



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

93
20

" EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE LAS PROTEINAS
DE MEMBRANA EXTERNA DE Salmonella typhi, EN UN MODELO
EXPERIMENTAL MURINO " .

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTAN

MARTIN VARGAS GAMA

JACOBO TELLEZ-GIRON CRUZ

ASESOR DE TESIS DR. ARMANDO ISIBASI

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1987.



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 está 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.

CONTENIDO

	PAG.
RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y SOLUCIONES	16
METODOS	24
1.- CULTIVO Y COSECHA DE LAS CEPAS BACTERIANAS	24
2.- OBTENCION DE LAS PME DE <u>S. typhi 9, 12, d, Vi</u>	24
3.- PRECIPITACION DE LAS PME DE <u>S. typhi 9, 12, d, Vi</u>	25
4.- CUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE PME	26
5.- CUANTIFICACION DEL LPS CONTENIDO EN LAS PME COMO CONTAMINANTE	26
6.- CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LAS PME DE <u>S.typhi 9,12,d,Vi, S. typhi Ty2 y S. typhimurium</u>	26
7.- DETERMINACION DE LA DL ₅₀	27
8.- EVALUACION DE LA INMUNIDAD ACTIVA	29
9.- OBTENCION DEL SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI-PME DE <u>S. typhi 9, 12, d. Vi.</u>	31
10.- ENSAYO INMUNOENZIMATICO	31
11.- ABSORCION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PME DE <u>S.typhi 9, 12, d, Vi</u> .DEL SUERO INMUNE DE CONEJO	33
12.- EVALUACION DE LA INMUNIDAD PASIVA	33
13.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	33
RESULTADOS	36

	PAG.
DISCUSION	56
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	60

RESUMEN

Las PME de S. typhi 9, 12, d, Vi se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria. Por electroforesis en geles de poliacrilamida se demostró que tenían pesos moleculares que iban de 14 a 70 kd. Estas proteínas confieren una protección activa del 100% en el modelo murino contra retos de hasta 1000 DL₅₀ de la cepa homóloga cuando se administraron concentraciones mayores de 10 ug. La protección disminuye al 30%, cuando el reto se efectuó con 500 DL₅₀ de S. typhimurium.

Ensayos de inmunidad pasiva demostraron que los anticuerpos anti-PME confieren una protección del 100% contra un reto de 100 DL₅₀ de la cepa homóloga, mientras que se observó una protección cruzada al reto con S. typhimurium a la misma DL₅₀, en donde la sobrevivencia fue del 80%. La protección pasiva desapareció cuando el anti suero anti-PME administrado se absorbió con las PME.

La presencia de anticuerpos de conejo anti-PME se demostró por el ensayo inmunoenzimático (ELISA), e inmunoelectrotransferencia; por este último se encontró que los anticuerpos estaban dirigidos principalmente hacia el grupo de proteínas denominadas porinas.

ABREVIATURAS

- A.C.F. : Adyuvante completo de freund
Anti-PME : Suero inmune anti-proteínas de membrana externa
DL₅₀ : Dosis letal al 50%
DNAsa : Desoxirribonucleasa
D.P. : Distancia proporcional
EDTA : Acido etilén diamino tetracético
ELISA : Ensayo inmunoenzimático
Hepes : Acido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin - etanosulfónico
I.P. : Vía intraperitoneal
I.V. : Vía intravenosa
Kd ó Kd : Kilodaltones
KDO : 2-ceto-3-desoxioctanato
LPS : Lipopolisacárido
PBS : Solución amortiguadora de fosfatos
PME : Proteínas de membrana externa
PSA : Persulfato de amonio
RNAsa : Ribonucleasa
SDS : Dodecil sulfato de sodio
S.S.F.: Solución Salina fisiológica
TEMED : N,N,N',N' - tetrametil etiléndiamino
Tris: Tris - (Hidroximetil) - aminometano

I N T R O D U C C I O N

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión intestinal de Salmonella typhi. Esta es una bacteria - gramnegativa. móvil, de la tribu Salmonellae y familia Enterobacteriaceae. De acuerdo a la clasificación de Kauffman-White Salmonella typhi pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9,12, los flagelos contienen el antígeno " d " y en la superficie posee el antígeno " Vi ". La fórmula: 9, 12, Vi denota a S. typhi en forma abreviada (1).

Las primeras descripciones de la fiebre tifoidea se le atribuyen a Thomas Willis en 1659, quien describió los diferentes signos y síntomas de la enfermedad así como la duración y severidad de la misma. A pesar de esto, durante años, esta enfermedad se confundió con el tifo, y no fue sino hasta 1782 que Ruxham - describió las dos enfermedades febriles como entidades clínicas diferentes; la fiebre pútrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo) (2,3).

Gerhard, en 1837, estableció claramente las diferencias clínicas que había entre el tifo y la fiebre tifoidea, Jenner en 1850, en su libro titulado " Sobre la identidad y no identidad de las fiebres tifoídicas y tifosa", describió detalladamente las manifestaciones clínicas y demostró que las lesiones de las placas de Peyer y nódulos linfáticos eran específicas de la fiebre tifoidea (3).

William Budd, en 1856, estableció que la enfermedad se transmitía a través de alimentos y aguas contaminadas con material fecal proveniente de individuos enfermos (2). Estos hallazgos motivaron al gobierno británico, en 1875, a establecer leyes para mejorar las condiciones sanitarias de su país, con el objeto de impedir la diseminación de la enfermedad.

Eberth, en 1880, describió la presencia del bacilo tifoídico en secciones histológicas de ganglios linfáticos mesentéricos y en hígado de pacientes con fiebre tifoidea, Pfeiffer, en 1885, hizo el primer aislamiento del bacilo a partir de heces (2). En el mismo año, Pfeiffer y Kolle demostraron que el suero de pacientes convalecientes protegía a cobayos contra dosis letales del bacilo tifoídico y en 1895 Widal describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (3).

La primera inmunización experimental con suspensión de Salmonella typhi - fué realizada con éxito en conejos por Fränkel y Simmons en 1886 y en ratones por Bauner y Peipper en 1887, empleando en los dos casos microorganismos vivos. Klikevich posteriormente empleó bacilos muertos con el mismo propósito y este indujo a Wright en Inglaterra y simultáneamente a Pfeiffer y Kolle en Alemania a emplear, en 1897, por primera vez vacunas inactivas para la inmunización de humanos. (4). La vacuna de Wright fué un cultivo en caldo de 3 a 5 - tres semanas de incubación, inactivado por calor a 60°C y preservado con fenol a 0.5%. La vacuna de Pfeiffer y Kolle, preparada en medio sólido, también fue una vacuna inactivada por calor a 56°C y fenolada (4).

Estas vacunas fueron utilizadas en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica - donde encontraron disminuciones significativas en la morbilidad, así como una atenuación de los síntomas de individuos vacunados que sufrieron la enfermedad (4).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas con bacterias vivas atenuadas, administradas por vía oral. El efecto de las mismas fué estudiado en el ejército francés en donde, desafortunadamente, hubo muertes entre los indivi-

duos y estas vacunas fueron sustituidas por vacunas elaboradas con bacterias muertas (5).

Las vacunas tifoídicas elaboradas con bacterias muertas en forma semejante a las de los autores citados o modificadas en cuanto a dosis, vías de administración y procedimientos de inactivación, siguieron utilizandose durante décadas sin conocerse su verdadero efecto protector, ya que se carecía de modelos animales para probar su eficacia y no se lograba relacionar el efecto protector con algún indicador serológico. Esto hizo que hasta 1955 no se tuviera un ensayo controlado que proporcionara información confiable acerca del valor profiláctico de las vacunas (4,5). A partir de esta fecha bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética, en donde se investigó la eficacia de vacunas tifoídicas preparadas con células enteras de Salmonella typhi inactivadas con acetona, con calor y fenol o con alcohol. De los resultados obtenidos en estos estudios, se concluyó que la vacuna inactivada con acetona designada con la letra K, resultó ser la mejor ya que la protección conferida no solo fué de mayor grado, sino también de mayor duración. La vacuna inactivada con calor y fenol, designada con la letra L, resultó menos eficaz que la vacuna K y la protección obtenida con la vacuna inactivada con alcohol fué menor que las dos anteriores. Se observó que la protección inducida por una sola dosis de las vacunas K y L era aceptable; sin embargo, el empleo de dos dosis proporcionaba una inmunidad más efectiva y de mayor duración (6, 7) .

Los estudios realizados en 1968 por Hornick y colaboradores, en voluntarios humanos, usando las vacunas K y L, demostraron que la protección conferida por estas vacunas estaba en función de la dosis a la que el individuo inmunizado -

estuviera expuesto (8).

El hecho de que estas vacunas parenterales protegieran únicamente ante inóculos no mayores de 10^5 bacterias, junto con la alta toxicidad que era característica de las suspensiones de bacterias muertas de S. typhi, motivó la búsqueda de un agente inmunizante más efectivo y menos tóxico para la infección tifoídica. Para ello, se recurrió nuevamente al uso de vacunas orales elaboradas con bacterias vivas atenuadas, propuestas desde 1925 por Besredka, puesto que ya se contaba con más información acerca de los mecanismos inmunes locales del aparato gastrointestinal, debido a los progresos alcanzados en el campo de la inmunidad secretora durante la década de 1960 (9, 10, 11).

Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas de bacterias vivas de administración oral; una, proveniente de una cepa dependiente de estreptomycinina y otra de una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa, designada como Ty21a - por Germanier (12,13). La efectividad de ambas vacunas fue valorada en voluntarios humanos, encontrándose resultados contradictorios en la protección conferida por la cepa dependiente de estreptomycinina (14), mientras que los resultados obtenidos al emplear la cepa de Germanier fueron satisfactorios. La vacuna protegió al 87% de los individuos inmunizados cuando la dosis de desafío fué de 10^7 bacterias (DI_{50}) siendo esta protección mayor que la inducida por las vacunas parenterales (15). Los estudios realizados en Alejandría, Egipto, indicaron que la vacuna era capaz de inducir protección en el 95% de la población estudiada (16). Sin embargo, estudios realizados en Chile (1983) en una población infantil demostraron que con tres dosis de la vacuna aplicada en cápsulas de capa entéricas con intervalos de dos ó 21 días entre cada dosis, - produjo una eficacia del 51 - 61 % respectivamente después de tres años confir

mando la relación entre el número de dosis y la eficacia (17).

De las experiencias anteriores resalta el hecho de que se desconoce la naturaleza del ó de los antígenos de S. typhi relacionados con la protección y más aún, la respuesta inmune del hombre frente a estos antígenos de S. typhi. Han sido numerosas las investigaciones realizadas dirigidas a la identificación de los antígenos responsables de la inmunidad protectora en la fiebre tifoidea, - estando la mayoría de ellas orientadas particularmente al estudio de los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el antígeno somático - " O ", el antígeno flagelar " H " y el antígeno capsular " Vi ". Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático " O " jugaba un papel muy importante en la protección por lo que se elaboró una vacuna utilizando el lipopolisacárido (LPS), como antígeno; sin embargo, la protección obtenida fué escasa y de corta duración (7, 18). Por otra parte, se han realizado varios estudios en pacientes con fiebre tifoidea y en individuos vacunados con diferentes tipos de vacuna tifoídicas que señalan la poca importancia de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno somático " O " en la protección (5, 19, 20) .

En lo que respecta al antígeno flagelar " H ", se ha demostrado que tampoco está relacionado con la inmunidad protectora en la fiebre tifoidea Tully y colaboradores en 1962 observaron que al inmunizar chimpancés con una capa rugosa de S. typhi, se inducía la producción de anticuerpos contra el antígeno " H ", pero no se obtenía protección, aun en presencia de títulos altos de anticuerpos antiflagelares (21). Anderson en 1968 demostró que en ratones inmunizados con una mutante sin flagelos de S. typhi, se obtenía el mismo grado de protección - que en aquellos inmunizados con la cepa móvil (22) .

Por otro lado, se ha tratado de demostrar la relación del antígeno " Vi "

en los mecanismos de protección en la fiebre tifoidea. Los primeros estudios - datan de 1934, cuando por primera vez, Félix y Pitt informaron de la presencia de este antígeno en cepas de S. typhi aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, así como la presencia de anticuerpos contra dicho antígeno en el suero de estos pacientes (23). Desde entonces, a la fecha, se han realizado numerosos estudios, obteniéndose resultados contradictorios. La falta de relación de los anticuerpos anti - Vi con la respuesta inmune protectora, ha sido demostrada - por varios investigadores (11, 19, 24,), no obstante, otros estudios revelan que el antígeno " Vi " por sí solo es capaz de inducir protección (8) y se - ha señalado la importancia que tiene este antígeno en la virulencia de la cepa infectante, así como la conveniencia de conservarlos en la preparación de vacu - nas (8, 24, 25).

La demostración de Youmans y Youmans en 1965 de que la fracción ribosomal de Mycobacterium tuberculosis era efectiva para inducir inmunidad en el ratón contra el microorganismo homólogo, condujo a investigar la capacidad protectora de estas fracciones en diferentes especies bacterianas encontrándose actual - mente un gran número de referencias que demuestran la protección conferida por estos antígenos ribosomales en microorganismos tales como : Vibrio cholerae, - Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Listeris monocytogenes, Brucella abortus y otros (26, 27). En 1970, Venneman y colaboradores demostraron que las fracciones ribosomales de S. typhimurium inducían protección en el ratón contra la bacteria virulenta (28). Resultados similares fueron informados en México por Molinari y Larralde (1974), quienes trabajaron también con fracciones ribosomales de S. typhimurium (29). En tra - bajos posteriores, Molinari y Cabrera (1974) demostraron que las fracciones ribosomales obtenidas de S. typhi inducían protección en ratones (30).

Con el fin de demostrar al ó los antígenos responsables de la protección - inducida por estas fracciones ribosomales, se realizaron varios estudios en - los cuales se obtuvieron resultados muy diversos. En los primeros trabajos al respecto, realizados por Venneman y colaboradores (1970) se describe al RNA ribosomal como el antígeno protector (28). Johnson (1972) presentó evidencia de que eran las proteínas ribosomales las que protegían a los ratones (31). Smith y Biglye (1972) sugirieron que ambos antígenos; el RNA y las proteínas se requerían para obtener una buena protección (32) ; sin embargo, en trabajos realizados por Eisenstein (1975) y Misfeld y Johnson (1977), se demostró que las fracciones ribosomales de Salmonella se encontraban contaminadas - con LPS y proteínas de la envoltura celular (33, 34). Más aún, en trabajos posteriores, Misfeld y Johnson (1978) demostraron que las proteínas de la envoltura celular de S. typhimurium protegían a los ratones contra la infección por esta bacteria, siendo el grado de protección semejante al inducido por las fracciones ribosomales (35). Estos experimentos ponen en duda la efectividad ribosomales y apoyan por Mates y Yesipovisi (1976), de que los antígenos protectores de Salmonella se localizan en la superficie de la bacteria (36).

En los últimos años, la membrana externa de las bacterias Gramnegativas ha cobrado gran importancia y diversos investigadores han enfocado sus estudios - hacia el papel que desempeñan las proteínas de esta membrana en la relación - Huésped - parásito, puesto que se consideraba, con base a su localización, que son elementos clave tanto en la patogenicidad como en la protección contra enfermedades producidas por estas bacterias. El estudio de las proteínas de la - membrana externa (PME) de las bacterias Gramnegativas, se pudo llevar a cabo - gracias al advenimiento de métodos específicos para la separación de membranas.

Miura y Misushima, en 1968, descubrieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de Escherichia coli empleando para ello esferoplastos preparados con lisozima y EDTA, los cuales se lisaron asmáticamente, separando posteriormente en un gradiente de sacarosa la membrana externa de la citoplasmática (37). Estos estudios demostraron que la membrana externa estaba constituida por lípidos, proteínas y por lipopolisacáridos (fig.1). El procedimiento anteriormente mencionado, fué modificado por Osborn con el objeto de disminuir la cantidad de lipopolisacárido (38). Schnaitman, en 1971, describió una metodología que evita la preparación de esferoplastos para la obtención de la membrana externa. Consiste en el rompimiento de las bacterias en una prensa francesa, seguida posteriormente de la solubilización de la membrana interna con un detergente no iónico (39).

La identificación de las PME fué posible gracias a la electroforesis en gels de poliacrilamida. Schnaitman fué el primero en reportar que E. coli contenía una proteína mayor, la cual constituye 70% de las proteínas totales de la membrana (40) y poco después, él y otros investigadores (41, 42, 43) demostraron por electroforesis que esa proteína mayor estaba constituida por cuatro proteínas.

Schmitges y Henning describieron una proteína principal, que electroforéticamente se podía separar en dos bandas (44). Actualmente se sabe que el número de las PME es variable y depende de la información genética de la bacteria. Su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo, temperatura, mutaciones, etc.

Las proteínas de la membrana externa más ampliamente estudiadas, han sido las E. Coli y S. typhimurium. Di Rienzo, Nakamura e Inouye en 1978 y Osborn y

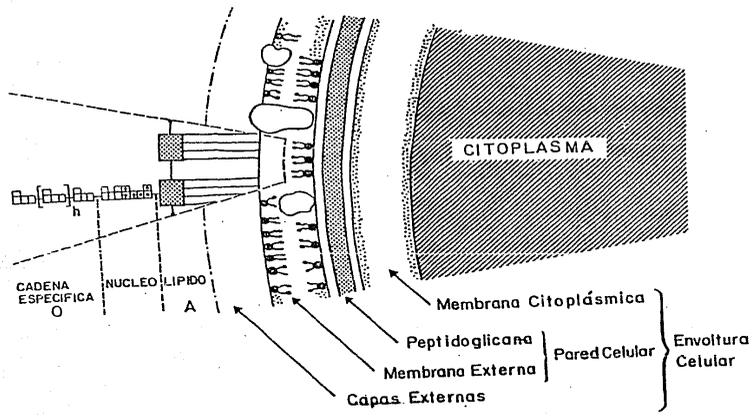


FIGURA 1
ESQUEMA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS
GRAM NEGATIVAS (37)

Wu en 1980, hacen una revisión externa de ellas (45, 46) estas se clasificaron en proteínas principales y menores. Las primeras pueden ser o estar expresadas con más de 100,000 copias por células y se han descrito alrededor de 10, aunque por lo general, solamente se expresan cinco de ellas en una bacteria. Dentro de las proteínas principales o mayores encontramos :

- 1).- Proteínas matrices y porinas; relacionadas con el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana.
- 2).- Proteínas modificables por el calor; relacionadas con los procesos de conjugación genética y que actúan como receptores de fagos y colicinas.
- 3).- Lipoproteína de Braun; la cual esta unida covalentemente a la peptidoglucana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional - de la membrana.

El arreglo de estas proteínas en la membrana se ilustra en el esquema propuesto por los mismos autores (fig. 2).

Con respecto a la función de las proteínas menores se ha demostrado que intervienen como acarreadores en el transporte de las sustancias de alto peso molecular a través de la membrana, también se relacionan con la replicación celular y entre ellas se encuentra la única proteína de membrana externa que se ha demostrado que tiene actividad enzimática: la fosfolipasa A (45, 46)

Las evidencias de que estas PME están expuestas al medio externo llevó a investigar su eficacia como inmunógenos protectores. Frasch y colaboradores encontraron que las PME de Neisseria meningitidis grupo B, eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos e inducían la producción de títulos altos de anticuerpos, los cuales in vitro presentaban actividad bactericida mediada por complemento (47).

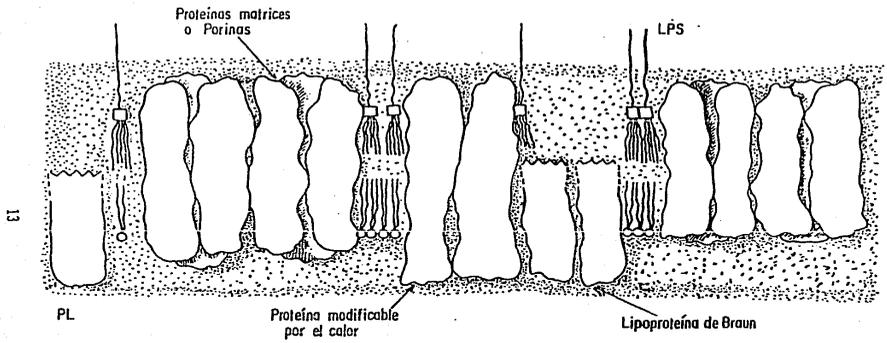


FIGURA 2
 ORGANIZACION DE LAS PROTEINAS EN LA MEMBRANA EXTERNA (13 B)

Buchanan y Arko demostraron que el antígeno capaz de proteger específicamente contra la uretritis gonocócica en chimpancés estaba presente en la membrana externa de la Neisseria gonorrhoeae (48). Posteriormente, evidenciaron que las proteínas de dicha membrana, eran las que conferían la protección específica en cobayos a los que había inducido una infección gonocócica experimental (49).

Kussi y colaboradores demostraron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de S. typhimurium protegen al ratón de un reto con una capa lisa de la bacteria, lográndose el mismo efecto de protección con anticuerpos específicos contra estas proteínas (50, 51).

Estudios realizados recientemente por Killian y colaboradores (1986) han sugerido que una porción de proteínas unida a Lipido A y LPS de una cepa de S. typhimurium puede ser requerida para inducir protección en el ratón contra retos letales de la misma bacteria (52).

Tomándose en consideración los antecedentes de protección que se obtuvieron en los modelos animales con la PME de otras bacterias Gramnegativas, se decidió estudiar el papel que podrían jugar las PME de Salmonella typhi como inmunógenos protectores en un modelo experimental murino.

O B J E T I V O S

Objetivo General :

Demostrar que las PME de S. typhi actúan como inmunógenos protectores de la fiebre tifoidea en modelo experimental murino.

Objetivos particulares :

- 1).- Aislar y caracterizar PME de S. typhi 9, 12, d, Vi, S. typhi Ty2 y S. typhimurium.
- 2).- Determinar la dosis letal a 50% (DL₅₀), de S. typhi 9, 12, d, Vi, S. typhi Ty2 y S. typhimurium.
- 3).- Determinar la actividad protectora de las PME de S. typhi 9, 12, d, Vi en un modelo experimental murino.
- 4).- Obtener suero de conejo anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi y cuantificar título de anticuerpos específicos contra estas PME por un método inmunoenzimático (ELISA).
- 5).- Determinar la actividad protectora del suero anti-PME en un modelo experimental murino.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y SOLUCIONES

1.- MATERIAL BIOLÓGICO

A).- Cepas de bacterias

Se trabajaron las siguientes cepas : Salmonella typhi Ty2 y Salmonella typhimurium donadas por el Instituto Nacional de Higiene: Salmonella typhi 9, 12, d, Vi aislada de un paciente con fiebre tifoidea.

B).- Ratones

Se utilizaron ratones de la cepa NIH de 18-20 g. de un solo sexo. Estos se emplearon para determinar la DL_{50} , así como para los ensayos de inmunización activa y pasiva.

C).- Conejos

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda de 3 a 5 kg. Estos se emplearon, - para la obtención del suero inmune anti-PME de Salmonella typhi 9, 12, d, Vi.

2.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

A).- Solución salina fisiológica (S.S.F.)

Cloruro de sodio (Baker)	8.5 g
Agua destilada	100 ml

B).- Agar BHI

Agar BHI (Biexon)	52 g
Agua destilada	1 L

c).- Agar nutriente

Extracto de carne (BBL)	0.9 g
---------------------------	-------

Peptonas de caseína (Biexen)	1.5 g
Agar bacteriológico (Biexon)	4.5 g
Agua destilada	300 ml

D).- Mucina al 5% en S.S.F.

Mucina gástrica (Sigma)	12.5 g
S.S.F.	(250 ml

E).- LIPOPOLISACARIDO DE S. typhi liofilizado

(Donado por el Instituto Nacional de Higiene)

Se preparó la solución de LPS a 1 mg/ml en S.S.F.

F).- Medio mínimo A

Fosfato diabásico de potasio (Baker)	70.0 g/l
Fosfato monobásico de potasio (Baker)	30.0 g/l
Citrato de sodio (Baker)	5.0 g/l
Sulfato de amonio (Baker)	10.0 g/l
Sulfato de magnesio (Baker)	1.0 g/l

A 50 ml de modelo mínimo A, se le agregan 450 ml. de agua destilada. Esto se esteriliza a 121°C por 15 min. y a 15 lb de presión. A todo lo anterior se le adiciono 20 ml de Glucosa al 12.5 % (merck) y un mil de leucina al 1% (bi-xon), previamente esterilizadas.

G).- Solución de lavado

Hepes 0.01 M pH 7.4	
Hepes (Sigma)	2.6 g/l
Agua destilada	1 l

H).- Soluciones amortiguadoras para el aislamiento de las PME

- Hepes 0.01 M pH 7.4, Triton X-100 al 2%	
Hepes	2.6 g/l
Triton X-100 (Sigma)	20.0 g
Agua destilada	1 l
- Tris 50 mM, EDTA 5mM pH 7.8, Triton X-100 al 2%	
Tris (Sigma)	6.05 g
Edta (Sigma)	1,861 g
Triton X-100	20.0 g
Agua destilada	1 l

I).- Soluciones para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

- Solución para la curva patrón de proteínas	
Albumina sérica bovina (Sigma)	25.0 mg
Agua destilada	25 ml
- Reactivos para la curva patrón	
Carbonato de sodio (Baker)	2.0 g
Hidróxido de sodio 0.1 M (Baker)	100 ml
Tartrato doble de sodio y potasio (Baker)	2.0 g
Agua destilada	100 ml
- Sulfato de cobre pentahidratado (Baker)	1.0 g
Agua destilada	100 ml
Reactivo de Folin ciocolteu (Merck)	2 ml
Agua destilada	6 ml

J).- Determinación de KDO

- Solución patrón de 2-ceto- 3-desoxioctanato (KDO)	
KDO (Sigma) 1.0 mg/ml	0.1 ml

Agua destilada	0.9 ml.
- Acido sulfúrico 0.2 (Monterrey)	1.0 ml.
- Acido peryódico 0.04 M (Monterrey)	0.25 ml.
- Arsenito de sodio al 2.6 % en ácido clorídrico 0.5 M (Merck)	0.25 ml.
- Dimetil sulfóxido (Sigma)	1.0 ml

K).- Soluciones para la electroforesis en acrilamida

- Acrilamida (Biorad)	30.0 g
N'N bismetilen acrilamida (Biorad)	0.08 g

Se afora a 100 ml con agua desionizada y destilada; se filtra en papel Whatman # 41 y se mantiene a 4°C en un frasco ámbar.

- Amortiguador tris-HCl 1.5 M pH 8.8	
Trizma base (Sigma)	6.0 g

Ajustar el pH con HCl 2 N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.

- Amortiguador Tris - HCl 0.5 M pH 6.8	
Trizma base (Sigma)	6.0 g

Ajustar a pH con HCl 2 N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.

- Amortiguador de muestra	
Amortiguador Tris - HCl pH 6.8	25 ml
SDS (Sigma)	2.0 ml
Azul de bromofenol al 1.5 (Sigma)	0.1 ml
Glicerol (Baker)	10 ml
2- Mercaptoetanol (Sigma)	5.0 ml

- Amortiguador de corrimiento pH 8.3	
Trizma base	3.0 g
Glicina (Sigma)	14.4 g
SDS (Sigma)	1.0 g
Agua destilada y desionizada	1 l
- Solución fijadora	
Metanol (Merck)	400 ml
Acido acético (Baker)	70 ml
Aforar con agua destilada a 1 l.	
- Solución colorante de protefnas	
Metanol al 50%	454 ml
Acido acético	46 ml
Azul de Coomassie (Sigma)	1.2 g
Se agita durante 30 min. y se filtra en papel Whatman # 41.	
- Solución decolorante para el azul de Coomassie	
Metanol	50 ml
Acido acético	25 ml
Aforar a 1 l con agua destilada	
- Gel separador para la placa de electroforesis	
al	11.5 %
Acrilamida	11.5 ml
Tris - HCl 1.5 M pH 8.8	7.5 ml
Agua destilada y desionizada	11.0 ml
SDS al 10%	0.6 ml
TEMED (LKB)	0.01 ml
PSA 10.	0.05 ml

Se mezcla el agua, tris y acrilamida; se desgasifica la solución de 3-5 min. para posteriormente adicionar el SDS, TEMED Y PSA.

- Gel introductor para la placa de electroforesis

Acrilamida	2.5 ml
Tris - HCl 0.3 M pH 6.8	3.75 ml
Agua destilada y desionizada	7.5 ml
SDS al 10%	0.15 ml
TEMED	7.5 ml
PSA al 10%	50 ul

1).- Soluciones utilizadas para el ensayo inmunoenzimático (ELISA)

- Amortiguador de carbonatos pH 9.5

Carbonato de Sodio (Baker)	7.0 g
Bicarbonato de sodio (Baker)	2.8 g

Se disuelven las sales en 1 l de agua

- Amortiguador de fosfatos (PSS) pH 7.4

Cloruro de sodio	8.7 g
Fosfato monobásico de sodio (Baker)	0.4 g
Fosfato dibásico de sodio (Baker)	2.7 g
Agua destilada y desionizada	1 l

- Solución de lavado

PBS 0.15 M pH 7.2	1 l
Tween 0.15 M pH 7.2	1 ml

- Solución de bloqueo

PBS 0.15 M pH 7.4	1 l
Gelatina (Difco)	10 g

- Solución diluyente para el 1 er anticuerpo y para el conjugado

PBS 0.15 M pH 7.4	1 l
Gelatina	5.0 g
Tween 20 (Baker)	1.0 g
- Conjugado

Antigamaglobulina total de cabra, unida a peroxidasa (Sigma)	
--	--
- Amortiguador de citratos pH 5.6

Citrato de sodio (Baker)	29.0 g
Acido cítrico (Baker)	4.1 g
Agua destilada	1 l
- Solución para el sustrato de peroxidasa

Orte - fenilendiamina (Monterrey)	6.0 mg
Amortiguador de citratos	12 ml
Peróxido de hidrógeno (Merck)	10 ul
- M).- Soluciones utilizadas para la electrotransferencia
 - Amortiguador de transferencia

Trizma base	9.075 g
Glicina	43.2 g
Metanol	600 ml
Agua destilada	2400 ml
 - Amortiguador de fosfatos (PBS)

La misma preparación que para la ELISA.
 - Solución de lavado

La misma preparación que para la ELISA.
 - Solución de Bloqueo

PBS 0.15 M pH 7.2	1 l
Gelatina	15 g
- Conjugado	
Antigamaglobulina total de cabra unida	
a peroxidasa	3 ml
- Sustrato para el conjugado	
Tris - HCl 0.1 M pH 7.6	
Trizma base	609 mg
Ajustar pH con HCl 2 N, llevar a 50 ml con agua destilada	
Diamino bencidina (Sigma)	25 mg
Peróxido de hidrógeno al 30% (Merck)	50 ul.
- Tinta china para tinción	
Tinta china (Pelikan)	0.25 ml
PBS tween 20 al 1%	250.0 ml

M E T O D O S

1.- CULTIVO Y COSECHA DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Se sembraron en placas de agar BHI por separado, Salmonella typhi 9, 12, d, Vi Salmonella typhi Ty2 y Salmonella typhimurium. Se dejaron crecer durante 24 horas a 37°C y se tomaron inóculos pesados con asa bacteriológico, los cuales se depositaron en tres matraces de 125 ml cada uno, que contenían 50 ml de medio mínimo A (Inóculo). Después de un tiempo de crecimiento de 18 horas a 37°C, se dividió cada inóculo en partes iguales y se agregaron a botellas de cultivo que contenían 1.5 l de medio mínimo A. Las botellas de cultivo se incubaron a 37°C en agitación constante en un agitador (New Brunswick Scientific Co., INC U.S.A.), durante 8 horas, deteniendo el crecimiento en la fase exponencial hasta obtener una densidad óptica de 190 unidades Klett.

Posterior al crecimiento, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1650 xg durante 15 min. a 4°C en una centrifuga Sorvall RC5C (Servall Instru ments Dupont); la pastilla se resuspendió en Hepes 10 mM a pH de 7.4 y se cen trifugó de nuevo. La pastilla así obtenida finalmente se resuspendió en Hepes 10mM pH 7.4 y se conservó a 20°C.

2.- OBTENCION DE LAS PME DE Salmonella typhi 9, 12, d, Vi.

Las bacterias en Hepes 10mM pH 7.4 se homogenizaron durante un minuto (ho mogenizador Sorvall), para eliminar flagelo, cápsula y antígeno Vi. El homoge nizado se diluyó con Hepes 10mM pH 7.4 hasta obtener una densidad óptica de - 1.2 a 660 nm (Espectofotómetro Beckman DU-7). La biomasa bacteriana colocada en un baño de hielo se liso por ultrasonido en un sonicador (Lab line Ultra tip Labsonic System) por períodos de 2 min. a 180 watts. Al producto de la -

sonicación se le añadieron 200 μ l de DNA_{sa} y RNAsa (Sigma), así como dos gotas de cloruro de magnesio (MgCl₂) 1 M por cada 10 ml de suspensión. El rompimiento celular se continuó hasta obtener una densidad óptica de 0.3 a 0.4 nm de la suspensión. Finalmente se centrifugó a 500 rpm por 15 min. a 5°C dos veces con el fin de eliminar células enteras. El sobrenadante, producto de la - centrifugación, se colocó en tubos de ultracentrifuga, y se centrifugó a -- 100,000xg durante 45 min. a 5°C (Ultracentrífuga Beckman L8-M) con el fin de sedimentar la envoltura celular, la pastilla resultante se suspendió en Hepes 10 mM pH 7.4 volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. La envoltura celular, contenida en la pastilla se resuspendió en una solución de Tritón -- X-100 al 2% en Hepes 10mM pH 7.4 y con el objeto de solubilizar y eliminar la membrana citoplasmática se centrifugó a 100,000xg durante 45 min. a 5°C. La -- pastilla resultante se solubilizó en una solución de Tritón X-100 al 2% en Tris 50 mM EDTA 5mM pH 7.8; la solución obtenida se incubó a 37°C. El sobrenadante contenía principalmente las PME, mientras que en la pastilla se encontraba la peptidoglicana.

3.- PRECIPITACION DE LAS PME de Salmonella typhi 9, 12, d, Vi

Las PME, se obtuvieron a partir del sobrenadante de la última centrifugación. Para esto se tomó 1 volumen de sobrenadante y se precipitó con 6 volúmenes de acetona fría. Todo lo anterior se dejó reposar durante 12 h a -20°C. - Posteriormente se centrifugó a 1650xg por 15 min. y se tomó el sobrenadante pa ra resuspenderlo en solución amortiguadora de TRIS 50 mM EDTA 5mM pH 7.8. Se formaron alícuotas de 2 ml a una concentración de 2 mg/ml y se conservaron a -20°C para su uso posterior.

4.- CUANTIFICACION DEL CONTENIDO PME.

Se hizo de acuerdo al método de Lowry modificado (53), usando albúmina sérica bovina (Sigma) para la curva patrón.

5.- CUANTIFICACION DEL LIPOPOLISACARIDO (LPS) CONTENIDO EN LAS PME COMO CONTAMINANTE.

El LPS se determinó en forma indirecta a través del contenido de KDO, usando como curva patrón KDO (Sigma) y preparando la muestra problema de la siguiente manera .

A 50 ul de muestra de proteínas se le añadió 1 ml de ácido sulfúrico 0.2 N y se puso en el horno a 100°C durante 30 minutos, se dejo enfriar y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm, se tomo entonces 0.5 ul de la mezcla y se le añadió 0.25 ml de Acido Peryódico 0.04 N. en ácido sulfúrico 0.125 N, dejándolo reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 0.25 ml de Arsenito de Sodio al 2.6 % en ácido clorhídrico 0.5 N y se dejo hasta que desapareciera el color café enseguida se añadió 0.5 ul de ácido tiobarbitúrico 0.6% dejando reposar esto 15 minutos a 100°C, por último se añadió en caliente 1 ml de dimetil - sulfóxido y leyo a 540 nm (58).

6.- CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LAS PME de S. typhi 9, 12, d, Vi, S. typhi Ty2 S. typhimurim.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, en condiciones reductoras y un sistema de amortiguador discontinuo. Las muestras de PME de S. typhi 9, 12, d, Vi, S. typhi Ty2 y S. typhimurium se precipitaron con acetona fría durante 12 hrs. a -20°C y se resuspendieron en Amortiguador de muestra a una concentración de 1 mg/ml, las muestras se hirvieron 5 min. y se -

depositaron 30 ul de cada una, en forma alternada en los carriles de las placas de 16 x 14 cm y estas se colocaron en un sistema de electroforésis vertical (LKB Bromma), siguiendo la técnica descrita por Laemli (54). Los marcadores de pesos moleculares utilizados fueron albúmina sérica bovina, anhidrasa carbónica y lisozima con pesos moleculares de 66, 29 y 14 Kd, respectivamente.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 10°C, durante 6 hrs.aprox. a 20 miliamperes. Al finalizar la electroforesis (esto es cuando al frente de corrimiento se encontró a 1 cm. del final de la placa), los galesse tiñieron con solución de Coomassie y se eliminó el exceso de colorante empleando la solución decolorante, cambiándola cada hora hasta que las bandas de proteínas revelaron claramente.

7.- DETERMINACION DE LA DL₅₀

Para esto se utilizaron las cepas de S. typhi 9, 12, d, Vi, S. typhi Ty2 y S. typhimurium. Las bacterias crecieron en placas con BHI durante 18 hrs. después de este tiempo se resembro y el crecimiento se detuvo en la fase exponencial. El número de bacterias en esta fase se ajustó a 0.6 de D.O. a 540 nm. que equivale aproximadamente a 10^9 bact./ml. A partir de la concentración de 10^9 bact/ml. y utilizando un factor de dilución constante se prepararon las siguientes concentraciones de bacterias mostradas en el cuadro I.

Las bacterias de cada cepa fueron resuspendidas en mucina al 5% en S.S.F. - estéril y se inocularon por vía intraperitoneal en 0.5 ml cada concentración - bacteriana a grupos de 10 ratones NIH de un solo sexo con un peso de 18 a 20 g. Como testigo se utilizaron 10 ratones (para cada experimento) inoculados unicamente con 0.5 ml de mucina en S.S.F. estéril. La sobrevivencia de los rato-

CUADRO I

CONCENTRACIONES BACTERIANAS PARA EL CALCULO DE LA DL₅₀ PARA DIFERENTES CEPAS DE SALMONELLA

<u>S.typhi 9.12.d.Vi</u> (bact./ml.) ^a	<u>S.typhi Ty 2</u> (bact./ml.)	<u>S.typhimurium</u> (bact./ml.)
8 000 000	2 000 000	200 000
1 600 000	400 000	40 000
320 000	80 000	8 000
64 000	16 000	1 600
12 800	3 200	320
2 560		64

^a LAS BACTERIAS DE CADA CEPA FUERON RESUSPENDIDAS EN MUCINA AL 5% EN S.S.F. ESTERIL Y SE INOCULARON 0.5 ml. DE CADA CONCENTRACION BACTERIANA POR VIA INTRAPERITONEAL A GRUPOS DE 10 RATONES NIH. SE UTILIZARON COMO TESTIGO GRUPOS DE 10 RATONES INOCULADOS UNICAMENTE CON 0.5 ml. DE MUCINA AL 5% EN S.S.F.

nes se evaluó a los tres días del reto para S. typhi Ty2 y S. typhi 9, 12, d, Vi, mientras que a los diez días para S. typhimurium. La DL_{50} se determinó por el método de Reed y Muench (55) de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$\log DL_{50} = \log \text{dil} \downarrow 50\% - \left[\frac{50\% - (\% \text{Mort dil} \downarrow 50\%)}{(\% \text{Mort dil} \uparrow 50\%) - (\% \text{Mort dil} \downarrow 50\%)} \right] \log \text{factor de dil.}$$

Los datos encerrados entre corchetes representan la distancia proporcional (D.P.).

50% - La dilución de la concentración que mata al 50% de la población

% Mort dil \downarrow 50% = La dilución inferior inmediata a la dilución de la concentración que mata al 50% de la población.

% Mort dil \uparrow 50% = La dilución superior inmediata a la dilución de la concentración que mata al 50% de la población.

La D.P. se multiplica a su vez por el factor de dilución y el resultado obtenido se le resta al log de la dilución en la cual el % de mortalidad fué menor al 50%. Finalmente a este resultado se le saca su antilog para obtener la DL_{50} .

8.- EVALUACION DE LA INMUNIDAD ACTIVA.

Para evaluar la inmunidad activa se inmunizaron por vía I.P. grupos de 10 ratones de la cepa NIH, con diferentes concentraciones de las PME de S. typhi 9, 12, d, Vi. El reto se realizó diez días después de la segunda inmunización con las PME, las cepas de Salmonella empleadas para el reto fueron : S. typhi -

CUADRO II
PROTOCOLO DE INMUNIZACION (PROTECCION ACTIVA)

DIA	INMUNIZACION	VIA	[PME ^d μg]	DL ₅₀ ^e
0	1a.	IP	1.25, 2.5, 5.0 10, 20, 30	
15	2a.	IP	1.25, 2.5, 5.0 10, 20, 30	
25	RETO CON: a) <i>S. typhi</i> 9, 12, d, vi b) <i>S. typhi</i> T y Z c) <i>S. typhimurium</i> .	IP		20, 50, 100 300, 500, 1000

^{a)} DL₅₀ = 40 X 10³ BACT./ml. ✓

^{b)} DL₅₀ = 150 X 10³ BACT./ml. ✓

^{c)} DL₅₀ = 160 BACT./ml. ✓

^{d)} PME - PROTEINA DE MEMBRANA EXTERNA

^{e)} NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50 % (DL₅₀) UTILIZADAS PARA EL RETO

- SE UTILIZARON 6 LOTES DE 10 RATONES NIH PARA CADA CONCENTRACION
- SE UTILIZARON LOTES TESTIGO INOCULANDO TRIS-EDTA, MUCINA AL 5% Y LPS (0.4 μg y 1.2 μg)
- DESPUES DEL DESAFIO; EL EXPERIMENTO SE REGISTRO EN UN PERIODO DE 10 DIAS. SE EVALUO LA PROTECCION COMO % DE SOBREVIVENCIA.

9, 12, d, Vi y S. typhi Ty2 y Salmonella typhimurim los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a lo que se muestra en el cuadro II.

9.- OBTENCION DEL SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi.

Se utilizaron 2 conejos Nueva Zelanda machos de 3 a 5 kg. de peso. El esquema de inmunización se muestra en el cuadro III.

10.- ENSAYO INMUNOENZIMATICO ELISA

Para la titulación de los sueros de conejo anti-PME se empleo la técnica de ELISA (56). Las PME de S. typhi 9, 12, d, Vi se diluyeron en amortiguador de carbonatos a una concentración de 2 mg / ml y se adicionaron a los pozos de la inmunoplaaca (Nunc-Immune Plate I) en un volúmen constante de 100 ul, lo anterior se dejo toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavaron los pozos 4 veces con PBS - Tween 20 al 0.1 %. Posteriormente se le adicionó PBS gelatina al 1%, esto se mantuvo durante 1 hora a 37°C y se lavaron 4 veces de nuevo. Después del último lavado se le agrego el suero de conejo anti-PME (diluido en - PBS - Tween gelatina 0.5 %, a diferentes diluciones partiendo de 1 : 50 hasta 1 : 3200 ; lo anterior se incubo por 3 horas a 37°C se realizaron 4 lavados y se agrego suero de cabra anti-gamaglobulinas de conejo unidas a peroxidasa. Después de 1 hr. 30 min. a 37°C se lavarón y se les agrego el sustrato. Una vez - agregado este último se dejo en la obscuridad durante 10 min, y se detiene la reacción con H_2SO_4 2.5N; las lecturas se realizaron en un lector de ELISA (Mini reader II) a una longitud de onda a 490 nm.

CUADRO III

PROTOCOLO DE INMUNIZACION PARA LA OBTENCION DEL SUERO ANTI - PME DE S. typhi 9.12. d. VI

DIA	INMUNIZACION	VIA	DOSIS	OBSERVACIONES
0	1a.	S.C. ^a	1.0 mg.	ADYUVANTE COMPLETO FREUND
7	2a.	S.C	1.0 mg.	ADYUVANTE COMPLETO FREUND
14	3a.	I.V. ^b	50 ug.	TRIS — EDTA
21	4a.	I.V	50 ug.	TRIS — EDTA

^a S.C. — SUBCUTANEA

^b I.V — INTRAVENOSA

LOS CONEJOS SESANGRARON EL DIA 28 POR PUNCION CARDIACA PARA LA OBTENCION DE SUERO INMUNE ANTI — PME. EL SUERO SE CONSERVO A -20°C.

11.- ABSORCION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PME DE S. typhi 9, 12, d, Vi. DEL SUERO INMUNE DEL CONEJO.

El suero hiperinmune de conejo anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi se absorbió con las PME homólogas en equivalencia. Para esto se realizo previamente - una curva de precipitación cuantitativa. Una vez el suero absorbido se titulo de nuevo por ELISA.

12.- EVALUACION DE LA INMUNIDAD PASIVA.

Para esto se empleo el suero de conejo anti-PME de Salmonella typhi 9,12, d, Vi. El esquema de inmunización y los retos con las diferentes cepas de Salmonella se muestran en el cuadro IV.

13.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

La inmunolectrotransferencia se realizo de acuerdo a la técnica de Towin (56). Se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida con las muestras de PME de S. typhi 9, 12, d, Vi, Salmonella typhi Ty2 y Salmonella typhimurium además un carril con marcadores de pesos moleculares de 45 Kd (ovoalbúmina) y 29 Kd (Anhidrasa carbónica), finalizada la electroforesis se retiraron los geles de las placas y se colocaron en el sistema de electrotransferencia, evitando la formación de burbujas de aire entre ambos: hecho esto el - papel se colocó sobre la esponja que descansa a su vez sobre la rejilla del sistema: sobre el papel se marcaron con lápiz el frente electroforético, tanto su límite superior como inferior así como el lugar donde se colocó la muestra de - PME en el gel; sobre el papel de nitrocelulosa se colocó otro papel filtro y - por último la rejilla, armado el sistema se puso, en contacto con el amortiguador de transferencia, procurando que el gel coincidiera con el polo negativo y

CUADRO IV PROTOCOLO DE INMUNIZACION
(PROTECCION PASIVA)

HORA	INMUNIZACION	VIA	DL ₅₀
0	SUERO INMUNE ANTI-PME: <u>S. typhi</u> 9,12,d.VI.	I V	
1	RETO CON : <u>S. typhi</u> 9, 12, d. VI. <u>S. typhi</u> Ty 2 <u>S. typhimurium</u> .	I P	50 y 100

- EL SUERO PREVIAMENTE SE INACTIVO A 56°C/30 min.
- SE UTILIZARON LOTES TESTIGOS ADMINISTRANDO A RATONES NIH; SSF ESTERIL, SUERO NORMAL DE CONEJO, SUERO NORMAL ABSORBIDO CON PME Y DILUIDO 1:400.
- DESPUES DEL DESAFIO; EL EXPERIMENTO SE REGISTRO EN UN PERIODO DE 10 DIAS, EVALUANDO LA PROTECCION, COMO EL % DE SOBREVIVENCIA.

el papel con el polo positivo dentro del sistema, las condiciones a las cuales se realizó la electrotransferencia fueron de 100 miliamperes y 10 volts - durante 18 hrs. el gel se tiñó con azul de Coomassie para comprobar la transferencia.

El papel de nitrocelulosa se dividió en dos partes y se lavaron con PBS - Tween. La parte que corresponde a la de los marcadores de pesos moleculares se tiñó con tinta china, mientras que la otra parte del papel se dejó en solución de bloqueo durante 2 hrs. a 37°C transcurrido este tiempo se procedió a la incubación del papel con el suero de conejo anti-PME de Salmonella typhi 9, 12, d, Vi diluido 1:50 durante 3 hrs., se lavo el papel 4 veces con PBS-Tween y - agitación constante, cada lavado fué de 15 min., posteriormente al papel se le adicionó el conjugado antigamaglobulina de conejo unida a peroxidasa diluido - 1:500 con solución de bloqueo dejándolo durante hora y media; nuevamente se - realizaron los lavados, 3 con PBS Tween y 2 con solución de PBS pH 7.2, siempre con agitación constante de 15 min., por último se realizó la incubación con el sustrato, eliminando con agua destilada el exceso de sustrato en el momento de aparición de las bandas.

R E S U L T A D O S

1.- OBTENCION DE LAS PME

La concentración de las PME de las cepas estudiadas y el contenido de LPS presente como contaminante de las mismas, se enlistan en el cuadro V.

2.- ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS PME

En los patrones electroforéticos de las PME de las tres cepas estudiadas, se puede observar, bandas proteicas cuyos pesos moleculares van de 17 a 70 Kd (fig. 3). En ellas se destaca la presencia de dos grupos de proteínas bien - definidos; uno que va de 36 a 41 Kd, y otro de 23 a 28 Kd, así como una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 17 Kd.

CUADRO V
DETERMINACION DEL CONTENIDO DE
PME Y KDO

CEPA	PME mg/ml ^a	KDO mg/ml ^b	%KDO
<i>S. typhi</i> 9. 12. d. VI	2.0	0.08	4.0
<i>S. typhi</i> T y 2	1.02	0.0102	1.0
<i>Styphimurium</i>	1.24	0.066	5.4

^a DETERMINADO POR EL METODO DE LOWRY (53)

^b DETERMINADO POR EL METODO DE KARKHANIS (58)

PME — PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA .

KDO — 2 — CETO — 3 — DESOXIOCTANATO .

PERFIL ELECTROFRETICO DE LAS PROTEINAS
DE MEMBRANA EXTERNA.

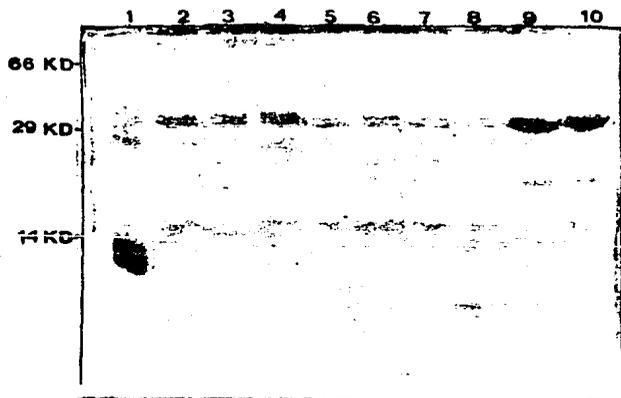


FIGURA 3 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las PME de tres cepas de Salmonella; Carril 1 marcadores de peso molecular: 66 KD Albúmina sérica bovina, 29 KD Anhidrasa carbónica, 14 KD Lisozima : Carriles 2,3 y 4 PME de S. typhi 9,-12, d, Vi; Carriles 5,6,7 y 8 PME de S. typhi Ty2; Carriles 9 y 10 PME de S. typhimurium.

3.- DETERMINACION DE LA DL₅₀

La DL₅₀ para cada una de las cepas estudiadas se muestran en el cuadro VI.

CUADRO VI

**DL₅₀ EN RATONES NIH PARA
DIFERENTES CEPAS DE SALMONELLA**

CEPA	DL ₅₀ ^o
<i>S. typhi</i> 9. 12. d. VI	MACHO 150 X 10 ³ BACT./ ml.
<i>S. typhi</i> T y 2	MACHO 40 X 10 ³ BACT./ ml.
	MACHO 160 10 ³ BACT./ ml.
<i>S. typhimurium</i> .	HEMBRA 1.6 X 10 ² BACT./ ml.

^o DL₅₀ = DOSIS LETAL AL 50 % .

LA MORTALIDAD DE LOS RATONES SE REGISTRO A LOS TRES DIAS .
EXCEPTO EN LOS EXPERIMENTOS CON *S. typhimurium* . DONDE LA PRUEBA
SE REGISTRO A LOS 10 DIAS LOS EXPERIMENTOS SE REALIZARON POR
TRIPLICADO , VERIFICANDO CUENTA VIABLE EN PLACAS DE AGAR NU-
TRIENTE .

4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE LAS PME DE S. typhi 9,12,d,Vi

En el cuadro VII, se observa que inmunizaciones en el ratón de 1.25ug, 2.5 ug y 5.0 ug de PME de S. typhi 9, 12, d, Vi; confirieron una protección del -- 100 % al reto de 100 veces la DL₅₀ de la cepa homóloga, mientras que cuando los ratones fueron inmunizados con dosis mayores de 10 ug de PME, estos soportaron retos de hasta 500 DL₅₀ de la misma cepa registrándose un 100% de sobrevivencia.

Estas mismas proteínas confirieron una protección semejante cuando el reto se realizó con S. typhi Ty2, concentraciones de hasta 5.0 ug fueron capaces de inducir una protección al ratón del 100%, cuando se retaron con 100 DL₅₀. Con la administración de concentraciones mayores de 10 ug se observó una sobrevivencia entre el 90% y el 100 % al reto de hasta 1000 veces la DL₅₀ de S. typhi Ty2 (Cuadro VIII).

Por otro lado en ratones inmunizados con concentraciones menores de 5 ug - de PME y retados con 20 DL₅₀ de S. typhimurium, se observó una sobrevivencia - del 70%, concentraciones mayores de 10 ug confirieron una sobrevivencia del 30% cuando se retaron con 500 DL₅₀ de S. typhimurium, cuadro IX.

En las figuras 4 y 5 se observó el porcentaje de sobrevivencia de los ratones NIH inmunizados con la dosis mínima (1.25 Ug) y máxima (30 Ug) de PME, al reto con 20 y 500 veces la DL₅₀ de las tres cepas de Salmonella trabajadas.

La cantidad de LPS presente como contaminante en 30 ug. de PME de S.typhi 9, 12, d, Vi; confirió al ratón una protección del 40% al reto con la cepa homóloga, esta protección desapareció cuando el reto fué con S. typhi Ty2 - S. typhimurium (figura 6).

CUADRO VII

PROTECCION ACTIVA: SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON PME DE S. typhi 9.12.d.Vi Y RETADOS CON S. typhi 9.12.d.Vi

CONCENT. NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50 % (DL₅₀).

PME ug	20 DL ₅₀	50 DL ₅₀	100 DL ₅₀	300 DL ₅₀	500 DL ₅₀
1.25	10/10 ⁺	10/10	10/10	7/10	1/10
2.5	10/10	10/10	9/9	9/10	9/10
5.0	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10
10.0	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
20.0	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
30.0	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

GRUPOS TESTIGOS	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50% (DL ₅₀)		
	20 DL ₅₀	50 DL ₅₀	100 DL ₅₀
SN INMUNIZAR	2 / 5	1 / 5	0 / 5
TRIS - EDTA	N D	1 / 5	N D
LPS 0.4 ug.	N D	4 / 5	3 / 5
LPS 1.2 ug.	N D	4 / 5	2 / 5

+ SOBREVIVENCIA / TOTAL
NO DETERMINADO

- SE VERIFICO VIABILIDAD EN PLACAS DE AGAR NUTRIENTE.
- LOS RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA SE REGISTRARON A LOS 10 DIAS POSTERIORES AL RETO. DURANTE EL PERIODO DE INMUNIZACION SE REGISTRO MORTALIDAD EN LOS RATONES POR LO QUE NO SE MANEJARON GRUPOS HOMOGENEOS EN NUMERO.

CUADRO VIII

PROTECCION ACTIVA: SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON PME DE *S.fyphi* 9.12.d, VI Y RETADOS CON *S.fyphi* T y 2

CONCENT.	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50 % (DL ₅₀)					
	PME ug	20 DL ₅₀	50 DL ₅₀	100 DL ₅₀	300 DL ₅₀	500 DL ₅₀
1.25	9 / 10 [†]	7 / 10	3 / 10	4 / 10	0 / 10	1 / 10
2.5	7 / 8	7 / 8	5 / 8	3 / 8	3 / 8	0 / 8
5.0	8 / 8	8 / 8	6 / 8	6 / 8	3 / 9	4 / 8
10.0	8 / 8	8 / 8	8 / 8	10 / 10	10 / 10	10 / 10
20.0	9 / 9	9 / 9	9 / 9	10 / 10	10 / 10	9 / 10
30.0	7 / 7	7 / 7	7 / 7	10 / 10	9 / 10	9 / 9

GRUPOS TESTIGOS	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50 % (DL ₅₀)			
	20 DL ₅₀	50 DL ₅₀	100 DL ₅₀	300 DL ₅₀
SIN INMUNIZAR	0 / 10	0 / 8	0 / 8	ND [°]
INMUNIZADOS CON :				
TRIS — EDTA	0 / 10	0 / 8	0 / 8	ND
LPS 0.4 ug.	ND	0 / 8	0 / 5	0 / 5
LPS 1.2 ug.	ND	1 / 5	0 / 5	1 / 5

† SOBREVIVENCIA/TOTAL

° NO DETERMINADO.

- SE VERIFICO VIABILIDAD EN PLACAS DE AGAR NUTRIENTE.
- LOS RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA SE REGISTRARON A LOS 10 DIAS POSTERIORES AL RETO. DURANTE EL PERIODO DE INMUNIZACION SE REGISTRO MORTALIDAD EN LOS RATONES POR LO QUE NO SE MANEJARON GRUPOS HOMOGENEOS EN NUMERO.

CUADRO IX

PROTECCION ACTIVA: SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON PME DE Styphi 9,12, d, Vi Y RETADOS CON S. typhimurium.

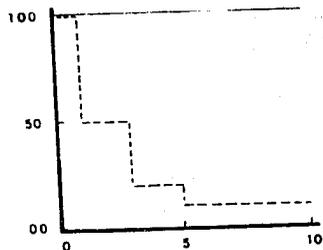
CONCENT .	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50% (DL ₅₀)				
	PME ug.	20 DL ₅₀	100 DL ₅₀	500 DL ₅₀	1000 DL ₅₀
1.25	7 / 10 ⁺	3 / 10	0 / 10	1 / 10	
2.5	3 / 10	6 / 10	1 / 10	2 / 10	
5.0	3 / 10	1 / 10	1 / 9	2 / 10	
10.0	7 / 10	4 / 10	3 / 10	2 / 10	
20.0	6 / 8	2 / 9	3 / 9	1 / 9	
30.0	4 / 7	2 / 9	2 / 7	3 / 7	

GRUPOS TESTIGOS	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50% (DL ₅₀)		
	20 DL ₅₀	100 DL ₅₀	500 DL ₅₀
SIN INMUNIZAR	0 / 5	0 / 5	ND ^o
TRIS - EDTA	ND	0 / 5	0 / 5
LPS 0.4 ug.	0 / 5	1 / 5	1 / 5
LPS 1.2 ug	1 / 4	0 / 4	0 / 5

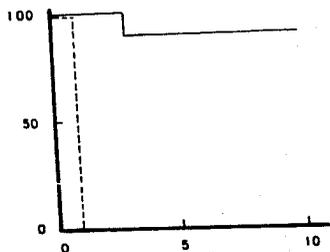
+ SOBREVIVENCIA TOTAL
o NO DETERMINADO

- SE VERIFICO VIABILIDAD EN PLACAS DE AGAR NUTRIENTE
- LOS RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA SE REGISTRARON A LOS 10 DIAS POSTERIORES AL RETO DURANTE EL PERIODO DE INMUNIZACION SE REGISTRO MORTALIDAD EN LOS RATONES POR LO QUE NO SE MANEJARON GRUPOS HOMOGENEOS EN NUMERO

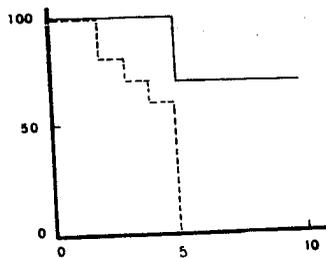
% SOBREVIVENCIA



RETO CON:		%
<u>S. typhi</u>	9, 12, d, vi.	
—	20 DL ₅₀	100
- - -	500 DL ₅₀	10



RETO CON:		%
<u>S. typhi</u>	Ty2	
—	20 DL ₅₀	90
- - -	500 DL ₅₀	0

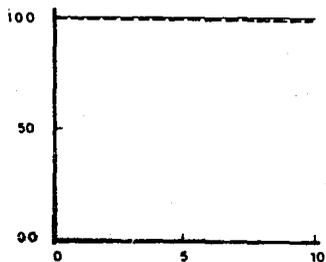


RETO CON:		%
<u>S. typhimurium</u>		
—	20 DL ₅₀	70
- - -	500 DL ₅₀	0

DIAS POST - RETO

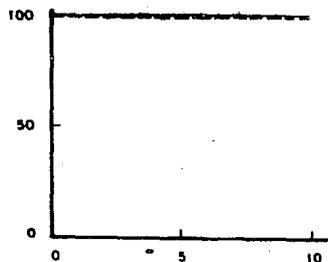
FIG 4. SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH
 INMUNIZADOS CON PME (1.25 µg).
 DE S. typhi 9, 12, d, vi.

% SOBREVIVENCIA



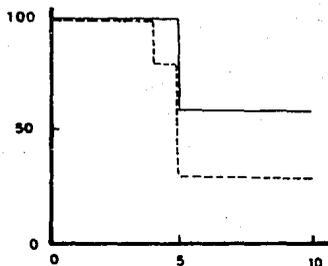
RETO CON:
S. typhi 9, 12, d, vi

—	20 DL ₅₀	100
- - -	500 DL ₅₀	100



RETO CON
S. typhi Ty 2

—	20 DL ₅₀	100
- - -	500 DL ₅₀	100



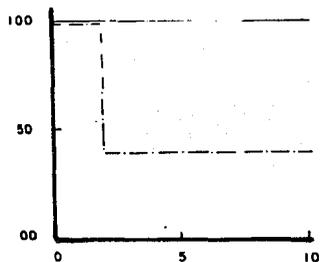
RETO CON:
S. typhimurium

—	20 DL ₅₀	60
- - -	500 DL ₅₀	30

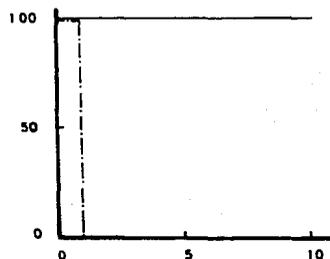
DIAS POST - RETO

FIG. 5 SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON PME (30 μ g). DE S. typhi 9, 12, d, vi.

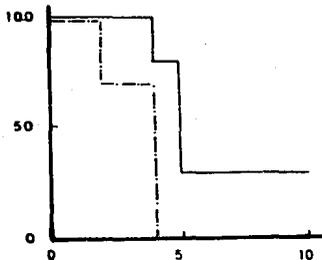
% SOBREVIVENCIA



RETO CON :	%
<u>S. typhi 9, 12, d, vi</u>	
— PME; RETO 500 DL ₅₀	100
- - - LPS; RETO 100 DL ₅₀	40



RETO CON	%
<u>S. typhi Ty 2</u>	
— PME; RETO 500	100
- - - LPS; RETO 100	0



RETO CON	%
<u>S. typhimurium</u>	
— PME; RETO 500 DL ₅₀	30
- - - LPS RETO 100 DL ₅₀	0

DIAS POST - RETO

FIG. 6 SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH
 INMUNIZADOS CON PME (30 μ g).
 DE S. typhi 9, 12, d, vi y LPS (1.2 μ g)

5.- TITULACION DEL SUERO DE CONEJO ANTI-PME DE S. typhi 9, 12, d, Vi POR EL METODO DE ELISA.

En la figura 7 se muestran las curvas de titulación de : Suero de conejo no inmune, suero de conejo anti-PME y suero de conejo anti-PME absorbido a equivalencia con PME, como se puede observar la dilución 1:400 de suero inmune presentó una absorbancia mayor de 1.0, mientras que el suero preinmune y el suero inmune absorbido, no alcanzaron en ninguna de las diluciones empleadas esa positividad.

^a Absorción del suero de conejo anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi.

El suero de conejo anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi se absorbió con 30 ug de PME de S. typhi 9, 12, d, Vi; para verificar la absorción de los anticuerpos anti-PME se realizaron ensayos de ELISA.

6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA DEL SUERO DE CONEJO ANTI-PME DE S. typhi 9, 12, d, Vi.

Los resultados de protección pasiva, obtenidos en diversos experimentos, se presentan en los cuadros X, XI y XII. Se observa que el suero inmune anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi protege en un 100% (sobrevivencia), a los ratones NIH; utilizando para el reto, 100 veces la DL_{50} tanto S. typhi 9, 12, d, Vi como S. typhi Ty2. En cambio, el suero inmune protegió a los ratones en un 80%, cuando el reto fué con 100 veces la DL_{50} de S. typhimurium.

Al emplear un suero inmune diluido 1:400 se observó una protección del 40% y 60%, al reto con S. typhi 9, 12, d, Vi y S. typhi Ty2 respectivamente.

La capacidad de protección del suero inmune descendió por debajo del 20%

cuando este se absorbió con las PME (figura 8).

En la figura 9, se observa la sobrevivencia de los ratones NIH inmunizados con suero inmune, comparándose la acción protectora de este suero, con un suero normal de conejo.

7.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

El suero de conejo anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi reconoció con mayor intensidad al grupo de PME con pesos moleculares de 36 a 41 Kd tanto de la cepa homóloga, como de S. typhi Ty2. Además se observa reactividad cruzada hacia las PME de S. typhimurium, (figura 10).

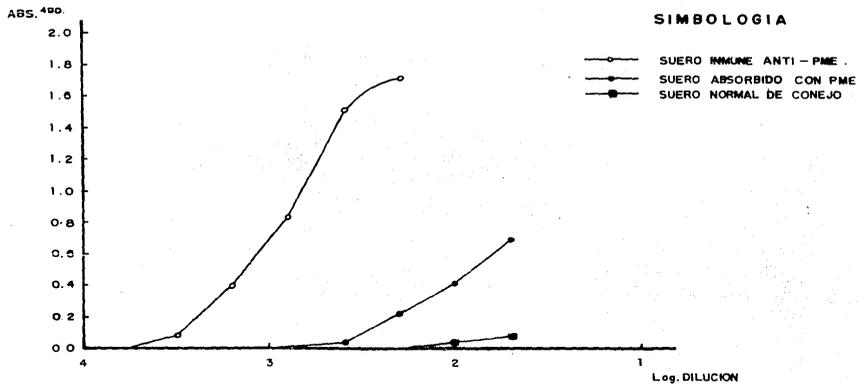


FIG. 7 DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-PME DE UN SUERO DE CONEJO POR EL METODO DE ELISA

CUADRO X

PROTECCION PASIVA: SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON SUERO INMUNE ANTI-PME DE S. typhi 9, 12, d, VI. Y RETADOS CON S. typhi 9, 12, d, VI

INMUNIZADOS CON:	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50% (DL ₅₀)	
	50 DL ₅₀	100 DL ₅₀
SUERO INMUNE	10 / 10 †	10 / 10
SUERO INMUNE DIL. 1:400	ND ^o	4 / 10
SUERO INMUNE ABSORBIDO CON PME Y DIL 1:400	2 / 10	2 / 10
SUERO NORMAL	1 / 5	0 / 5
S. S. F.	0 / 5	ND

† SOBREVIVIENTES / TOTAL.

^o ND - NO DETERMINADO

- A LOS RATONES SE LES ADMINISTRO 0.2 ml. DE SUERO INMUNE ANTI-PME POR VIA INTRAVENOSA Y FUERON RETADOS UNA HORA DESPUES SER INMUNIZADOS POR VIA INTRAPERITONEAL.
- LOS RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA SE REGISTRARON DURANTE LOS 10 DIAS POSTERIORES AL RETO.

CUADRO XI

PROTECCION PASIVA : SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON SUERO INMUNE ANTI-PME DE S. typhi 9, 12, d. Vi Y RETADOS S. typhi T y 2.

INMUNIZADOS CON :	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50 % (DL ₅₀)	
	50 DL ₅₀	100 DL ₅₀
SUERO INMUNE	10 / 10 [†]	10 / 10
SUERO INMUNE DIL. 1:400	ND ^º	6 / 10
SUERO INMUNE ABSORBIDO CON PME Y DIL. 1:400	ND	1 / 10
SUERO NORMAL	ND	1 / 5
S. S. F.	0 / 5	0 / 5

† SOBREVIVIENTES / TOTAL

º ND — NO DETERMINADO

- A LOS RATONES SE LES ADMINISTRO 0.2 ml. DE SUERO INMUNE ANTI - PME POR VIA INTRAVENOSA Y FUERON RETADOS UNA HORA DESPUES DE SER INMUNIZADOS POR VIA INTRAPERITONEAL.
- LOS RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA SE REGISTRARON, DURANTE LOS 10 DIAS POSTERIORES AL RETO.

CUADRO XII

PROTECCION PASIVA: SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON SUERO INMUNE ANTI-PME DE S. typhi 9, 12, d, Vi. Y RETADOS CON S. typhimurium.

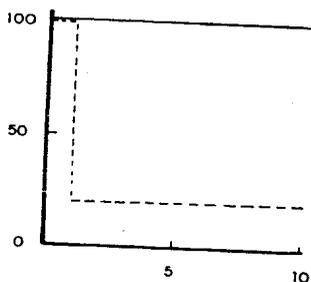
INMUNIZADOS CON :	NUMERO DE DOSIS LETALES AL 50% (DL ₅₀)	
	50 DL ₅₀	100 DL ₅₀
SUERO INMUNE	10 / 10 ⁺	8 / 10
SUERO INMUNE DIL. 1:400	1 / 10	ND ^a
SUERO INMUNE ABSORBIDO CON PME Y DIL. 1:400	0 / 10	ND
SUERO NORMAL	0 / 5	0 / 5
S. S. F.	0 / 5	ND

+ SOBREVIVIENTES / TOTAL .

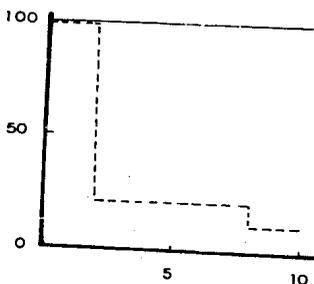
^a ND — NO DETERMINADO

- o A LOS RATONES SE LES ADMINISTRO 0.2 ml. DE SUERO INMUNE ANTI-PME POR VIA INTRAVENOSA Y FUERON RETADOS UNA HORA DESPUES DE SER INMUNIZADOS POR VIA INTRAPERITONEAL .
- o LOS RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA SE REGISTRARON, DURANTE LOS 10 DIAS POSTERIORES AL RETO .

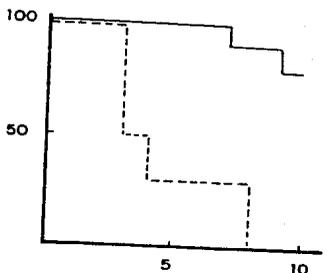
% SOBREVIVENCIA



RETO CON		%
<u>S. typhi</u> 9.12.d.vi		
— (SI) RETO 100 DL ₅₀		100
- - - (SIA) RETO 50 DL ₅₀		20



RETO CON		%
<u>S. typhi</u> T y 2		
— (SI) RETO 100 DL ₅₀		100
- - - (SIA) RETO 100 DL ₅₀		10

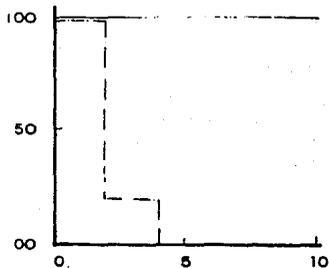


RETO CON		%
<u>S. typhimurium.</u>		
— (SI) RETO 100 DL ₅₀		80
- - - (SIA) RETO 50 DL ₅₀		0

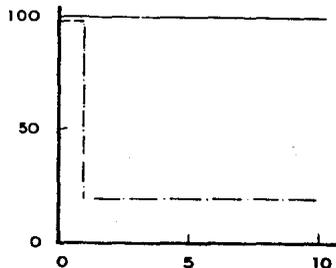
DIAS POST - RETO

FIG. 8 SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON 0.2 ml. DE (SI) ANTI- PME DE *S. typhi* 9.12. d. vi Y (SIA) CON PME DE *S. typhi* 9.12.d.vi .

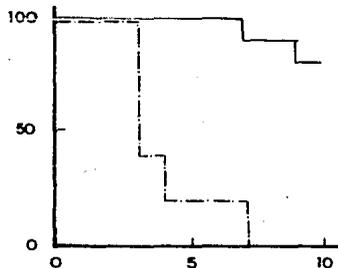
% SOBREVIVENCIA



RETO CON %
S. typhi 9, 12, d, vi
 (SI) RETO 100 DL₅₀ 100
 (SN) RETO 100 DL₅₀ 0



RETO CON %
S. typhi Ty 2
 (SI) RETO 100 DL₅₀ 100
 (SN) RETO 100 DL₅₀ 0



RETO CON %
S. typhimurium
 (SI) RETO 100 DL₅₀ 80
 (SN) RETO 50 DL₅₀ 0

DIAS POST - RETO

FIG. 9 SOBREVIVENCIA DE RATONES NIH INMUNIZADOS CON 0.2 ml. S. INMUNE (S.I) ANTI - PME Y SUERO NORMAL (S.N)

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

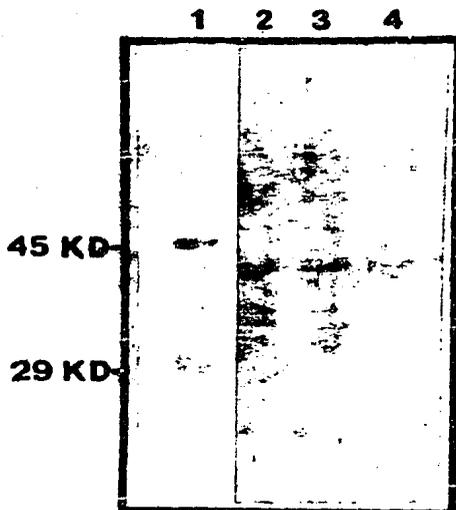


FIGURA 10. Inmuno-electrotransferencia de las PME de las cepas de *Salmonella* estudiadas, reveladas con un suero de conejo anti-PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi diluido 1:50. Carril 1 Marcadores de peso molecular (teñidos con tinta china); 45 KD Ovoalbúmina, 29 KD Anhidrasa carbónica. Carril 2 PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi. Carril 3 PME de *S. typhi* Ty2. Carril 4 PME de *S. typhimurium*.

D I S C U S I O N

El patrón de corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida, de las PME de las tres cepas de Salmonella estudiadas, demostró la presencia de un grupo de tres proteínas cuyos pesos moleculares iban de 36 a 41 Kd, otro de 23 a 28 Kd y un último constituido por una proteína de 17 Kd. Esto fue muy similar a lo encontrado por Kamio para S. typhimurium sobre todo en lo que corresponde a las llamadas porinas cuyos pesos moleculares van de 36 a 38 Kd (59).

La similitud en pesos moleculares no indica que todos los determinantes antigénicos sean iguales, pero que en sus moléculas podría haber partes comunes y partes específicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la inmunidad activa, se demostró que concentraciones de 19 ug, 20 ug y 30 ug de PME de S. typhi 9, 12, d, Vi. confieren una protección del 100% en el ratón, soportando retos de 500 y 1000 veces la DL₅₀ tanto de la cepa homóloga como de S. typhi Ty2. Sin embargo, la protección fue del 30% al reto con 500 DL₅₀ de S. typhimurium. Por otro lado, 1.25 ug de PME fue la dosis mínima que indujo protección del 100% al reto de 20 DL₅₀ para la cepa homóloga 90% para S. typhi Ty2 y 70% para S. typhimurium.

Resultados similares de protección con PME fueron descritos por Kussi y colaboradores (50,51), quienes demostraron que las porinas de una cepa rugosa de Salmonella typhimurium así como un suero de conejo anti-porinas protegieron a ratones de la cepa Balb/c de la salmonelosis murina.

El presente trabajo, demostró que los ratones inmunizados con las PME de S. typhi 9, 12, d, Vi. quedaron protegidos parcialmente ante el reto con S. Typhi

murium. Estos experimentos de protección cruzada están relacionados con el hecho de que las PME de estas enterobacterias tengan determinantes antigénicos comunes. Los trabajos de Tokunaga (60) y Lee (61) apoyan esta hipótesis, ya que el estudio del pérfil peptídico de las porinas de S. typhimurium y E. coli, demostró que había secuencias de aminoácidos en común dentro de la estructura primaria de estas proteínas.

Los experimentos de protección realizados, demostraron en el modelo murino, la participación de las PME de S. typhi en los mecanismos de protección contra la infección experimental por Salmonella. Estas proteínas al igual que las PME de otras bacterias Gram-Negativas como Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae y Salmonella typhimurium inducen protección en animales de experimentación (47, 49, 6, 50, 51).

Killion y Morrison (52) demostraron que la administración de un complejo de Lípido A - proteínas - LPS de S. typhimurium; ratones de la cepa C3H/HeJ indujo una protección del 100% a un reto de 100 veces la DL₅₀ de la cepa homóloga, mientras que el LPS sólo protegía en un 40%. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en los experimentos de protección realizados en ratones con 1.2 ug - de LPS de S. typhi, en los cuales hubo protección del 40% a un reto de 100 DL₅₀ de la cepa homóloga, en cambio no se indujo protección por esta molécula, cuando el reto fue con S. typhi Ty2 ó S. typhimurium. Estos resultados no deben descartar la posible participación de LPS en los mecanismos de protección.

Experimentos de inmunidad pasiva, efectuados en el modelo de ratón, demostraron que suero inmune anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi, confirió una protección del 100% de sobrevivencia hacia retos de 100 veces la DL₅₀ de S. typhimurium fue del 80%. La protección pasiva desapareció cuando el suero inmune se

absorbió con las PME, lo que sugiere que son los anticuerpos específicos anti-PME los responsables de la protección.

Los experimentos de inmunidad pasiva reflejan también protección efectiva al reto con la cepa homóloga y protección parcial al reto con S. typhimurium. El mecanismo de protección cruzada se podría explicar a través de los resultados obtenidos en la inmunoelectrotransferencia, ya que el suero inmune de conejo anti-PME de S. typhi 9, 12, d, Vi empleado, reconoce también las PME de S. typhimurium y en especial a las que corresponden al grupo de las porinas.

Con base a los resultados obtenidos, se sugiere la participación de las porinas como inmunógenos protectores, sin embargo será necesaria su purificación para conocer el papel que juegan en los mecanismos de protección hacia la infección experimental con Salmonella y ser propuestos como posibles candidatos para la elaboración de una vacuna que permita la inmunoprolifaxis de la fiebre tifoidea.

CONCLUSIONES

- 1.- Las PME de S. typhi 9, 12, d, Vi; S. typhi Ty2 y S. typhimurium son similares ya que sus pesos moleculares van de 17 a 70 Kd. En éstas, se destacan un grupo cuyos pesos moleculares van de 36 a 41 Kd las cuales corresponden a las denominadas porinas.
- 2.- La inmunización de ratones NIH por PME de S. typhi 9, 12, d, Vi. induce - protección contra retos de la cepa homóloga. Y existe protección parcial cuando el reto es con S. typhimurium.
- 3.- El LPS de S. typhi confiere protección parcial al reto con la cepa homóloga, por lo tanto no se puede descartar su posible participación en los mecanismos de protección.
- 4.- Los experimentos de inmunidad pasiva, demostraron protección efectiva al reto con la cepa homóloga y protección parcial al reto con S. typhimurium. Esta protección cruzada aparentemente esta dada por los anticuerpos dirigidos -- contra las porinas.
- 5.- Las porinas probablemente son las que juegan el papel principal en los mecanismos de protección contra la Salmonelosis experimental murina.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Gingberg, H.S., Wood, W.B. Tratado de Microbiología, 2a. edición, Ed. Salvat, editores Barcelona 1983.
- 2.- Huckstep, R.L. Typhoid fever and other Salmonella infections. Ed. E. y S. Livingstone, Ltd, London 1983, pp 4-9.
- 3.- Sandford, G.R. Infections disease. Ed. Burgess Pub. Co, E.U.A., 1979, pp 55-130.
4. Pérez, M.A., Cabrera, R. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. Rev. Salud Pública de México XV: 185-194, 1974.
- 5.- Kumate, J. Inmunidad, inmunización y vacunas, 2a. edición, Ediciones médicas del hospital infantil de México 1970, pp 227-247.
- 6.- Hansen, E.J., Robertson, P.A., Gulig, Frisch, G.F., Haanes, E. J. Immunoprotección against Haemophilus influenzae type b diseases mediated by monoclonal antibody directed against a Haemophilus outer membrane protein. Lancet 1:366 368, 1982.
- 7.- Joo, I. Present status and perspectives of vaccination against typhoid fever. En: International conference on the Application of Vaccines against Viral Rickettsial and Bacterial Diseases of Man, D.C. E.U.A. PAHO/WHO Scientific Publication 226: 329-341, 1970.
- 8.- Hornick, R.B., DuPont, H.L., Dawkins, A.T., Snyder, M.J., Woodward, T.E. - Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Sinposio Series in Immunobiological standarization. 15:143-150. 1968.

- 1.- Dienenstock, J. The physiology of the local immune response and the gastro intestinal tract. Prog. Immunol. 4: 197-207, 1974.
- 2.- Fuburg, E.S., Freter, R. Protection against enteric bacteria by S IgA J. Immunol. 111:395-403, 1973.
- 3.- Warren, J.W., Hernick, R.E. Immunization against typhoid fever. Ann. Rev. Med. 30:457-472, 1973.
- 4.- Germanier, R., Furer, E. Isolation and characterization of S. typhi gal E mutant Ty 21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infect. Disease. 131:553-558, 1975.
- 5.- Reitman, M. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent Salmonella typhosa. J. Infect. Disease. 117: 101-107, 1967.
- 6.- Levine, M.M., Dupont, H.L., Hornick, R.E., Snyder, M.S., Woodward, W., Gilman, H.R. Libonatti, J.P. Attenuated, streptomycin dependent Salmonella typhi oral vaccine: Potential deleterious effects of lyophilization. J. Infect. Dis. 133:424-429, 1976.
- 7.- Germanier, R., Situation actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. Bol. of Sanit. Panamá. 82: 300-311, 1977.
- 8.- Wadhan, M.H., Serie, C., Cerisier, Y., Sallam, S., Germanier, R. Controlled field trial of live Salmonella typhi strain Ty 21a oral vaccine against typhoid: Three years results. J. Infect. Dis. 145:292-293, 1982.
- 9.- Germanier, R., The live oral typhoid vaccine Ty 21a: Recent field trial results. Sclavo International Conference on Bacterial Vaccines and Local Immunity. Siena, Italy. p.p. 10-12

- 18.- Kumate, J. Inmunidad, inmunización y vacunas. 2a. edición. Ediciones medicas del Hospital Infantil de México, p.p. 227-247. 1979.
- 19.- Hornick, R.B., Greisman, S.E., Woodward, T.E., DuPont, H.L., Dawkins, A.-T., Snyder, M.J. Typhoid fever, pathogenesis and immunological control. New Engl. Med. 283: 686-691 y 739-746, 1970.
- 20.- Bennenson, A.S. Serological responses of man to typhoid vaccines. Bull. Wld. Hlth.Org. 30: 653.1981.
- 21.- Tully, J.G., Gaines, S. Tigertt, W.D. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV. Role of H. antigen in protection J.Infect Dis. 112: 118-124, 1963.
- 22.- Anderson, E.S., Proposal use of a non-motile variant of Salmonella typhi for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposio Series in Immunobiological Standardization 15: 79-86, 1986.
- 23.- Félix, A., Krikorian, K., Reitler, R. The occurrence of typhoid bacilli - containing Vi antibody in their sera. J. Hyg. 35:421-427. 1935.
- 24.- Robbins, J.D. Robbins, J.B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of Salmonella typhi. J. Infect Dis. 150: 436-449, 1984.
- 25.- Pittman, M., Bohner, H.J. Laboratory assays of different types of field - trial typhoid vaccines and the relationship to efficacy in man. J. Bacteriol. 91: 1713-1723.
- 26.- Misfeldt, M.L., Johnson, W. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from Salmonella typhimurium. Infect.-Immun. 14: 652-659, 1976.

- Youmans, A.S., Youmans, G.P. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from Mycobacterium tuberculosis. J. Bacteriol. 99: 42-50.
- Venneman, M.R., Brigley, N.J., Berry, L.J. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from Salmonella typhimurium. Infect Immun. 1: 574-582, 1970.
- Molinari, J.L., Larralde, C. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of Salmonella typhimurium. Rev. lat. Amer. Microbiol. 16: 189-197, 1974.
- Johnson, W. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from Salmonella typhimurium and Yersinia pestis. Infect. Immun. 5: 947-952, 1972.
- Smith, R.A., Brigley, N.J. Ribonucleic acid protein fractions of virulent Salmonella typhimurium as protective immunogens Infect. Immun. 6: 373-383, 1972.
- Molinari, J.L., Cabrera, R. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de Salmonella typhi Ty2. Rev. Latinoamer. Microbiol. 16: 199-204, 1974.
- Einsenstein, T.K. Evidence for O antigen as the antigenic in "ribosomal - vaccines" prepared from Salmonella typhimurium Infect. Immun. 12: 364-377, 1975.
- Misfeldt, M.L., Johnsons, W. Role of endotoxin contamination in ribosomal - vaccines prepared from Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 17: 98-104, 1977.

- 35.- Misfeldt, M.L., Johnson, W. Identification of protective cell surface -- proteins in ribosomal fraction from Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 24: 808-816, 1978.
- 36.- Mates, A., Yosipevici, H. Localization of the protective antigens in Salmonella typhimurium. Microbios 16 : 81-90, 1976.
- 37.- Miura, T., Mizushima, S. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from seroplast membrane of Escherichia coli K-12. Biochim. Biophys. Acta. 150: 159-161, 1968.
- 38.- Cabern, M.J. Gander, J.E., Parisi, E., Carson, J. Mechanism of assembly of outer membrane of Salmonella typhimurium: Isolation and characterization - of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol.Chem. 247: 3962-3972, 1972.
- 39.- Schnaitman, C.A. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of the wall of Escherichia coli. J. Bacteriol. 108 : 553-556, 1971.
- 40.- Schnaitman, C.A. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli by polyacrilamida electrophoresis. J. Bacteriol. 104: 882-889, 1970.
- 41.- Bragg, P.D., Hov, C. Organization of proteins in the native and reformed - outer membrane of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Acta. 274: 478-488, 1972.
- 42.- Schnaitman, C.A. Outer membrane proteins of Escherichia coli. III Evidence that the major proteins of E. Coli O 111 outer membrane consist of four - distinct polypeptide species. J. Bacteriol. 118: 442-453, 1974.
- 43.- Inouye, M., Yee, M.L. Homogeneity of envelope proteins of Escherichia coli

- aparated by gelelectrophoresis J. Bacteriol. 113: 304-312, 1973.
- 44.- Schmitges, C.J., Henning, V. The major proteins the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Heterogeneity of protein I. Eur. J. Biochem. 63: 47-52, 1976.
- 45.- Di Rienzo, J.M., Nakamura, K., Inouye, M. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria, biosynthesis assembly and functions. Ann Rev. Biochem. 47: 481-523, 1978.
- 46.- Osborn, M.J., Wu, H.C. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. Ann.Rev. Microbiol. 34: 369-432. 1980.
- 47.- Frasc, C.E., Robbins, J.D. Protections against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccine and specificity of protection in guinea pig. model. J. Exp.Med. 147: 629-644, 1978.
- 48.- Buchanan, T.H., Pearce, W.A. & Schoolnick, G.K., Arko, R.J. Protection against infections with Neisseria gonorrhoeae by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. J. Infect.Dis. 136 (supl.) : 132-137, 1977.
- 49.- Buchanan, TyM., Arko, R.J. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of Neisseria gonorrhoeae in guinea pigs. J.Infect,Dis. 135: 879-887, 1977.
- 50.- Kussi, N., Nurminen, M., Saxen, H., Valtonen, M., P.H. Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. Infect Immun. 25: 857-862, 1979.
- 51.- Kussi, N., Nurminen, M., Saxén, H., Makela, P.H. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in Experimental murine Sal

- monellosis: Effect of Lipopolysaccharide. Infect. Immun. 34: 328-332, 1981
- 52.- Killian, J.W., Morrison, D.C. Protection of C3H/HeJ mice from lethal Salmonella typhimurium LT2 Infection by Immunization with Lipopolysaccharide-Lipid A-Associated Protein Complexes. Infect. Immun. 54: 1-8, 1986.
- 53.- Lowry, O.H., Rosebrough, J., Farr, A.L. Protein measurement with the phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 54.- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.
- 55.- Reed, L.J., Muench, H.A. Simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Hygiene, 27 (3): 493-497, 1938.
- 56.- Engvall, E., Perlman, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochem. 8: 874-879, 1971.
- 57.- Towbin, H., Staehelin, F., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and Some Applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1979.
- 58.- Karkhanis, T.O., Zelther, J.Y., Jackson, J.J., Carlo, D.J. An improved microassay to determine 2-keto-3-deoxy-octonate in Lipopolysaccharide in Gram-Negative Bacteria. Anal. Biochem 85: 595-601, 1978.
- 59.- Kamio, Y., Nikaido, H. Outer membrane of Salmonella typhimurium identification of proteins exposed on cell surface. Biochim. Biophys. Acta. 464 : 589-601, 1977.
- 60.- Tokunaga, H., Tokunaga, M., Nakae, T. Characterization of Porins from the Outer Membrane of Salmonella typhimurium. Eur. J. Biochem. 95: 433-439, 1979.

61.- Lee, D.R., Schnaitman, C.A., Pugaley, P.A. Chemical Heterogeneity of Major Outer Membrane Pore Proteins of *Escherichia coli*. J. Bacteriol 138 : 861-870, 1979.