

11261

3  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA**

**ENSAYO INMUNOENZIMATICO PARA  
LA DETECCION DE SALMONELLAS  
EN: SANGRE, HECES Y ORINA.**

**T E S I S**

**Maestría en Ciencias Biomédicas  
Inmunología**

**ARTURO ANGEL CORTES FIGUEROA**

**TESIS CON  
FOLIO 11261**

MEXICO, D. F.

1992



## **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.

## I N D I C E :

- 1.- RESUMEN
- 2.- INTRODUCCION.....pág. 1-43
- 3.- OBJETIVOS E HIPOTESIS...pág. 44
- 4.- MATERIAL Y METODOS.....pág. 47-59
- 5.- RESULTADOS.....pág. 60-100
- 6.- DISCUSION .....pág. 101-107
- 7.- CONCLUSIONES.....pág. 108
- 8.- BIBLIOGRAFIA.....pág.109-120

INDICE DE TABLAS:

- Tabla 1.- Determinación del valor de corte para el blanco en la prueba de ELISA....pág. 73
- Tabla 2.- Reproducibilidad de la prueba de ELISA.. pág. 75
- Tabla 3.- Evaluación de la reacción cruzada con otras salmonellas.....pág. 78
- Tabla 4.- Evaluación de la reacción cruzada de la prueba de ELISA contra algunas enterobacterias .....pág. 79
- Tabla 5.- Datos clínicos obtenidos de los pacientes agrupados de acuerdo al diagnóstico..... pág. 81
- Tabla 6.- Datos clínicos obtenidos de los pacientes agrupados de acuerdo al diagnóstico..... pág. 83
- Tabla 7.- Datos clínicos obtenidos de los pacientes agrupados de acuerdo al diagnóstico..... pág. 84
- Tabla 8.- Datos clínicos obtenidos de los pacientes agrupados de acuerdo al diagnóstico..... pág. 85
- Tabla 9.- Datos clínicos obtenidos de los pacientes

agrupados de acuerdo al diagnóstico.....	pág. 85
Tabla 10.- Resultados de reacciones febriles en los pacientes agrupados por diagnóstico.....	pág. 86
Tabla 11.- Resultados de la biometría hemática, agrupados por diagnóstico.....	pág. 89
Tabla 12.- Especies de salmonellas en el copro- cultivo, pacientes con salmonelosis.....	pág. 93
Tabla 13.- Grupo de pacientes con fiebre tifoidea...	pág. 93
Tabla 14.- Grupo de pacientes con shigellosis.....	pág. 93
Tabla 15.- Gérmenes aislados en coprocultivo.	pág. 94
Tabla 16.- Pacientes que recibieron tratamiento previo a la toma de la muestra para el cultivo .....	pág. 97
Tabla 17.- Prueba exacta de Fisher.....	pág. 99
Tabla 18.- Indices de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA.....	pág. 100

## INDICE DE FIGURAS:

- Figura 1.- Curva dosis respuesta del anticuerpo  
peroxidado.....pág. 61
- Figura 2.- Determinación de la concentración óptima  
del Ac de captura.....pág. 62
- Figura 3.- Curva dosis respuesta para evaluar la  
concentración óptima del Ac de captura..  
pág. 64
- Figura 4.- Determinación de la concentración óptima  
del Ac de captura.....pág. 65
- Figura 5.- Determinación de la concentración óptima  
del anticuerpo peroxidado.....pág. 66
- Figura 6.- Precultivo incubado 6 horas, heces  
adicionadas con S. typhi.....pág. 68
- Figura 7.- Precultivo incubado 16 horas, heces  
adicionas con S. typhi.....pág. 69
- Figura 8.- Precultivo incubado 16 horas, orina  
adicionada con S. typhi.....pág. 71
- Figura 9.- Precultivo incubado 16 horas, sangre  
adicionada con S. typhi.....pág. 72
- Figura 10.- Reacciones febriles.....pág. 87
- Figura 11.- Diagrama de dispersión .....pág. 95
- Figura 12.- Diagrama de dispersión.....pág. 96

INDICE DE ABREVIATURAS:

Ac Acs	Anticuerpo (s)
Ag	Antígeno
ARN	Acido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CIE	Contra inmunolectroforésis
COAG	Coaglutinación
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
H	Antígeno flagelar
Igs	Inmunoglobulinas
KDO	Acido 2-ceto 3-oxi-D manoctanoico
LPS	Lipo-polisacárido
M	Molar
ml	Millilitro
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
OPD	Ortofenilendiamina
O	Antígeno somático O
PBS	Solución salina de fosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
TAB	Tifoidea paratifoidea
R	Rugosas

## R E S U M E N

Con el objeto de desarrollar una prueba inmunoenzimática (ELISA) que detectara antígenos de salmonellas patógenas al hombre en muestras de sangre, heces y orina; fué estandarizado el presente ensayo de ELISA. Para tal fin se evaluaron las concentraciones óptimas del anticuerpo de captura y del conjugado peroxidado. Y se encontró que era de 20  $\mu\text{g}/\text{pozo}$ , para el primero y el segundo se utilizó a una dilución 1:1000. Los anticuerpos de captura fueron acoplados a una fase sólida y las condiciones óptimas para desarrollar la unión antígeno-anticuerpo fueron: incubación a temperatura ambiente en agitación, durante una hora, tanto para la unión del antígeno como para el del conjugado, el sustrato ortofenilendiamina se incubó durante 20 minutos. La prueba de ELISA se encontró reproducible, con un coeficiente de variación promedio no mayor de 5.8% para la detección del antígeno de S. typhi JM 1301, a una concentración de 0.015  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se evaluó la reacción cruzada con 10 especies de salmonella aisladas de pacientes en el H. 20 de Noviembre (ISSSTE) y se encontró positiva para todas las bacterias probadas aún cuando para dos especies se



requirió una concentración de  $10^7$  bacterias/ml, para obtener lecturas positivas. También se evaluó la reacción cruzada con otras enterobacterias (12 especies diferentes) con las cuales no se presentó reacción positiva, hasta una concentración de  $10^7$  bacterias/ml.

En las pruebas de campo el presente ensayo de ELISA fué capaz de detectar 6 pacientes con fiebre tifoidea, 21 con salmonellosis de entre 118 pacientes. El resto de pacientes se encontraron 58 con gastroenteritis, 7 con shigellosis, y los restantes 26 con otros padecimientos.

Demostrandose que tuvo el ensayo una sensibilidad, especificidad, exactitud, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de: 100, 88, 90.6, 70 y 100 % respectivamente.

El análisis con la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de medias de muestras independientes, se encontró con una diferencia significativa de  $P < 1.6 \cdot 10^{-12}$ .

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

El estudio de las enfermedades infecciosas en el humano, constituyen un capítulo abierto dentro de la medicina contemporánea. La inmunización activa y la administración pasiva de anticuerpos, así como el descubrimiento de los antibióticos y la posibilidad de modular la respuesta inmune, son descubrimientos que han hecho pensar en un futuro erradicar las enfermedades infecciosas.

Sin embargo, a pesar de los nuevos conocimientos acerca de los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos a nivel molecular, y de las nuevas tecnologías que permiten estudiar la interacción huésped-parásito y brindan la posibilidad de alterar dicha relación en beneficio del hombre. Las enfermedades infecciosas continúan siendo uno de los principales problemas a nivel mundial.

Aunque el tipo de patología que afecta a la población en los países desarrollados ha cambiado en las últimas décadas, en los países económicamente débiles las enfermedades infecciosas y parasitarias siguen formando parte de los cuadros principales de morbi-mortalidad.

Dentro de las enfermedades infecciosas y parasitarias, los agentes que colonizan el tubo digestivo, alterando su fisiología y provocando diarrea, constituyen una de las principales causas de muerte en la población infantil.

Se calcula que más de 5 millones de niños menores de cinco años mueren anualmente por síndrome diarreico en América Latina, África y Asia excluyendo China (39). Si a este dato añadimos las cifras correspondientes a mortalidad por enfermedades infecciosas, (intestinales y respiratorias) y las parasitosis sistémicas de la población en general, tendremos una imagen más clara de la importancia de estas enfermedades en cuanto a los millones de muertes que causan anualmente. En México, se calcula que cada persona sufre de un promedio de tres cuadros diarreicos por año, lo cual da un total de más de 200 millones de casos por año; estos son más frecuentes durante el período de lactancia y la infancia, constituyendo la segunda causa de muerte (69).

La fiebre tifoidea y la Salmonellosis prevalecen como enfermedades endémicas en muchos países de América Central, América del Sur, Oriente Medio y África (39). En países altamente desarrollados del Norte de América, Europa, incluyendo Japón, la incidencia es muy baja. Sin embargo el problema de las infecciones por salmonella aún no ha sido erradicado de estos países. Estas infecciones toman mayor

importancia en países subdesarrollados, ya que afectan predominantemente a los individuos en los extremos de la vida con una mayor morbi-mortalidad en estos grupos.

De acuerdo al boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud en México (69), el número de enfermos reportados con fiebre tifoidea fué de 17 mil casos y de infecciones intestinales, 3 millones de casos, acumulados para el mes de octubre de 1989. En la misma fuente de información epidemiológica para la elaboración de Diagnóstico de Salud en México 1988 (69), en la cual se refiere que las infecciones intestinales como causa de muerte se encuentran en el tercer lugar, con un total de 30,800 defunciones y una tasa de 39.5 casos por 100 mil habitantes en la población general, lo que constituye un 7.4 % del total de defunciones en todo el país, reflejando claramente la magnitud del problema.

El Dr. P. Ch. Louis en 1829 (1), describió magistralmente y separó con claridad a la fiebre tifoidea de otras fiebres, asociando las manifestaciones clínicas con las lesiones características encontradas en la enfermedad, tales como las lesiones en el intestino, nódulos mesentéricos y bazo. Describió además la roseola, la perforación intestinal y la hemorragia. Por otro lado, el Dr. M. Bretonneau en Francia y el Dr. N. Smith en Estados Unidos, reconocieron que la enfermedad se transmite por contagio y que ésta confiere inmunidad frente

a una nueva infección (11).

En 1873 William Budd (2) describió en su obra de epidemiología, que la fiebre tifoidea se transmite por materia fecal y la contaminación del agua, leche, alimentos, así como otros fomites, son fuente de contagio. A partir de este momento creció el interés por el estudio de los diversos aspectos de la infección, por salmonellas. Los esfuerzos realizados pronto aportaron importantes conocimientos científicos relacionados con la etiología, patogenia, inmunidad y diagnóstico, los cuales establecieron que la infección por especies del género *Salmonella* produce diversos cuadros clínicos, dependiendo del microorganismo infectante. Algunos de los hallazgos más relevantes al respecto fueron: la identificación del bacilo de la tifoidea por Eberth en 1880. En Alemania, Gaffkey (1884) aisló por primera vez la *Salmonella typhi* del bazo de los pacientes con infección. Y poco tiempo después otros investigadores, aislaron la bacteria a partir de heces, orina, roseolas y vesícula biliar. En 1855 Salmón y Smith (11) aislaron *S. cholerasuis* y posteriormente Gaerther en 1888 (11) aisló *S. enteritidis* de enfermos sin fiebre tifoidea. Más adelante Duham y Noble (48) lograron la identificación de *Salmonella typhimurium*, en heces.

Wright en 1896, inoculó bacilo muerto por calor a dos oficiales médicos en la India; uno de estos voluntarios, fué

inoculado posteriormente con una cepa viva de Salmonella typhi, no desarrollando la enfermedad. En ese mismo año, Pfeiffer y Kalle (4), prepararon la primera vacuna para uso humano contra la tifoidea, con bacterias muertas por calor y conservadas en fenol, observando el desarrollo de anticuerpos protectores en tales individuos. Por otro lado, se hicieron pruebas de protección pasiva en cobayos, administrando anticuerpos provenientes de sueros de individuos vacunados, para posteriormente desafiarlos con bacterias vivas, encontrando protección en dichos animales (4). En ese mismo año, las investigaciones realizadas por Gruber y Durham (6) en forma independiente, los llevó a describir el fenómeno de adhesión y formación de ovillos ("Stick Together in larger balls") observando por otro lado, la pérdida de movilidad de las Salmonellas en cultivos, al agregar sueros de cobayos previamente inmunizados, lo que originó el término de aglutinina.

Simultáneamente, Widal (7) describió una prueba serológica utilizando suero de pacientes con fiebre tifoidea, del que hizo diluciones seriadas agregandolo al cultivo de Salmonella typhi, produciendose una reacción gruesa de floculación a las 24 horas de incubación.

En 1903, Robert Koch describió tres métodos sencillos para el control de la fiebre tifoidea: desinfección de excretas

contaminadas con la Salmonella typhi, mejoramiento del manejo sanitario de las aguas negras y aislamiento de los convalescientes hasta que estén libres del bacilo (11). En ese mismo año, Smith y Reagh (5) describieron los tres grupos de antígenos de las Salmonellas: antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) y antígeno de superficie o Vi, y reportaron el comportamiento diferente de los antígenos flagelares (H) y somáticos (O) de las Salmonellas; sin embargo, los hallazgos no fueron apreciados (5). Las formas H contienen ambos antígenos H y O, las formas no flagelares no contienen los antígenos H, únicamente los O. Los antígenos H no resisten el calor (termolábiles) y los O son resistentes al calor (termoestable).

Los intentos por desarrollar vacunas más eficientes y con menos efectos colaterales, dieron como consecuencia que en 1916 se desarrollara una vacuna combinada (tifoidea-paratifoidea, TAB), la cual únicamente incrementó las reacciones adversas; sistémicas y locales, lo que resultó en una alternativa inaceptable (11). En 1920, se inició la administración de una vacuna oral inactivada, la que probablemente debería ser más efectiva por actuar a nivel del sitio de infección natural. Sin embargo, a través de los años, se han hecho varias modificaciones a esta vacuna y los resultados siguen siendo controversiales (11).

Los primeros intentos de clasificación de la Salmonella se

iniciaron con Schetza (1920) y White (1925). Dichos estudios sentaron las bases para la creación posteriormente del esquema de Kauffman-White (70,72), elaborado en Copenhagen en 1972. El descubrimiento del antígeno Vi por Felix y Pitt en 1939 (9) contribuyó importantemente en la serología de S. typhi y resuelve el misterio de la inaglutinabilidad del antígeno O en algunas cepas.

Warren Coleman en 1901 (48), usó un manejo del paciente con fiebre tifoidea, basado en una dieta con un aporte protéico-calórico alto, para acortar el prolongado período de convalecencia y minimizar el efecto debilitante de la enfermedad. Sin embargo, las tasas de mortalidad continuaron altas. En el año de 1948, Theodore Woodward (10), introdujo el uso de cloranfenicol en pacientes con fiebre tifoidea en Malasia y demostró que el antibiótico es capaz de esterilizar la sangre de los pacientes a corto plazo, disminuyendo la mortalidad, con lo cual se inició una nueva era en el tratamiento de la enfermedad.

## Clasificación, Morfología, Identificación y

### Estructura.

La salmonellosis es un complejo sindromático debido a la infección por bacterias del género *Salmonella*. Hasta el año de 1983, se empleaba una clasificación con tres



especies primarias, de las cuales hay más de 1,700 serotipos, de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White. Las especies primarias son: Salmonella typhi, Salmonella choleraesuis, Salmonella enteritidis (más de 1,500 serotipos).

La clasificación de Kauffmann-White (70,72) se hace en relación a los antígenos somáticos O y flagelares H; estos últimos son difásicos. Salmonella typhi, posee un antígeno de superficie llamado Vi, que confiere o se relaciona con la virulencia y es un polímero de ácido N-acetil-D-galactosamurámico. Algunos autores refieren a este antígeno como perteneciente al grupo de antígenos llamados K (70). Esta clasificación propuesta por Kauffmann (72) en 1972 basada en los estudios morfológicos, reacciones bioquímicas serotipia y fagotipias de la salmonellas, se modificó a partir de 1983, al ser aceptada una nueva clasificación por el Comité Internacional de Taxonomía de Enterobacterias en base a estudios de hibridización del DNA, propuesto por Brenner (71). Muchos especialistas están de acuerdo que haya una sola especie de Salmonella (S. choleraesuis) sin embargo, algunos otros prefieren el nombre de S. entérica.

Esta clasificación se hizo utilizando la hibridización del DNA de estos microorganismos (71), con lo cual se considera al género Salmonella como perteneciente a la familia de las Enterobacteriaceae y a la Tribu salmonelleae con seis

**subespecies:**

- 1) Subespecie 1. *Salmonella* entérica subsp  
entérica
- 2) Subespecie 2. *Salmonella* entérica subsp  
salamae
- 3) Subespecie 3a. *Salmonella* entérica subsp  
arizonae
- 4) Subespecie 3b. *Salmonella* entérica subsp  
diarizonae
- 5) Subespecie 4. *Salmonella* entérica subsp  
houtonae
- 6) Subespecie 5. *Salmonella* entérica subsp  
bongori

Las *Salmonellas* son bacilos Gram negativos de la familia *Enterobacteriaceae*, móviles, aerobios facultativos, no forman esporas, tienen longitud de 2 a 3 micras y 0.6 de ancho. En cultivos jóvenes predominan organismos cocobacilares y en líquidos pueden haber formas filamentosas. La mayoría de cepas son móviles, con flagelos peritricos y algunos pueden formar cápsulas. Las pruebas bioquímicas permiten diferenciar los distintos grupos de éstas, las *Salmonellas* crecen bien en medios ordinarios de cultivo, casi todas producen ácido y gas

a partir de la glucosa, el manitol, sorbitol y la maltosa; no fermentan la lactosa, sacarosa y el adomitol; casi nunca forman indol, ni acetil-metil-carbinol; no hidrolizan la urea, ni desaminan la fenilalanina; producen ácido sulfhídrico; crecen en medios con citrato y descarboxilan la lisina (14,74,75,37).

El rango de temperatura para el desarrollo de Salmonellas es de 19°C a 42°C, con un óptimo de 37°C; la mayoría de las Salmonellas mueren a 60°C en 15 a 20 minutos. Pueden permanecer bajo condiciones naturales por largos períodos de tiempo, incluso pueden resistir la congelación del suelo.

Las infecciones por Salmonella en el humano, pueden tener una amplia diversidad de cuadros clínicos:

- a) Fiebre tifoidea o paratifoidea
- b) Gastroenteritis aguda
- c) Septicemia
- d) Infecciones localizadas
- e) Infección intestinal asintomática

Esta última es un problema de Salud Pública, dado que constituye la fuente principal de transmisión de la infección salmonellosica.

La salmonella como todas las bacterias gram-negativas tienen una estructura más compleja en su envoltura celular, que a diferencia de las gram-positivas, además de la membrana

citoplasmática y la peptidoglicana tienen una cubierta exterior conocida como membrana externa. La composición de la membrana interna y externa de las gram-negativas es diferente, ya que la primera está constituida por fosfolípidos y proteínas y la externa además contiene lipopolisacáridos (LPS) los cuales son componentes característicos y específicos de las bacterias gram-negativas.

Los estudios de la membrana externa se iniciaron con Miura y Mizushima (33), quienes lograron separar la membrana externa de E. coli, demostrando que se compone de fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS). Las investigaciones de Braun y Rehen (35), encaminados a conocer en detalle la estructura de la membrana externa, demostraron la presencia de una proteína de naturaleza lipoprotéica que se une covalentemente a la peptidoglicana.

Estudios posteriores han revelado la presencia de otras proteínas, de las cuales Schanaitman y cols. (34) clasificaron estas proteínas como 1a, 1b, 3a, 3b. Junto con la lipoproteína de Braun, constituyen al grupo de proteínas principales de la membrana externa.

Osborn y Wu reclasificaron estas proteínas en tres grupos, en base a su estructura y función: I. proteínas matrices o porinas (1a, 1b); II. proteína modificable por el calor (3a); III. Lipoproteína de Braun.

Las proteínas matrices o porinas, tienen una función específica en la formación de poros, para la difusión pasiva de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular, a través de la membrana. Otros tipos de proteínas son designadas como proteínas asociadas a la peptidoglicana y actúan como receptores de fagos y colicinas (36).

Las proteínas modificables por el calor (3a), debido a que al pasarlas por geles de poliacrilamida-SDS se modifica su peso molecular dependiendo de la temperatura de solubilización, (aumentan su peso molecular, a 100°C). Se encuentran expuestas en la superficie celular, actuando como receptores de fagos y colicinas, además de relacionarse con procesos de conjugación bacteriana (36).

Las lipoproteínas de Braun, se unen covalentemente a la peptidoglicana, por un enlace peptídico entre el grupo amino de la lisina terminal y el grupo carboxilo del ácido mesodiaminopimélico de la peptidoglicana. La función de esta lipoproteína es mantener la integridad estructural y funcional de la membrana externa, por lo que su principal función es estabilizar la membrana celular. A las proteínas antes mencionadas, se les ha llamado mayores y existe otro grupo de 10 a 20 proteínas menores, llamadas así por encontrarse en menor cantidad, las cuales intervienen en procesos de transporte como acarreadores, a través de la membrana, y como

receptores de fagos y colicinas. Por otro lado, se relacionan también con la replicación del DNA y la división celular. Entre estas proteínas está la enzima fosfolipasa A, la que está asociada con los procesos de invasión microbiana, a través de dos mecanismos: primero promoviendo la fusión de la membrana huésped o induciendo cambios fisicoquímicos en ella, y segundo estimulando la endocitosis (12,36).

La participación de estas proteínas en la relación huésped-parásito, es clave debido a que se sitúa en la superficie de la membrana celular, tomando parte en los mecanismos de adherencia e invasibilidad de las bacterias, así como la resistencia de las mismas al efecto bactericida del suero (12, 29,27).

Los microorganismos del género *Salmonella* en cultivo, pueden dar lugar a cambios de fase, (lisa o rugosa), lo cual está determinado por la presencia o no de antígenos O, que recubren a los antígenos R. Los polisacáridos que forman el antígeno central o core, está constituido principalmente por el ácido 2-ceto-3oxi-D-manooctanóico, o KDO unido por L-glicero-D-monoheptosa, a otro pentasacárido intermedio. El lípido A, es un polímero de disacáridos de glucosamina, unidos por puentes de fósforo beta 1-6, acilados por su grupo hidróxilo con el ácido beta-hidroximirístico y por su grupo amino con ácidos grasos de cadena larga (12,13,14). Los fosfolípidos están constituidos casi esencialmente por fosfatil etonalamina, que

es el más abundante de estos fosfatilgliceroles y difosfatilglicerol y representan un 90% de la composición de los fosfolípidos de membrana de S. typhimurium (12,23).

El antígeno (Ag) O forma un complejo, que de manera general está estructurado por dos subunidades llamadas A y B de naturaleza lipídica, unidas a un polisacárido y una proteína de la siguiente manera: lípido A-polisacárido-proteína-lípido B. El lípido A es tóxico, la proteína es la principal responsable de antigenicidad, y la especificidad serológica del complejo, está dada por el polisacárido o antígeno O (23,14,12,24).

Las características del LPS de bacterias Gram negativas son: moléculas anfipáticas con una parte hidrofóbica llamada lípido A, y una hidrofílica constituida por un oligosacárido central (core), el cual generalmente está unido al Ag O, este es un polímero constituido por la repetición de unidades de carbohidratos. El lípido A se obtiene por hidrólisis ácida de LPS, obteniéndose además del glicolípido (lípido A) una serie de polisacáridos degradados del LPS. En enterobacterias el ácido beta hidroxil-tetradecanoico es el más abundante.

Nakano y col. (49), en sus estudios realizados en ratones encontraron que el LPS puede estar involucrado en la capacidad de S. typhimurium LT2 para infectar al ratón, a las cuales se les hicieron mutaciones en la estructura de su LPS, modificando el contenido de los azúcares de las cadenas laterales O, se

inocularon al ratón, encontrando que en las cepas que mantenían la unidad básica tetrasacárida; abeucosa-manosa-ramosa-galactosa, se mantenía la virulencia matando a todos los ratones inoculados, a diferencia de aquellas en las que faltaban uno o varios de estos azúcares en las cadenas laterales O. Los ratones sobrevivientes fueron inoculados nuevamente con la cepa silvestre y se observó en las cepas que conservaban el LPS casi completo ofrecían una mejor protección que aquellas, en las cuales éste se encontraba muy alterado. Además observaron que las cepas altamente mutadas perdían su capacidad de multiplicarse en el ratón y por lo tanto de conferir protección, lo que sugiere que la multiplicación de la cepa vacunal es necesaria para producir inmunidad protectora. Estos investigadores concluyeron que la cadena lateral O es un importante factor de virulencia, que evita la fagocitosis de la bacteria. En otros estudios, evaluando la relación del LPS con la virulencia de la S. typhimurium, se demostró que el LPS debe mantenerse completo para expresar al máximo la virulencia de la Salmonella, y al inducir mutaciones en la bacteria, que producen un LPS incompleto se puede afectar la capacidad de invasión a la mucosa intestinal, o la producción de enterotoxina por el microorganismo. La combinación de estos factores contribuye importantemente en la producción de la diarrea (24).



En estudios con Salmonella typhimurium realizados por Kussi y col. (85), encontraron que los anticuerpos (Acs) producidos contra sus porinas, protegían a los ratones contra la infección, por S. typhimurium. Hernández e Isibasi (41), usando un modelo experimental en ratón con S. typhi, encontraron que proteínas de la membrana externa de esta bacteria, protegía a los ratones en contra de una exposición posterior a dicha bacteria, lo que sugirió que estas proteínas pueden ser utilizadas en la inmunoprofilaxis de las enfermedades causadas por bacterias gram negativas.

Los flagelos, fimbrias y pilis son apéndices constituidos por subunidades de proteínas: los flagelos están implicados en la morbilidad de las bacterias; las fimbrias son similares, aunque más rígidas que los flagelos, al parecer hay muchas variedades de fimbrias que están implicadas en la adhesión a células eucariotes; el pili es un tipo especial de fimbria, que es esencial para la unión de la célula donadora a la receptora, durante la conjugación bacteriana (12,17,19).

#### Epidemiología

La fiebre tifoidea continúa siendo un problema importante de salud pública, especialmente en los países en vías de desarrollo. No existen estimaciones adecuadas acerca de su incidencia, morbilidad y mortalidad (69).

Para ilustrar el problema de las infecciones por Salmonellas, tomaremos algunos datos emitidos por Eldman (39), referentes a la incidencia de fiebre tifoidea en el mundo. En el Este de Europa, Estados Unidos y Japón se reporta una incidencia de 0.24 a 3.7 casos por 100 mil habitantes y en el Sureste Europeo de 4.3 a 14.5 casos por 100 mil habitantes al año.

En países en vías de desarrollo, es muy difícil tener datos confiables de morbilidad, por lo que se usan factores proporcionales derivados de estadísticas de morbilidad y mortalidad de enfermedades diarreicas. El Dr. Barua (39), hace una estimación anual aproximada de 12.5 millones de casos en el mundo, excluyendo a China. De estos, 6.98 millones de casos al año ocurrieron en el Sur y Este de Asia, 749 mil en el Oeste de Asia, 4.36 millones en Africa, 15 mil en Egipto, 406 mil en América Latina, y las Islas del Pacífico Sur y 23 mil casos en países desarrollados, con una incidencia de 365 casos por 100 mil habitantes en todo el mundo, y 540 casos al año por 100 mil habitantes en la población de países en desarrollo.

En México, la Dirección General de Epidemiología ha calculado para el período de 1978-1988, un aumento de la incidencia de fiebre tifoidea a una tasa anual de 16.37 por 100 mil habitantes. Contrario a la tendencia descendente mostrada por la enfermedad en la década de los 60s y principio de los

70s con una tasa de 4.5 y 5.7 casos por 100 mil habitantes respectivamente para cada década. Este repunte en la incidencia de la enfermedad está probablemente producido por la situación económica del país en los últimos años (69).

#### Historia natural de la enfermedad.

La fuente primaria de la infección son las personas enfermas, y más a menudo los portadores asintomáticos quienes excretan S. typhi de manera continua. Un 10% de los convalecientes son portadores a corto plazo, excretando Salmonella hasta por tres meses, y un 3% se convierten en portadores a largo plazo (14,74,75). En las mujeres, el estado de portador es favorecido por la presencia de colecistitis o colelitiasis previa. El urocultivo es positivo hasta un 25 % de los enfermos, como resultado de pielonefritis y cabe mencionar que no es raro encontrar portadores urinarios crónicos.

La vía de transmisión, es por el contacto directo e indirecto con heces y orina de enfermos, convalecientes o portadores, ya que la eliminación de Salmonella especialmente en las heces, puede ser tan grande como de  $10^{11}$  bacterias/gramo de heces.

Dentro de la transmisión, juegan un papel importante las manos, insectos tales como las moscas y otros fomites, los cuales contaminan con heces principalmente los alimentos y

bebidas.

Salmonella typhi y Salmonella paratyphi parasitan exclusivamente al huésped humano, y otras especies de Salmonellas tienen como reservorio a varios animales, algunos de los cuales son destinados al consumo humano (aves de corral, cerdos, reses, corderos). Las frutas y vegetales crudos, son vehículos importantes de transmisión. Los huevos, carnes ahumadas y alimentos industriales pueden contener grandes cantidades de estas bacterias. Los ostiones, almejas y otros moluscos pueden concentrar altas cantidades de Salmonellas debido a que poseen sistemas de filtración muy rudimentarios. La leche, crema y otros productos lácteos son importantes fuentes de contagio para el hombre, y para los animales; los alimentos industrializados y los fertilizantes, favorecen la infección en ellos y propician que los diferentes animales se conviertan en reservorios, los cuales posteriormente serán usados para el consumo humano.

El portador crónico, es aquel en el que se aísla Salmonella typhi después de un año del episodio de tifoidea, o un individuo con un cultivo positivo sin antecedentes de enfermedad; este estado predomina en las mujeres en proporción de 3:1. Por otro lado, la detección de portadores no es fácil y requiere de coprocultivos seriados, ya que un solo examen aporta pobres resultados, debido a que existe una gran

interferencia con la flora normal del intestino. El cultivo de bilis ha demostrado ser más útil en la detección de portadores, que los coprocultivos en serie de tres (54).

Finalmente, se ha visto que el contacto intrafamiliar no es determinante en la transmisión de casos en la familia, incluso la ingestión común de un alimento contaminado no determina la adquisición de la enfermedad. Parece ser que la principal fuente de infección se encuentra fuera del hogar (14,39,48).

Para que se produzca la infección en el humano se requiere de la ingestión de una dosis mínima que fluctúa entre  $10^4$  y  $10^7$  organismos. El período de incubación suele ser de 24 horas a 7 ó 21 días, terminando con la aparición de fiebre y otros síntomas debidos a la liberación de endotoxinas de Salmonella typhi (21, 74).

Para el establecimiento de la infección por Salmonella se requiere que esta logre sobrevivir a los mecanismos inespecíficos de defensa del individuo, como es el jugo gástrico, el cual es capaz de destruir a la bacteria después de 30 minutos; sin embargo, la presencia de alimentos puede proteger a las bacterias de esta acción.

Una vez en el intestino la salmonella puede reproducirse en la luz intestinal antes de invadir la mucosa y en ocasiones la bacteria puede invadirla directamente, desde el yeyuno hasta

el ileon, sin lesionar al epitelio intestinal (19,38).

En estudios con voluntarios, se ha visto que este microorganismo puede localizarse en las vías biliares durante las primeras etapas de la infección, lo que se ha demostrado por cultivo de bilis, sin que haya presencia de la bacteria en otras localizaciones (sangre o heces) (39,54).

Una vez que atraviesan la mucosa intestinal, los bacilos pasan rápidamente a los vasos linfáticos y ganglios mesentéricos, desde donde van al hígado y posteriormente por el conducto torácico al torrente sanguíneo, y se localizan intracelularmente en fagocitos mononucleares, lo cual representa una ventaja para la bacteria, al lograr evadir la bacteriolisis por anticuerpos y complemento sérico. En esta situación, inician su multiplicación en el interior de los fagocitos. El bacilo tífico induce una respuesta linfocitaria neutrofílica con producción de prostaglandinas. Además, desde su localización intracelular, el bacilo puede liberar sus endotoxinas, que algunos autores han postulado como las responsables del daño tisular y que dan origen a los síntomas de toxemia generalizada. Todo esto sucede durante el período de incubación, que dura de 10 a 14 días. Esta es la primera etapa de la enfermedad, en la cual la infección se generaliza (83).

La segunda etapa dura aproximadamente una semana y se caracteriza por la aparición de las primeras manifestaciones

clínicas de la enfermedad, las cuales son producidas por la liberación del bacilo que se reproduce intracelularmente en los macrófagos (principalmente de gánglios mesentéricos) y ocurre una amplia diseminación de los microorganismos a la circulación sanguínea originando, la septicemia la cual se acompaña de una gran liberación de endotoxina. A partir de esta nueva bacteremia, el microorganismo es fagocitado por el sistema retículo endotelial del bazo, hígado y pulmón predominantemente.

La tercera etapa, que suele durar de una semana a 10 días, se destaca por los efectos de la lesión producida por las bacterias localmente, en particular en el tubo digestivo, gánglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo. Estas lesiones se manifiestan en las placas de Peyer y folículos linfáticos por la hiperplasia y tumefacción que presentan, originando protrusiones de aspecto nodular. A los 7 ó 10 días, el cuadro intestinal se complica con necrosis y ulceración en las áreas donde antes había hiperplasia linfoide, caracterizado por la aparición de úlceras en el ileon. Característicamente hay una falta de leucocitos polimorfonucleares, predominando los macrófagos. Estos monocitos abundan en el lecho y márgenes de la úlcera, pero también se observan linfocitos y plasmocitos. Los gánglios linfáticos exhiben necrosis que puede ser muy extensa y las células sinusoidales también. La falta de

participación de los leucocitos polimorfonucleares, se refleja en la leucopenia que es un signo muy característico de la enfermedad. En bazo e hígado también se presentan lesiones de necrosis focal. La defervescencia de la enfermedad ocurre cuando se desarrolla inmunidad y la bacteria es eliminada por el sistema inmune, iniciándose el último período (83). Este se denomina etapa de lisis, en la cual el proceso infeccioso cede en forma gradual. Los síntomas desaparecen con lentitud y la temperatura se normaliza, siguiendo a todo esto un período de convalecencia que es variable en cuanto a su duración y en promedio puede durar un mes.

El Dr. Hoffman (86) ha postulado la siguiente hipótesis para tratar de explicar la fisiopatogenia de la enfermedad, atribuyendo las manifestaciones clínicas de la tifoidea a la liberación; de metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres de oxígeno y otros mediadores relacionados, así como a la liberación de factores supresores, por parte de los macrófagos. A estos factores se les ha asociado a la inmunosupresión observada en la enfermedad (39,15,86).

La patogénesis de la gastroenteritis por salmonella se puede dividir en cuatro etapas: la primera ocurre cuando el microorganismo llega al tubo digestivo y hay un crecimiento y proliferación de éste en el intestino (colonización), sigue a esto la invasión de la mucosa gastrointestinal; la tercera



etapa es la estimulación a la excreción de líquidos y electrolitos al lumen intestinal y finalmente una diseminación de la bacteria al sistema retículo endotelial del intestino. Se ha demostrado que esta invasión a la mucosa intestinal del ileon y colon es la responsable de la diarrea, ya que la lesión origina liberación de prostaglandinas que afectan el sistema del AMP-adenil-ciclasa (26).

Respuesta inmune a la infección.

La defensa del huésped en contra de salmonella y en general para cualquier bacteria patógena, consiste en una variedad de mecanismos específicos e inespecíficos, que deben ser superados por las bacterias para producir enfermedad en el hospedero. Algunos de los mecanismos inespecíficos de defensa son: la integridad de la piel, la presencia de enzimas como la lisosima en las secreciones, el moco y cilios, el ácido clorhídrico en el estómago, y la flora bacteriana normal en todo el organismo (90).

Los mecanismos específicos de defensa, dependen de la interacción de la bacteria con el sistema inmune del huésped, en el cual el linfocito T juega un papel crucial en la respuesta, contra las bacterias que tienen la capacidad de replicarse, dentro de fagocitos mononucleares, y otros tipos de células del mismo (91).

La respuesta inmune específica se inicia con la fagocitosis, de las células bacterianas por el sistema fagocítico mononuclear, iniciándose así el procesamiento y presentación del antígeno, en donde los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (APC) son las encargadas, de digerir las fracciones proteínicas de los patógenos a péptidos (92), y expresarlos en su membrana, asociados a las glicoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que pueden dar lugar a la activación de la vía citosólica, para las moléculas clase I del MHC, o a la vía endosomal, para las moléculas clase II del MHC. Esta última ha sido asociada a la inmunidad protectora contra bacterias, hongos y protozoarios, ya que las moléculas clase II estimulan a los linfocitos T CD4+, que a su vez activan a los linfocitos B, y macrófagos por medio de la liberación de interleucinas (91).

El linfocito T se caracteriza, por la presencia de marcadores de superficie, y entre ellos las moléculas CD3, que asociadas al receptor de células T (TCR), el cual está compuesto por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ , son capaces de reconocer antígenos extraños al organismo, cuando son presentados al linfocito T por la APC, la cual modifica estos antígenos, y los presenta asociados a sus moléculas del MHC (93).

Estos linfocitos pueden ser divididos en dos tipos diferentes de células: aquellas células que presentan moléculas

CD4, y reconocen antígenos en el contexto del MHC clase II, y aquellas que expresan moléculas CD8, y reconocen antígenos en el contexto del MHC clase I. Inicialmente se creía que únicamente las células CD4<sup>+</sup>, eran las que se activaban en respuesta a una infección bacteriana, sin embargo, se ha acumulado una gran cantidad de datos indicando, que las células CD8<sup>+</sup>, también tienen un papel importante, en la respuesta a la infección (91, 93), lo cual se ha apoyado en las siguientes evidencias: 1) en muchas infecciones producidas por bacterias o protozoarios, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tienen un papel fundamental en la protección contra estas (93); 2) se han demostrado funciones efectoras citotóxicas, en la inmunidad contra bacterias y protozoarios (93); 3) se han caracterizado dos tipos de células T CD4<sup>+</sup> (Th1 y Th2), las Th1 asociadas a un efecto protector contra las infecciones, y las Th2 pueden exacerbar la infección (94); 4) se ha demostrado la presencia de células T  $\gamma/\delta$ , en respuesta a ciertas infecciones por bacterias (95).

Las bacterias que son captadas por las células del huésped, pasan al compartimiento endosómico, y los péptidos antigénicos de estas son asociados a las moléculas clase II, y presentados a las células T CD4<sup>+</sup> (96, 97). A diferencia de los péptidos derivados de proteínas intracelulares o de proteínas sintetizadas de novo, sujetas a proteólisis en el citosol

(compartimiento citoplasmático), las cuales son translocadas al retículo endoplasmico, y asociadas a las moléculas clase I, para finalmente este complejo sea translocado a la superficie de la célula, y presentado a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (96, 97, 98). Estos pasos experimentados por los péptidos, para ser asociados a las moléculas clase I, dificultaría la expresión de antígenos bacterianos en asociación a estas moléculas, sin embargo, datos recientes han mostrado, que algunos mecanismos utilizados por las bacterias intracelulares, para escapar a su destrucción y sobrevivir, así como replicarse dentro del macrófago, pueden favorecer la asociación de los péptidos bacterianos a las moléculas clase I del MHC (97, 99). Los mecanismos de escape son: interferencia con la producción de moléculas efectoras de bajo peso molecular (radicales de oxígeno y metabolitos de nitrógeno), inhibición de la fusión al fagolisosoma, y evasión dentro del citoplasma (97, 99). Este último favorece principalmente, la unión de los antígenos bacterianos a las moléculas clase I. Otros factores que favorecen esta asociación, es la introducción de proteínas solubles al compartimiento citoplasmático, como en el shock osmótico (99), así como también la aplicación de lipopéptidos, o la asociación de proteínas solubles a complejos inmunoestimulantes (100). Estas son vías, que pueden ser seguidas, por el sistema inmune en respuesta a la salmonella.

Muchas bacterias intracelulares, escapan a su destrucción dentro del citoplasma de los macrófagos, atravesando la membrana de los endosomas. Las proteínas producidas por bacterias que residen en el citoplasma deben, sin embargo, tener acceso a la vía de las moléculas clase I, y estimular a los linfocitos CD8<sup>+</sup>, e iniciar así una vía alterna de estimulación de los linfocitos citotóxicos (CTL) (101, 102).

Se han identificado además de los linfocitos T, con receptor  $\alpha/\beta$ , que hay un segundo tipo de linfocitos que también expresan moléculas CD3, y usan otro receptor de célula T constituido por una cadena  $\tau$  y otra  $\delta$  (103). Recientemente se ha demostrado, que varios grupos de células con receptor de T  $\tau/\delta$ , reconocen preferentemente componentes de micobacterias, estas células también se han identificado en humanos (104,105). Demostrando que estas células, tienen una importante función, en la respuesta inmune a las infecciones intracelulares, como la producida por salmonellas.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, realizan principalmente funciones de cooperación (Th helper = cooperación), y los CD8<sup>+</sup> de citotoxicidad (CTL citotóxico), mientras que la función de los linfocitos T  $\tau/\delta$ , no es bien conocida, aunque pueden desarrollar tanto funciones de cooperación, como de toxicidad (106).

La participación de células T CD8<sup>+</sup> en la respuesta a

bacterias intracelulares, puede tener la ventaja de que al lisis una célula blanco, que es incapaz de destruir a las bacterias en su interior, permite que los microorganismos sean liberados, y a su vez captados por células asesinas más eficientes para esta función, como son los monocitos sanguíneos. Aún cuando, la lisis de las células blanco puede ocasionar lesión al huésped (106).

Se sabe que la activación de las células T, es altamente específica para un antígeno en particular, sin embargo, se ha demostrado que no necesariamente este es el caso, y que la activación de los linfocitos puede ocurrir, además por dos diferentes vías: 1) por moléculas con actividad policlonal, que pueden estimular a todas las células T, o a casi todas las células T, como por ejemplo las toxinas bacterianas que llevan entre ellas mitógenos, y antígenos específicos que activan muchas, aunque no todas las clonas de células T, por unión a ciertos tipos de TCR (97). 2) Algunos antígenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y altamente conservados en la filogenia, dado que ellos pueden ser mostrados por una amplia variedad de bacterias patógenas, las células T que tienen especificidad, para estos epitopes tienen el potencial de reconocer a un amplio espectro de agentes infecciosos. En algunos casos, esta conservación puede extenderse a moléculas del huésped, y en este caso las células

T, que muestran epitopes contra estos antígenos pueden causar enfermedad autoinmune (reactividad cruzada de células T), (97).

En años recientes se ha demostrado, que este tipo de reactividad cruzada, ocurre ampliamente en el caso de proteínas de "Stress" o de choque (HSPs).

La exposición a varios estímulos nocivos incluyendo el calor, induce una respuesta filogenética altamente conservada, caracterizada por un incremento en la síntesis de un grupo de polipéptidos, llamados HSPs (107), que tienen una importante función en las células normales en el doblado y desdoblado, en la traslocación de proteínas, y el armado y desarmado de complejos proteicos. La estructura de las HSPs, es altamente conservada en la filogenia, por ejemplo los miembros de las familias de HSP70 en comparación con las HSP60, muestran una alta homología, superior al 50% en especies tan diferentes como bacterias, levaduras, y células de plantas y animales (108, 109), y dado que las HSPs sirven como antígenos comunes en numerosas infecciones, estas proteínas representan los principales antígenos, para la reactividad cruzada. Se han encontrado células T, dirigidas contra HP65 en individuos sanos, lo que indica que la respuesta contra HPS puede ser inducida, y dirigida por una amplia variedad de microorganismos, en infecciones subclínicas. Evidencias obtenidas en modelos murinos, han demostrado que un alto

porcentaje de células T  $\tau/\delta$ , usan al HPS65 como su principal antígeno (110). En los humanos los linfocitos T  $\tau/\delta$  que responden a las HPS65, se han aislado de pacientes, con artritis reumatoide e individuos sanos (108). Aun cuando, también se ha visto que esta respuesta inmune, a las HSPs contribuye a la respuesta del huésped, contra patógenos en estadios tempranos de la infección, y es un lazo de unión entre la resistencia natural, y una discreta respuesta inmune específica contra el agente etiológico.

En el ratón las células T  $\tau/\delta$ , son abundantes en las capas epiteliales, las cuales son una importante barrera contra microorganismos invasores (111), participando estas células como mecanismo de defensa, que puede identificar células infectadas o lesionadas, eliminando a estas células.

El interferon ( $INF\tau$ ), se ha asociado a la activación de macrófagos y una serie de estudios indican, que esta citocina se produce en el sitio de la lesión. La liberación de esta citocina en respuesta a la infección, está relacionada con protección contra la misma (112).

Las citocinas producidas, en respuesta a la infección tienen diversos efectos sobre diferentes células, y estos dependen del tipo de célula, o de la presencia de otras citocinas (113). Por ejemplo; el FNT inhibe el crecimiento del tripanosoma musculi in vitro, e in vivo causa incremento de la



parasitemia. Lo que hace suponer que el FNT, induce la liberación de algún tipo de citocina, que actúa como factor estimulante del crecimiento del parásito.

El IFN $\gamma$  es un importante factor, que incrementa los mecanismos de eliminación de microorganismos en el macrófago, por lo que la protección a la infección, ha sido asociada a la inducción de células Th del tipo 1, que secretan; INF $\gamma$ , IL-2 y otras citocinas, mientras la exacerbación de la infección, se ha atribuido a las células Th2 que secretan; IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10 (112, 114). En la activación de un tipo u otro de células Th, se ha demostrado esta relacionada al antígeno estimulante, de las células T.

Existen mecanismos que pueden ayudar, a los agentes patógenos a evitar su destrucción, por la respuesta inmune, los cuales se han dividido en dos tipos; uno pasivo, que implica el ocultamiento al sistema inmune (como la variación antigénica, mimetismo molecular, etc.), y otro activo, en el cual se producen y liberan sustancias, como la proteína A que puede perturbar al sistema de citocinas, y ayuda a evitar la lesión de los microorganismos patógenos al interferir, con uno de los sistemas pivotes de la respuesta inmune (115).

Se ha visto, que en estadios tempranos de la infección por tripanosoma cruzi, se producen agentes que inducen inmunosupresión, y se ha demostrado que esta se debe a la

reducida capacidad de proliferación, de los linfocitos de individuos infectados, en respuesta a antígenos y mitógenos (115). Además, se encontró que células infectadas, mostraban una baja expresión de sus receptores, para la interleucina 2. La administración, de la IL-2 a linfocitos murinos los libera del efecto supresor, mientras que en linfocitos humanos esto no ocurre, implicando que hay diferentes mecanismos, de respuesta en estas dos especies.

Otros mecanismos que afectan la respuesta inmune, pueden ser una falta de producción de la IL-2, o falta de unión al receptor de IL-2, demostrado en la inmunosupresión observada, en la malaria (116).

Algunos estudios han mostrado que *P. aureoginosa*, produce proteasas que rompen al INF $\gamma$ , y la IL2 (117) causando así interferencia con el sistema inmune.

Se ha descrito que, la leishmania produce un factor, capaz de suprimir la inducción de mRNA para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , sugiriendo de alguna manera, que el parásito puede interferir con la transcripción de los genes de las moléculas clase II del MHC (118)

#### Prevención

Estudios en animales con *S. typhimurium* (Germanier, 1972) (76) y *S. enteritidis* (Collins) (78), mostraron que las

vacunas con bacterias vivas atenuadas son más eficaces que aquellas con bacterias muertas, especialmente cuando se dan oralmente (76,78). De las cepas atenuadas, probadas en el ratón, sólo una mostró una inmunidad similar a la producida por la infección natural y fué la de la vacuna con cepas Gal-E-mutantes (52). El uso de preparaciones con antígenos de S. typhimurium para aplicación parenteral, al inocular al ratón, han demostrado el desarrollo de inmunidad protectora en estos animales, cuando son inoculados posteriormente con la bacteria viva (Wong, 1974) (77).

La infección natural en el hombre parece producir un cierto grado de inmunidad, sin embargo, la información disponible no es enteramente satisfactoria. Estudios en voluntarios que fueron infectados con una cepa de S. typhi y que posteriormente se les administró un nuevo inóculo de  $10^5$  bacterias de la misma cepa, mostraron un alto grado de inmunidad adquirida, ya que sólo el 25% fueron susceptibles a la reinfección (Hornick, 1970). Sin embargo, mayores dosis, sobrepasaron esta protección. Por otra parte, al tratar de correlacionar la efectividad de una vacuna en humanos comparada con modelos experimentales en animales, se ha encontrado que no hay relación con la protección observada en los animales, con la eficacia de las vacunas en pruebas de campo realizadas en humanos (48).

La eficiencia de las vacunas parenterales, ha sido mostrada en estudios a gran escala (87), apoyados por la Organización Mundial de la Salud, al evaluar dos tipos de vacunas para administración parenteral: la vacuna-K (inactivada por acetona) y la vacuna-L (inactivada por calor-fenol). La diferencia fundamental entre las dos vacunas, radica en que el método de inactivación por acetona, conserva los antígenos Vi de superficie de la bacteria y por el otro método no son conservados estos antígenos. En estos estudios se reportó un significativo grado de protección del 80 al 90 %, para el tipo K, al menos por tres años o más y de 51 a 77 % para el tipo L (Cojetanovic, 1965) (87).

Las vacunas orales con microorganismos muertos, han sido probadas extensamente en estudios con voluntarios y en estudios de campo. En los voluntarios a los que se les administraron altas dosis de la vacuna muerta, mostraron desarrollo de inmunidad protectora y reducción de la incidencia de cultivos positivos en heces, después de una dosis de desafío con Salmonellas vivas (Du Pont, 1971), sugiriendo esto último, alguna influencia sobre el control de la infección a nivel local probablemente debido al desarrollo de inmunidad a nivel intestinal (79). En contraste con estos resultados alentadores iniciales, los resultados reportados por Chuttani (80) en estudios de campo, son contradictorios; en un estudio realizado

en la India entre 20 mil vacunados, y un grupo control de igual número de no vacunados, encontró que la tasa de ataque de la fiebre tifoidea, entre el grupo de inmunizados y el grupo control fué similar en ambos grupos.

Las vacunas vivas para la administración oral se muestran como buenos prospectos. Las mutantes de S. typhi dependientes de Estreptomina, en un estudio con voluntarios, mostró una protección significativa y una importante reducción de coprocultivos positivos. Sin embargo, la cepa mutante deficiente de la enzima UDP-galactosa-epimerasa, que provoca una síntesis incompleta del LPS de la pared celular, se muestra más eficiente que la anterior (52). En vivo, esta cepa puede tener una fuente exógena de galactosa y la pared puede ser sintetizada normalmente; sin embargo, el organismo permanece avirulento porque la galactosa fosforilada se acumula en la bacteria, por la deficiencia de la enzima ocasionando la lisis de la Salmonella. En estudios con voluntarios, a los que se administraron 8 dosis en el lapso de un mes, no presentaron efectos adversos y la bacteria viva raramente fué recuperada de las heces. A las seis semanas de la última inmunización, los participantes fueron inmunizados con una dosis de  $10^5$  bacterias virulentas de S. typhi, dosis suficiente para causar la enfermedad en el 25 al 50 % de sujetos normales. Se encontró que sólo el 7% desarrolló fiebre tifoidea, contra un 53% en los

controles, con un 87% de protección en el grupo de estudio (52). En este estudio, así como en previas investigaciones, no se ha encontrado correlación alguna entre protección y títulos séricos de anticuerpos a algún determinante antigénico del patógeno.

Otro enfoque original en la investigación y desarrollo de vacunas contra la fiebre tifoidea, lo constituyen los estudios encaminados al uso de fracciones antigénicas de las Salmonellas, en un intento por incrementar la eficiencia de la vacuna, reduciendo los efectos colaterales de las mismas. Los primeros estudios utilizando Salmonella typhi y Salmonella typhimurium, encaminados a evaluar la capacidad protectora de las fracciones antigénicas con el desarrollo de mínimos o nulos efectos adversos, Johnson en 1972 (88) reportó, que las proteínas ribosomales obtenidas de S. typhimurium, eran eficaces para inducir inmunidad en ratones contra el desafío del organismo homólogo. Smith y Bigley (89) estudiaron el papel de las proteínas contenidas en fracciones de ARN, obtenidas de S. typhimurium, en la inducción de inmunidad en contra de la infección de Salmonella. Inocularon varios grupos de ratones con diferentes concentraciones de ARN y proteínas (estas preparaciones contenían al menos 25 proteínas) y observaron que entre mayor era la concentración de proteínas en la preparación, se mejoraba la inmunidad inducida y que las

preparaciones que contenían más del 6 % de ARN, eran buenos inmunógenos. Los estudios de Molinari y col. en 1974 (30), en los cuales probaron una vacuna constituida principalmente por ribosomas de S. typhimurium, con la que protegieron al 100% de los ratones desafiados contra 100 DL 50 de S. typhimurium virulenta. En otro estudio Molinari y Cabrera valoraron la potencia de una preparación ribosomal obtenida de Salmonella typhi TY2, y como control usaron la vacuna inactivada por calor-fenol de la misma cepa. Los resultados mostraron que el grado de protección inducido en los animales inmunizados con la preparación ribosomal, fué significativamente más alto que el de los ratones inmunizados con la vacuna de referencia, contra el desafío de Salmonella virulenta en estos ratones (11).

En 1979, Tato y Molinari aislaron complejos inmunogénicos de S. typhimurium y S. typhi TY2, preparados por el método de polvos acetónicos (81). Estos complejos, estaban formados al menos por 25 proteínas, los que indujeron un alto grado de inmunidad contra el organismo virulento homólogo. El complejo de S. typhi TY2, indujo mayor protección en los animales inmunizados que la vacuna estandar de la Secretaría de Salud. Los estudios de estos complejos inmunogénicos de S. typhi purificados en una columna de DEAE celulosa, demostraron la presencia de 19 fracciones, seis de las cuales resultaron ser buenos inmunógenos; una de las fracciones que estaba

constituida por tres proteínas, indujo en el ratón un alto grado de protección. También se aisló una ribonucleoproteína de esta fracción, con un peso molecular de 8,500 daltones, la que resulta inmunogénica, ya que protegió a ratones contra el desafío de 10 DL 50 de S. typhi (29).

Todo lo anteriormente mencionado, nos da una idea bastante amplia de lo difícil que es actualmente, a nivel mundial, el control de las infecciones por Salmonellas, y deben realizarse mayores esfuerzos para sacar del atraso cultural y económico a los países subdesarrollados, debido a que estos factores son los más importantes para que la enfermedad permanezca en forma endémica en el mundo. Desde hace más de un siglo, se demostró que los mejores medios de prevención son los programas educacionales tendientes a mejorar los hábitos higiénicos personales y colectivos, los cuales incluyen:

- 1) Higiene adecuada del hombre
- 2) Pasteurización de la leche
- 3) Potabilización del agua

#### Diagnóstico

En México en la práctica médica para el apoyo en el diagnóstico de estas infecciones se usan primordialmente métodos tradicionales como los cultivos, reacciones febriles y la biometría hemática. Las reacciones febriles presentan el



inconveniente de ser inespecíficas y de poca utilidad para apoyar el diagnóstico en zonas endémicas, como nuestro país (Levine, 1978) (67).

Los anteriores estudios, son realizados desafortunadamente sólo en algunos de los pacientes sospechosos de la infección y en otros, el diagnóstico se basa únicamente en el criterio y experiencia del médico que atiende al enfermo. Otras pruebas mencionadas más adelante sólo se realizan con fines de investigación, en un reducido número de pacientes. Esto obliga necesariamente la búsqueda de otras técnicas de laboratorio más sensibles, específicas, de bajo costo y técnicamente simples, para coadyuvar a un mejor diagnóstico de estos padecimientos.

En la actualidad, el diagnóstico etiológico de la fiebre tifoidea y la salmonellosis está basado en pruebas bacteriológicas. Se han hecho varios estudios comparativos para tratar de evaluar las técnicas de aislamiento bacteriano más adecuadas. En estudios realizados en un gran número de pacientes (mayor de 500) con fiebre tifoidea y paratifoidea, se encontró que el cultivo de aspirado de médula ósea es el mejor procedimiento para el aislamiento de estos microorganismos resultando positivos en un 79 a 90% de los casos en diferentes estudios (54, 57). Otra de las ventajas fué que los cultivos persistieron positivos, aún cuando los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento con antibióticos. Los resultados con

cultivos de sangre fueron más variables y en general mostraron una sensibilidad similar a los cultivos de bilis obtenidos por cápsula duodenal (54, 66). Estos cultivos fueron a su vez significativamente más sensibles que los cultivos de orina y heces (66). En el caso de los cultivos de sangre, varios factores parecen ser importantes para la obtención de un mayor porcentaje de positividad, entre los cuales están el uso de un volumen grande de sangre (10 ml), la dilución de la sangre en un medio de cultivo (1:11), el medio de cultivo utilizado y un período de incubación de los cultivos de 21 días, antes de descartarlos como negativos.

Se han realizado varios intentos para desarrollar técnicas que permitan una rápida identificación de los microorganismos en cultivos. La reacción de coaglutinación con una suspensión de Stafilococcus aureus-proteína A (COAG) sensibilizados con anticuerpos anti O y anti Vi, permite una rápida detección de S. typhi en cultivo con una sensibilidad del 94-100% y especificidad del 83-100%. Sin embargo, esta técnica no mejora sustancialmente la sensibilidad de los sistemas de cultivo anteriormente mencionados (59, 60, 61). Los antígenos de S. typhi en medio de cultivo, pueden ser detectados por inmunoprecipitación con la técnica de contra inmunolectroforésis (CIE) (62). En el caso del coprocultivo, la incorporación de anticuerpos contra S. typhi en medio

semisólido, da lugar a un halo de precipitación alrededor de las colonias (58), una variante de esta técnica es la utilización de anticuerpos acoplados a proteína A de Stafilococcus Aureus, para incrementar la visualización del fenómeno de precipitación.

Otro tipo de pruebas utilizadas como auxiliar en el diagnóstico de fiebre tifoidea, están dirigidas a la detección de anticuerpos contra diferentes componentes de la bacteria; entre ellas están: la prueba de Widal para titulación de anticuerpos dirigidos contra antígenos O y H, y algunas otras encaminadas a la detección de anticuerpos (62, 67). Se pueden detectar rápidamente anticuerpos por contrainmunolectroforesis; esta técnica es altamente específica, pero de sensibilidad variable (62). También se ha descrito una prueba inmunoenzimática (ELISA) y un radioinmunoensayo para la detección de anticuerpos anti-LPS. Recientemente se ha descrito un método de inmunofluorescencia indirecta, específica para cuantificar anticuerpos anti-Vi, altamente sensible (39). La principal desventaja de las técnicas descritas anteriormente, radica en que son positivas a partir de la segunda semana de la enfermedad, y algunas de ellas son de poca utilidad en regiones endémicas (37, 38, 39).

Se han descrito pruebas para la detección de antígenos bacterianos en muestras de orina y suero de pacientes con

fiebre tifoidea. Como la prueba de COAG para determinar la presencia de antígenos O, H y Vi en orina, la cual mostró una alta sensibilidad pero no fué muy específica (39, 59). El ELISA para el antígeno Vi en orina tampoco mostró una especificidad adecuada (39). La CIE utilizada para detectar antígeno en suero, parece ser altamente específica pero de sensibilidad variable 36-92% (61, 62).

Recientemente fué descrito un ensayo inmunoenzimático para la detección de antígeno protéico de S. typhi, (Appassak, 1987) (63), el cual fué capaz de detectar el antígeno protéico de Salmonella en un rango de concentración de 0.5 a 50 ug/ml con una sensibilidad y especificidad de 84 y 89% respectivamente, realizandose este ensayo en un tiempo máximo de 24 horas.

Por otra parte el número de pruebas falsas positivas fué bajo, encontrandose que había reacción cruzada con otras enterobacterias relacionadas: S. typhimurium, S. paratyphi A, S. enteritidis y E. coli. Con las Salmonellas esta reacción cruzada no representa una desventaja ya que el pronóstico y el tratamiento puede ser similar (63).

Ya que no existe una prueba adecuada para el diagnóstico rápido de fiebre tifoidea, hemos tratado de desarrollar una prueba de ELISA que detecte antígenos de S. typhi y otras Salmonellas en muestras de sangre, heces y orina de individuos infectados.

### Objetivos

Desarrollar un método de diagnóstico inmunoenzimático que permita detectar organismos del género *Salmonella* patógenos para el hombre y/o sus antígenos en muestras de sangre, orina y heces.

Probar la confiabilidad de la prueba de ELISA en el campo clínico dándole validez con las pruebas de laboratorio rutinariamente utilizadas para el diagnóstico

### Hipótesis

La *Salmonella* es una bacteria que produce septicemia y se multiplica rápida y fácilmente en todo el organismo, lo cual debe permitir la detección de la bacteria o sus antígenos en diversos fluidos corporales, a través de una prueba inmunológica de alta especificidad y sensibilidad.

### Justificación

Las infecciones por enterobacterias representan un problema en el diagnóstico, ya que éste implica el aislamiento bacteriano, como la identificación de sus características metabólicas y la de sus antígenos de superficie, estos estudios requieren de varios días, para la obtención de resultados positivos. Otro factor importante que impide obtener resultados positivos es la interferencia que puede producir la flora

normal, por lo que no siempre se logra el aislamiento del patógeno. Por lo tanto creemos que la técnica de ELISA puede mejorar sustancialmente la sensibilidad, especificidad de las pruebas antes mencionadas a un costo razonablemente bajo.

La vigilancia epidemiológica obliga a conocer el mecanismo de transmisión , invasión y patogénesis de la infección por Salmonellas, así como los mecanismos y factores involucrados en la respuesta inmune protectora del huésped y el desarrollo de pruebas de laboratorio confiables y accesibles para el diagnóstico oportuno y la prevención de la diseminación del padecimiento en la población.

Por otra parte, es muy difícil llegar a un diagnóstico en base a manifestaciones clínicas, debido a que la gama de cuadros clínicos varía desde la fiebre tifoidea, las gastroenteritis, septicemia e infecciones localizadas. Además, no es rara la presencia de cuadros diarreicos, en los que no se sospecha la etiología, principalmente en lactantes, por lo que se requiere el apoyo de laboratorio. Sin embargo, muchas veces no es posible realizar una batería de pruebas completas por varios factores; entre ellos se cuentan los altos costos, la imposibilidad de contar con laboratorios adecuados en todo el país, el retardo en la obtención de resultados para administrar un tratamiento.

Esto motivó nuestro interés por desarrollar una prueba

sensible, específica, de bajo costo y que no requiriera de un equipo sofisticado de laboratorio, ya que incluso la interpretación del ensayo inmunoenzimático puede ser cuantitativo o cualitativo, lo que es una ventaja en laboratorios que no cuentan con lectores de ELISA. Además un punto muy importante es el tiempo de consumo de la prueba para tener resultados positivos o negativos, que es inferior a 24 horas.

## MATERIAL Y METODOS

## Obtención de Antígenos

El método para la obtención de Ag de Salmonella typhi JM 1301 se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Fessenden modificada por Tato y col. Se inocularon 5 litros de caldo soya tripticasa con 200 ml de un cultivo de 12 hrs. de Salmonella typhi JM 1301, el cual se incubó durante 4 hrs. a 37°C, en agitación. Las células bacterianas se cosecharon por centrifugación a 8,500 rpm durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada Kontron TGA-75. Las células bacterianas se resuspendieron en acetona fría, previamente deshidratada con cloruro de calcio, la suspensión se agitó durante 10 minutos y se pasó a través de un filtro de vidrio usando bomba de vacío, se repitió este paso hasta que se obtuvo acetona clara, se añadió cloroformo frío para eliminar la acetona y el material se dejó secar durante 72 hrs. en cámara al vacío y en refrigeración. Los polvos acetónicos se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.2, conteniendo; cloruro de magnesio 0.12 M, sacarosa 0.25 M, cloruro de potasio 0.1 M. y desoxicolato de sodio 0.4 ‰. Se añadió desoxirribonucleasa a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó durante 1 hr. a 38°C, en agitación continua. El material se dializó durante 3 días contra un amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.2, con cloruro de potasio 0.1 M con cambios frecuentes.



El material dializado se centrifugó a 17,500 rpm, durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y se esterilizó por filtración a través de una membrana con poro de 0.22  $\mu$ m, (milliporo Div. Bedford, Ma. USA), se liofilizó y se almacenó a 4°C.

#### Obtención de Antisueros

Los antisueros se obtuvieron inmunizando conejos de la cepa Nueva Zelanda, aplicando una dosis de 1 mg de Ag de Salmonella typhi JM 1301 liofilizado y homogeneizado con adyuvante completo de Freund, la administración fué vía intradérmica en los cojinetes plantares, repitiendo la misma dosis y vía una semana después, finalmente a la siguiente semana se aplicó una tercera dosis por vía intramuscular, distribuida en varios sitios.

A los cinco días del último estímulo antigénico, se realizó una prueba de aglutinación de Salmonella typhi para determinar el título de anticuerpos (Acs). Las inmunizaciones se repitieron hasta alcanzar un título de 1:2000 o más. Se obtuvo suero en una cantidad aproximada de 30 ml., las inmunoglobulinas (Igs) se precipitaron con solución saturada de sulfato de amonio al 33% y se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (Sigma St. Louis, Mo. USA) y posteriormente se hicieron alicuotas, las cuales se

congelaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Una fracción se usó como anticuerpos de captura acoplados a pozos removibles inmúnolón II (Dynatech Laboratories, INC. Alexandria, Va. USA), y otra como anticuerpos marcados con peroxidasa.

#### Obtención de Anticuerpos Peroxidados

Se procedió a acoplar la enzima peroxidasa de rábano tipo VI (Sigma Chemical, St. Louis Mt. USA) a las Igs contra Salmonella typhi. Se utilizó 1 mg de Igs por ml siguiendo la técnica descrita por Avrameas (119). Para ello se mezclaron 8 mg de peroxidasa en 1 ml de agua destilada y se agregaron 0.2 ml de periodato de sodio 0.1 M, se agitó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente, se dializó la muestra toda la noche en 1 litro de acetato de sodio 0.001 M, pH 4.4 a  $4^{\circ}\text{C}$ . Simultáneamente las Igs se dializaron en solución amortiguadora de bicarbonatos 0.01 M, pH 9.5. Al día siguiente, se agregaron a la peroxidasa 20  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de bicarbonatos 0.2 M, pH 9.5. Esto se mezcló con las Igs dializadas en carbonatos, la mezcla se agitó durante 2 hrs. a temperatura ambiente, se agregaron 0.4 mg de borhidruro de sodio y se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 hrs. Se dializó contra solución amortiguadora de boratos 0.1 M, pH 7.4, durante toda la noche. El material se pasó por una columna sephadex G-200, la cual se equilibró previamente con solución amortiguadora de boratos 0.1

M, pH 7.4, el material se eluyó con la misma solución y las fracciones se colectaron en tubos de vidrio de 7ml cada una. Para detectar la presencia de proteínas, las fracciones se leyeron en un monitor LKB 2138 UVICORD S, a una longitud de onda de 280 nm, conectado a un graficador automático LKB 2210. Las fracciones que dieron lectura se colectaron y se dializaron contra glicerol; el volumen obtenido se distribuyó en alícuotas y se guardaron en refrigeración a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Previamente se titularon y se determinó su actividad enzimática.

La titulación del conjugado se realizó acoplando antígeno protéico de Salmonella typhi JM 1301 a los pozos inmulón II a una concentración creciente de 1 a 0.0001 mg/ml, en solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M, pH 9.6, y se desecaron en cámara de vacío toda la noche, al día siguiente se lavó con 200  $\mu\text{l}$  de PBS-BSA al 3 % en tres ocasiones, se incubó durante 2 hrs. a  $37^{\circ}\text{C}$ , en agitación continua, al término de las cuales se lavó nuevamente en 3 ocasiones y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  del conjugado diluido 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500 y 1:2000, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, fué lavado como se describió anteriormente, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de sustrato ortofenilendiamina (OPD), (Sigma St. Louis Mt. USA) incubándose durante 30 minutos y se paró la reacción con 100  $\mu\text{l}$  de ácido clorhídrico 2.5 M, se leyó la absorbancia a 492 nm en

lector de ELISA.

La actividad enzimática se valoró, diluyendo el conjugado 1:1000, se tomaron 20  $\mu$ l del conjugado agregandose a 3 ml de sustrato recién preparado (OPD) en un tubo de ensayo, la mezcla se incubó a temperatura ambiente. Y se fueron tomando 200  $\mu$ l de la mezcla a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, depositandolos en pozos de ELISA, a los que se les añadió 25  $\mu$ l de ácido clorhídrico 2.5 M, e inmediatamente leer a 492 nm en el lector de ELISA

Ensayo Inmunoenzimático Para Detección de Antígenos  
y/o Microorganismos del Género Salmonella:

Estandarización de la Técnica

Se hicieron pruebas para determinar las concentraciones óptimas, tanto de anticuerpos de captura como de los conjugados utilizados en este sistema. Para determinar la concentración óptima del anticuerpo peroxidado, se acoplaron a cada pozo 20  $\mu$ g de anticuerpo de captura en 100  $\mu$ l de solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M, pH 9.6, se desecó la placa en cámara de vacío y se siguió la metodología para el ensayo de ELISA como se describe más adelante, usando 50 ng de antígeno de Salmonella por pozo. Se agregó el anticuerpo peroxidado a diferentes diluciones ( 1:100, 1:500, 1:800, 1:1000, 1:1500, y 1:2000), en cada una de las concentraciones del conjugado se

incluyó un control negativo en el cual se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) 0.5 % en lugar del antígeno de Salmonella para evaluar la magnitud de la reacción de inespecificidad del sistema en cada una de las diluciones antes mencionadas.

La determinación de la concentración óptima del anticuerpo de captura se realizó en dos pasos; primero se evaluó con el antígeno protéico de Salmonella y en el segundo con la S. typhi JM 1301 completa. Para el antígeno de Salmonella se distribuyeron en cada pozo 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60  $\mu\text{g}$  del anticuerpo de captura en 100  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M, pH 9.6, se les agregó 6 ng de antígeno de Salmonella y el conjugado a una dilución 1:1000. Finalmente se agregó e incubó el sustrato durante 20 minutos a temperatura ambiente al cabo de los cuales se detuvo la reacción con ácido clorhídrico 2.5 N y posteriormente se leyó la densidad óptica a 492 nm. El blanco deberá ser entendido en todo el documento como aquel control negativo realizado de la siguiente manera: anticuerpo de captura 20  $\mu\text{g}$ /pozo, adicionado con BSA al 5% en PBS al 0.01 M pH 7.4, incubado durante 1 hora, al término de ésta se agregó el anticuerpo peroxidado diluido 1:1000 y se incubó una hora, para posteriormente revelar la reacción con el sustrato.

En el caso de las bacterias se acoplaron 15 y 20  $\mu\text{g}$  de anticuerpo de captura por pozo, la S. typhi se inoculó en 50 ml

de caldo soya tripticasa con 500  $\mu$ l de un cultivo de toda la noche, se incubó durante 3 hrs. en agitación continua a 37°C. Las células bacterianas se cosecharon por centrifugación a 2600 rpm, en una centrifuga Beckman refrigerada a 4°C, en condiciones de esterilidad. Las células bacterianas se resuspendieron en 10 ml de solución salina isotónica (0.87 %). Se leyó la mezcla en un espectofotómetro a 560 nm, se ajustó la dilución de ésta mezcla hasta tener una lectura de 0.2 nm que corresponde a una concentración aproximada de  $10^8$  bacterias/ml y se hicieron diluciones seriadas para tener una concentración final de  $10^4$  a  $10^7$  bacterias por ml. Se incluyeron controles sembrando 100  $\mu$ l de las diluciones con  $10^2$  y  $10^3$  bacterias/ml, en cajas de petri con agar soya tripticasa y se contó al día siguiente el número de colonias que crecieron por cada dilución. Para el ensayo de ELISA se usaron las concentraciones de  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , y  $10^7$  bacterias por pozo las cuales se llevaron a ebullición en baño de agua durante 20 minutos, se colocaron en baño de hielo para acelerar su enfriamiento, se tomaron 100  $\mu$ l para añadirse a cada pozo, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y posteriormente se agregó el conjugado a una dilución 1:1000.

#### Sensibilidad y Especificidad

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la

prueba, se utilizaron las siguientes Salmonellas: S. typhi JM 1301, S. typhimurium, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. cholerasuis, S. panamá, S. newport, S. anatum. Se probaron también algunas Salmonellas obtenidas de pacientes reportados por el laboratorio como; salmonella grupo B, salmonella grupo D, y salmonella grupo III. Además de las siguientes enterobacterias: Shigella boydii, Shigella flexneri, Echerichia coli, Klebsiella sp, Pseudomona aureoginosa, Serratia sp, Citrobacter, Proteus mirabilis, Providencia, Enterobacter, Yersinia, Edwardsiella, y Vibrio. El procedimiento que se siguió para realizar la técnica de ELISA para cada una de estas bacterias fué similar al anteriormente descrito para la bacteria sola.

#### Selección del Medio de Cultivo y Determinación del

##### Tiempo de Incubación.

Para tal fin se procedió a crecer en caldo soya tripticasa una asada de S. typhi JM 1301, al día siguiente se tomó 1 ml del medio, donde había crecido la bacteria y se pasó a 50 ml de caldo soya tripticasa, el cual se incubó durante tres horas a 37°C en agitación al término de las cuales se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos, se decantó la muestra y el botón fué resuspendido en 10 ml de solución salina isotónica 0.87 % y se ajustó la dilución hasta obtener una lectura en el

espectrofotómetro igual a 0.2 que corresponde a una concentración aproximada de  $10^8$  bacterias/ml y hacer diluciones seriadas para tener una concentración de 10, 100,  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^6$  bacterias que se agregaron a 6 ml de caldo selenito o caldo tetratiónato, simultáneamente se colocó en el interior de cada tubo de ensayo un isótopo con muestra de materia fecal, y un tubo únicamente con muestra de heces, para descartar una reacción de inespecificidad. Un precultivo se incubó durante 6 horas y otro durante 16 horas (toda la noche) a  $37^{\circ}\text{C}$ , para después centrifugar la muestra a 2500 rpm durante 20 minutos y resuspender el sedimento en 1 ml de solución salina isotónica 0.87% y calentar a ebullición en baño de agua durante 20 minutos. Se tomaron 100  $\mu\text{ml}$  de la muestra y se depositaron en cada pozo, incubando durante una hora a temperatura ambiente en agitación, posteriormente se agregó el anticuerpo peroxidado diluido 1:1000 el cual se incubó en las mismas condiciones antes mencionadas y se añadió el sustrato. A los 20 minutos se paró la reacción con ácido clorhídrico 2.5 N. Estos ensayos también sirvieron para evaluar la sensibilidad y especificidad del sistema en la detección de la S. typhi la cual se añadió al cultivo, inoculado con la muestra de heces.

#### Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se distribuyeron 0.01 mg de Igs vs. S. typhi por pozo, en solución amortiguadora de bicarbonato 0.05 M pH 9.6, en pozos



removibles Inmunolón II, y se desecaron en cámara de vacío para conservarlos posteriormente en refrigeración a 4°C hasta su utilización. En el momento de usarlos se lavaron tres veces con PBS-tween y se bloquearon con PBS-tween-BSA 3% (PBS pH 7.4, 0.01 M), se incubaron a 37°C, durante 1 hora, al cabo de la cual se procedió nuevamente a lavar con PBS-tween tres veces, se agregaron 0.1 ml de la muestra problema. Además se usó un pozo como control positivo (S. typhi) y como control negativo un pozo con anticuerpo de captura incubado con BSA 0.5% y otro que se acopló únicamente con BSA 1 %. Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, en agitación (agitador Orbit Sttaker). Se lavaron nuevamente con PBS-tween en tres ocasiones como se describió anteriormente, se agregó 0.1 ml de anticuerpo peroxidado anti-S. typhi, procediendo a incubarlo 1 hora a temperatura ambiente en agitación, se hizo un último lavado en tres ocasiones con PBS-tween, para agregar 0.1 ml de sustrato, el cual consistió en una solución amortiguadora de citratos pH 5 adicionada de 0.4 mg de Ortofenilendiamina y 0.04 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, recién preparada. Se incubaron durante 20 minutos y bloquearon con una solución de HCL 2.5 M para finalmente leerse a una longitud de onda a 490 nm en un espectrofotómetro (Minireader II, Dynatech INC. Alexandria, Va. USA).

Criterios de Inclusión de los Pacientes.

La selección de pacientes para ser incluidos en el estudio se realizó por medio de el cuadro clínico que presentó cada uno de los enfermos al momento de ser atendidos en el servicio de urgencias, tanto de adultos como de niños del hospital, que presentaron: fiebre elevada, cefalea, dolor abdominal, con diarrea o estreñimiento y que cuando menos presentaran la combinación de 2 o más de estos datos asociados con alguno o algunos de los siguientes: mal estado general, mialgias, artralgias, fotofobia, cuadros repetitivos o antecedente de cuadro de diarrea.

#### Obtención de Muestras y Pretratamiento

La sangre, orina y heces, se obtuvieron por métodos convencionales y se sometieron a precultivo para incrementar el número de microorganismos de dichas muestras.

El procesamiento de muestras en pacientes con sospecha clínica de salmonellosis o fiebre tifoidea se hizo con cultivos de sangre, obteniendose por punción venosa, en caldo peptona (vacutainer), en proporción 1 a 11 ml y se incubaron a 37°C toda la noche. La muestra de heces se tomó con dos isópos rectales en medio de transporte de Stuart y posteriormente, uno se sembró en medios para enterobacterias; MacConkey, Tergitol y XLD (bioxón de México S.A.). El otro isópo se inoculó en caldo selenito para el ELISA, incubándose a 37°C toda la noche.

Para la muestra de orina se solicitó al paciente una

muestra del chorro urinario a la mitad de la micción en un frasco estéril, del cual se tomó 1 ml y se colocó en 6 ml de caldo selenito para incubarse a 37°C toda la noche. Para el control se hizo un urocultivo, esta muestra se sembró en MacConkey y Agar sangre (bioxón). Los precultivos en caldo selenito (orina y heces) se centrifugaron a 2,500 rpm durante 20 minutos, se resuspendió el botón en 1 ml de PBS, pH 7.4, 0.01 M y se sometió a ebullición durante 20 minutos, (se tomaron 0.1 ml para la ELISA). Para la muestra del hemocultivo se tomaron 5 ml del cultivo, depositándolos en un tubo de ensayo y se procesó la muestra como se describió anteriormente para los precultivos en selenito.

A la mayoría de los pacientes se les realizó coprocultivo y/o hemocultivo y en algunos casos urocultivo. Además se trataron de complementar estos estudios con la realización de las pruebas de reacciones febriles y biometría hemática. Estos dos últimos estudios fueron tomados cuando hubo cooperación por parte del paciente o su condición clínica y edad lo permitieron. Finalmente se realizó una historia clínica para integrar el diagnóstico clínico en cada enfermo.

#### Análisis Estadístico

Para la estadística se usó la prueba de U de Mann-Whitney que compara el valor medio entre dos muestras independientes.

Los índices de sensibilidad, especificidad, exactitud, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, de la técnica de ELISA, fueron calculados de la siguiente manera: sensibilidad,  $[ a/(a+c) ] \times 100$ ; especificidad,  $[ d/(b+d) ] \times 100$ ; exactitud,  $[ (a+d)/(a+b+c+d) ] \times 100$ ; valor predictivo positivo,  $[ a/(a+b) ] \times 100$ ; valor predictivo negativo,  $[ d/(c+d) ] \times 100$ , mientras que;  $a$  representa el número de muestras verdaderas positivas,  $b$  es el número de muestras falsas positivas,  $c$  es el número de falsas negativas y  $d$  es el número de verdaderas negativas.

Para establecer un diagnóstico de fiebre tifoidea o salmonellosis, únicamente se consideró como criterio diagnóstico el resultado del hemocultivo positivo a S. typhi, o el del coprocultivo o del urocultivo positivo a una especie de salmonella.

## RESULTADOS

### Estandarización de la Prueba de ELISA.

La determinación de las condiciones estandar para cada paso del ensayo inmunoenzimático fueron realizadas por titulación de las concentraciones adecuadas del anticuerpo de captura y el peroxidado. Las condiciones óptimas seleccionadas, fueron aquellas que presentaron la máxima sensibilidad de la prueba en los ensayos in vitro y que mostraron ser los adecuados para su utilización en el campo clínico con fines diagnósticos. Los resultados mostraron que la dilución que mejor funcionó para el anticuerpo peroxidado fué la de 1:1000 ya que se obtienen lecturas claramente positivas, con un fondo mínimo evaluado en los pozos controles, los cuales no rebasaron una lectura de 0.13 de densidad óptica en promedio (Figura 1).

A continuación se evaluó la concentración óptima del anticuerpo de captura, para el antígeno protéico y se encontró que la concentración para el anticuerpo de captura fluctuaba entre 15 y 20  $\mu\text{g/pozo}$  (Figura 2), por lo que posteriormente se realizaron experimentos con la bacteria completa para determinar la concentración a

# CURVA DOSIS RESPUESTA DEL Ac PEROXIDADO

61

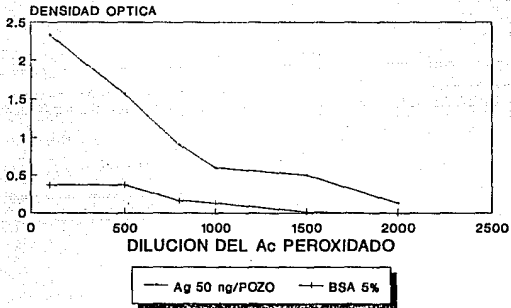


Figura 1

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL Ac DE CAPTURA

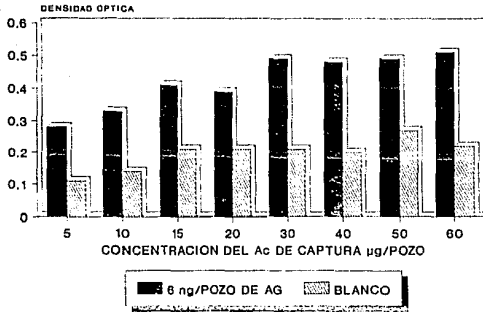


Figura 2

utilizar en el ensayo clínico (ver más adelante).

Finalmente para evaluar las concentraciones óptimas de ambos anticuerpos, así como la sensibilidad del ensayo, se realizó una curva dosis respuesta evaluando tres diferentes concentraciones del anticuerpo de captura (figura 3). Y se encontró que la concentración de 20  $\mu\text{g/pozo}$ , era la concentración más adecuada para el anticuerpo de captura, y del anticuerpo peroxidado la dilución de 1:1000, para ser utilizados en la prueba de ELISA. Con un tiempo de incubación de 1 hora a temperatura ambiente en agitación, tanto para el antígeno, como para la unión del peroxidado. Además se encontró que los anticuerpos una vez acoplados a los pozos, pueden ser almacenados a 4°C y permanecer las placas, de esta manera durante un mes sin alterar la capacidad de unión del antígeno al anticuerpo.

El siguiente paso a evaluar fué determinar si las concentraciones encontradas para la prueba usando antígeno protéico de salmonella era las mismas al usar la bacteria completa, (figura 4) y en este caso se encontró que la concentración de 20  $\mu\text{g/pozo}$  era la más adecuada. Finalmente se evaluó nuevamente el anticuerpo peroxidado, pero ahora con la bacteria completa (figura 5). Corroborandose que la dilución 1:1000 era la más adecuada para el ensayo, debido



CURVA DOSIS RESPUESTA PARA EVALUAR LA <sup>64</sup>  
CONCENTRACION OPTIMA DEL Ac DE CAPTURA

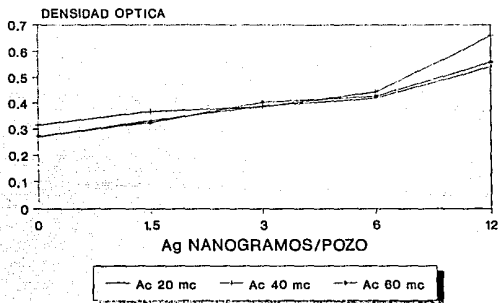


Figura 3

# DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL Ac DE CAPTURA

65

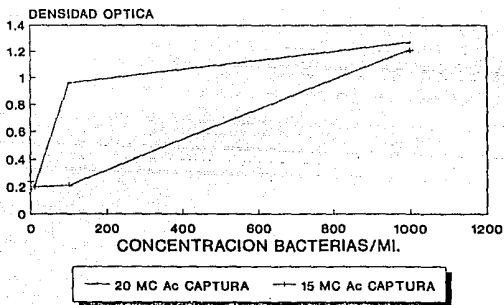


Figura 4

# DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL Ac PEROXIDADO

66

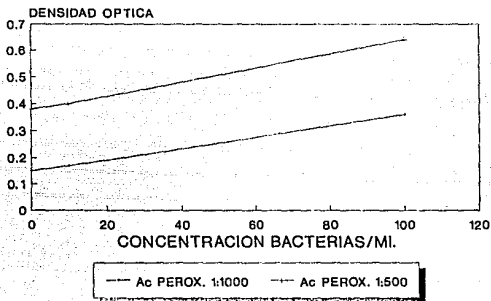


Figura 5

a que la dilución 1:500 incrementaba demasiado el fondo (background) del blanco.

Basados en los resultados anteriormente presentados, se procedió a determinar cual era el medio de cultivo más apropiado para el precultivo de la muestra de heces y orina, así como el tiempo mínimo de incubación del mismo y evaluar el número de bacterias por ml que era capaz de detectar la prueba. En primer término se evaluó una muestra de heces adicionadas con S. typhi, y se encontró que el período de incubación de 6 horas fué poco satisfactorio ya que se obtuvieron lecturas positivas a partir de haber colocado 10 mil bacterias a la muestra en caldo selenito y en las incubadas en caldo tetracionato no hubo evidencia de haber logrado crecimiento alguno (figura 6). Por lo tanto se decidió incrementar el período de incubación a 16 horas (toda la noche), para este segundo ensayo se observó que el caldo selenito fué el medio de cultivo de elección para las heces, ya que permitía la detección a partir de 10 bacterias/ml adicionadas al medio de cultivo, mientras que en el caldo tetracionato nuevamente no hubo desarrollo de la salmonella (figura 7).

También se experimentó con orina, desarrollandose el ensayo en similitud de condiciones que para las heces. Se observó nuevamente que el selenito era el medio más adecuado

PRECULTIVO INCUBADO 6 HORAS  
HECES ADICIONADAS CON S. TYPHI

68

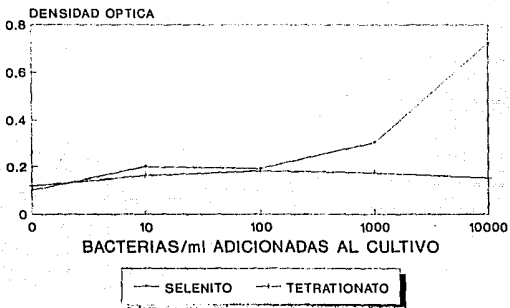


Figura 8

PRECULTIVO INCUBADO 16 HORAS  
HECES ADICIONADAS CON S. TYPHI

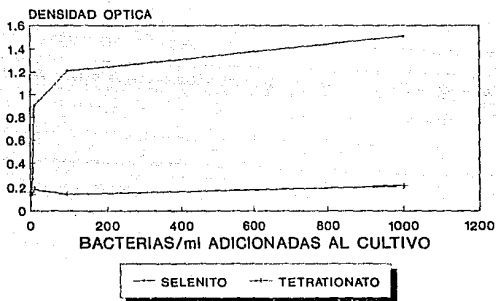


Figura 7

ya que fué posible obtener lecturas positivas a 2.5 de densidad óptica, en el precultivo al cual se le habían adicionado 5 bacterias por ml y en caldo tetrionato no hubo desarrollo (figura 8).

En la evaluación de los precultivos con sangre incubados durante 16 horas se encontró que el ensayo de ELISA detectaba desde 5 bacterias ml adicionadas al cultivo (figura 9).

El valor de corte para considerar negativa la prueba se realizó tomando en cuenta la media aritmética y el percentil 95, de los controles negativos (blanco) de 105 experimentos diferentes y se encontró que la media era de; 0.12 con una desviación estandar de;  $\pm 0.07$  y un valor de 0.25 en el percentil 95, por lo que se consideró negativo todo aquel resultado igual o inferior a 0.25 de densidad óptica (Tabla 1).

PRE CULTIVO INCUBADO 16 HORAS  
ORINA ADICIONADA CON S. TYPHI

71

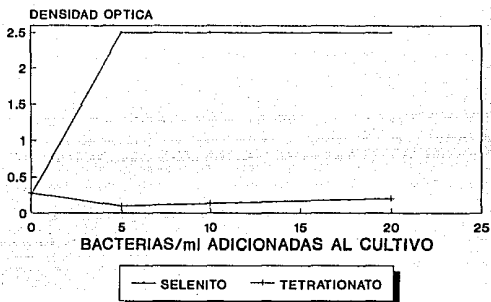


Figure 8



PRECULTIVO INCUBADO 16 HORAS  
SANGRE ADICIONADA CON S. TYPHI

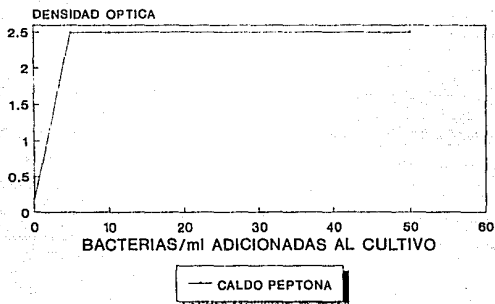


Figura 9

NUMERO DE OBSERVACIONES	MEDIA      DS	PERCENTIL 95
105	0.12    ± 0.07	0.25

Tabla 1. Determinación del valor de corte para el blanco en la prueba de ELISA.

Abreviaturas: DS: desviacion estandar.

### Sensibilidad y Reproducibilidad de la Prueba de ELISA.

Esta se analizó por la elaboración de una curva dosis-respuesta al antígeno protéico de S. typhi, las cuales se evaluaron por la realización de 27 ensayos diferentes, usando el antígeno y la S. typhi.

La sensibilidad del ensayo de ELISA se analizó por medio de la prueba U Mann-Whitney, la cual mostró que el ensayo era capaz de detectar antígeno protéico de Salmonella a una concentración tan pequeña de 1.5 a 100 ng/pozo y fué estadísticamente significativo con una  $P < 0.05$  para  $\alpha = 0.05$ , para cada una de las concentraciones de antígeno evaluadas.

Las bacterias también fueron evaluadas y se encontró que era estadísticamente significativo, a partir de 10,000 bacterias a 1 millón de bacterias que fué la máxima concentración evaluada, con una  $P < 0.000002$  y una  $\alpha = 0.05$  para cada una de las concentraciones.

La reproducibilidad fué valorada por medio de el coeficiente de variación (CV) de los valores de absorbancia obtenidos, al leer la densidad óptica a 492 nm, de las diferentes concentraciones del antígeno protéico de salmonella typhi. Se encontró que la variación

en el coeficiente fué para el valor mínimo de 1.9% a un máximo de 7.4%, con un coeficiente de variación promedio de 5.8% (tabla 2), para toda los rangos de concentración analizados.

TABLA 2. Reproducibilidad de la prueba de ELISA.

concentración Antígeno ng/ml	Valores de absorbancia X ± DS		% CV
0	0.26	0.02	7.4
15	0.33	0.01	3
30	0.38	0.02	5
60	0.42	0.02	4.7
120	0.54	0.04	7.4
250	0.71	0.05	7
500	1.02	0.02	1.9

Abreviaturas: X; media aritmética, CV; coeficiente de variación DS: desviación estandar.

### Especificidad.

Se evaluó con las bacterias completas en un rango de concentración de mil a un millón de bacterias/pozo. En un total de 20 ensayos diferentes fueron evaluadas 10 cepas de Salmonellas, las cuales siempre fueron comparadas contra S. typhi, para determinar el grado de reacción cruzada entre estas cepas, se construyó una curva dosis respuesta, y se encontró que todas las salmonellas evaluadas presentaron reacción cruzada en el ensayo de ELISA aún cuando en diferente grado. La S. typhi, S. grupo III, S. grupo B, S. grupo D, y S. Panamá, fueron detectadas desde una concentración de 10 mil bacterias/pozo, en un rango de lecturas de densidad óptica de 0.28 a 0.47. S. typhimurium, S. paratyphi B, S. paratyphi A, S. cholerasuis; se detectaron a una concentración de 100 mil bacterias/pozo en un rango de densidad óptica de 0.29 a 0.56. S. newport, S. anatum, fueron detectadas a partir de una concentración de un millón de bacterias/pozo en un rango de densidad óptica de 0.38 a 0.40, respectivamente. Por lo que se consideró que era factible su utilización en el campo clínico (tabla 3).

También se evaluó la reacción cruzada con otras

enterobacterias, a diferentes concentraciones partiendo de mil hasta un millón de bacterias/pozo, utilizando 12 diferentes especies de bacterias. Con ninguna de las enterobacterias hubo reacción cruzada aún cuando la concentración de bacterias fuera de un millón, ya que todas las lecturas encontradas fueron negativas en un rango de 0.06 a 0.17 (tabla 4).

Tabla 3. Evaluación de la reacción cruzada con otras salmonellas aisladas de enfermos.

ESPECIE	BLANCO					BACTERIAS POR POZO				
	0	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	0	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
S. TYPHI JM	0.08	0.12	0.28	0.88	2.19	0.08	0.12	0.28	0.88	2.19
S. GRUPO B	0.15	0.19	0.35	0.74	0.97	0.15	0.19	0.35	0.74	0.97
S. GRUPO III	0.13	0.20	0.34	0.71	1.10	0.13	0.20	0.34	0.71	1.10
S. GRUPO D	0.14	0.24	0.47	0.71	1.03	0.14	0.24	0.47	0.71	1.03
S. TYPHIMURIUM	0.07	0.06	0.12	0.38	1.03	0.07	0.06	0.12	0.38	1.03
S. NEWPORT	0.10	0.09	0.13	0.19	0.38	0.10	0.09	0.13	0.19	0.38
S. PARATYPHI B	0.09	0.10	0.17	0.56	1.19	0.09	0.10	0.17	0.56	1.19
S. CHOLERASUIS	0.06	0.05	0.10	0.29	1.76	0.06	0.05	0.10	0.29	1.76
S. PARATYPHI A	0.09	0.11	0.12	0.33	0.42	0.09	0.11	0.12	0.33	0.42
S. ANATUM	0.08	0.08	0.06	0.10	0.40	0.08	0.08	0.06	0.10	0.40
S. PANAMA	0.05	0.10	0.32	1.15	2.14	0.05	0.10	0.32	1.15	2.14

Los valores de esta tabla representan las lecturas promedio de densidad óptica, obtenidas en cada uno de los rangos de concentración de las bacterias.

Tabla 4. Evaluación de la reacción cruzada, de la prueba de ELISA, contra algunas enterobacterias.

ESPECIE	0	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
S. TYPHI JM	0.08	0.12	0.28	0.88	2.19
SHIGELLA FLEXNERI	0.13	0.13	0.14	0.12	0.16
KLEBSIELLA SP.	0.08	0.07	0.09	0.09	0.06
PSEUDOMONA SP.	0.07	0.07	0.08	0.08	0.11
SERRATIA SP.	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07
ESCHERICHIA COLI	0.09	0.08	0.09	0.09	0.11
PROTEUS MIRABILIS	0.11	0.08	0.14	0.13	0.14
PROVIDENCIA SP.	0.09	0.05	0.05	0.05	0.08
ENTEROBACTER SP.	0.08	0.06	0.11	0.11	0.11
YERSINIA SP.	0.09	0.05	0.08	0.08	0.17
VIBRIO SP.	0.09	0.07	0.07	0.07	0.09
EDWARSIELLA SP.	0.07	0.05	0.05	0.05	0.10
CITROBACTER SP.	0.07	0.08	0.06	0.07	0.11

Los valores de esta tabla representan lecturas promedio de densidad óptica, obtenidas de cada uno de las concentraciones de las bacterias evaluadas.



#### Parámetros clínicos evaluados.

Fueron captados en el estudio un total de 118 pacientes de los cuales se dividieron de la siguiente manera según el diagnóstico establecido: 21 con salmonellosis, 6 con fiebre tifoidea, 7 con shigellosis, 14 con síndrome febril, 58 con gastroenteritis, 6 con colitis y 6 más que fueron agrupados bajo el rubro de otros para facilitar la presentación en tablas, que incluyeron las siguientes enfermedades: infección de vías urinarias 2, apendicitis 1, tuberculosis meníngea 1, septicemia 1, colelitiasis 1.

La sintomatología encontrada entre los pacientes presentó poca variación de acuerdo a los diferentes diagnósticos establecidos por clínica. En la tabla 5 se presentan los datos de edad y sexo agrupados por diagnóstico. En relación a la edad se encontró que el promedio de esta para toda la muestra fué de 27.2 años con una desviación estandar (DS), de  $\pm 17.26$  y un rango de edades de 6 meses a 90 años. En la muestra un total de 70 pacientes fueron del sexo femenino y 48 del masculino.

Tabla 5. Datos clínicos obtenidos de los pacientes incluidos en el estudio y agrupados de acuerdo al diagnóstico clínico.

	A	B	C	D	E	F	OTROS
EDAD *FEM	11.5	15	21.2	24.6	32.5	26.3	31.5
^MAS	21	35.3	17.5	20.6	24.1	46	25.4
SEXO FEM	10	3	4	11	35	3	4
MAS	11	3	3	3	23	3	2

Abreviaturas: \*edad promedio de los pacientes del sexo femenino, ^ edad promedio de los pacientes del sexo masculino, A; salmonellosis, B; fiebre tifoidea, C; shigellosis, D; síndrome febril, E; gastroenteritis, F; colitis, Otros; septicemia, apendicitis, tuberculosis meningea, colelitiasis e infección de vías urinarias.

El tiempo promedio de evolución de la enfermedad al llegar al hospital fué de 9 días, el síntoma de fiebre se encontró en 99 enfermos de los 118 individuos que participaron en el estudio, la cefalea se encontró en 95 y el dolor abdominal en 100 pacientes, en la tabla 6 se presentan estos datos desglosados por diagnóstico. De los pacientes con fiebre tifoidea todos presentaron fiebre elevada y cefalea de tipo continuo y sorda. Y solo 4 dolor abdominal. Dentro del grupo con salmonellosis la fiebre estuvo presente en 19, la cefalea en 15 y el dolor abdominal en 17.

De las alteraciones en el tránsito intestinal; la diarrea fué el síntoma predominante con un total de 83 casos y el estreñimiento se encontró en 26 pacientes, 9 enfermos no reportaron alteración alguna en las evacuaciones. En los pacientes con salmonellosis predominó la diarrea con un total de 19 casos y un tiempo promedio de duración de 12 días. El estreñimiento se presentó en 2 casos. Entre los pacientes con fiebre tifoidea; 2 presentaron estreñimiento, 1 diarrea y 3 reportaron evacuaciones de características normales (tabla 7).

La fotofobia se presentó en 47 pacientes y dentro del grupo con fiebre tifoidea se encontró en 3 únicamente, y en 7 de los enfermos con salmonellosis.

La hipersensibilidad y el surrismo palpable se presentó en 1 paciente con fiebre tifoidea, estos datos y algunos otros relacionados con signos y síntomas en los pacientes se presentan en las tablas 8 y 9.

Tabla 6. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio, agrupados por diagnósticos.

SIGNOS Y SINTOMAS	A	B	C	D	E	F	OTROS
* DIAS DE EVOLUCION	12	8.6	12.4	6.2	8.03	7	19
VESPERTINA	14	6	5	12	38	3	0
FIEBRE CONTINUA	5	0	2	1	6	1	0
CEFALEA	15	6	6	11	44	6	0
CONTINUA	11	6	6	10	35	4	0
SORDA	9	5	4	3	29	3	0
DOLOR ABD.	17	4	7	11	52	4	4
TIPO COLICO	12	3	4	7	40	3	4

Abreviaturas: A; salmonellosis, B; fiebre tifoidea, C; shigellosis, D; síndrome febril, E; gastroenteritis, F; colitis, OTROS; septicemia, tuberculosis meningea, apendicitis, infección de vías urinarias, colelitiasis. \*: tiempo promedio.

Tabla 7. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio, agrupados por diagnósticos.

SIGNOS Y SINTOMAS	A	B	C	D	E	F	OTROS
ESTREÑIMIENTO	2	2	0	11	0	4	4
DIARREA	19	1	6	2	58	1	2
*EVACUACIONES	4.7	4	6	0	4.7	0	0
SEMILÍQUIDAS	10	0	2	0	33	1	2
LÍQUIDAS	9	1	1	1	21	0	0
MOCO	5	0	3	0	19		0
SANGRE	1	0	2	0	7	0	0
FETIDAS	13	1	3	3	32	0	2

Abreviaturas: \*: No de evacuaciones en promedio, A; salmonellosis, B; fiebre tifoidea, C; shigellosis, D; síndrome febril, E; gastroenteritis, F; colitis, OTROS; septicemia, tuberculosis meningea, coleditiiasis, apendicitis, infección de vías urinarias.

Tabla 8. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio, agrupados por diagnósticos.

SIGNOS Y SINTOMAS	A	B	C	D	E	F	OTROS
FOTOFOBIA	7	3	5	6	25	1	0
MIALGIAS	7	3	2	8	30	5	0
ARTRALGIAS	7	3	2	8	30	5	0
ANOREXIA	8	3	1	6	12	2	0
NAUSEAS	5	2	3	3	20	3	0
VOMITO	4	1	2	1	14	1	0

Abreviaturas: A; salmonellosis, B; fiebre tifoidea, C; shigellosis, D; síndrome febril, E; gastroenteritis, F; colitis, OTROS; septicemia, tuberculosis meningea, apendicitis, infección de vías urinarias, colelitiasis.

Tabla 9. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio, agrupados por diagnósticos.

SIGNOS Y SINTOMAS	A	B	C	D	E	F	OTROS
* INEXPRES.	5	2	0	2	9	0	0
BRADICARDIA	1	2	0	0	2	0	0
^ HIPERSENS.	9	1	4	2	26	2	2

Abreviaturas: \*: inexpresividad, ^: hipersensibilidad abdominal, A; salmonellosis, B; fiebre tifoidea, C; shigellosis, D; síndrome febril, E; gastroenteritis, F; colitis, OTROS; septicemia, apendicitis, tuberculosis meningea, colelitiasis, infección de vías urinarias.

El examen de reacciones febriles se realizó en 100 de los 118 pacientes evaluados y se encontró un alto índice de resultados positivos a esta prueba. Se consideró como resultado positivo aquel que se reportó con un título mayor de 1:80 para el antígeno O, y se encontró positiva a este título en 41 de los enfermos evaluados con esta prueba. En los pacientes del grupo con fiebre tifoidea unicamente se encontraron positivas en 4 de 5 pacientes a los cuales se les realizó el estudio (tabla 10 y figura 10).

Tabla 10. Resultados de las reacciones febriles realizadas a los pacientes, agrupados por diagnósticos.

	A		B		C		D		E		F		OTROS	
	O	H	O	H	O	H	O	H	O	H	O	H	O	H
POSITIVAS	4	2	4	3	3	2	4	1	18	11	6	5	2	2
NEGATIVAS	6	8	1	2	3	4	9	12	32	39	4	5	4	4

Abreviaturas: O; antígeno O positivo a un título mayor de 1:80, H; antígeno H positivo a un título mayor de 1:40, A; salmonellosis, B; fiebre tifoidea, C; shigellosis, D; síndrome febril, E; gastroenteritis, F; colitis, OTROS; septicemia, tuberculosis meníngea, apendicitis, infección de vías urinarias, coledolitiasis.

### REACCIONES FEBRILES POSITIVOS VS NEGATIVOS

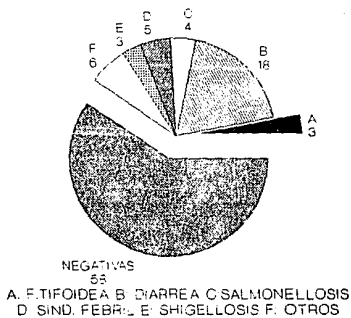


Figura 10



La biometría hemática, se realizó en 98 de los 160 pacientes evaluados, de los cuales en 54 no hubo alteración alguna y en 39 enfermos se encontró alguna alteración del tipo: anemia, leucopenia o leucocitosis. En 11 enfermos se presentó leucopenia, en 8 anemia y en 25 leucocitosis. En el grupo de pacientes con fiebre tifoidea se presentó un caso de anemia, y en el de salmonellosis se encontraron 6 con leucopenia y 4 con anemia. Entre los enfermos de shigellosis el dato predominante fué la leucocitosis que se presentó en 5 de ellos (tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la biometría hemática, agrupados por diagnósticos, de los 93 pacientes evaluados con este estudio.

DIAGNOSTICO	BIOMETRIA			ANEMIA	LEUCOPENIA	LEUCOCITOSIS
	*N	AN	NR			
SALMONELLOSIS	6	13	2	4	6	6
FIEBRE TIFOIDEA	3	1	2	1	0	0
SHIGELLOSIS	1	5	1	0	0	5
SINDROME FEBRIL	8	5	1	2	1	3
GASTROENTERITIS	29	12	17	1	4	7
COLITIS	2	2	2	0	0	2
OTROS	4	1	1	0	0	1

Abreviaturas: \*N; resultado normal, AN; resultado anormal, NR; estudio no realizado, OTROS; apendicitis, tuberculosis meningea, coleditiiasis, infección de vías urinarias, y septicemia.

En los resultados de los cultivos se encontró que de 117 coprocultivos realizados, hubo 20 positivos a diferentes salmonellas, 2 positivos a S. typhi. Se realizaron 88 hemocultivos de los cuales unicamente se encontraron 4 positivos a S. typhi. Asimismo hubo la oportunidad de realizar 2 mielocultivos de los cuales uno fué positivo. Y finalmente de los urocultivos solamente hubo un resultado positivo, reportado como salmonella sp., por lo que este paciente fué colocado en el grupo de salmonellosis (tablas 12, 13, 14, 15).

#### Prueba de ELISA en los Enfermos.

Las muestra con un índice de absorbancia  $\leq$  de 0.25 fueron considerados negativos y aquellas con un índice de absorbancia  $>$  de 0.25 se tomaron como positivos. Se evaluaron por la técnica de ELISA 88 muestras de hemocultivo de las cuales 6 se encontraron positivas: 5 muestras positivas tanto para el ensayo de ELISA como para el hemocultivo, y 1 positiva por ELISA y negativa en el hemocultivo. De los coprocultivos se analizaron un total de 117 muestras de las cuales hubo 33 positivas en la prueba de ELISA, con 22 positivas para ambos análisis, y 11 positivas por ELISA y negativas para el coprocultivo.

El urocultivo se realizó únicamente en 6 pacientes, se encontró un positivo para la ELISA y el cultivo y en el resto de los pacientes ambos análisis fueron negativos. Estos resultados se presenta en la figura 11 y 12, mostrando el índice de absorbancia para cada una de las muestras obtenidas, en los siete diferentes grupos formados de acuerdo al diagnóstico. El nivel de corte para considerar positivo un examen de ELISA fué explicado anteriormente en el documento. Sin embargo el criterio para establecer el diagnóstico de fiebre tifoidea o salmonellosis únicamente se tomó en cuenta el resultado positivo del hemocultivo o del coprocultivo a alguna especie de Salmonella. Teniendo que la positividad de la prueba de ELISA en el grupo de pacientes de fiebre tifoidea fué 6 de 6, en el de salmonellosis de 21 de 21, entre los que presentaron gastroenteritis hubo 8 positivos de 58 enfermos y entre los de colitis 1 de 6, de los mencionados como otros se encontraron 2 positivos de 6, en entre los demás grupos de padecimientos no hubo resultados positivos, para el ensayo de ELISA.

Por otra parte el número de pacientes que al ingresar al estudio, estaban recibiendo tratamiento a base de algún antibiótico fué de 32 y los que no recibieron tratamiento

alguno fué de 86 enfermos. Estos datos se presentan en la tabla 16, donde se observa que 9 de 21 pacientes recibieron antibiótico en el grupo de pacientes con salmonellosis y 4 de 6 pacientes con fiebre tifoidea, si bien algunos de los antibióticos que recibieron los enfermos no son de elección para la Salmonella, en todos estos se logró el aislamiento de la bacteria.

Tabla 12. Especies aisladas de Salmonella en el coprocultivo en el grupo de pacientes con salmonelosis (21 pacientes).

ELISA		COPROCULTIVO	NO.	HEMOCULTIVO			WIDAL		
POS	NEG			POS	NEG	NR	POS	NEG	NR
21		Salmonella entérica		0	6	15	4	7	10
		subespecie entérica:							
		grupo B.	11						
		grupo C.	1						
		grupo C2.	1						
		grupo D.	4						
		grupo E.	3						
		salmonella sp.	1						

Abreviaturas: POS; resultado positivo, NEG; resultado negativo, NR; examen no realizado.

Tabla 13. Grupo de pacientes con fiebre tifoidea (6 pacientes).

ELISA	HEMOCULTIVO	NO.	COPROCULTIVO	NO.	WIDAL		
POSITIVO					POS	NEG	NR
6	Salmonella typhi	4	Salmonella typhi	2	3	2	1

Abreviaturas: NO; número de aislamientos de la bacteria. POS; resultado positivo, NEG; resultado negativo, NR; examen no realizado.

Tabla 14. Grupo de pacientes con shigelosis.

ELISA	COPROCULTIVO	NO.	HEMOCULTIVO			WIDAL		
NEGATIVO			POS	NEG	NR	POS	NEG	NR
7	Shigella flexneri	5	0	4	3	3	3	1
	Shigella boydii	2						

Abreviaturas: NO; número de aislamientos de la bacteria, POS; resultado positivo, NEG; resultado negativo, NR; examen no realizado.

Tabla 15. Gérmenes aislados en el coprocultivo de los pacientes con diagnóstico de gastroenteritis, síndrome febril, colitis, apendicitis, coleditiiasis, tuberculosis meningea, infección de vías urinarias.

ELISA		CORPOCULTIVO	^NO.	HEMOCULTIVO			WIDAL		
POS	NEG			POS	NEG	NR	POS	NEG	NR
1	5	Escherichia coli	6	6*			4	2	
1	10	Escherichia coli Proteus sp.	11	4	7		5	5	1
1	6	Escherichia coli Enterobacter sp.	7	5	2		2	4	1
	1	Enterobacter sp.	1	1			1		
1	14	Escherichia coli Klebsiella sp.	15	8	7		4	10	1
1	6	Escherichia coli Citrobacter sp.	7	5	2		1	5	1
	2	Escherichia coli Pseudomona sp.	2	2			1	1	
	12	Proteus sp. Klebsiella sp.	12	9	3		5	6	1
1	2	Proteus sp. Pseudomona sp.	3	2	1		1	2	
2	1	Prcteus sp. Citrobacter sp.	3	1	2		1	2	
2	5	Klebsiella sp. Enterobacter sp.	7	7			2	4	1
	2	Klebsiella sp. Citrobacter sp.	2	2			1	1	
1	3	Pseudomona sp.	4	1	3		1	1	2
	2	Citrobacter sp. Enterobacter sp.	2	1	1		2		
	1	Citrobacter sp.	1	1			1		

Abreviaturas: ^NO; número de aislamientos en cada combinación de bacterias reportadas por el laboratorio. \*NEG; el germen reportado en el hemocultivo fué: Streptococcus sp., Staphylococcus sp. coagulasa negativa. POS; resultado positivo, NEG; resultado negativo, NR; examen no realizado.





DIAGRAMA DE DISPERSION DEL  
ENSAYO DE ELISA CON HECES

INDICE DE ABSORCION

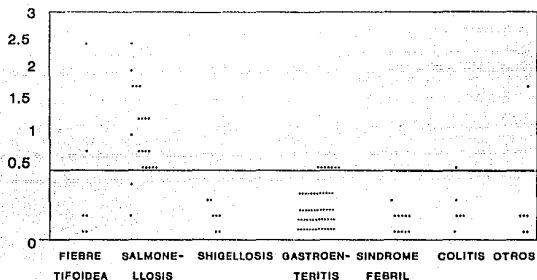


Figura 12

Tabla 16. Pacientes que recibieron tratamiento previo a la toma de la muestra para el cultivo.

DIAGNOSTICO	TRATAMIENTO		ANTIBIOTICO:
	NO	SI	
SALMONELLOSIS	12	9	penicilina 2, ampicilina 3, amikacina 4, furazolidona 1, trimetoprim con sulfametoxazol 4, metronidazol 1, vancomicina 1, gentamicina 1, kanamicina 1, ketoconazol 1.
FIEBRE TIFOIDEA	2	4	eritromicina 1, cloranfenicol 1, trimetoprim con sulfametoxazol 2, furazolidona 1.
SHIGELLOSIS	7	0	
SINDROME FEBRIL	11	3	ampicilina 1, penicilina 1, acido nalidixico 1, gentamicina 1.
GASTROENTERITIS	44	14	trimetoprim con sulfametoxazol 5, penicilina 1, ampicilina 3, cloranfenicol 2, furazolidona 1, metronidazol 3, diyodhidroxiquinoleina 1, mebendazol 1.
COLITIS	6	0	
OTROS	4	2	penicilina 1, ampicilina 1.
TOTAL	86	32	

El análisis estadístico de cada uno de los grupos de resultados de la prueba de ELISA en base a un resultado positivo, negativo y dudoso, este último establecido bajo el criterio de tener un resultado positivo para la prueba de ELISA y negativo para el hemocultivo y/o coprocultivo. Evaluados por la prueba exacta de Fisher se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar los diferentes grupos antes mencionados (tabla 12). Para la comparación de los resultados positivos contra los negativos se obtuvo una  $P < 1.6 \cdot 10^{-12}$ , para una  $\alpha = 0.001$ . El grupo de dudosos contra el de los negativos se encontró una  $P < 8 \cdot 10^{-9}$ . Y finalmente los negativos comparados contra el grupo de los controles usados como blancos no se encontró diferencia significativa, con una  $P < 0.25$ , (tabla 17).

Tabla 17. Prueba exacta de Fisher comparando los resultados del ensayo de ELISA.

COMPARACION ENTRE:	P <	RESULTADO DE LA PRUEBA
POSITIVOS CONTRA NEGATIVOS	$1.6^{-12}$	SIGNIFICATIVO
DUDOSOS CONTRA NEGATIVOS	$8^{-9}$	SIGNIFICATIVO
NEGATIVOS CONTRA EL GRUPO BLANCO	0.25	NO SIGNIFICATIVO

La sensibilidad, especificidad, exactitud, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, para la establecida prueba de ELISA fué de 100, 88, 82, 70.2, y 87% respectivamente. Estos índices fueron establecidos únicamente por medio de la comparación de los resultados de los cultivos contra la prueba de ELISA, tomando como único criterio diagnóstico el aislamiento de alguna cepa de Salmonella en los cultivos, (tabla 18).

Tabla 18. Índices de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA.

SENSIBILIDAD	100	%
ESPECIFICIDAD	88	%
EXACTITUD	82	%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	70.2	%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	87	%

## DISCUSION

Debido a que el hemocultivo, coprocultivo y otros tipos de cultivos, así como la prueba de Widal, los cuales son comunmente usados para el diagnóstico de enfermedades causadas por salmonellas y muy especialmente las originadas por S. typhi, tiene muchas desventajas, se ha tratado de desarrollar nuevas técnicas de laboratorio que sustituyan convenientemente a las anteriormente mencionadas, tanto en los aspectos de sensibilidad, especificidad, tiempo requerido para obtener resultados definitivos (46, 47, 48, 57, 58, 59, 60, 61, 62). Entre los estudios utilizados a la fecha destaca la técnica de ELISA para detección de S. typhi, en el cual se detectan antígenos protéicos en muestras de suero (63), esta tiene la desventaja de que a altas concentraciones de antígenos de E. coli presenta reacción cruzada, además de que en ocasiones se presentan falsos negativos, lo cual cremos que puede ser debido a que posiblemente se requiere que haya en circulación fracciones antigénicas de la S. typhi liberadas y que deben alcanzar un umbral mínimo para que sean detectadas estas fracciones antigénicas por la técnica. Aún cuando se reportó un nivel de sensibilidad de 0.5 µg/ml por estos autores, nosotros encontramos durante las pruebas de estandarización que la prueba de ELISA que hemos desarrollado detectaba 0.015 µg/ml.

Sin embargo esta fracción antigénica que es una mezcla poliantigénica, muy concentrada en cuanto a su contenido de antígenos somáticos (polvos acetónicos), en la cual Tato y Molinari (70), encontraron que estaba constituida al menos por 25 proteínas diferentes entre las cuales habían algunas con alta capacidad como inmunógenos. Esto nos hace suponer que probablemente, la presencia de falsos negativos sea originada porque la liberación de las fracciones antigénicas de la bacteria a la circulación no alcanza el umbral de detección, estandarizado encontrado in vitro para esta técnica. Otra posible explicación pudiera ser, que según la fase en la que se encuentra la evolución de la infección, no haya bacterias en circulación en el momento de tomar la muestra (durante la fase de septicemia de la enfermedad), o bien que el sistema inmune del organismo no haya desarrollado inmunidad, y la bacteria aún no sea destruída por las células del organismo (28, 37) y esta permanezca oculta intracelularmente en los macrófagos. La anterior suposición la basamos en el hecho observado también, durante las pruebas de estandarización con la bacteria completa, en la cual encontramos que la cantidad mínima de bacterias necesarias para ser detectadas, fué superior a 10 mil cuerpos bacterianos por pozo, lo que probablemente significa que se requiere una gran cantidad de células bacterianas

para producir las cantidades suficientes de antígenos para ser detectados por la técnica de ELISA. Sin embargo, también queremos hacer notar que las bacterias no fueron sometidas a un tratamiento como el de la técnica de polvos acetónicos para la producción de antígenos, ya que las bacterias únicamente fueron sometidas a un tratamiento con calor (ebullición por 20 minutos), lo que no garantiza que haya una liberación total de los antígenos. Además algunos autores mencionan que el tratamiento con calor de los antígenos de Salmonella únicamente los solubilizan y no los destruyen (59).

Por lo cual decidimos desarrollar una técnica de ELISA que detectara no solo S. typhi, sino otras Salmonellas patógenas para el humano, que si bien fué basada en la detección de antígenos de las Salmonellas para evitar se presentara el problema anteriormente descrito en el cual se dependiera de la liberación en forma natural de los antígenos de la bacteria a los fluidos corporales, por lo que utilizamos un cultivo previo en medio selectivo para Salmonella, el cual además logró incrementar el número de bacterias presentes en la muestra al momento de ser analizados por ELISA. Otro objetivo fué disminuir al máximo posible el tiempo para obtener el diagnóstico, lo que se logró al tener un tiempo menor de 20 horas desde la toma de



la muestra, y que no ha sido reportado por otros autores. Nosotros encontramos que el presente ensayo de ELISA, era capaz de detectar 1.5 ng/pozo del antígeno protéico de Salmonella y a la Salmonella en una concentración por pozo de 10,000 células bacterianas, con un coeficiente de correlación menor de 5.8 %. Aún cuando el nivel de detección con las diferentes Salmonellas probadas, mostró sensibilidad variada para cada especie, no se encontró reacción cruzada con ninguna de las otras enterobacterias evaluadas, lo que representa una ventaja más en comparación de la técnica de ELISA reportada por Appassak (63), y ya que la prueba fué evaluada en México que es una zona endémica para las infecciones por Salmonella, los resultados encontrados son satisfactorios, debido a que se encontró un índice de sensibilidad, especificidad y exactitud de 100, 88, y 82 % respectivamente, los cuales fueron obtenidos por la comparación única y exclusivamente de los resultados de los cultivos, como único criterio diagnóstico. La validez de estos valores es comparable con los obtenidos por Appassak (63) en su técnica de ELISA y a los de Jacob, (60) en la prueba de aglutinación pasiva para detección de S. typhi, probablemente debido a que estas técnicas también detectan los antígenos somáticos de la bacteria. Además se encontró superior a otra técnica reportada para la detección de

antígeno Vi en portadores en zonas endémicas de fiebre tifoidea (59).

Por otra parte no existen suficientes estudios reportados en la literatura, encaminados a el diagnóstico de las infecciones por Salmonella. Recientemente fué descrita una técnica para el diagnóstico de Salmonellas basado en la técnica de ELISA con la producción de un anticuerpo monoclonal para ser utilizada en el campo clínico, en el diagnóstico de infecciones por Salmonella en muestras de heces y en la industria de alimentos, el cual mostró que era capaz de detectar 10 millones de bacterias presentando el inconveniente de tener reacción cruzada con otras enterobacterias, disminuyendo su especificidad (40).

La técnica de ELISA que describimos también se mostró satisfactoria para la detección de diferentes cepas de Salmonellas productoras de patología entre los enfermos evaluados en el estudio, en los cuales predominó el problema de la gastroenteritis, principalmente como un cuadro de tipo crónico. Esto probablemente sea debido a que en los cuadros de tipo agudo por ser autolimitados no hubo la posibilidad de evaluar a este tipo de pacientes, por lo que creemos que es necesario continuar la investigación con la prueba de ELISA para tener una mayor experiencia al respecto y evaluar ampliamente la real utilidad y alcance de la prueba en el

diagnóstico de las Salmonellas. También es importante evaluar la utilidad real de las reacciones febriles en nuestra población ya que en el estudio se confirmó el hecho de que este estudio es de valor muy limitado en nuestro país para el diagnóstico de la fiebre tifoidea, como lo reporta Myron (67), en su estudio en el cual encontró una prevalencia elevada de positividad a los antígenos O y H entre la población de países endémicos para la fiebre tifoidea y esta positividad se incrementa con la edad en los sujetos que viven en estos lugares considerados como zonas endémicas. Además es importante destacar que los pacientes en nuestro país se muestran poco interesados en cooperar, para su atención integral ya que una vez que sean recuperado parcial o totalmente del mal que los hizo solicitar ayuda médica ya no regresan para concluir sus estudios e incluso abandonan el tratamiento antes de completar el mismo, lo que dificulta en la mayoría poder tener un segundo análisis de reacciones febriles, que es indispensable en aquellas poblaciones en zona endémicas para corroborar el diagnóstico de fiebre tifoidea ya que este estudio puede ser de ayuda para establecer el diagnóstico, cuando se demuestra un incremento en los títulos observados en la prueba de Widal. Esta falta de cooperación por parte de los pacientes probablemente se deba a la deficiente cultura que la

población tiene en forma general, lo cual lleva al círculo vicioso de ignorancia-pobreza-enfermedad. También otro aspecto relevante observado en el transcurso de la investigación fué el encontrar que se diagnostica fiebre tifoidea sin tener, pruebas de laboratorio que confirmen, el diagnóstico, basandose únicamente en criterios clínicos o cuando más en una sola determinación de la prueba de Widal por lo que probablemente la incidencia real sea menor a la reportada a nivel nacional por la Secretaría de Salud, sin perder de vista que también es cierto que el reporte de padecimientos no se realiza adecuadamente, principalmente entre los médicos que ejercen la medicina privada en México. y finalmente también se observa que en realidad en los cuadros febriles y diarreicos es importante el contar con apoyos de laboratorio para poder establecer el diagnóstico nosológico y el paciente se vea beneficiado, y no sea expuesto al riesgo potencial que genera el uso incesario de antibióticos, los cuales generalmente son administrados en varias combinaciones, pretendiendo dar un tratamiento de amplio espectro que cubra la posibilidad de atacar varios gérmenes involucrados en la patogénesis de cuadros diarreicos o febriles, práctica muy comúnmente observada en la atención a los pacientes.

## CONCLUSIONES

El presente ensayo inmunoenzimático que hemos presentado es satisfactorio para el diagnóstico de fiebre tifoidea e infecciones por Salmonella, en el cual se encontró un buen índice de sensibilidad, especificidad y exactitud, así como de reproducibilidad, siendo el presente ensayo una prueba útil para el diagnóstico de tales infecciones.

Este ensayo de ELISA se puede considerar dentro de las pruebas rápidas que existen actualmente, y consideramos que es una técnica económica y de fácil manejo, que puede ayudar enormemente, tanto al médico como al paciente para obtener un resultado positivo, en un corto período de tiempo con el fin de que se instituya el tratamiento requerido a la mayor brevedad posible. Por otra parte el hecho de que la prueba no identifica la especie de Salmonella que origina la infección, no representa en realidad una desventaja, ya que el tratamiento para este tipo de infecciones es el mismo.

## Bibliografía

- 1.- Louis PChA. Recherches anatomiques, pathologiques et thérapeutiques sur la maladie connue sous les noms de gastroentérite, fièvre putride, adynamique ataxique, typhoïde, comparée avec les maladies aiguës les plus ordinaires. 2 vols. Paris: J-B Bailliere 1873.
- 2.- Budd W. Typhoid fever: its nature, mode of spreading, and prevention. London: Longmans. 1873.
- 3.- Wright AE. Sample D: Remarks on vaccination against typhoid fever. Brit. Med J 1:256-259. 1896.
- 4.- Pfeiffer R. Kolle W.: Ueber die spezifische Immunitätsreaction der typhus-bacillen. Z. hyg. Infect 21:203-246. 1896.
- 5.- Smith Th., Reagh A. L.: J. Med. Res. 9: 270, 1903.
- 6.- Gruber M. Durham HE.: Eine Methode zur raschen Erkennung des cholera-vibrio und des typhusbacillus. Munchen Med. Wschr 43:285-286. 1896.
- 7.- Widal F.: Serodiagnostic de la fièvre typhoïde. Sem. Med 16:259. 1896.
- 8.- Eberth CJ.: Die organismen in den organen bei typhus abdominalis. Virchow Arch. Phat. Anat. 81:58-74. 1880.
- 9.- Felix A. Pitt RM.: The Pathogenic and immunogenic activities of Salmonella Typhi in relation to its antigenic constituents. J. Hyg. (Camb) 49:92-110, 1915.
- 10.- Woodward TE. et al : Preliminary report on the beneticial effect of chloromycutin in the treatment of typhoid feve. Amm. Intern. Med. 29:131-134. 1948.
- 11.- Velasco A.: Proteinas aisladas de Salmonella Typhimurium involucradas en la inmunidad. Tesis UNAM 1987.
- 12.- Ben Lugtenberf and loek Van Alphen: Molecular Architecture and functioning of the outer membrane of Escherichia coli and other gram-negative bacteria. Biochimica et biophysica. Acta 737: 51-115, 1983.

- 13.- Joah, D. Robbins and John B. Robbins.: Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (VI antigen) of *Salmonella thyphi*. The journal of infectious diseases. Vol. 150, No. 3, 436-443, 1984.
- 14.- Teodoro Carrada Bravo, M.C.: La fiebre tifoidea y la vacunación antitifoidea. Salud Pública de México. Vol. XXXIII, No., 2, 103-158. 1981.
- 15.- Graham. S. Smith, BVMS, MRCVS, MSC; JOHN H Lumsdern: Neutrophil bactericidal capability in experimentally induced salmonellosis in pigs. Am. J. Fet. Res. Vol. 42, No. 8, 1332-1334, 1981.
- 16.- Maurice Landy: Enhancement of the immunogenicity of typhoid vaccine by retention of the Vi Antigen. Am. J. Hyg. Vol. 58, 148-164, 1953.
- 17.- Salvatore Antonacci, Emilio Jirillo, MTV, SMM, LB and JR MC.: Relationship between immune system and gram-negative bacteria. The J. of Immunology. Vol. 133, No. 2, 729-733, 1984.
- 18.- Alf. A Lindberg. and Jan A. Robertsson: *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. Infection and immunity Aus. Vol. 41(2), 751-754, 1983.
- 19.- Gerald, W, Tannock, R.H.B. and Dwayne C. Savage: Association of *salmonella typhimurium* with and its invasion of the ileal mucosa in mice. Infection and immunity. Vol. 11 (2), 365-370, 1975.
- 20.- John, O. Clementss, and Sawsan El-morshidy: Construction of a potential live oral bivalent vaccine of typhoid fever and cholera-*escherichia coli*. Related diarrheas infect. and Immunity. Vol. 46(2). 564-569, 1984.
- 21.- Guillermo Alfaro: Related R plasmids in *salmonella typhi* strains isolated in Mexico city clinical samples. Rev. Lat. Amer. Microbiol. Vol. 19: 209-215, 1977.
- 22.- Stepend D. Sears, Catterrine Ferrecci and Myron Levine: Sensitivity of moore sewer swabs for isolating *salmonella typhi*. Applied and environmental microbiology.

Vol. 51(2), 425-426, 1986.

23.- O. Lünderitz, A.M.S., and O. Westphal: Immunochemistry of O and R antigens of salmonella and related enterobacteriaceae. Bacteriological Rev. Vol. 30, 192-199, 1966.

24.- Clifford. S. Mintz. and R.H. Deibel.: Effect of Lipopolysaccharide mutations on the pathogenesis of experimental salmonella gastroenteritis Infection and immunity. Vol. 236-244, 1983.

25.- P. Helena Mähelä, V.V.V., and M. Voltonen: Role of O-antigen (LPS) factors in the virulence of salmonella J. Gen. Microbiol. Vol. 69, 107-115, 1971.

26.- Ralph, A. Gianella.: Pathogenesis of salmonella Enteritis and Diarrhea. 170-173, 1982.

27.- Felix, C. W. Koo, J.W.P. and N. Christine Molina: Pathogenesis of Experimental salmonellosis: Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. Infection and Immunity Vol. 43(1), 93-100, 1984.

28.- Larry, A. Wheeler, Jhon H. Carter, Joseph A. Ingelfinger and Peter Goldman: The effects of additional flora on the response of salmonella mutants. Lodged in the gastrointestinal tract. Cancer Research. Vol. 37, 451-455, 1977.

29.- J.L. Molinari, P. Tato and L. Mendez.: Ribonucleic acid-protein purified from salmonella typhi involved in experimental immunity. Ann. Immunol. 132D, 25-41, 1981.

30.- José, L. Molinari, Ana Flisser y Roberto Cabrera: Inmunidad inducida con fracción ribosomal obtenida de S. Typhi Ty2 contra diversas cepas de S. typhi. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 17, 149-156, 1975.

31.- Roantree, R. J. The relationship of lipopolysaccharide structure to bacterial virulence. Microbiol toxic, Vol. 5. 1-32, 1979.

32.- Moll, A., Manning, P.A. and Achtman, M.; Plasmid determined resistance to serum bactericidal activity: A major outer membrane protein. Infec. Immun. Vol. 28(2), 359-67, 1980.



- 33.- Miura, T. and Mizushima, S.: Separation and properties of outer and cytoplasmic membranes in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 193, 268-276, 1969.
- 34.- Schnaitman C.A.: Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* Vol. 104: 890-896, 1970.
- 35.- Braun, V., k. Rehn: Chemical Characterization spatial distribution and function of lipoprotein on the Membrane Structure of *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.* 10: 426, 1969.
- 36.- Osborn M., WuC.: Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 369, 1980.
- 37.- Cecil Loeb et al. *Tratado de Medicina Interna*, 21. Ediciones Interamericana, 1984.
38. Nelson et al: *Tratado de Pediatría* 6a. Edición Interamericana, 1984.
- 39.- R. Edelman and M.M. Levine: Summary of an International workshop on typhoid fever. *Reviews of Infectious Diseases*. Vol. 8 No. 3 May-Jun 1986.
- 40.- J.A. Mattingly: An Enzyme Immunoassay for the detection of all salmonella using a combination of a myeloma protein and a hybridoma antibody. *J. Immunological Methods*. 73.: 147-156, 1984.
- 41.- A. Isibasi et al.: Protection against salmonella typhi infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from salmonella typhi 9, 12, d, Vi. *Infection and immunity* Vol. 56(11), 1640-1645, 1988.
- 42.- Vianney Ortiz et al.: Immunoblot detection of Class-specific humoral immune response to outer membrane protein isolated from salmonella typhi in humans with typhoid fever. *J. of Clinical Microbiology* Vol. 27(7): 1640-1645 1988.
- 43.- J. R. Morphy et al.: Immunity to Salmonella typhi considerations relevant to measurement of cellular immunity in typhoid-endemic regions. *Clin. Exp. Immunol.* 75: 228, 233, 1989.

44.- Pak-Leong lim and Wai-Fung Choy: A spectrophotometric method for evaluating a latex agglutination assay of salmonella typhi lipopolysaccharide. J. of Immunol Methods. 115: 269-274, 1988.

45.- K. Foulaki et al.: Isolation and immunological characterization of a 55 kilodalton surface protein from Salmonella typhimurium. Infection and Immunity. Vol. 57(5): 1399-1404, 1989.

46.- S.G. Jachson et al.: A double antibody sandwich enzyme immunoassay for clostridium perfringens type A enterotoxin detection in stold specimens. J. of immunol methods. 83: 141-150, 1985.

47.- B.S. Robinson et al.: Enzyme Immunoassay in wich a myelomma protein is used for detection of salmonellae. Applied and environmental microbiology Vol. 45(6): 1816-1821, 1983.

48.- R. B. Hornick et al.: Typhoid fever: pathogenesis and Immunologic control. The new England j. of Medicine Sep. 196-691, 1970.

49.- M Nakano and K. Saito: Chemical components in the cell wall of Salmonella typhirimium affecting its virulence ant Immunogenicity in Mice. Natura 222: 1085-1086, 1969.

50.- Janet E. Plant & A.A. Glynn: Genetic control of resistance to Salmonella typhimurium infection in high and low antibody responder mice. Clin. Exp. Inmmunol. 50: 291-297, 1982.

51.- James R. Morphy, S.B., C. M., L.S., C.F., A.L., S.S., G. L: Characteristics of humoral and cellular Immunity to Salmonella typhi in Residentes of typhoid Endemic and typhoid-free Regions. The J. of infec. diseases. Vol. 156 No. 6: 1005-1009, 1987.

52.- R. Germanier and E. FÜRer: Isolation and characterization of Gal-E mutant Ty 21a of salmonella typhi. A candidate strain for a live oral typhoid vaccine: The J of Inf. Dis., Vol. 131, No. 5: 553-560, 1975.

53.- Toby K. Eisentein, Loran M. Killar and Barnett M. Sultzer.: Immunity of infection with salmonella typhimurium: Mouse strain differences in vaccine- and serum-mediated protection: The J. Inf. Dis., Vol. 150 No. 3: 425-434, 1984.

54.- Stephen L. Hoffman, N.H.P., R.C.R., A.S., A.R.R., and P.P.: Duodenal string-capsule culture compared with bone-marrow blood, and rectal-swab cultures for diagnosing typhoid and paratyphoid fever. The J. of Inf. Dis., Vol. 149 No. 2; 157-161, 1984.

55.- S.D. Sears, C.F., M.M.L., A.M.C., J.M., R.B., K.D., B.R., and the Chilean typhoid Committee.: The use of moore swabs for isolation of salmonella typhi from irrigation water in Santiago de Chile. :The J. of Inf. Dis., Vol. 199 No. 4: 640-642, 1984

56.- Stephen L. Hoffman, et al. : Reduction of mortality in chloramphenicol treated severe typhoid fever by high-dose dexamethasone. The New E. J. of Medicine; 12: 82-88, 1984.

57.- Isis A. Mikhall, Warren R. Sanborn, and John E. Sippel. Rapid, Economical Diagnosis of Enteric Fever by a blood clot culture coagglutination procedure. Journal of Clinical Microbiology; Vol. 17 (3); 564-565, 1983.

58.- C.M. Nolan, Elizabeth A. Labordet, R.T. Howell, and David T. Dennis. Detection of salmonella typhi in faecal specimens by an antiserum agar method. J. Med. Microbiol.; Vol. 13 ; 373-377, 1980.

59.- Robert Rockill, Larry W. Rumans, Murad Lesmana, and David T Dennis. Detection of salmonella typhi Vi, and D. antigens, by slide coagglutination in urine from patients with typhoid fever. Journal of Clinical Microbiology.: Vol.11(3); 213-216, 1980.

60.- T. Jacob John, K. Sivadasan, and Betty Kurien.: Evaluation of passive bacterial agglutination for the diagnosis of typhoid fever. Journal of Clinical Microbiology. : Vol. 20(4); 751-753, 1984.

61.- Nandini P. Shetty, M.B., B.S., Hiresave, Srinivasa, M.D., and Prema Bath, P.H.D.: Coagglutination and counter immunoelectrophoresis in the rapid diagnosis of typhoid fever. A. J. C. P. Vol. 84 No. 1, 1985.

62.- Ashok K. Gupta and Kola M. Rao. Simultaneous detection of salmonella typhi antigen and antibody in serum by counter-immunoelectrophoresis for an early and rapid diagnosis of typhoid fever. Journal of immunological methods, 30: 349-353, 1979.

63.- Appassak H. et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of salmonella typhi protein antigen. J. Clin. Microbiol. Vol. 25 (2); 273-77, 1987.

64.- Sadallah F. et al: Production of specific monoclonal antibodies to salmonella typhi flagellin and possible application to immunodiagnosis of typhoid fever. J. of Infect. Dis. Vol. 161: 59-64, 1990.

65.- Sivasadan K., Kurren B., Jacob T. Rapid diagnosis of typhoid fever by antigen detection. Lancet; 134-135, 1984.

66.- Gilman R., T.M., M.M.L., H.P., Relative efficacy of blood, urine, rectal swab, bone-marrow, and rose-spot cultures for recovery of salmonella typhi in typhoid fever. The Lancet. 1211-1213, 1975.

67.- Levine M. et al. Diagnostic value of the widal testin areas endemic for typhoid fever. Am. J. Trop. Med. Hyg. : 27(4), 795-800, 1978.

68.- Taylor-Robinson S., M.R., W.A., D.R., Infección por salmonella y colitis ulcerosa. the Lancet 1 (1) 145: 270-271, 1989.

69.- Boletín mensual; Epidemiología SNS. Vol. 5 No. 5 , Mayo 1990.

70.- Kauffmann F. Classification of bacteria, 1a. edición Munksgaard, Copenhagen, Denmark. 1975.

71.- Brenner, D. j.: American Society for Microbiology, Washigton, D. C. 49-58, 1983.

72.- Kauffmann F.: Serological diagnosis of salmonella-species. Kauffmann-White-Schema. Internat. Bull. Bacter. Nomenclat. and taxon. 11: 5-95, 1972.

73.- Osawa et al.: Immunology of the gastrointestinal tract . P. Asquith 1979 Churchill Livingstone London.

74.- Davis, E. Dulbeco, R.: Microbiology. Third Editions, Harpe and Row published, Inc. 1980.

75.- Ernest Jewets, et al.: Microbiología Médica, 12a. Edición . El Manual Moderno, 1986.

76.- Germanier J. : Immunity in Experimental Salmonellosis. III . Comparative immunisation with Viable and Heat Inactivated Cells of Salmonella Typhimurium. Infec. and Immunity. 5: 792-797, 1972.

77.- Wong K., Feeley J., N. R., and F. M. : Vi antigen from Salmonella Typhosa and Immunity against typhoid fever. I . Isolation and Immunologic properties in animals. Infec. and Immunity. 9: 348-353, 1974.

78.- Collis F., Carter P.: Cellular Immunity in enteric diseases: Am. J. of Clin. Nutrition. 27: 1424-1433, 1974.

79.- Dupont H. et al: Studies of Immunity in Typhoid Fever. Protection Induced by Killed Oral Antigens or by Primary Infection. Bull. of The W. H. O. 44: 667-672, 1971.

80.- Chutani C.: Controlled trials of three different oral killed Typhoid Vaccines in India. 14TH Congress Standardistation, Douglas, Isle of man. 33: 98-101, 1975.

81.- Tato P. Molinari J.: Immunogenic Complexes Obtained from Salmonella Typhimurium and Salmonella Typhi Ty2 by the bacterial acetone powder method. Ann. Microbiology (Inst. Pasteur). 130 A : 47-60, 1979.

82.- Howry O. H., R. N., F. A., R. R.: Protein Measurement with the folin phenol reagent. J. Biological and Chemistry. 193: 265-275, 1951.

83.- Kissane A.: Enfermedades bacterianas (capitulo 7). Editorial Médica Panamericana. octava edición 1986.

84.- Soderman and Soderman: Host responses to infection. Editorial W. B. Saunders Philadelphia. 1979.

85.- Kussi N., Murrninen M., Saxen H., Valtonen M.: Outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Inf. and Immun. 25:857. 1979.

- 86.- Hoffman St., Punjabi Nh., K. S., W. Te.: Reduction of mortality in chloramphenicol-treated severe typhoid fever by high-dose desametaxone. *N. Engl. J. Med.* 310:82-88. 1984.
- 87.- Cvjatanovic B. and Uemura K., *Bulletin World Hygiene Organization.* 32:29-36. 1965.
- 88.- Johanson W.: Ribosomal vaccines I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. *Infect. and Immun.* 5(6):947-952. 1972.
- 89.- Smith R. A. and Bigley N. J.: Ribonucleic acid-protein fractions of virulence *Salmonella typhimurium* as protective immunogens. *Infect. and Immun.* 6:377-383. 1972.
- 90.- Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male.: *Immunology. Cap. 16 Immunity to virus, bacteria and fungi.* Ed. Churchill Livistone. London New York 1990.
- 91.- Hahn H, Kaufmann SHE,: Role of mediated immunity in bacterial infections. *Rev Infect Dis* 3:1221-1250, 1990.
- 92.- Chesnut, RW, Colon SM and Grey HM,: Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of cell tumor and macrophages. *J Immunol* 129:2382-2388, 1982.
- 93.- Kaufmann SHE,: CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in intracellular Microbial Infections. *Immunol Today* 9:168-174, 1988.
- 94.- Mosmann TR, Coffman RL,: Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-174, 1989.
- 95.- Kaufmann SHE, Kabeltz D,: Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 167:191-207, 1991.
- 96.- Yewdell JW, Bennik JR,: The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 62:203-206, 1990.
- 97.- Kaufmann SHE,: Role of T-cell subsets in bacterial infections. *Curr Opinion in Immunology* 3:465-470, 1991.
- 98.- Bjorkman PJ, Parham P,: Structure, function and diversity of class I Major Histocompatibility Complex

molecules. *Annu Rev Biochem* 59:253-288, 1990.

99.- Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ,: Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54:777-785, 1988.

100.- Takahashi H, Takeshita T, Morein B, Putney S, Germain RN, Berzofky JA,: Induction of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 334:873-875, 1990.

101.- Mielke MEA, Niedobitek G, Stein H, Hahn H,: Acquired resistance to *lysteria monocytogenes* is mediated by Lyt-2<sup>+</sup> T cells independently of the influx of monocytes into granulomatous lesions. *J Exp Med* 170:589-594, 1989.

102.- Brunt LM, Portnoy DA, Unanue ER,: Presentation of *lysteria monocytogenes* to CD8<sup>+</sup> T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J Immunol* 145:3540-3546, 1990.

103.- Raulat DH,: The structure, function, and molecular genetics of the p $\bar{U}$  T cells receptor. *Annu Rev Immunol* 7:175-208, 1989.

104.- Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, De Bruyn J, Strober S,: Isolation of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 339:226-229, 1989.

105.- Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB,: Lymphocytes bearing antigen-specific p $\bar{U}$  T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 339:544-547, 1989.

106.- Steinhoff U, Kaufmann SHE,: Specific lysis of CD8<sup>+</sup> T cells of schwann cells expressing mycobacterium leprae antigens. *Eur J Immunol* 18:969-972, 1988.

107.- Ottenhoff THM, Ab BK, Van Embden JDA, Thole JER, Kiessling R,: The recombinant 65-kD heat shock protein of mycobacterium bovis bacillus calmette-Guerin/M. tuberculosis is a target molecule for CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes that lyse human monocytes. *J Exp Med* 168:1947-1952, 1988.

108.- Lamb JR, Bal V, Mendez-Sampeiro P, Mehlert A, So A, Rothbard J, Jindal S, Young DB,: Stress proteins may

provide a link between the immune response to infection and immunity. *Int Immunol* 1:191-196, 1989.

109.- Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr RW, Young RA, Kufmann SHE,: T lymphocyte from healthy individuals with specificity to self epitopes shared by the mycobacterial and human 65 kDa heat shock protein. *J Immunol* 143:2844-2849, 1989.

110.- Koga T, Wand-Württenberger A, DeBruyn J, Munk ME, Schoel B, Kaufmann SHE,: T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages. *Science* 245:1112-1114, 1989.

111.- Janeway CA Jr, Jones B, Harday A,: Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptor. *Immunol Today* 3:73-76, 1988.

112.- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A: Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 168:1675-1684, 1988.

113.- Kongschavn PA, Ghadrian E,: Enhancing and suppressive effects of tumor necrosis factor/cachectin on growth of *Trypanosoma muscivi*. *Parasite Immunol* 10:581-588, 1988.

114.- Liew FY, Millott S, Li Y, Lelchuk R, Chan WL, Ziltener H,: Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T-cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* 19:1227-1232, 1989.

115.- Beltz LAM, Szein MB, Kierszenbaum F,: Novel mechanism for *trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes: inhibition of IL-2 receptor expression. *J Immunol* 141:289-294, 1988.

116.- Kierszenbaum F, Szein MB, Beltz LA,: Decreased human IL-2 receptor expression due to a protozoan pathogen. *Immunol Today* 10:129-131, 1989.

117.- Horvat RT, Parmely MJ,: *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. *Infect Immun* 56:2925-2932, 1988.



118.- Reiner NE, Ng W, Ma T, McMaster WR,: Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocopatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 85:4330-4334, 1988.

119.- Nakane P. K. and Pierce G. B. Jr. Enzyme labeled antibodies; preparation and application for the localization of antigen. J. Histochem. Cytochem. 14:929 1966.

120.- Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the deteccion of antigens and antibodies. Immunochemistry. 6:43-47 1969.