. typhimurium in infection of mice with their natural pathogen Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 230 A, 451-465.
- Barber, C. & Eylan, E., (1976) The unfortunate role of precedent in bacteriology. -I. The main antigenes of salmonellae: the proteins. Zbl. Bakt., I. Abt. orig. 234 A, 53-59.
- Bhatnagar N.B. and Schecht., (1985) Proteins from Salmonella R-Mutants Mediating Protection Against Salmonella typhimurium Infection in Mice 3. Separation and Purification of Soluble Proteins and Their Use As Vaccines and As Precipitating Antigens. ZENTRALBATT für BAKTERIOLOGIE MIKROBIOLOGIE and HYGIENE 260(4): 448-458
- Blanden R.B. Mackaness G.B. and Collins F.M., (1966) Mechanims of Acquired Resistance in Mouse Typhoid. JOURNAL EXPLORATION MEDICINE 124: 585-600
- Brock D.T. Brock G.B and Ward D.M., (1986) Bacterial Diseases. Microbiology of Water and Wastwater. Food Microbiology. BASIC MICROBIOLOGY. Third Edition. Prentice-Hall. 11-15-16: 311-312, 410-411, 445-447.
- Carpenter P.L., (1979) Enfermedades Transmitidas por el Agua y Alimentos. MICROBIOLOGIA IV Edición, Nueva Editorial Interamericana. 21: 294-307.
- Collins F.M., (1969) Effect of Specific Immune Mouse Serum on

- the Growth of Salmonella enteritidis Non-vaccinated Mice Challenged by Various Routes. JOURNAL BACTERIOLOGY 97: 667-691.
- Collins F.M. (1970). Immunity to enteric infection in mice. INFECTION AND IMMUNITY 1: 243.
- Collins F.M., (1979) Cellular Antimicrobial Immunity CRC CRITICAL REVIEWS MICROBIOLOGY 7: 27-91.
- Cvjatanovic B. and Uemura K., (1965) BULLETIN WORLD HYGIENE ORGANIZATION 32:29-36.
- Davis B. D. Dulbecco R. Eisen H.N. Ginsberg H.S. y Wood W.B., (1979) Bacilos Entéricos y otras Bacterias Gram negativas TRATADO DE MICROBIOLOGIA, II Edición, 2o Reimpresión, Editor Maclyn MacCarty. Salvat Editores. 21: 797-801.
- Downie N.M. y Heath R.W., (1978) METODOS ESTADISTICOS APLICADOS Editorial Harla 6a. reimpresión.
- Eisenstein T.K. and Angerman C.R., (1978) Immunity to Experimental Salmonella infection; Studies on the Protective Capacity and Immunogenicity of Lipopolysaccharide, Acetone-Killed Cells and Ribosome-Rich Extracts of Salmonella typhimurium in C3H/HeJ and CD-1 Mice. JOURNAL IMMUNOLOGY 121: 1010-1014.
- Fessenden J.M., Donnenberg M.A. and Racker E., (1967) Coupling Factor 2 (F₂): Preparation of Mitochondrial Acetone Powder. METHODS IN ENZIMOLOGY X. Colowik S.P., and Kaplan N.O. (eds) Estrabrook R.W. and Pullmar N.E., Academic Press 84-a. Vol. X: 528-529.
- Freeman B.A., (1983) Bacilos Entericos Grupo Salmonella TRATADO DE MICROBIOLOGIA DE BURROWS. Nueva Editorial Interamericana XXI Edición 19: 517-530.
- Fuerst R.J., (1981) Microorganismos Patógenos Transmitidos a Partir de las Vías Digestivas y Urinarias. "Salmonellosis, Shigelosis y Cólera". MICROBIOLOGIA DE FROBISHER y FUERST XIV Edición Nueva Editorial Interamericana 23 (A): 294-307.
- Garza Ramos Juan, Viesca Carlos, Franco-de Guzmán Guadalupe; (1984) LAS VACUNAS EN MEXICO, SIMPOSIO AVANCES EN EL USO DE VACUNAS 1985-1985, 124-133.
- Germanier R., and Fuerer E., (1971) INFECTION AND IMMUNITY 4: 663-673.
- Germanier R., (1972) Immunity in experimental salmonellosis. III Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of Salmonella typhimurium INFECTION AND IMMUNITY 5: 792-797.

- Germanier R., and Fuerer E., (1975). JOURNAL INFECTIONS DIS. 136: 717-723.
- Germanier R., (1984) Preface and Typhoid Fever. BACTERIAL VACCINES Germanier R. (ed). xi-xli, 5: 137-164
- Hornick R.B. Greisman S.E. Woodward T.E. Dupont H.L. Dawkins A.T. and Snyder M.J., (1970-a) NEW ENGLAND JOURNAL MEDICINE 283: 686-691.
- Hornick R.B. Greisman S.E. Woodward T.E. Dupont H.L. Dawkins A.T. and Sinder M.J., (1970-b) NEW ENGLAND JOURNAL MEDICINE 283: 739-746.
- Jawetz E. Melnick J.L. Adelberg E.A. (1983) Microorganismos Entéricos Gramnegativos. MICROBIOLOGIA MEDICA X Edición Editorial el Manual Moderno 18: 239-242.
- Jenkin, C.R. and Rowley D. (1963) Basis for Immunity to Typhoid in Mice and the Question of "Cellular Immunity" BACTERIOLOGICAL REVIEWS 27: 391-405.
- Johnson W., (1972) Ribosomal Vaccines I. Immunogenicity of Ribosomal Fractions Isolated from Salmonella typhimurium and Yersenia pestis INFECTION AND IMMUNITY 5(6) 947-952
- Johnson W., (1973) Ribosomal Vaccines II. Specificity of the Immune Response to Ribosomal Ribonucleic Acid and Protein Isolated from Salmonella typhimurium 8: 395-400.
- Killar L.M. and Eisenstein T.K., (1986) Delayed-Type Hypersensitivity and Immunity to Salmonella typhimurium INFECTION AND IMMUNITY 52 (2): 504-508.
- Killion J.M. and Morrison D.C., (1986) Protection of C3H/EJ Mice from Lethal Salmonella typhimurium LT2 infection by immunization with Lipopolysaccharide-Lipid A-Associated Protein Complexes INFECTION AND IMMUNITY 54(1): 1-8.
- Kuusi M., Nurminen M., Saxon H., Valtonen M. and Makela H. (1979) Immunization with Major Outer Membrane Proteins in Experimental Salmonellosis of Mice. INFECTION AND IMMUNITY 25 (3); 857-862.
- Kuusi M., Nurminen M., Saxon H. and Makela P. H., (1981) Immunization with Major Outer Membrane Protein (Porin) Preparations in Experimental Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. INFECTION AND IMMUNITY 34 (2): 328-332.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J. Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. JOURNAL. BIOLOGICAL AND CHEMISTRY 193: 265-275.

- Mackanness G.B., Blanden R.V., and Collins F.M., (1966) Infection-immunity in experimental Salmonellosis. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 124: 601-619.
- Mackanness G.B. (1971-a) Cellular-Immunity. ANNALES INSTITUTE PASTEUR 120: 428-437.
- Mackanness G.B. (1971-b) Resistance to Intracellular infection., JOURNAL OF INFECTION DISEASES 123 (4): 439-445.
- Mel D.M., Arsic B.L., Radovenovic M.L., Kaljavolic R., and Litvinjenko S., (1974) ACTA. MICROBIOL. ACAD. SCI. HUNG. 21: 161-166.
- Misfeldt M.L., and Johnson W., (1978) Protective ability of Salmonella ribosomal protein and RNA in inbred mice, INFECTION AND IMMUNITY 21: 286-291.
- Misfeldt M.L., and Johnson W., (1978-b) Identification of Protection Cell Surface Proteins in Ribosomal Fractions from Salmonella typhimurium INFECTION AND IMMUNITY 24: 808-813.
- Molinari J.L., and Larralde (1974) Acquired Immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fractions of Salmonella typhimurium REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA 16: 189-197.
- Molinari J.L. y Cabrera R., (1974) Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de Salmonella typhi Ty2 REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA 16: 199-204.
- Molinari J.L., Flisser A. y Cabrera R., (1975) Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de S. typhi Ty2 contra diversas cepas de S. typhi. REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA 17: 149-156.
- Molinari J.L., Gavilanes M., y Tato P., (1976). Vacuna Ribosomal Obtenida de Salmonella typhimurium probada contra el Desafío del Microorganismo Virulento Administrado por Vía Bucal. ARCHIVOS DE INVESTIGACION MEDICA 7 (3): 127-135.
- Molinari J.L., Yépez, L., Tato P. and Méndez L. (1981) Ribonucleic Acid-Protein Purified from Salmonella typhi involved in Experimental immunity. ANNALES IMMUNOLOGY (Inst. Pasteur) 132 D: 25-41.
- Pelczar M.J. y Chan E.C.S., (1984) Enfermedades transmitidas por alimentos. Infecciones transmitidas por el agua. ELEMENTOS DE MICROBIOLOGIA 28-29: 513-545
- Putman E.W. (1957) Paper Chromatography of Sugar (anthrone method) Colowick S.P., and Kaplan N.O. (eds) METHODS IN ENZIMOLGY III Academic Press p 71.

- Reed L.J. and Muench H., (1938) A simple method of Estimating fifty percent end points AMERICAN JOURNAL HYGIENE 27: 493
- Reitman M., (1967) JOURNAL INFECT. DIS. 117: 101-107.
- Scheele G.A., (1975) Two-Dimensional Gel Analysis of Soluble Proteins THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 250(14):5375-5385.
- Selye H. Tuchweber B. and Bertok., (1966) Effect of Lead Acetate on the Susceptibility of Rats to Bacterial Endotoxins. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 91 (2): 884-890.
- Smith R.A. and Bigley N.J., (1972-a) Ribonucleic Acid-Protein Fractions of Virulence Salmonella typhimurium as Protective Immunogens INFECTION AND IMMUNITY 6: 377-383.
- Smith R. A. and Bigley N.J., (1972-b) Detection of Delayed Hipersensitivity in Mice Injected with Ribonucleic Acid-Protein, fractions of Salmonella typhimurium INFECTION AND IMMUNITY 6: 384-389.
- Svenson S.D. Nurminen and Lindberg A.A., (1979) Artificial Salmonella Vaccines: O-Antigenic Oligosaccharide-Protein Conjugates Induce Protection Against Infection with Salmonella typhimurium. INFECTION AND IMMUNITY 25: 863-872.
- Tato P. Flisser A. Gavilanes M. and Molinari J.L., (1979) Immunogenic Complexes Obtained from Salmonella typhimurium and Salmonella typhi Ty2 by the Bacterial Acetone Powder Method ANNALES MICROBIOLOGY (Inst. Pasteur) 130 A: 47-60.
- Venneman M. R. and Berry N.J. (1969) Isolation and Partial Characterization of an Immunogenic moiety Obtained from Salmonella typhimurium. JOURNAL BACTERIOLOGY 100: 140-148
- Venneman M.R. and Berry L.J. (1971) Cell-Mediated Resistance Induced with Immunogenic Preparations of Salmonella typhimurium. INFECTION AND IMMUNITY 1 (4); 381-387.
- Volk M.A. and Wheeler M.F., (1984) Pathogens that Enter the Body Via the Digestive Tractor. BASIC MICROBIOLOGY V Edition Harper & Row, Publishers 26: 421-429
- Weber K. and Osborn M. (1969) The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 244 (L6): 4406-4412.
- Westphal (1972) Westphal's Method of the Lipopolysaccharide METHODOLOGY OF IMMUNOCHEMICAL and IMMUNOLOGICAL RESEARCH Kwapiński (ed) Wiley Interscience p 80-81.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Wirtz R.A., Billou W.R., Schneider I., Chedid L., Gross N.J.,
Young J.F., Hollingdale M., Diggs C.L., and Hockmeyer
W.T., (1987). Plasmodium falciparum: Immunogenicity of
Circumsporozoite Protein Constructs Produced in
Escherichia coli. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY 43: 166-
172.

Youmans G.P. and Youmans A.S., (1965) Nonspecific Factors in
Resistance of Mice to Experimental Tuberculosis JOURNAL
BACTERIOLOGY 97: 134-156.