

2787  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EFFECTO DE LA VIA DE INMUNIZACION EN LA  
RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA  
S. typhimurium**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A I  
**CARLOS PEREZ MUÑOZ**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

**1989**



## **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.

**INDICE GENERAL****Pags.**

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
HIPOTESIS	4
GENERALIDADES	
Características del Género <u>Salmonella</u>	5
Enfermedades producidas	7
Inmunidad Humoral y Celular	9
DISEÑO EXPERIMENTAL	23
MATERIAL Y METODOS	26
RESULTADOS	36
DISCUSION DE RESULTADOS	62
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFIA	70

## INTRODUCCION

En México la fiebre tifoidea continúa siendo un serio problema sanitario y se ha constituido en una enfermedad de tipo endémico, que toma mayor importancia en las poblaciones carentes de agua y de los servicios sanitarios básicos.

En la epidemiología de la fiebre tifoidea tiene gran importancia el fecalismo al aire libre y el manejo inadecuado de los alimentos y el agua, que son contaminados principalmente por los portadores asintomáticos.

La fiebre tifoidea y las gastroenteritis infecciosas son las causas más frecuentes de muerte, entre todas las enfermedades transmisibles. La respuesta inmune es uno de los factores más importantes involucrados en la protección del individuo frente a estas enfermedades, en particular la encontrada a nivel de mucosas donde se lleva a cabo el primer contacto de la mayoría de los agentes infecciosos con el huésped; sin embargo, se desconocen aún en gran parte los mecanismos inmunológicos involucrados a este nivel, así como su interacción con el sistema inmune sistémico.

Debido a que los ratones infectados con *Salmonella typhimurium* desarrollan un padecimiento muy similar a la fiebre tifoidea del humano, se ha utilizado este modelo para estudiar varios de los

aspectos de la respuesta inmune generada y su correlación con el grado de protección. Aun cuando los estudios realizados en este campo no son concluyentes, muestran que tanto la respuesta inmune humoral como celular, están involucradas en la protección a dicha enfermedad, siendo entre ellas la más estudiada la primera, en particular, la generada a nivel sistémico, prestándose poca atención a la respuesta inmune humoral de la mucosa intestinal (local).

En estudios en los que se emplea como modelo experimental al ratón y S. typhimurium, las inmunizaciones y/o desafíos al animal se llevan a cabo por diferentes vías y esquemas de inmunización, lo cual podría ser importante para explicar algunos de los datos contradictorios encontrados en la literatura, ya que se ha visto, que la vía de administración del antígeno puede alterar la respuesta inmune tanto a nivel local como sistémico, e incluso se puede inducir un estado de tolerancia inmunológica a determinados antígenos cuando se utiliza una vía de inmunización diferente a la utilizada para el desafío.

Un estudio que contemple el efecto que tiene el administrar un antígeno por diferentes vías y esquemas de inmunización, sobre la respuesta inmune generada a nivel de la mucosa intestinal y su interacción con la respuesta inmune sistémica no se ha realizado aún en el modelo animal, de aquí la importancia del presente trabajo, el cual se espera pueda contribuir de alguna forma a la solución de este grave problema de salud en México.

## OBJETIVOS

Estudiar la respuesta inmune humoral tanto a nivel local como sistémico en ratones Balb/c inmunizados por vía oral o parenteral con *S. typhimurium*.

Determinar si existe alguna correlación entre los datos obtenidos y el grado de protección conferido.

## HIPOTESIS

Dado que la infección con *S. typhimurium* en el ratón produce una enfermedad sistémica y no permanece localizada en la mucosa intestinal, sería de esperarse que aquellos métodos de inmunización capaces de generar una buena respuesta inmune local y sistémica sean los más adecuados para conferir protección.

## GENERALIDADES

### Características del género Salmonella

El género Salmonella pertenece a la familia Enterobacteriaceae (y a la parte B según el Manual de Bergey) (5). Son microorganismos Gram negativos, sin agrupación característica, móviles, no esporulados, crecen muy bien a 37°C en los medios de cultivo ordinarios, en los medios sólidos se manifiestan como colonias grandes (5-6 mm), redondas de bordes regulares, convexas y de color blanco grisáceo. Son bacilos facultativos, no fermentan la lactosa, ni la salicina, son productoras de ácido sulfhídrico, no licúan la gelatina ni producen indol. La fermentación de carbohidratos sin producción de gas es una característica de Salmonella typhi. (16,35)

Este género posee tres clases principales de antígenos de superficie, Weil Felix los denominó:

a) Antígeno "H" flagelar, el cual se presenta en las proteínas que forman la estructura de los flagelos. b) El antígeno "O" somático, que está constituido por polisacáridos y forma parte del lipopolisacárido (LPS) o endotoxina presente en

los Gram negativos. Su toxicidad es inespecífica, y las respuestas más evidentes son fiebre y alteraciones de la permeabilidad capilar, este antígeno se encuentra en la pared celular, y su especificidad se altera en la disociación de colonias lisas-colonias rugosas (S-R). Las variantes de colonias rugosas que carecen de cadenas laterales "O" específicas en el LPS son avirulentas, mientras que las variantes de colonias lisas son virulentas. c) Antígeno "Vi" de superficie, el cual está constituido por subunidades de ácido N-acetil galactosaminurónico y se denomina factor de virulencia, que correspondería a la cápsula de otros microorganismos, y está presente sólo en algunos de los miembros del género. ( 16,11,20 )

En 1856, se describió por primera vez la naturaleza infecciosa de la fiebre tifoidea por William Budd, quien con bases epidemiológicas, sugirió que la enfermedad se transmitía a través de agua contaminada por heces humanas, pero fué hasta 1880 cuando el bacilo de la tifoidea fué identificado por Eberth en los ganglios mesentéricos y en el bazo de personas muertas por dicha enfermedad. En 1920, Schotz hizo un primer intento por clasificar a este género y, finalmente, Kauffman y White en 1925 lo clasificaron en grupos dependiendo de los antígenos "O" comunes con letras mayúsculas desde la A a la I y en especies, considerando otros antígenos "O" y "H"; éstos últimos tanto en fase 1 como en fase 2 y así se tiene:

Salmonella paratyphi (S. paratyphi A), S.schottmulleri (S.

paratyphi B), S. typhimurium, S. coleraesuis, S. hirschfeldii (S. paratyphi C), S. newport, S. typhi, S. enteritidis (20). Sin embargo, actualmente la clasificación más aceptada es la de Ewing, que clasifica al género en tres especies y éstas son: S. typhi, S. coleraesuis, y S. enteritidis, el resto de las especies reconocidas por Kauffman y White se consideran como variedades o biotipos de la especie. (73,45)

#### Enfermedades producidas

El género Salmonella puede causar en el humano gastroenteritis principalmente por S. typhimurium y S. enteritidis; también causa fiebres paratifoideas, producidas por S. paratyphi A, B y C y fiebre tifoidea, producida por S. typhi.

**Gastroenteritis:** Se presenta después de haber ingerido alimentos contaminados con bacterias que se multiplican y alcanzan un número muy elevado.

Tiene un período de incubación de 8 a 48 horas y entre los síntomas que se presentan están: ligero aumento de la temperatura, náuseas, vómito, diarrea y postración; la recuperación suele lograrse en pocos días. (10,60).

**Fiebres paratifoideas:** Son muy parecidas a la tifoidea pero siguen un curso más leve, se caracterizan por un comienzo brusco,

después de un periodo de incubación de 1 a 10 días, con escalofríos y la mayor parte de los síntomas que presenta la tifoidea, pero en un grado menor. El curso suele ser más breve y la mortalidad media más baja, pero el único medio seguro para distinguir la tifoidea de la paratifoidea, es aislando e identificando el microorganismo causal. ( 8 )

Fiebre tifoidea: la enfermedad usualmente comienza insidiosamente después de un periodo de incubación de 7 a 14 días, con malestar general, anorexia, y dolor de cabeza seguido por la aparición de fiebre. Los microorganismos ingeridos se multiplican en el tracto gastrointestinal, particularmente en las placas de Peyer, de donde pasan a la circulación diseminándose por todo el cuerpo. La bilis es un excelente medio de cultivo para S. typhi, la capacidad de éste para permanecer en el tracto biliar puede dar como resultado la aparición de portadores crónicos asintomáticos que continuamente excretan al microorganismo en las heces.

La fiebre se acompaña generalmente con relativa bradicardia, la postración está usualmente ausente, las distensiones son comunes. Pueden estar presentes tos y signos de bronquitis, la esplenomegalia y leucopenia son frecuentes. En los casos de muerte las lesiones más prominentes encontradas en las autopsias son hiperplasia linfóide, ulceraciones en las placas de Peyer con hemorragias o perforación del intestino. (16,84 )

## Inmunidad Humoral y Celular

Las enfermedades causadas por el género Salmonella, han sido objeto de numerosos y amplios estudios para tratar de entender mejor tanto los mecanismos de patogenicidad como los de defensa desarrollados por el huésped.

Ya que Salmonella typhi, que es el agente causal de la fiebre tifoidea, es solamente virulenta para el hombre y el chimpancé (50,12) y debido a que los ratones infectados con S. typhimurium desarrollan un padecimiento similar a la fiebre tifoidea del humano, se ha utilizado este modelo experimental para estudiar varios aspectos de la respuesta inmune generada, así como para probar la eficacia de varias vacunas constituidas por microorganismos atenuados o muertos y la contribución, tanto de la inmunidad humoral como celular en la defensa del huésped contra la infección sistémica ocasionada por S typhimurium ( 3,40,41 ).

Sin embargo, esta gran cantidad de información arroja una serie de datos contradictorios, así por ejemplo: En los experimentos clásicos de Mackaness ( 51 ) realizados en ratones, en los que se buscó aclarar cuál era la importancia de la inmunidad humoral y celular en la protección frente a esta enfermedad, se vió que después de un primer contacto con el microorganismo administrado intravenosamente, el animal desarrollaba un mecanismo capaz de destruir una nueva dosis alta

de microorganismos , pero era incapaz de eliminar microorganismos de la infección primaria, los cuales constantemente retornaban a la circulación a partir de los focos necróticos. También se encontró que la transferencia pasiva de suero proveniente de animales infectados activamente o vacunados con microorganismos muertos por calor, incrementaban la capacidad del huésped para eliminar los microorganismos circulantes, pero no interferían en grado significativo con la subsecuente multiplicación en los tejidos. De estos resultados se concluyó que la resistencia de los animales activamente infectados dependía de la inmunidad celular. Posteriormente, otros investigadores coinciden en atribuir a los componentes de la inmunidad celular un papel importante en la erradicación del microorganismo invasor (13,74) y señalan además que los macrófagos activados por la liberación de linfocinas contribuyen en la protección frente a dicha enfermedad ( 4 ). Otros trabajos no muestran una correlación entre la inmunidad celular detectada mediante la prueba de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado (HTR) y la protección conferida ( 33,68,67 ), lo cual puede indicar que la resistencia del huésped a la infección, radica entonces en la inmunidad humoral. Sin embargo, estudios recientes llevados a cabo en diferentes cepas de ratones , mostraron que aún cuando estaba presente la inmunidad celular detectada por otras pruebas , en algunos casos ésta no se detectó al realizar la prueba de HTR, lo cual indica que ésta y la inmunidad mediada por células, son

reguladas por mecanismos diferentes y no siempre correlacionan bien la una con la otra ( 40,25 ).

Numerosos autores han demostrado que la inmunidad humoral contribuye de manera importante a la defensa del huésped contra salmonela ( 78,2,42 ). Hochadel y col. ( 31 ), en estudios de transferencia pasiva de linfocitos T o B provenientes de animales inmunizados, encontraron que los últimos eran los más importantes para conferir resistencia contra el desafío con S. typhimurium, al menos en la etapa temprana de la infección. Kenny y col. ( 38 ), lograron inducir una respuesta protectora mediante la inoculación de la bacteria muerta y detectaron anticuerpos circulantes con capacidad bacteriolítica en contra de la salmonela, pocos días después de la inmunización. Estos datos contradicen resultados anteriores en los que se mencionaba que solo era posible conferir protección con microorganismos viables y ésta se debía a la inmunidad de tipo celular ( 83 ).

Numerosos trabajos muestran que vacunas hechas con diferentes cepas de salmonela muerta o extractos proteicos de las mismas, administradas por vía parenteral, confieren protección al ratón ( 78,2,42,77,44 ). En estudios histopatológicos llevados a cabo por Nakoneczna y Hsu ( 55 ) se encontró que la protección conferida por el microorganismo atenuado viable, era el resultado de mostrar la suma sinérgica de los efectos protectores conferidos por la inmunidad celular así como también de la humoral; en cambio las características protectoras conferidas por

el microorganismo muerto parecen deberse a los efectos de la inmunidad humoral, únicamente en estos casos se observaron múltiples focos de necrosis y microabscesos agudos, con predominio de los polimorfonucleares (PMN). Estas lesiones primarias se agrandaron y los gránulos se transformaron en granulomas por la infiltración progresiva de células mononucleares que reemplazaron a los PMN; las lesiones son claramente distinguibles de las desarrolladas en ratones inmunizados con la vacuna avirulenta. En este mismo estudio se observó que, aunque la vacuna obtenida de cepas muertas era incapaz de inducir HTR contra antígenos de salmonela, ésta generaba una respuesta alta de anticuerpos; sin embargo, estos títulos altos no correlacionaban con el grado de protección. En otros trabajos se encontró que vacunas de *S. typhimurium* tanto de microorganismos vivos como muertos, administradas por vía oral, conferían protección al desafío con el microorganismo virulento, y ésta fue superior a la inducida por la vacuna parenteral ( 26,86,71 ).

Datos recientes indican que la cooperación entre anticuerpos de la clase IgA y linfocitos T, por medio de citotoxicidad dependiente de anticuerpos, juega un papel importante en la defensa contra bacterias de las superficies de las mucosas (37). Tagliabue y col. ( 56 ) encontraron que linfocitos T murinos provenientes del intestino pero no de otros tejidos, son capaces de ejercer actividad antibacteriana natural contra *S.*

*Syphimurium*, y la IgA secretora incrementa específica y significativamente dicha actividad e induce actividad antibacteriana en células provenientes del bazo pero no del timo o de nódulos linfáticos periféricos; se han obtenido datos similares con linfocitos de sangre periférica humana y anticuerpos IgA ( 81 ). Estos datos sugieren que los mecanismos antibacterianos naturales así como los dependientes de anticuerpos pueden ser importantes en la defensa contra *S. typhimurium*, particularmente a nivel gastrointestinal, donde muchas infecciones bacterianas tienen su primer contacto con el sistema inmune del huésped.

En los últimos años tanto la inmunidad humoral como celular presente en las mucosas han sido objeto de muchos estudios que han dilucidado numerosas incógnitas al respecto, como es el caso de saber que la inmunoglobulina que principalmente se encuentra recubriendo las mucosas es la IgA, la cual se presenta en forma de dímero (11 S) y no de monómero (19 S) como en la sangre, aunque pueden detectarse pequeñas cantidades de ésta última; la IgA secretora posee además una cadena J, que funciona induciendo la polimerización de los monómeros de IgA y un componente secretor (CS) que le facilita el paso a través de las células epiteliales y la protege de la degradación enzimática. ( 22,7 ). La IgM ocupa el segundo lugar en cuanto a concentración en las secreciones, y se ha visto que es capaz de unir la cadena J en su molécula; el componente S parece no unirse a esta

inmunoglobulina ( 7 ). Es de particular importancia notar que en las secreciones la concentración de IgE es más alta que en suero y se ha asociado con la inmunidad a enfermedades causadas por helmintos que afectan el tubo digestivo ( 22 ).

Se ha postulado la existencia de un sistema inmunológico común asociado a mucosas, varios trabajos apoyan su existencia, por ejemplo : se han encontrado anticuerpos de la clase IgA en el calostro con especificidad para antígenos presentes en el tracto gastrointestinal (28 ), también se ha detectado la presencia de células plasmáticas productoras de IgA secretora, inducidas por inmunización oral contra ferritina en la mucosa intestinal, glándulas salivales, glándulas mamarias y tracto respiratorio ( 87 ).

En un estudio donde se transfirieron linfocitos alogénicos provenientes tanto del tejido linfóide asociado a los bronquios como de placas de Peyer, a conejos previamente irradiados, se observó una repoblación predominantemente de la lámina propia del intestino y bronquios, así como del bazo, en dichos animales con células productoras de IgA, lo cual no sucedió con la transferencia de células provenientes de los nódulos linfáticos (72).

Otros estudios apoyan la existencia de migración de células linfoides y localización de las mismas, preferentemente en órganos del sistema inmune secretor ( 6 ), aunque la ruta exacta de la migración no se ha aclarado.

A pesar de que el conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos que actúan a nivel de mucosas ha aumentado considerablemente en los últimos años, permanecen desconocidos muchos aspectos acerca de la función de los anticuerpos secretores y los métodos más adecuados para inducir su producción. Uno de los aspectos con relación a este último punto sería el concerniente a utilizar diferentes vías de inmunización. Se ha visto que la vía de inoculación del antígeno puede alterar la respuesta inmune tanto a nivel sistémico como local. F. Pierce (62), trabajando con toxina del cólera, ha reportado que inmunizaciones parenterales repetidas pueden inducir la síntesis de anticuerpos séricos con gran avidéz, sin una estimulación del tejido asociado a mucosas y que dichos anticuerpos pueden suprimir marcadamente la fase primaria y secundaria de la respuesta inmune local para antígenos aplicados en mucosas, mientras que los anticuerpos séricos obtenidos después de una simple inyección de la toxina son mucho menos efectivos para inducir dicha supresión. Yardley y col. (88), estudiaron los efectos que se presentan al administrar la toxina del cólera por diferentes vías, en particular a nivel local (asas intestinales), a nivel subcutáneo o con una combinación de ambos (local y subcutánea) observando que los dos últimos esquemas mostraron títulos altos de anticuerpos neutralizantes en suero, mientras que en fluido intestinal (f.i.), los animales inmunizados localmente o con el esquema combinado presentaron los mejores títulos. Los títulos de anticuerpos de la clase IgA

específicos contra la toxina del cólera en fluido intestinal, fueron más altos después de la inoculación local únicamente y bajos en los animales inmunizados por vía subcutánea. En el esquema combinado se presentaron títulos de IgA reducidos comparados con los presentes en los animales que se inmunizaron por vía oral. Estos hallazgos sugieren un efecto supresor en la inmunidad local por la administración subcutánea del antígeno. En este mismo estudio se encontró que los títulos de anticuerpos neutralizantes para las muestras de fluido intestinal, correlacionaron mejor con los valores de IgA que con los de la IgG. Andre y col ( 1 ) reportaron que algunos esquemas de inmunización por vía oral puede provocar supresión de la respuesta sistémica, quizá porque los anticuerpos originalmente inducidos impiden el contacto posterior del antígeno a nivel intestinal; se vió además que un refuerzo por vía parenteral tampoco era capaz de inducir una respuesta, esto provocado quizá por la presencia de complejos Ag-Ac circulantes dependientes de IgA.

Se ha encontrado que la administración local de antígenos puede inducir en algunos casos una buena respuesta secretora acompañada de un estado de inmunosupresión a nivel sistémico (52,70 ). Estos resultados se deben de tener muy en cuenta cuando se trata de emplear métodos preventivos, ya que en un momento dado puede convenir más la administración del antígeno por alguna vía específica para evitar efectos como los antes mencionados.

La mayoría de los estudios apoyan la administración de antígenos a nivel de mucosas cuando se quiere inducir una buena respuesta secretora, ya que se ha visto que en estos sitios hay un predominio de células comprometidas para la síntesis de IgA ( 6,64 ). Estas células pueden generarse por un proceso de división celular dependiente de antígenos ( 24 ), o por la presencia en estos órganos de una mayor cantidad de linfocitos T cooperadoras, específicos para la síntesis de IgA y supresores específicos para la IgG. ( 37 )

Kawanishi y col ( 37,36 ) han encontrado que la diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de IgA, en el tejido linfóide asociado al intestino, parece requerir al menos dos etapas: una que involucra un cambio de isotipo a cadenas pesadas de la clase alfa dirigido por células T isotipo específicas para IgA presentes en las placas de Peyer, y otra que involucra la diferenciación de las células B a células plasmáticas y que es gobernada por células T cooperadoras presentes fuera del tejido linfóide de las placas de Peyer (como son nódulos linfoides mesentéricos y bazo ).

Numerosos trabajos han indicado que la administración de dosis repetidas del antígeno por vía parenteral son poco eficientes para inducir una respuesta inmune específica a nivel secretor ( 64,58,30,65 ). Sin embargo, la inmunización parenteral con algunos antígenos puede inducir la aparición de anticuerpos en el intestino ( 21,66,23,43 ). Pierce y col ( 66 ) estudiaron en perros inmunizados con toxoide del cólera los

efectos de administrar el toxoide intrayeyunal o parenteralmente para inducir anticuerpos específicos en el suero y f.i. observando que la administración del antígeno por cualquiera de las dos rutas causaba la elevación de los niveles de anticuerpos antitóxicos en f.i. y que dichos anticuerpos derivaban principalmente de suero, cuando el antígeno se administraba por vía parenteral, mientras que cuando lo fue por vía intrayeyunal, la mayoría se sintetizaron localmente. En ambos casos los anticuerpos específicos de la clase IgA contribuyeron a la respuesta inmune intestinal, mostrando características de IgA secretora, y aparentemente la respuesta generada tenía memoria inmunológica. Resultados similares los han encontrado varios autores en otros modelos animales ( 21,23,43 ). Se ha visto que tanto las características del antígeno como la dosis administrada, juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune a nivel de mucosas ( 78,34,76,63 ).

Varios reportes indican que la administración oral de S. typhimurium induce una respuesta inmune protectora, frente a retos posteriores con la bacteria virulenta, y ésta puede ser superior a la inducida por la administración parenteral. Srisart y col ( 75 ) encontraron títulos altos de anticuerpos de la clase IgA en ratones inmunizados oralmente con algunas cepas de S. typhimurium, y estos mismos grupos de ratones fueron resistentes al reto con una cepa virulenta. Puesto que no hubo correlación entre la protección y la especificidad del antígeno somático " O " de la cepa utilizada para la inmunización y el desafío, los

anticuerpos IgA específicos detectados, no fueron los responsables de la protección. No obstante, los niveles de éstos correlacionaron con la resistencia de los ratones a la infección con Salmonella. Lindberg y Robertsson ( 47 ), en un estudio comparativo de la inmunización parenteral con la bacteria muerta como de la oral con la salmonela atenuada en vacas, encontraron que la inmunidad celular en los animales inmunizados por vía oral fue mucho más alta que en los de la parenteral; en cambio, los títulos séricos de IgG e IgM contra LPS homólogos y porinas, fueron más altos en estos últimos. La protección conferida frente al reto de la bacteria virulenta, correlacionó mejor con el incremento de la reacción inmune mediada por células en las vacas a las que se les dió la vacuna viva. En otros estudios, estos mismos autores encontraron que la respuesta de HTR en vacas inmunizadas oralmente, estaba dirigida contra el polisacárido "O" específico de la Salmonella inmunizante (48). Hackett y col. ( 29 ) reportaron que la protección generada por S. typhimurium administrada oralmente, se relaciona mejor con las cepas que producen altos niveles de flagelina.

Los reportes acerca de las clases de inmunoglobulinas inducidas por diferentes condiciones de inmunización son escasos. Hohmann y col. ( 32 ), encontraron que ratones inmunizados con S. typhimurium viva por vía oral, generaban niveles altos de anticuerpos principalmente de la clase IgA, tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, esta respuesta solo fue inducida

por las cepas capaces de colonizar las placas de Peyer y estos anticuerpos estuvieron dirigidos en contra de sus respectivos antígenos "O". Nakano y Saito ( 57 ) afirman que las cadenas laterales "O" son un importante factor de virulencia y lo relacionan con la capacidad de la bacteria para resistir a la fagocitosis, pero los anticuerpos anti "O" generados no juegan un papel esencial para conferir protección en el modelo experimental

Ebersole y Molinari ( 17 ) examinaron la especificidad y el isotipo de los anticuerpos presentes en saliva y suero de ratones inmunizados por vía oral con varios antígenos de Salmonella, encontrando que en la primera, la mayor parte de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno "O" fueron de la clase IgA, los anticuerpos dirigidos contra el antígeno "H" eran tanto de la clase IgA como IgG, y para el antígeno "Vi" fueron únicamente de la clase IgG. En el suero, las inmunoglobulinas producidas después de la administración oral de los antígenos, fueron de la clase IgM.

Muchos investigadores han tenido éxito en inducir inmunidad protectora en ratones , contra subsecuentes dosis letales de la salmonela virulenta, empleando tanto diferentes esquemas de inmunización como antígenos (ya mencionado antes); sin embargo, al aplicar estos esquemas en los humanos dicha protección no se ha podido igualar, y hasta ahora no se ha logrado conseguir una vacuna que confiera una adecuada protección en el hombre.

La primera vacuna contra la fiebre tifoidea aplicada en

humanos fue mediante la salmonela muerta por calor y conservada en fenol, la elaboraron los grupos de R. Pfeiffer y W. Kolle así como Wright, en 1896. Esta vacuna provocó reacciones locales generalizadas serias, y no se observó una adecuada protección en los individuos vacunados.

En 1916 se usó una vacuna que contenía tanto Salmonella paratyphi A y B como S. typhi, mejor conocida como vacuna TAB, la cual incrementó la gravedad de las reacciones tanto a nivel local como las generalizadas, resultando poco aceptable. En 1940 se aplicó una vacuna tifoídica inactivada por vía oral; sin embargo, se dejó de aplicar pues los niveles de anticuerpos que se indujeron fueron muy bajos ( 27 ).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1916, auspició en diversos países una prueba de campo para probar la eficacia de la vacuna parenteral con dos tipos de vacuna : una preparada por inactivación mediante acetona ( vacuna K ) y la otra inactivada por calor - fenol (vacuna L ), preparadas ambas a partir de la cepa de S. typhi Ty2. La vacuna K confirió una protección del 79- 93%, mientras que la vacuna L mostró una eficacia de sólo el 51 al 77% ( 15 ).

En Egipto se realizó una prueba de campo con niños en edad escolar empleando una vacuna de S. typhi cepa Ty21a administrada oralmente y se encontró que fue capaz de conferir protección por un período de al menos 3 años ( 85 ). En Chile se practicaron también en niños 3 pruebas de campo simultáneamente , para

determinar la formulación más favorable, el número de dosis y el esquema de inmunización capaz de conferir protección mediante una vacuna que empleaba la misma cepa Ty21a usada en la prueba de Egipto. En este caso encontraron que una vacuna administrada oralmente como protección entérica, fue más práctica y segura para inmunizar masivamente y más efectiva que una formulación a base de cápsulas de gelatina conteniendo la misma vacuna y Na HCO<sub>3</sub>, se vió además que dos o tres dosis, indujeron una protección del 54 - 62% de sobrevida durante 33 y 18 meses, respectivamente ( 46 ). Parece ser entonces, que no sólo es importante contar con un buen antígeno, sino también con un adecuado método de inmunización para lograr estimular convenientemente el sistema inmune y obtener los efectos deseados.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formaron grupos de 10 ratones, los cuales se inmunizaron con *S. typhimurium* viable por vía oral o parenteralmente con la bacteria muerta. Se les administraron 2, 3 o 4 dosis de salmonela con una semana de intervalo. Otros grupos se inmunizaron con 3 dosis de salmonela por vía oral administradas en días consecutivos (tabla 1 y cuadro 1). Los grupos anteriormente mencionados, se utilizaron 15 días o 18 semanas después de la última inmunización para determinar:

- a) La presencia de anticuerpos específicos en suero y fluido intestinal por la técnica de ELISA y
- b) La protección conferida por los diferentes esquemas de inmunización, para lo cual se realizó un desafío por vía oral con *S. typhimurium* virulenta.

En todos los casos se incluyeron grupos de animales control que no se inmunizaron.

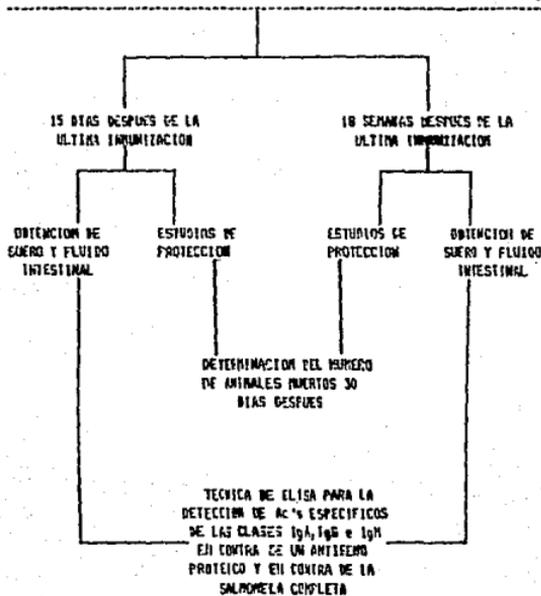
TABLE I  
 CUADRO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPO DE ESTUDIO	VIA DE INMUNIZACION	No. DE DOSIS	INTERVALO ENTRE CADA POSIS	15 DIAS DESPUES ULTIMA DOSIS	10 SEMANAS DESPUES ULTIMA DOSIS		
II	A	1	ORAL	DOS	UNA SEMANA	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION
II	B	2	PARENTERAL	DOS	UNA SEMANA	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION
III	A	3	ORAL	TRES	UNA SEMANA	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION
III	B	3	PARENTERAL	TRES	UNA SEMANA	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION
IV	A	4	ORAL	CUATRO	UNA SEMANA	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION
IV	B	4	PARENTERAL	CUATRO	UNA SEMANA	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION
I	A	3	ORAL	TRES	UN DIA	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION
CONTROL	---	---	---	---	---	↳ SUERO Y FLUIDO	↳ SUERO Y FLUIDO
						↳ PROTECCION	↳ PROTECCION

- ↳ = SE ADMINISTRARON 1X10 A LA 7 UFC EN UN VOLUMEN TOTAL DE 0.1 ml INTRAGASTRICAMENTE
- ↳ = SE ADMINISTRARON UN NUMERO EQUIVALENTE A 1X10 A LA 7 UFC EN UN VOLUMEN TOTAL DE 0.05 ml EN EL COJINETE PLANTAR
- ↳ = OBTENCION DE SUERO Y FLUIDO INTESTINAL PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS DE CLASE IgM, IgG E IgA EN CONTRA DE UN ANTIGENO PRECITO Y LA SALMUELA COMPLETA POR LA TECNICA DE ELISA
- ↳ = ESTUDIOS DE PROTECCION

DIAGRAMA DE FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

EXPERIMENTAL GRUPO	GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV		ALTERNATIVA GRUPO
I	A	B	A	B	A	B	CONTROL
ESTRATEGIA	ETA	ETB	ETA	ETB	ETA	ETB	CONADICIA



## MATERIAL Y METODOS

### Material:

Tubos de ensayo de 12 x 75, 13 x 100 y 16 x 150 mm

Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml

Matraces Erlenmeyer de 50, 100 y 1000 ml

Probetas de 50, 100, 500 y 1000 ml

Embudo de cola larga

Matraces aforados de 50, 100, 500 y 1000 ml

Cajas de Petri

Mechero Fisher

Asa bacteriológica

Gradilla

Tela de asbesto

### Lista de Equipo

Agitador American Rotor M-4140

Centrifuga Beckman TJ-6

Espectrofotómetro Carl Zeiss PQ-M II

Ultra Centrifuga TGA-75

Baño María Gyrotory Whater Bath Shaver G-76

Lector de ELISA Minireader II (Dynatech producy)

## Animales

Se emplearon ratones de la cepa Balb/c hembras entre 6 y 8 semanas de edad provenientes de una colonia mantenida en el bioterio de la Facultad de Medicina. Los animales se alojaron en cajas de plástico con astilla y agua esteril y Purina ad Libitum.

## Microorganismos empleados

Se utilizaron dos cepas de S. typhimurium sero grupo B; una presentó una baja virulencia para ratones Balb/c (LD50>10 a la 11 por administración intragástrica ( i.g.) y se denominó F1. La otra cepa denominada F3 es más virulenta y es resistente a la ampicilina. Estas cepas las donó el Dr. Leoncio Filloy, jefe del Laboratorio Clínico del Hospital Infantil de México y muestran las siguientes reacciones bioquímicas típicas del género.

Glucosa	+	Rojo de metilo	+
Lactosa	-	Voges Proskauer	-
Sulfhídrico	+	Gelatina	-
Indol	-	Descar. de la lis.	+
Movilidad	+	Ampicilina	R (F3)
Citrato	+	Ampicilina	S (F1)
Malonato	-	Ureasa	-

Para conservar su virulencia cada cuatro meses aproximadamente, se realizó un pase por ratón, recuperándose las bacterias del bazo 5 días después de la infección.

## Metodología

### Determinación de la Dosis Letal Cincuenta (DL50).

Se realizó para la cepa F3 de S. typhimurium en ratones Balb/c de acuerdo al método de Reed y Muench (82). Para ello se formaron 6 grupos de 10 ratones cada uno. A cada grupo se le administró una dosis diferente de Salmonella ( $1 \times 10^1$  a la 2, 3, 4, 5, 6, y 7 respectivamente, de bacterias vivas en 0.1 ml) por vía ig. Se registró el número de muertos en cada grupo, durante los 30 días posteriores a su infección.

### Inmunización

Se formaron grupos de 10 ratones distribuidos en forma de cola china de acuerdo a su peso. Estos grupos de animales se inmunizaron por vía oral con Salmonella viva o por vía parenteral con la bacteria muerta.

### Vacunación

a) Vacuna oral: Se realizó administrando S. typhimurium viva (F1) por vía ig mediante una cánula de plástico introducida hasta el estómago. La dosis utilizada fue  $1 \times 10^7$  bacterias en 0.1 ml de solución salina isotónica (SSI).

Para esto, una colonia de salmonela cultivada en agar soya tripticasa (AST) (Bioxon de México), se sembró en un tubo con 10 ml de caldo soya tripticase (CST) y se incubó durante 24 h a 37°C. De este cultivo se tomó 0.5 ml y se sembró en 50 ml del mismo medio, se incubó durante 3 h a 37°C con agitación a 150 rpm.

Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 2,600 rpm durante 30 min a 4°C, el paquete bacteriano se resuspendió en SSI y se ajustó a  $1 \times 10^8$  células/ml por determinación de la Densidad Óptica (DO) a 560 nm. En este caso se determinó que una suspensión bacteriana de  $10^8$  por ml, da una DO de 0.2 a esta longitud de onda.

Para confirmar el número de bacterias inoculadas se sembraron por duplicado diferentes diluciones de la suspensión bacteriana en cajas de Petri con medio AST.

b) Inmunización parenteral: Se realizó mediante la inoculación de la salmonela muerta (F1) (equivalente a  $1 \times 10^7$  bacterias / 0.05 ml de SSI), en el cojinete plantar del ratón.

Para ello la salmonela desarrolló y se procesó de la misma forma antes mencionada para la vacuna oral, pero en este caso la bacteria se destruyó por calor en autoclave a 121°C durante 20 min. Se comprobó su esterilidad sembrando en placas de AST por duplicado.

### Obtención de suero y fluido intestinal

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, después de la última inmunización (2 semanas y 18 semanas), de cada lote de ratones (inmunizados y controles), se procedió a obtener suero y fluido intestinal de la siguiente forma:

Para el suero; los animales se anestesiaron previamente con éter, se sangraron por punción del plexo retroorbital, se depositó la sangre en un tubo de ensaye de 12 por 75 mm, se dejó coagular por 30 min. a temperatura ambiente (t.a.) y se centrifugó a 1,800 rpm durante 10 min a 4°C, se separó el suero del paquete celular, se depositó en tubos Eppendorf y se guardó en congelación a -20°C hasta su uso.

Para los Fluidos Intestinales; se sacrificaron los animales, se les extrajo el intestino delgado y se lavó con 1 ml de solución balanceada de fosfatos (PBS). A las muestras obtenidas se les añadieron inhibidores enzimáticos según el método descrito por Elson y col. ( 19 ). El fluido así obtenido, se centrifugó a 2,600 rpm /20 min ; el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregó 0.1ml de solución inhibidora de tripsina (1 mg/ml), 0.01 ml de la sal sódica del ácido etil diamino tetracético (EDTA) 50 mM y 0.010 ml de fenil sulfonil fluoruro (PMSF) 100 mM.

Se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones y el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregó 0.010 ml de PMSF, se dejó a temperatura ambiente durante 15 min transcurridos los cuales se agregó albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración final de 0.5 %. Los fluidos así tratados se guardaron en viales a -20 °C hasta su uso.

#### Obtención de antígenos empleados para la técnica de ELISA

##### Antígeno de salmonela completa:

Para la obtención de este antígeno, la salmonela desarrolló y se procesó de la misma forma que la vacuna parenteral, sólo que en este caso el microorganismo muerto por calor se resuspendió en 5 ml de amortiguador de carbonato 0.2 M, a pH 4.5, y de ésta se hizo una dilución 1:10, a la cual se le determinó la D.O. a 560 nm, ajustándose entre 0.59 y 0.65, esta dilución se empleó para acoplar el antígeno a las tiras de ELISA.

##### Antígeno proteico de salmonela:

Este antígeno (Ag) se obtuvo mediante el método de Tato y col (82), el cual se describe a continuación:

Se sembró una colonia de *S. typhimurium* en 10 ml de CST y se incubó 24 h a 37°C., se pasó 1 ml de éste a un matraz conteniendo 300 ml del mismo medio, se incubó nuevamente 24 h a 37°C y se sembró en 6 l de CST, distribuyéndose 100 ml del cultivo por cada dos l de medio, los cuales se incubaron 12 h a 37°C .

El paquete celular se cosechó por centrifugación a 8,500 rpm durante 20 min a 4°C, en seguida, las bacterias se resuspendieron en SSI estéril (300 ml aprox.) y se centrifugaron nuevamente a las mismas constantes. El paquete bacteriano se resuspendió en 30 ml de acetona fría previamente deshidratada con cloruro de calcio anhidro y se mantuvo en agitación durante 10 min.

La suspensión bacteriana se centrifugó nuevamente a las mismas constantes, se desechó el sobrenadante y al sedimento se le agregó nuevamente acetona, este último paso se repitió dos veces.

Después, el sedimento se pasó a una caja de Petri, se dispersó y se dejó secando durante 24 h en un desecador con vacío. El producto obtenido, polvo acetónico, se disolvió en 30 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, a 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 agregó por último desoxirribonucleasa I (Sigma Chemical, St. Louis Mo), aproximadamente 20 microgramos por ml y se mantuvo en agitación a 37°C durante 1 h en Baño María. Posteriormente, se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, a pH 7.2, conteniendo KCl 0.1 M, con cambios frecuentes durante 5 días.

El material dializado se centrifugó a 17,500 rpm durante 15 min a 4°C, se desechó el sedimento y el sobrenadante se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22  $\mu$ m. Al filtrado se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (49) y se guardó en congelación a -20°C hasta su uso.

#### Técnica del ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Se empleó una modificación de la técnica descrita por Ortíz y col.(59). Para la prueba se plaquearon los pozos de las tiras de microtitulación (Immunolon II, Dinattech Laboratories Inc. Alexandria VA, USA), con 50 microlitros de amortiguador de carbonatos 0.01 M a pH 9.6, conteniendo 30 microgramos por ml del antígeno proteico o  $1 \times 10^8$  células formadoras de colonias/ml de bacterias muertas por calor. Las tiras se colocaron en un desecador con vacío a temperatura ambiente toda la noche. Al momento de usarse, se rehidrataron con una solución balanceada de fosfatos (PBS) 0.02 M, pH 7.2, conteniendo 0.5 % de tween 20 (Sigma Chemical, St. Louis Mo, USA) y 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA) y se lavaron dos veces con PBS + 0.5% de tween 20. Posteriormente, se añadió una solución de PBS + 3% de BSA y se incubaron toda la noche a 4°C con el fin de bloquear los sitios que no fueron recubiertos con antígeno. Las tiras se lavaron 2 veces, y se les agregó 0.05 ml de una dilución apropiada del suero (ver adelante) o del fluido intestinal sin diluir a cada pozo, las tiras con las muestras se incubaron 1 hora a 25°C. Después se lavaron nuevamente y se agregó 0.05 ml de una dilución 1:1,000 de diferentes anticuerpos peroxidados (Cappel, Malven, P.A. USA) dirigidos contra la fracción Fc de la IgG, IgA o IgM de ratón a los pozos correspondientes para determinar el isotipo de los anticuerpos. Las tiras se incubaron nuevamente (1 hora/25°C), se lavaron 2 veces y se agregó 0.05 ml del sustrato,

el cual consiste de 10 ml de un amortiguador de citratos 0.1 M., pH 4.5, conteniendo 10 mg de D-fenilendiamina (Sigma Chemical, St. Louis Mo USA) y 0.004 ml de una solución al 30 % de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), la reacción se paró 5 min después con 0.2 ml de una solución 1 M de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). Se leyó la DO a 490 nm. Todas las incubaciones de 1 hora se llevaron en agitación.

La dilución apropiada de los sueros para cada clase de inmunoglobulina en las muestra problema, se determinó previamente haciendo diluciones seriadas de los sueros y graficando el logaritmo de los inversos de las diluciones contra la DO, obteniéndose una curva que presentó una región lineal de la cual se escogió la dilución 1:50 para la IgA e IgM y 1:1,000 para la IgG sérica.

Los resultados se expresan como el promedio de las lecturas de DO a 490 nm, a las cuales se les restó el valor del promedio más una desviación estándar de las lecturas de las muestras de los animales normales

#### Estadística

Se utilizó la prueba de Fisher para determinar la homogeneidad de las varianzas entre los grupos. Para estimar la significancia de la diferencia entre las medias, se aplicó la prueba de la t de Student cuando las varianzas fueron homogéneas y la U de Mann-Whitney cuando las varianzas fueron heterógenas.

### Estudio de protección

Se realizó con el mismo número de grupos, inmunizados con los esquemas anteriormente descritos, los cuales se desafiaron con S. typhimurium (F3) viva administrada ig. La dosis utilizada fue de  $1 \times 10^6$  bacterias en 0.1 ml de SSI.

La salmonela desarrolló y se procesó de la misma forma antes mencionada para la vacuna oral, y la dosis de desafío se administró en los ratones 15 días y 18 semanas después de aplicarse la última dosis inmunizante.

Se anotó el número de animales muertos y los días en que esto ocurrió, durante un período de observación de 30 días.

## RESULTADOS

Las pruebas bioquímicas realizadas a *S. typhimurium* (F1 y F3) concordaron en todo momento con las reacciones típicas del género, y la cepa F3 conservó su capacidad de crecer en medios con ampicilina con 50 mg/ml.

### DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50)

En la tabla 2 y figura 1, se muestra el porcentaje de muertes y los días en que éstas ocurrieron durante un periodo de observación de 30 días, después de la administración de diferentes dosis de *Salmonella* ( F3 ) por vía ig.

La DL50 determinada por el método de Reed y Muench fue de  $2.57 \times 10^8$  (tabla 2).

TABLA No 2

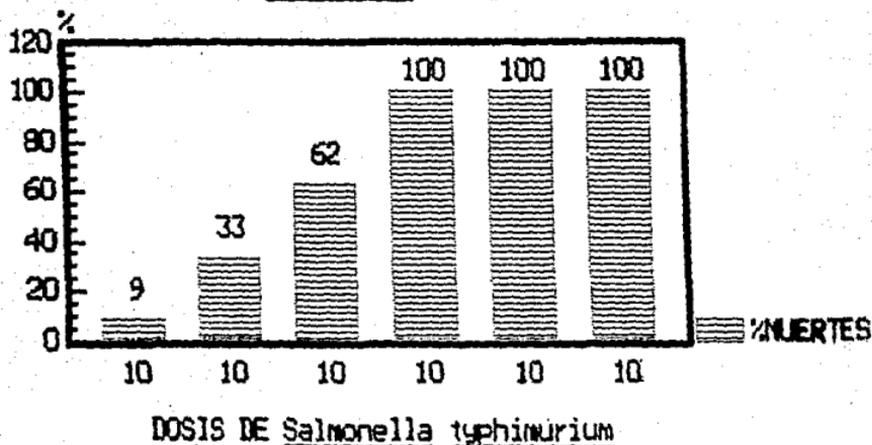
DL50 DE Salmonella typhimurium CEPA F3 EN RATONES Balb/c

CANTIDAD * BACTERIAS	RELACION MUERTOS	No. DE MUERTOS	SOBREVIVIENTES	VALORES ACUMULADOS			
				TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	RELACION DE: MORTALIDAD	% DE MORTALIDAD
10	10/10	10	0	40	0	40/40	100
10	10/10	10	0	30	0	30/30	100
10	10/10	10	0	20	0	20/20	100
10	4/10	4	6	10	6	10/16	62
10	4/10	4	6	6	12	6/18	33
10	2/10	2	8	2	20	2/22	9

\* SE ADMINISTRÓ EN UN VOLUMEN TOTAL DE 0.1 ml POR VÍA ORAL.

FIGURA No 1

% DE MUERTES DE RATONES Balb/c 30 DIAS  
DESPUES DE LA ADMINISTRACION POR VIA  
ORAL DE Salmonella (F3) (DL50)



## DETECCION DE ANTICUERPOS 15 DIAS Y 18 SEMANAS DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION.

Los niveles de anticuerpos contra *S. typhimurium* detectados 15 días y 18 semanas después de la última inmunización en contra de la salmonela completa como antígeno, se muestran en las tablas 3 y 4 respectivamente, para los esquemas de inmunización de 2, 3 y 4 dosis tanto orales como parenterales, con intervalos de una semana entre cada una de ellas.

### ANTICUERPOS DETECTADOS 15 DIAS DESPUES

Suero: Como se muestra en la tabla 3, en todos los casos se encontraron presentes los tres isotipos analizados ( IgG, IgA e IgM ). En ella también se puede ver que los valores de IgG fueron muy similares en los grupos II y III y significativamente altos para el grupo IV B (  $p < 0.005$  ) con respecto al A. Para la IgM, los animales que recibieron las inmunizaciones por vía oral tuvieron valores más altos comparados con sus correspondientes grupos que se inmunizaron por vía parenteral (  $p < 0.005$  ). La IgA sólo fue significativamente más alta en el grupo II A con respecto al B.

En general, los niveles detectados para los anticuerpos de las clases IgA e IGM fueron bajos, se pudo ver además que éstos aumentaron para los tres isotipos conforme al número de dosis. No obstante, la IgG fue el isotipo que predominó por encima de las otras dos, independientemente de la vía y el número de dosis administradas.

**FLUIDO INTESTINAL :** En los resultados que muestra la misma tabla 3, se puede ver que los grupos que recibieron dos y tres dosis por vía oral ( grupo II A y III A ). tuvieron niveles de IgA e IGM significativamente más altos que sus correspondientes grupos que se inmunizaron por vía parenteral ( grupo II B y III B ). La IgB fue la única inmunoglobulina que tuvo valores diferentes y más altos en el grupo IV A con respecto a los animales que recibieron las cuatro dosis por vía parenteral ( grupo IV B ) ( $p < 0.005$ ). En todos los grupos los datos del ELISA para la IgB fueron más altos ( II y IV ) o de similar magnitud ( III ) que los de la IgA.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en suero y fluido intestinal, se vió que los valores de IgG en este último se encontraron más bajos, pero a diferencia del suero sus niveles más altos se detectaron en el grupo IV A1 en cambio la IgA se encontró con valores más altos que los presentes en suero, para los grupos III y IV aunque fueron muy similares en el grupo II. La IGM en fluido intestinal se presentó a niveles bajos.

TABLA No 3

CLASES DE INMUNOGLOBULINAS PRODUCIDAS POR RAJONES Balb/c  
DOS SEMANAS DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION

GRUPO	I ANTICUERPOS SERICOS *			II ANTICUERPOS EN FLUIDO INTESTINAL *		
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
	1:1000	1:50	1:50			
A	0.440±0.023	0.055±0.003	0.098±0.003	0.176±0.035	0.085±0.038	0.090±0.017
B	0.410±0.006	0.010±0.006	0.019±0.003	0.153±0.029	0.009±0.008	0.00
A	0.497±0.035	0.045±0.003	0.100±0.001	0.297±0.054	0.344±0.022	0.086±0.011
B	0.510±0.035	0.035±0.005	0.050±0.024	0.231±0.027	0.164±0.042	0.035±0.010
A	0.510±0.017	0.140±0.029	0.193±0.017	0.548±0.052	0.229±0.031	0.065±0.001
B	0.680±0.006	0.105±0.009	0.142±0.002	0.310±0.035	0.178±0.034	0.066±0.003

\*DETECTADOS POR ELISA LOS VALORES SON EXPRESADOS COMO LA MEDIA DE LA DO A 490 nm A LOS CUALES SE LES PESTO EL VALOR DEL PROMEDIO MAS UNA DESVIACION ESTANDAR DE LAS MUESTRAS DE LOS ANIMALES NORMALES EN TRES EXPERIMENTOS POR SEPARADO

± = A vs B p < 0.005 POR PRUEBA DE T DE STUDENT

∖∖ = A vs B p < 0.005 POR U DE MANN WHITNEY.

## ANTICUERPOS DETECTADOS 18 SEMANAS DESPUES

Fueo que la respuesta de anticuerpos puede variar mucho entre ratones inmunizados con diferentes vacunas, especialmente durante largos periodos, se evaluaron los niveles de anticuerpos especificos presentes 18 semanas después de su última inmunización ( tabla 4 ).

SUERO: Se siguieron detectando los tres isotipos de inmunoglobulinas en todos los grupos, excepto la IgA en los grupos II A y B y III B. Los resultados de IgG fueron significativamente más altos en los grupos inmunizados por vía oral que en los inmunizados por vía parenteral. Para la IgA y la IgM, se observaron en general niveles más altos en los grupos inmunizados oralmente, los cuales se incrementaron conforme al número de dosis.

Nuevamente aquí se vió que la inmunoglobulina predominante fue la IgG independientemente del número de dosis administradas y la vía de inmunización.

FLUIDO INTESTINAL: En estas muestras se encontraron valores para la IgG que fueron muy parecidos, independientemente de la

vía de inmunización para todos los grupos excepto para el III A, en donde fueron significativamente más altos que en el correspondiente B, en cambio los valores para la IgA e IgM fueron mayores en los grupos II y III A ( $p < 0.005$ ). En el grupo IV no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tres isotipos y mientras la IgM permaneció a niveles bajos, la IgA se encontró elevada e incluso fue la inmunoglobulina que predominó en estas muestras. Comparando los valores detectados tanto en suero como en fluido intestinal, en ambos sitios la IgM los tuvo bajos. La IgG que en el primero estuvo presente a niveles muy altos, principalmente en los grupos III A Y IV A, en el segundo se encontraron bajos; en cambio la IgA que en suero se detectó con valores muy bajos ( grupo III A y IV ) o no se detectó ( grupos II A y B y III B ); en fluido intestinal se encontró elevada. Por último, los resultados de la tabla 4 indican en general que los animales inmunizados oralmente tuvieron niveles de anticuerpos ( IgG, IgM e IgA ) más altos que los inmunizados por vía parenteral.

Al hacer una comparación de los resultados presentes en las tablas 3 y 4 se ve que los niveles para la IgG fueron mucho más altos que los observados a las dos semanas en los grupos III Y IV inmunizados por vía oral, en tanto que los inmunizados por vía parenteral los tuvieron solo ligeramente más altos. En cambio en los grupos II A y B los valores presentes a las 18 semanas fueron aproximadamente la mitad de los detectados a los 15 días.

TABLA No 4

CLASES DE INMUNOGLOBULINAS PRODUCIDAS POR RATONES Ba16/c  
18 SEMANAS DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION

GRUPO	ANTICUERPOS SERICOS *				ANTICUERPOS EN FLUIDO INTESTINAL *			
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM		
	1:1000	1:50	1:50					
II	A	0.261±0.012	0.000	0.056±0.005	0.135±0.018	200±0.014	0.020±0.006	
	B	0.184±0.023	0.000	0.021±0.005	0.133±0.031	0.123±0.016	0.00	
III	A	1.485±0.024	0.035±0.017	0.117±0.020	0.300±0.038	0.480±0.049	0.077±0.010	
	B	0.571±0.036	0.000	0.077±0.001	0.136±0.038	0.132±0.018	0.032±0.004	
IV	A	1.262±0.032	0.153±0.003	0.185±0.011	0.160±0.020	0.485±0.038	0.099±0.018	
	B	0.926±0.031	0.070±0.008	0.145±0.012	0.200±0.038	0.490±0.014	0.099±0.024	

\*DETECTADOS POR ELISA LOS VALORES SON EXPRESADOS COMO LA MEDIA DE LA DO A 490 nm A LAS CUALES SE LES RESTO EL VALOR DEL FONDONO MAS UNA DESVIACION ESTANDARD DE LAS MUESTRAS DE LOS ANIMALES NORMALES EN TRES EXPERIMENTOS POR SEPADADO

& = A vs B p< 0.005 POR PRUEBA DE T DE STUDENT  
 \ \ = A vs B p< 0.005 POR U DE MANN WHITNEY

La IGM permaneció sin cambios aparentes en sus niveles y la IgA tuvo valores muy similares ( grupos III A y IV ) o no se detectó ( grupos II A y B y III B ).

En las muestras de fluido intestinal a diferencia de lo observado a los 15 días, la IgA fue la inmunoglobulina predominante en todos los grupos inmunizados oralmente y sólo en el grupo inmunizado con 4 dosis parenterales. Para la IGM los niveles detectados no cambiaron mucho y en general permanecieron igual en todos los grupos. para la IgG en los grupos III Y IV se vió una disminución con el tiempo.

#### COMPARACION ENTRE LOS GRUPOS INMUNIZADOS CON 3 DOSIS ORALES A DIFERENTES INTERVALOS DE ADMINISTRACION

Los niveles de anticuerpos contra *S. typhimurium* detectados 15 días y 18 semanas después de la última inmunización en contra de la bacteria completa como antígeno, se muestran en la figura 2 y 3.

Para investigar si el intervalo entre las dosis administradas por inmunización oral puede influir en el isotipo y/o los niveles de anticuerpos, se trató un grupo de ratones con tres dosis de

S. typhimurium ( F1 ) viva administrada i.g. en días consecutivos ( grupo I ) y se compararon los resultados obtenidos con su correspondiente grupo que recibió tres dosis orales con intervalo de una semana cada una.

SUERO Y FLUIDO (15 DIAS): Como muestra la figura 2, el grupo I en el suero, presentó niveles de inmunoglobulinas séricas más altos para los tres isotipos que el grupo III A, siendo estos significativamente altos para los de las clases IgA e IgM. Además, este fue el único grupo en el que se detectaron niveles más altos de estas dos últimas (IgA e IgM) con respecto a los demás esquemas de inmunización, e incluso aquí, la IgA se encontró ligeramente más elevada que la IgG la cual fue el isotipo que predominó en los demás grupos a este nivel.

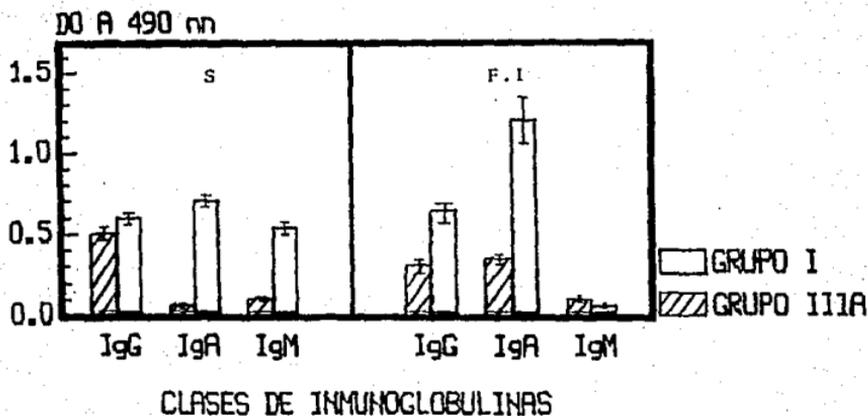
En fluido intestinal tanto la IgA como la IgG tuvieron valores significativos más altos en el grupo I con respecto al III A y mientras en el último estas dos inmunoglobulinas se encontraron a niveles muy parecidos en el grupo I la IgA fue la que predominó. La IgM tuvo valores bajos en ambos grupos y no se encontraron diferencias significativas entre ellos.

SUERO Y FLUIDO (18 SEMANAS): En la figura 3 se ve a nivel sérico que la IgG fue la única inmunoglobulina con valores significativamente más altos en el grupo III A; en cambio, en el fluido intestinal tanto ésta como el isotipo IgA mostraron los niveles más altos.

Al comparar los resultados presentes en las figuras 2 y 3 se ve que, cuando el antígeno se administró en días consecutivos (grupo I), los niveles de anticuerpos decrecieron con el tiempo tanto en suero como en fluido intestinal, mientras que en el esquema donde las inmunizaciones se dieron con intervalos de una semana (grupo III A) la IgG fue la única que se incrementó en suero, permaneciendo sin grandes cambios los tres isotipos a nivel de fluido intestinal, mostrándose sólo un ligero incremento para la IgA.

FIGURA No 2

COMPARACION DE NIVELES DE ANTICUERPOS  
PRODUCIDOS POR RATONES Balb/c EN EL  
GRUPO I vs IIIA 15 DIAS DESPUES  
CONTRA LA SALMONELA COMPLETA



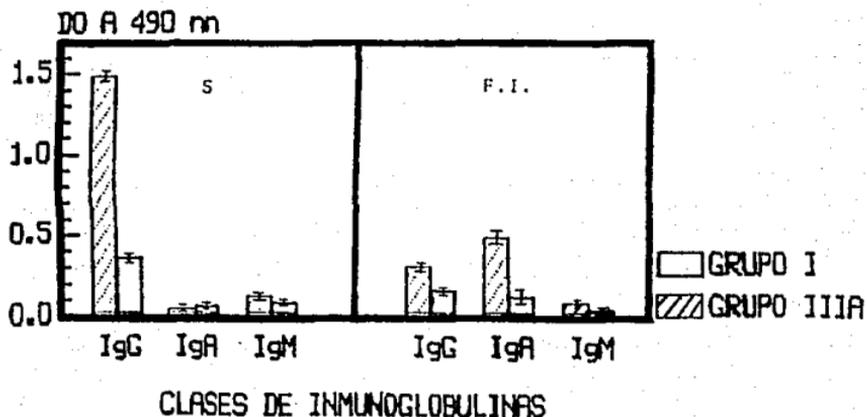
S= SUERO

F.I.= FLUIDO INTESTINAL

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO ± EL ERROR  
ESTANDAR DE 3 EXPERIMENTOS.

FIGURA No 3

COMPARACION DE NIVELES DE ANTICUERPOS  
PRODUCIDOS POR RATONES Balb/c EN EL  
GRUPO I vs IIIA 18 SEMANAS DESPUES  
CONTRA LA SALMONELA COMPLETA



S= SUERO

F.I.= FLUIDO INTESTINAL

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO  $\pm$  EL ERROR  
ESTANDAR DE 3 EXPERIMENTOS.

DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA UN ANTIGENO  
PROTEICO 15 DIAS DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION

Debido a que se ha mencionado que los anticuerpos dirigidos en contra de proteínas de S. typhimurium podrían ser importantes en la protección contra la enfermedad, se estudiaron los niveles de anticuerpos generados con los diferentes esquemas de inmunización antes mencionados y el o los isotipos de inmunoglobulinas que predominaron en cada caso tanto en suero como en fluido intestinal.

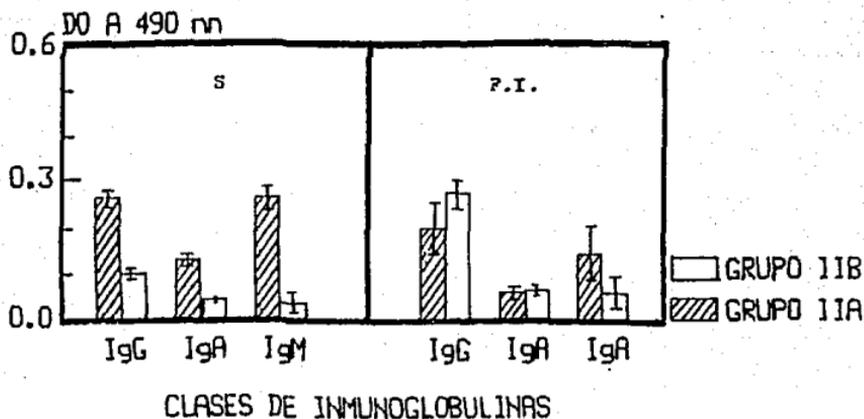
Las figuras 4a, 4b y 4c muestran los resultados de los niveles de anticuerpos específicos detectados 15 días después de la última inmunización, para los grupos que recibieron dosis diferentes del antígeno (2, 3 y 4) a intervalos de una semana entre cada una de ellas. En dichas figuras, a nivel sérico se observan valores en los tres isotipos ( IgG, IgA e IgM ) que fueron significativamente más altos en los grupos inmunizados oralmente, comparado con los correspondientes inmunizados por vía parenteral ( fig, 4a y 4b ), excepto en el grupo IV para la IgG ( fig, 4c ), e incluso la IgM no se detectó en los animales

inmunizados por esta vía con 3 y 4 dosis ( fig. 4b y 4c ) . Los niveles más altos estuvieron presentes en el grupo IV para todas las inmunoglobulinas ( fig. 4c ). Mientras que en fluido intestinal, no existieron diferencias significativas en ninguno , a excepción del grupo IV donde fue más alto el valor en los animales inmunizados por vía oral con respecto a los inmunizados por vía parenteral ( $p < 0.005$ ) (fig. 4c ).

Al comparar el grupo III A con el grupo I ( figura 5 ), se observaron valores más altos en ambos niveles ( $p < 0.005$ ) para el grupo I, con excepción de la IgM en fluido intestinal donde no existieron grandes diferencias.

FIGURA No 4 A

CLASES DE IMMUNOGLOBULINAS PRODUCIDAS  
POR RATONES Balb/c 15 DIAS DESPUES DE  
LA ULTIMA IMMUNIZACION EN EL GRUPO II  
CONTRA EL ANTIGENO PROTEIOO



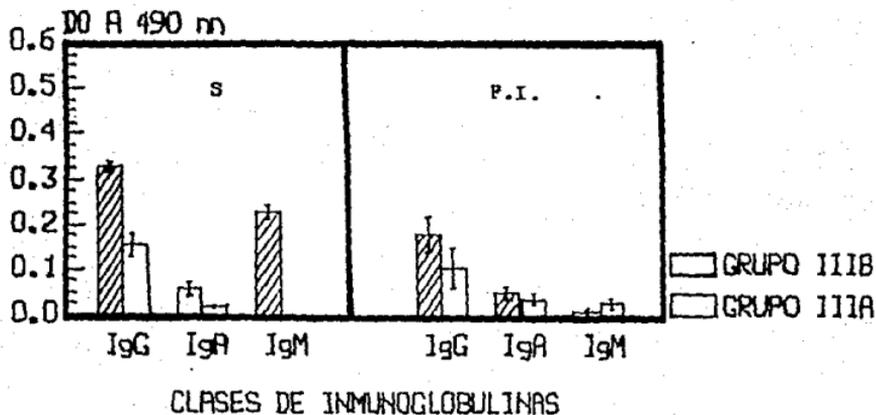
S= SUERO

F.I.= FLUIDO INTESTINAL

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO ± EL ERROR ESTANDAR DE 3 EXPERIMENTOS.

FIGURA 4B

CLASES DE INMUNOGLOBULINAS PRODUCIDAS  
 POR RATONES Balb/c 15 DIAS DESPUES DE  
 LA ULTIMA IMMUNIZACION EN EL GRUPO III  
 CONTRA EL ANTIGENO PROTEICO



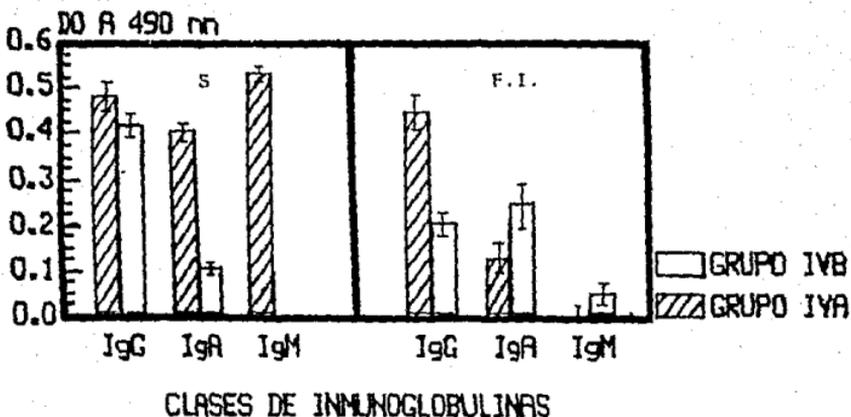
S = SUERO

F.I. = FLUIDO INTESTINAL

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO ± EL ERROR ESTANDAR DE 3 EXPERIMENTOS.

FIGURA 4C

CLASES DE INMUNOGLOBULINAS PRODUCIDAS  
 POR RATONES Balb/c 15 DIAS DESPUES DE  
 LA ULTIMA INMUNIZACION EN EL GRUPO IV  
 CONTRA EL ANTIGENO PROTEICO



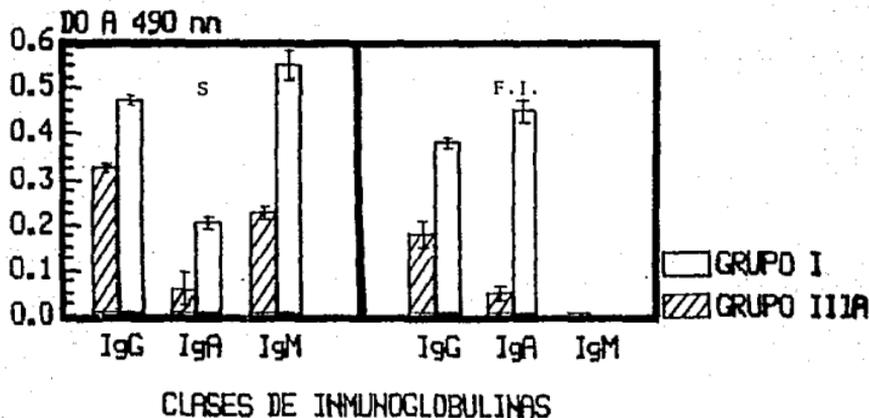
S= SUERO

F.I.= FLUIDO INTESTINAL

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO  $\pm$  EL ERROR  
 ESTANDAR DE 3 EXPERIMENTOS

FIGURA 5

COMPARACION DE NIVELES DE ANTICUERPOS  
 PRODUCIDOS POR RATONES Balb/c EN EL  
 GRUPO I vs IIIA 15 DIAS DESPUES  
 CONTRA EL ANTIGENO PROTEICO



S= SUERO

F.I.= FLUIDO INTESTINAL

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO +/- EL ERROR ESTANDAR DE 3 EXPERIMENTOS.

## ESTUDIOS DE PROTECCION

Los animales fueron desafiados i.g. con 138 DL50 de la cepa F3, y se observaron por un lapso de 30 días. los datos del porcentaje de sobrevivida se muestran en las figuras 6 y 9 .

Los resultados de la figura 6 para los grupos desafiados 15 días después de haberseles administrado la última inmunización, indican que el mayor porcentaje de sobrevivida se presentó en los animales que recibieron las dosis de inmunización por vía oral, principalmente en los grupos III Y IV. Es de notarse, que los grupos que recibieron las mismas dosis que el grupo III A pero en días consecutivos ( grupo I ), manifestaron un porcentaje de sobrevivida aproximadamente de la mitad de éste.

En la figura 7 que muestra el porcentaje de muertes acumuladas ocurridas en los primeros 10 días y posteriores hasta los 30 (figura 8) después del desafío para todos los grupos. se nota una mayor mortalidad en el primer periodo para los grupos que fueron inmunizados oralmente, contrario a lo ocurrido en los grupos inmunizados parenteralmente, en los cuales la mayor mortalidad se presentó en los siguientes días siendo más notorio en el III B y IV B.

FIGURA No 6

PORCIENTO DE SOBREVIDA A LOS 30 DIAS EN  
LOS GRUPOS DE RATONES DESAFIADOS 15 DIAS  
DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION

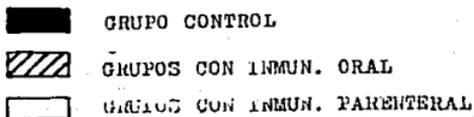
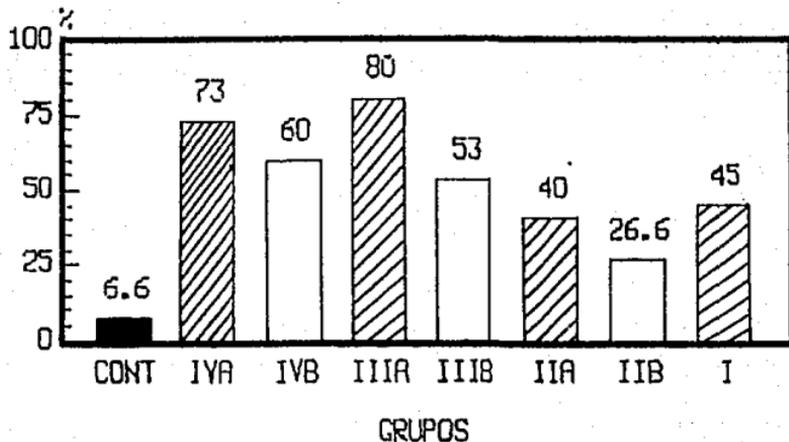
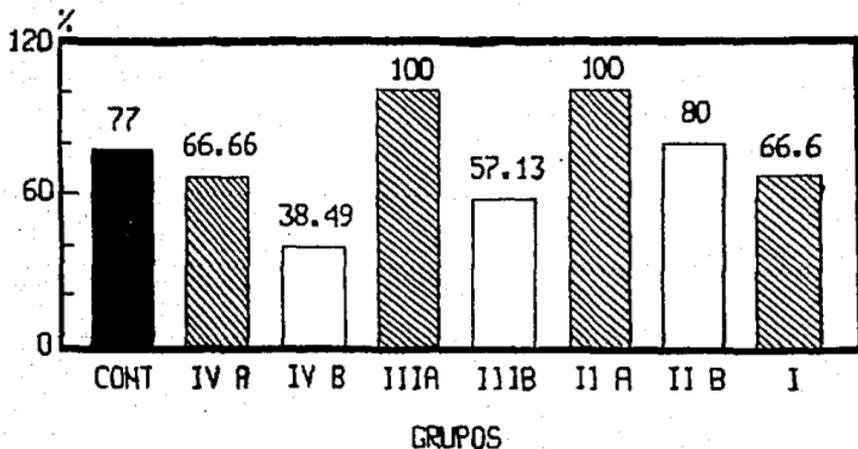


FIGURA No 7

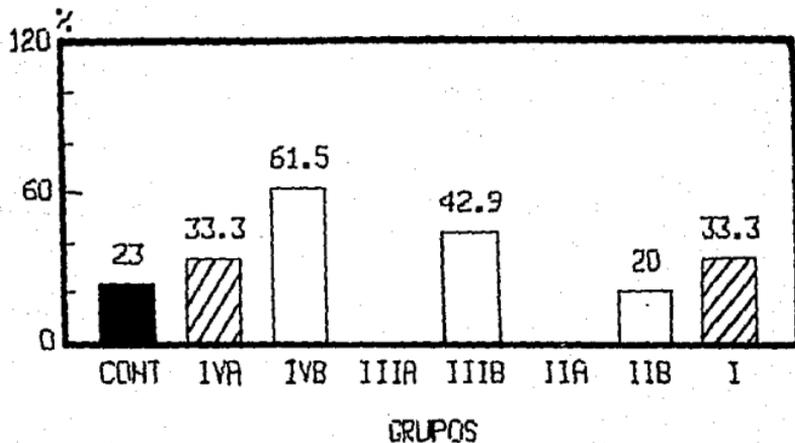
ACUMULACION DEL PORCIENTO DE MORTALIDAD  
EN LOS PRIMEROS 10 DIAS POSTERIORES AL  
RETO



-  GRUPO CONTROL
-  GRUPOS CON INMUN. ORAL
-  GRUPOS CON INMUN. PARENTERAL

FIGURA No 8

ACUMULACION DEL PORCIENTO DE MORTALIDAD  
DE 11 A 30 DIAS POSTERIORES AL RETO



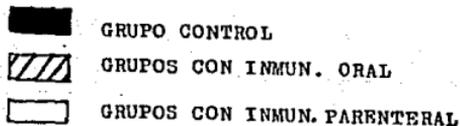
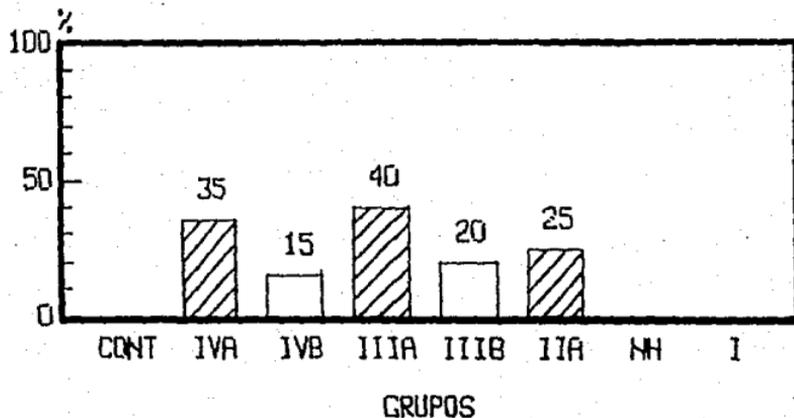
-  GRUPO CONTROL
-  GRUPOS CON INMUN. ORAL
-  GRUPOS CON INMUN. PARENTERAL

La figura 9 presenta los resultados de protección ( como porcentajes), para todos los grupos desafiados 18 semanas después de haber recibido la última inmunización. En ella se observa que los porcentajes más altos de sobrevida se presentaron en los animales inmunizados oralmente, principalmente en el grupo III, con excepción del grupo I que recibió las dosis en días consecutivos, en el cual murieron todos los animales. Es de notarse que en todos los grupos las muertes ocurrieron en los primeros 10 días posteriores al desafío.

Al hacer una comparación de la protección presente a los 15 días con la de 18 semanas después de la última inmunización, es claro que ésta disminuyó en general a la mitad con el paso del tiempo, e incluso desapareció por completo en el grupo I.

FIGURA No 9

PORCIENTO DE SOBREVIDA A LOS 30 DIAS EN  
LOS GRUPOS DE RATONES DESAFIADOS 18  
SEMANAS DESPUES DE LA ULTIMA  
INMUNIZACION



## DISCUSION DE RESULTADOS

En los mamíferos, la inmunización en contra de bacterias produce habitualmente la presencia de anticuerpos específicos con actividad antibacteriana observable fácilmente por diferentes métodos. Sin embargo, todavía no es posible predecir las diferentes respuestas generadas en individuos de la misma o de diferentes especies, y más aún poderla manipular convenientemente.

En este trabajo, con ambas rutas de inmunización (oral y parenteral), no se encontró una correlación aparente entre los niveles de anticuerpos presentes en suero y en fluido intestinal (lo mismo ocurrió para las muestras probadas con el antígeno proteico). Así, en los diferentes grupos se encontraron niveles altos de algunos isotipos en el fluido intestinal pero a nivel sérico se detectaron con valores bajos, mientras que en otros ocurrió lo contrario. Tampoco existió una sincronización en la elevación o disminución de las inmunoglobulinas presentes en ambos compartimentos. Parece ser por estos resultados, que los anticuerpos presentes en fluido intestinal los sintetizaron células plasmáticas presentes en el tejido linfóide asociado a la mucosa del intestino, en los animales inmunizados tanto por vía oral como parenteral. Existen reportes en la literatura en donde

se indica que dosis repetidas del antígeno ( no viable ) administradas por vía parenteral, son poco efectivas o incapaces de provocar una respuesta específica de IgA en la mucosa intestinal de animales no inmunizados ( 64,14 ). Sin embargo, ciertos antígenos, administrados por vía parenteral, pueden inducir la presencia de anticuerpos específicos tanto en suero como en fluido intestinal ( 39,9,21,66 ), en algunos casos se ha demostrado que los anticuerpos a nivel intestinal provienen del suero. En estos estudios, el incremento o la disminución de dichos anticuerpos en ambos sitios fueron sincronizados (21,66). Aunque este no parece ser el caso, por los motivos antes mencionados. Para poder comprobar si hay producción local de anticuerpos, hace falta que se lleven a cabo otros estudios, quizá tratando de buscar la localización de las células productoras de anticuerpos específicos para S. typhimurium.

En general se observa una correlación entre el número de dosis y los niveles de anticuerpos, ésta es más aparente en el suero y fluido intestinal de los ratones inmunizados parenteralmente a los 15 días ( probadas contra la salmonela completa ). A las 18 semanas la asociación estuvo presente en los animales inmunizados por cualquiera de las dos vías a nivel sérico, encontrándose valores más altos de inmunoglobulinas en los inmunizados por vía oral tanto en suero como en fluido intestinal. La mejor capacidad de la vacuna oral para inducir una mayor magnitud en la respuesta de anticuerpos, puede deberse a la constante estimulación

antigénica provocada por la persistencia de la salmonela viable, como lo han reportado otros autores (51,61).

Estos resultados muestran una influencia del número de dosis administradas y la inducción de la síntesis de IgA en el intestino. Los niveles de IgA locales se elevaron más, después de la inmunización oral que con la parenteral para los grupos que recibieron 2 o 3 dosis; sin embargo, los que recibieron 4 dosis parenterales presentaron niveles de IgA similares a los obtenidos en los animales inmunizados con 3 ó 4 dosis por vía oral. Esto puede deberse quizá, a que los linfocitos precursores involucrados en la síntesis de IgA se localizan principalmente en el tejido linfoide asociado a mucosas ( 24 ) y, probablemente, el antígeno aplicado por vía parenteral tenga que ponerse en contacto con este tejido ( o que los linfocitos comprometidos migren a órganos periféricos) para que la estimulación ocurra. El presente trabajo, así como los de Svennerholm y col. ( 76 ), sugieren que la cantidad de antígeno que se pone en contacto con las células inmunocompetentes en el intestino, más que la ruta de inmunización per se, determinan la respuesta inmune generada en la mucosa .

El intervalo entre las dosis aplicadas afectó considerablemente la respuesta humoral tanto en suero como en fluido intestinal, notándose un franco dominio de los niveles de IgA locales, en los animales que se inmunizaron con 3 dosis en días consecutivos, comparado con los de los inmunizados con las

mismas dosis pero con una semana de intervalo; cuando las muestras se probaron contra el antígeno protéico se vieron resultados parecidos. Quizá el esquema de inmunización en días consecutivos induzca un proceso de división celular dependiente del antígeno; y que favorezca la síntesis de IgA por parte de las células plasmáticas en las mucosas. ( 24 )

A tiempos largos, se vió una disminución en los valores de las inmunoglobulinas presentes en los animales inmunizados con el esquema consecutivo, cosa que no ocurrió con los inmunizados a intervalos de una semana entre cada dosis, en los cuales la respuesta anti salmonela permaneció constante o aumentada. Szigoleit y col. (79) han reportado resultados en los que se muestra la presencia de anticuerpos específicos después de un tiempo similar, en ratones infectados por vía oral con S. typhimurium.

El isotipo de los anticuerpos en el fluido intestinal tuvo un cambio con el paso del tiempo, así, en un principio la IgG fue la inmunoglobulina predominante, pero después de 18 semanas la que se encontró a niveles más altos fue la IgA. Debe tenerse en cuenta aquí, que los niveles detectados en cada isotipo, pueden no ser el reflejo directo de su concentración, ya que la presencia de anticuerpos de una clase con mayor avidéz por el antígeno que los anticuerpos de otro isotipo, pueden enmascarar los resultados (61 ).

Los anticuerpos de la clase IgG fueron los que predominaron en suero, independientemente de la vía de inoculación y el número de dosis, cuando el antígeno se administró a intervalos de una semana. Metcalf y col. (53) obtuvieron resultados similares encontrando que en ratones inmunizados con S. typhimurium por vía intraperitoneal, subcutánea o intravenosa la mayor parte de los anticuerpos séricos eran IgG.

Los resultados de este estudio difieren de los obtenidos por Eddie y col. (18), quienes encontraron niveles muy bajos de anticuerpos intestinales en conejos inmunizados con S. typhimurium por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Esto puede deberse a diferencias entre las especies en cuanto a la magnitud en que el antígeno administrado parenteralmente es capaz de inducir la IgA, o a los diferentes esquemas de inmunización utilizados, ya que en este estudio se encontró que los niveles y clases de inmunoglobulinas obtenidas varían considerablemente al cambiar el esquema de inmunización.

Numerosos reportes mostraron que varias vacunas compuestas a base de células muertas o extractos proteicos ( 78,2,42,44 ) de cepas de Salmonella administradas por vía parenteral, protegieron a los ratones de contraer la enfermedad; sin embargo, en estos estudios utilizan diferentes vías a la oral para dar el desafío con la bacteria virulenta. Otros reportes han mostrado que la administración oral de S. typhimurium induce una respuesta inmune protectora contra retos con la bacteria virulenta, que es

superior a la inducida por la administración parenteral ( 26,86,71 ). En el presente estudio, se encontró también que la inmunización por vía oral genera una mayor protección contra posteriores retos con la bacteria virulenta, que la inmunización por vía parenteral. Sin embargo, dicha protección no correlacionó con los niveles de anticuerpos presentes tanto en suero como en fluido intestinal dirigidos contra la salmonela completa o el antígeno proteico. Se utilizó este último antígeno debido a que estudios previos habían demostrado una buena protección inducida por dicho extracto proteico ( 54 ).

En estudios realizados por Grisart y col. ( 63 ) se encontró una buena correlación entre títulos altos de anticuerpos IgA y protección; estos datos difieren de los mostrados aquí, en los cuales con el esquema de inmunización en días consecutivos se obtuvieron los mejores títulos de anticuerpos IgA y sin embargo mostraron una baja protección. También se vió que los animales inmunizados por vía parenteral presentaron una mayor sobre vida que los inmunizados por vía oral y los controles durante los primeros 10 días posteriores a la infección y aunque la vacuna parenteral retarda el periodo en que ocurren las muertes, no las evita; estos resultados se deben de tener muy en cuenta en el momento de interpretar los efectos protectores de alguna vacuna ya que el tiempo en que se observen los ratones puede ser crítico para una correcta evaluación.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo indican que la inmunización tanto por vía oral como parenteral, pueden generar la producción de anticuerpos presentes tanto en suero como en fluido intestinal para los tres isotipos buscados (IgG, IgM e IgA). Estos anticuerpos presentaron variaciones en sus niveles y clases dependiendo no solo de la vía de inmunización sino también del número de dosis del antígeno administrado y el intervalo entre ellas.

No se encontró una correlación aparente entre los niveles de anticuerpos séricos y los presentes en el fluido intestinal. Lo que indica, que las inmunoglobulinas presentes en este último, fueron sintetizadas por células plasmáticas localizadas en el tejido linfoide asociado al intestino.

Se encontró en general una correlación entre los niveles de anticuerpos y el número de dosis aplicadas, principalmente con el isotipo IgA en fluido intestinal que sugiere, que la cantidad de antígeno que se pone en contacto con las células inmunocompetentes del intestino, más que la ruta de inmunización, determina la respuesta inmune generada en la mucosa intestinal.

El intervalo entre las dosis aplicadas, afecta

considerablemente la respuesta humoral, tanto en suero como en fluido intestinal. Así, los anticuerpos inducidos por los esquemas de inmunización con intervalos de una semana se mantienen con niveles constantes por más tiempo, comparados con los inducidos por el esquema de inmunización consecutivo.

Los anticuerpos de clase IgG, son los que predominan a nivel sérico, independientemente de la vía de inoculación y el número de dosis, cuando el antígeno se administra con intervalos de una semana.

La inmunización por vía oral genera una mayor protección contra posteriores retos con la bacteria virulenta, que la inmunización por vía parenteral, la cual retarda el tiempo en que mueren los animales pero no la evita. Sin embargo, no correlaciona con los niveles de anticuerpos presentes tanto en suero como en fluido intestinal.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la protección inducida, no se debe a los altos títulos de anticuerpos. Sin embargo, no se puede descartar que los anticuerpos dirigidos contra otros antígenos de la Salmonella no jueguen un papel protector.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 .-Andre, C., Heremans, J.F., Vaerman, J.P., Cambiaso, C.L.  
"A mecanism for the induction of immunological tolerance  
by antigen feeding : antigen-antibody complexes". J. Exp.  
Med. 142: 1509-1519 (1975)
- 2 .-Angerman,C.R.,Eisentein,T.K . "Comparative efficiacy and  
toxicity of a ribosomal vaccine, cell vaccine prepared  
from Salmonella typhimurium". Infect. Immun. 19:575-588.  
(1978)
- 3 .-Angerman,C.R. and Einsenstein, T.K. "Correlation and  
Magnitude of protection Against Salmonella Infection Afforded  
by Vanous Vaccines with Antybody Titers". Infect. Immun.  
27:435-443. (1980)
- 4 .-Attride,S.R. and Kotlarski.I. "In vitro Lymphokine release by  
Lymphocytes from mice infected with Salmonella". J. Exp.  
Biol. Med. 63:489-502. (1985)
- 5 .-Bergey, D. H.  
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.  
Ed. by Williams and Wilkins  
Baltimore. (1984)
- 6 .-Bienenstock, J., and Befus, A.D. "Review Mucosal  
Immunology". Immunology 41 : 249-269 (1980)
- 7 .-Briar, J.U., Schiff, M.J. "Immunoglobulin A:Strategic Defense  
Initiative at the Mucosal Surface". Ann. Rev. Immunol. 4:389-  
417 (1986)

- 8 .-Brock, D.T., Brock, G.B. and Ward, D.M.,  
 BASIC MICROBIOLOGY.  
 Third Edition.  
 Prentice-Hall.  
 N. Y. (1986)
- 9 .-Carol, O., Tacket., Ferrocio, C., Robbins, J.B., Teai, Ch.M.,  
 Schulz, D., Cadoz, M. Godeau, A., Levine, M.M. "Safety and  
 immunogenicity of two Salmonella typhi Vi capsular  
 polysaccharide vaccines" - J. Infect. Dis. 154 : 342-  
 345.(1986)
- 10.-Carpenter, P.L.  
 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR EL AGUA Y ALIMENTOS.  
 MICROBIOLOGIA.  
 IV Edición.  
 Nueva Editorial Interamericana.  
 México (1979)
- 11.-Carrada, B.T. "La fiebre tifoidea y la vacunación  
 antitifoidea". Salud Pública de México, 23 :103-158.(1981)
- 12.-Collins, F.M. "Cellular Antimicrobial Immunity Critical".  
Reviews Microbiology 7:27-91. (1979)
- 13.-Collins, F.M. "Vaccines and cell-mediated immunity".  
Bacteriol. Rev. 38:371-402. (1974)
- 14.-Crabbe, P.A., Nash, D.R., Bazin, H., Eyessen, H., Heremans,  
 J.F. "Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells  
 of germ free mice after oral or parenteral immunization with  
 ferritin". J. Exp. Med. 130: 723-744. (1969)
- 15.-Cvijatanovic, B. and Uemura, K. "Bulletin world Higiene  
 Organization" . 32:29-36. (1965)
- 16.-Davis, E., Dulbeco, R.  
 MICROBIOLOGY.  
 Third edition.  
 Harper and Row published inc.  
 Maryland (1980)

- 17.-Ebersole, M.T. and Molinari, J. L. "Correlation of the duration and magnitud of protection agains salmonella infections afforded by various vaccines with antibody titers". Infec. Immun. 27 :435-443 (1980)
- 18.-Eddie, D.S., Schulkid, M.L. "Robbins, J.B. The isolation and biological activities of purified secretory IgA and IgG anti-Salmonella typhimurium "0" antibodies from rabbit intestinal fluid and calostrum". J. Immunol. 106: 181-190 (1971)
- 19.-Elson, C.O., Ealding W, Lefkowitz, J. "A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions". J. Immunol Methods 47:101-108. (1984)
- 20.-Freeman, B.A.  
TRATADO DE MICROBIOLOGÍA DE BURROWS.  
XXI Edición.  
Nueva Editorial Interamericana.  
México (1983)
- 21.-Fubara, E.S., Freter, R. "Availability of locally synthesized and sistemic antibodies in the intestine". Infec. Immun. 6: 964-981. (1972)
- 22.-Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Cadwell, L.J., Wills, J.V.  
INMUNOLOGÍA BASICA Y CLINICA.  
5a.edición.  
El Manual Moderno S.A. de C.V.  
México (1985)
- 23.-Fuhrman, J.A., Cebra, J.J. "Special features of primin process for a secretory IgA response. B cell priming with cholera toxin". J. Exp. Med. 153: 534-544. (1981)
- 24.-Gearhart, P.J., and Cebra, J.J. "Differentiated B lymphocytes. Potential to express particula antibody variable and constant regions depends on site of limphoyd tissue and antigen load". J. Exp. Med. 216-217 (1978)

- 25.-George, A., Rath, S. and Kamat, R.S. "Differential regulation of effector responses of cell mediated immunity in experimental Salmonellosis". Clin. Exp. Immunol. 63:327-333. (1986)
- 26.-Germanier, R. "Immunity in experimental salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cell of Salmonella typhimurium". Infect. Immun. 5:792-797 (1972)
- 27.-Germanier, R. (Ed.)  
PREFACE AND TYPHOID FEVER BACTERIAL VACCINES.  
Stockholm (1984)
- 28.-Goldblum, R.M., Alstekt, S., Carlson, B., Hanson, L.A., Jodal, U., Lindin-Janson and Shol-Akerlund, G. "Antibody forming cells in human caslostrum after oral immunization". Nature 257:797. (1975)
- 29.-Hackett, J., Attridge, S., and Rowley, D. "Oral immunization with live, avirulent fla + strains of salmonella protects mice against subsequent oral challenge with Salmonella typhimurium". J. Infect. Dis. 157:78-84. (1988)
- 30.-Hamilton, S.R., Yardley, J.H., Brown, G.D. "Suppression of local intestinal immunoglobulin A immune response to cholera toxin by subcutaneous administration of cholera toxoids". Infect. Immun. 24: 422-426. (1979)
- 31.-Hochadel, F.J. and Keller, F.K. "Protective effects of passively transferred immune T or B-Lymphocytes in mice infected with Salmonella typhimurium". J. Infect. Dis. 135:813-823. (1977)
- 32.-Hohmann, R.M., Kraft, S.C., Michalek, S.P. "Sistemic immunity after local antigenic stimulation of the lymphoid tissue of the gastrointestinal tract". J. Immunol. 111 :1906-1913 (1973)
- 33.-Hormaeche, C.E. "Natural resistance to Salmonella typhimurium in different inbred mouse strains". Immunology 37:311-318. (1979)

- 34.-Ivanoff, B., Andre, C., Fontages, R., Jourdan, G. "Secondary immune response to oral and nasal rough mutant strains of Salmonella typhimurium". Ann. Immunol. 133: 61-70. (1982)
- 35.-Ernest Jawetz, L.J.  
REVIEW OF MEDICAL MICROBIOLOGY.  
2nd. Ed.  
Lange Medical Publications.  
(1984)
- 36.-Kawanishi, H., Saltzman, L.E. and Strober, W.  
"Characteristics and regulatory function of murine con-A induced, clone T cells of taneid from Peyer's patches and spleen: Mechanism regulatin isotype-specific immunoglobulin production by Peyer's patche B cells". J. Immunol. 129:475-483. (1982)
- 37.-Kawanishi, H., and Strober, W. "T cell regulation of IgA immunoglobulin production in gut-associated lymphoid tissues". Molec. Immunol. 20 : 917-930 (1983)
- 38.-Kenny, K. and Herzberg, M. "Early antibody response in mice to either infection or immunization with Salmonella typhimurium". J. Bacteriol. 93: 773-778. (1967)
- 39.-Kere, D.F., Scott, P.J., McDonald, R.A., Wiatrak, M. "Effect of parenteral immunization on the local immunoglobulin A response of the intestino to Shigella flexneri antigens". Infect. Immun. 42: 202-207. (1983)
- 40.-Killar, L.M. and Einsenstein, T.K. "Delayed-Type Hipersensitivity and Immunity to Salmonella typhimurium". Infect. Immun. 52:504-508. (1986)
- 41.-Killion, J.M. and Morrison, D.C. "Protection of C3 H/E<sub>1</sub> Mice from Lethal Salmonella typhimurium LT 2 Infection by Immunization with Lipopolysaccharide-Lipid A-associated protein complexes". Infect. Immun. 54: 1-8. (1986)

- 42.-Kita, E., Nishi, K., Emoto, M., Katsui, N., Yasui, K., Kashiba, S.  
 "Analysis of immunity to infection with Salmonella typhimurium in outbred mice. I Requirement of antibody to non-  
 o antigen for protection in mice that are not protected by  
 the RNA-Rich vaccine". Immunology 61:535-541 (1987)
- 43.-Klipstein, F.A., Engert, R. F., Clements, J. A. "Arousal of  
 mucosal secretory immunoglobulin A antitoxin in rat immunized  
 with Escherichia coli heat-labile enterotoxin". Infect. Immun.  
 41: 249- 269. (1982)
- 44.-Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H., Valtonen, M., and Makela, H.  
 "Immunization with Major Outer membrane protein in  
 experimental Salmonellosis of mice". Infect. Immun. 25:857-  
 862. (1979)
- 45.-Lennette, H.E., Ballows, A.  
 MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.  
 3rd. Ed.  
 American Society for Microbiology.  
 Washington (1984)
- 46.-Levine, M.M., Black, R.E., Ferroccio, C., Clements, M.L.,  
 Lanata, C., Rooney, J. and Germanier, R.  
 DEVELOPMENT OF VACCINES AND DRUGS AGAINST DIARRHEA.  
 11th Nobel conf.  
 Stockholm session (1985)
- 47.-Lindberg, A.A. and Robertsson, J.A. "Salmonella typhimurium  
 infection in calves: Cell-Mediated and humoral immune  
 reactions before and after challenge with live virulent  
 bacteria in calves given live or inactivated vaccines".  
Infect. Immun. 41: 751-757. (1983)
- 48.-Lindberg, A.A., Svenson, B.S., and Robertsson, J.A.  
 "Salmonella typhimurium infection in calves : Delayed  
 specific skin reactions directed against the O- antigenic  
 polysaccharide chain". Infect. Immun. 37: 737-748. (1982)
- 49.-Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.  
 "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol.  
Chem. 193: 265-275. (1951)

- 50.-Mackaness, G.B. "Cellular-Immunity". Ann. Inst. Pasteur, 120: 428-437. (1971)
- 51.-Mackaness, G.B., Collins, F.M. "Host-parasite relations in mouse typhoid". J. Exp. Med. 124:57 3-583. (1986)
- 52.-Mattingly, J.A., and Wwaksman, B.H. "Immunologic suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration the sheep erythrocytes and their systemic migration". J. Immunol 121:1878-1883. (1978)
- 53.-Metcalf, E.S., O'Brien, A.D. "Characterization of murine antibody response to Salmonella typhimurium by a class-specific solid-phase radio immunoassay". Infect. Immun. 31: 33-34 (1981)
- 54.-Molinari, J.L., Yepes, L., Tato, P., and Mendez, L. "Ribonucleic acid-protein purified from salmonella typhimurium involved in experimental immunity". Ann. Immunol. Inst. Pasteur 132 D: 25-41 (1981)
- 55.-Nakoneczna, I., HSU, H.S. "Histopathological study of protective immunity against murine Salmonellosis induced by killer vaccine". Infect. Immun. 39:423-430 (1983)
- 56.-Nencioni, L., Villa, L., Boraschi, D., Berti, Brunilda, and Tagliabue, A. "Natural and antibody-dependent cell-mediated activity against Salmonella typhimurium by peripheral and intestinal lymphoid cell in mice". J. Immunol. 130:903-907. (1983)
- 57.-Nokcano, F.T., and Saito, H.U. "Comparative immunogenicity of heat-killed and living oral salmonella vaccines". Infect. Immun. 6: 451-458 (1972)
- 58.-Ogra, R.P., Karson, D.T., Righthand, F., McGillivray, M.. "Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliiovaccine and natural infection". N. Engl. J. Med. 279: 893-900. (1968)

- 59.-Ortiz-Ortiz L., Jimenez, C., Mendoza, F., Michalak, C., Melendro, E.I., Oliva, A. "Entamoeba histolytica: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody". Exp. Parasitol. 61: 390-397. (1986)
- 60.-Pelczar, M.J. y Chan E.C.S.  
ELEMENTOS DE MICROBIOLOGIA.  
El Manual Moderno  
México (1984)
- 61.-Persson, M. A. A., Hammarstrom, L. S., Smith, C.I.E. "Enzyme-Linked Immunosorbent assay for subclass distribution of human IgG and IgA antigen-specific antibodies". J. Immunol. Methods 78: 109-121. (1985)
- 62.-Pierce, N.F. "Suppression of the intestinal immune response to cholera toxin by specific serum antibody". Infec. Immun. 30: 62-68 (1980)
- 63.-Pierce, N.F. "The role of antigen form and function in the primary and secondary intestinal immune responses to cholera toxin and toxoid in rats". J. Exp. Med. 195: 206 (1981)
- 64.-Pierce, N.F., Gowans, J.L. "Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats". J. Exp. Med. 142: 1550-1563. (1975)
- 65.-Pierce, N.F., Koster, F.T. "Priming and suppression of the intestinal immune response to cholera toxoid/toxin by parenteral toxoid in rats". J. Immunol. 124: 307-311. (1980)
- 66.-Pierce, N.F., Reynolds, H.Y. "Immunity to experimental cholera II. Secretory and humoral antitoxina response to local and sistemic toxoid administration". J. Infect. Dis. 131: 383-389. (1975)
- 67.-Plant, J., and Glynn, A.A. "Genetics of resistance to infection with Salmonella typhimurium in mice". J. Infect. Dis. 133: 72-78 (1976)

- 68.-Plant, J., and Glynn, A.A. "Natural resistance to Salmonella infection, delayed hypersensitivity and Ir genes in different strains of mice". Nature, 248:345-347 (1974)
- 69.-Reed, L.J., and Muench, H. "A simple method of estimating fifty percent and points". Am. J. Hyg. 27:493 (1933)
- 70.-Richman, L.K., Graeff, A.S., Yorchoan, R. and Strober, W. "Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patches after protein feeding". J. Immunol. 126: 2979-2983. (1981)
- 71.-Robertson, J.A., Lindberg, A.A., Hoiseth, S., Stocker, B.A.D. "Salmonella typhimurium infections in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines". Infect. Immun. 41:742-750. (1983)
- 72.-Rudzic, R., Clancy, R.L., Perey, D.V.E., Day, R.P., and Bienenstock, J. "Repopulation with IgA-containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patch and bronchial lymphocytes". J. Immunol. 114 : 1599-1604. (1975)
- 73.-Schuardt, T.V.  
PATHOGENIC MICROBIOLOGY.  
J.B. Lippincott Company.  
Boston (1982)
- 74.-Smith, R. A., Bigley, N. J. "Detection of delayed hypersensitivity in mice injected with ribonucleic acid-protein fractions of Salmonella typhimurium". Infect. Immun. 6:384-389 (1972)
- 75.-Srisart, P., Reynolds, B.L., and Rowley, D. "The correlation between serum IgA antibody levels and resistance to infection with Salmonella typhimurium after oral immunization with various salmonellas". J. Exp. Biol. Med. 63:177-182. (1985)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 76.-Svennerholm, A.M., Langes, S., Holmgren, J. "Intestinal immune response to cholera toxin: dependence on route and dosage of antigen for priming and boosting". Infect. Immun. 30:337-341 (1980)
- 77.-Svenson, S.B. and Lindberg, A.A. "Salmonella typhimurium O-antigen-specific oligosaccharide protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice". Infect. Immun. 32:490-496 (1981)
- 78.-Svenson, S.B., Nurminen, M., Lindberg, A.A. "Artificial Salmonella vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with Salmonella typhimurium". Infect. Immun. 25:863-872 (1979)
- 79.-Sziegoleit, A. "Secretory immunoglobulins and serum antibodies after oral infection of the white mouse with Salmonella typhimurium". Immunitats forsch Immunobiol 152:244-259 (1976)
- 80.-Tagliabue, A., Nencioni, L., Villa, L., Keren, D.F., Lowell, G.H., and Boraschi, D. "Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of intestinal lymphocytes with secretory IgA". Nature 306:184-185. (1983)
- 81.-Tagliabue, A., Villa, L., Magistris, M.T., Romano, M., Silvestri, S., Boraschi, D., and Nencioni, L. "IgA-driven T cell-mediated anti-bacterial immunity in man after live oral Ty 21a vaccine". J. Immunol. 137:1504-1510 (1986)
- 82.-Tato, P., Flisser, A., Gavilanes, M., and Molinari, J.L. "Immunogenic complexes obtained from Salmonella typhimurium and Salmonella typhi Ty2 by the bacterial acetone powder method". Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. 130 A:47-60 (1979)
- 83.-Ushiba, D.K., Saito, T.A., Nakanishi, M., Sugiyama, T. "Studies on experimental typhoid; bacterial multiplication and host cell response after infection with Salmonella enteritidis in mice immunized with live and killed vaccines". Jap. J. Microbiol. 3:231-242 (1959)

- 84.-Volk, W.A. and Wheeler, M.F.  
 PATHOGENS THAT ENTER THE BODY VIA DIGESTIVE TRACTER. BASIC  
 MICROBIOLOGY.  
 5th Ed.  
 Harper and Row, Publishers.  
 N. Y. (1984)
- 85.-Wahdan, M.H., Serie, C., Cerisier, Y., Sallam, S., and  
 Germanier, R. "A controlled field trial of live S. typhi  
 strain Ty 21a oral vaccine against typhoid: three-year  
 results". J. Infect. Dis. 145 : 292-296 (1982)
- 86.-Waldman, R.H., Grunspan, R., Ganguly, . Oral immunization of mice  
 with killed Salmonella typhimurium vaccine". Infect. Immun.  
6:58-61 (1972)
- 87.-Weisz-Carrington, P., Roux, M. E. McWilliams, M., Phillips-  
 Quagliata, J.M. and Lamm, M.E. "Organ and isotope  
 distribution of plasma cells producing especific antibody  
 after oral immunization: Evidence for a generalized secretory  
 immune sistem". J. Immunol. 123 : 1705 (1979)
- 88.-Yardley, J.H., Kere, D.F., Hamilton, S.R., and Brown,  
 G.D. "Local ( Immunoglobulin A ) immune response by the  
 intestine to cholera toxin and its partial suppression with  
 combined systemic and intra-intestinal immunization". Infect.  
Immun. 19 : 589-597 (1978)