

Nº 86  
REV.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**“SINTESIS DE UN CONJUGADO ANTIGENO VI-PORINAS  
DE *Salmonella typhi*”**

**T E S I S**

que para obtener el título de

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

presenta

**CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS**

México, D. F.

1992.

**FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **CONTENIDO**

### **1.0 RESUMEN**

### **2.0 ANTECEDENTES**

#### **2.1 INTRODUCCION**

#### **2.2 FIEBRE TIFOIDEA**

##### **2.2.1 Generalidades**

##### **2.2.2 Agente causal**

##### **2.2.3 Penetración del microorganismo y respuesta inmune**

##### **2.2.4 Epidemiología**

#### **2.3 VACUNAS CONTRA LA FIEBRE TIFOIDEA**

##### **2.3.1 Vacunas de células muertas**

##### **2.3.2 Vacunas elaboradas a partir de cepas atenuadas de Salmonella**

##### **2.3.3 Vacunas elaboradas a partir de fracciones de S.typhi**

#### **2.4 PERSPECTIVAS PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS**

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

#### **3.2 Objetivos particulares**

## **4.0 MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 METODOS BACTERIOLOGICOS**

**4.1.1 Cepas bacterianas**

**4.1.2 Cultivo de bacterias**

### **4.2 METODOS BIOQUIMICOS**

**4.2.1 Obtención de las porinas**

**4.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

**4.2.3 Cuantificación de proteínas**

**4.2.4 Reacción de O-acetilo**

**4.2.5 Obtención y purificación de conjugados  
Ag Vi-porinas**

**4.2.5.1 Conjugado con SPDP como molécula  
espaciadora**

**4.2.5.2 Conjugado con ADH como molécula  
espaciadora**

**4.2.6 Caracterización de los conjugados  
Ag Vi-porinas**

### **4.3 METODOS INMUNOQUIMICOS**

**4.3.1 Purificación de porinas por Cromatografía  
de Afinidad**

**4.3.2 Evaluación de antígeno Vi**

**4.3.3 Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida  
(ELISA)**

**4.3.3.1 Valoración del cruce con porinas del suero de burro  
anti-Vi después de ser absorbido con S. typhi O901**

**4.3.3.2 Preparación del conjugado anticuerpo-peroxidasa**

**4.3.3.3 Evaluación del conjugado anticuerpo-peroxidasa**

## **5.0 RESULTADOS**

- 5.1 Obtención de porinas de S. typhi**
- 5.2 Obtención de gama globulinas de burro anti-Vi, y de conejo anti-burro**
- 5.3 Unión de las gama globulinas de conejo anti-burro con la peroxidasa**
- 5.4 Valoración del suero de burro anti-Vi (cruce con porinas)**
- 5.5 Purificación cromatográfica del conjugado  
Ag Vi-porinas con SPDP como molécula espaciadora**
- 5.6 Purificación cromatográfica del conjugado con ADH  
como molécula espaciadora**
- 5.7 Purificación cromatográfica del antígeno Vi en  
Sephacryl S-1000**
- 5.8 Purificación cromatográfica de las porinas en  
Sephacryl S-1000**

## **6.0 DISCUSION**

## **7.0 CONCLUSIONES**

## **8.0 BIBLIOGRAFIA**

## 1.0 RESUMEN

Con el objeto de obtener un inmunógeno bivalente que se podría emplear como futura vacuna en la prevención de la fiebre tifoidea, se unió covalentemente el antígeno Vi (Ag-Vi) de Citrobacter freundii con las porinas de Salmonella typhi.

En un primer ensayo, la unión se realizó utilizando N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) como molécula espaciadora. En primer término se hicieron reaccionar las porinas con el SPDP (porinas-SPDP), mientras que por separado se hizo reaccionar al Ag-Vi con cistamina, en presencia de carbodiimida (EDAC), y posteriormente con ditiotreitol. Los productos de las dos reacciones se mezclaron en atmósfera de nitrógeno.

En un segundo ensayo la unión se realizó utilizando dihidrazida del ácido adípico (ADH) como molécula espaciadora. Primeramente el Ag-Vi se hizo reaccionar con carbodiimida y ADH (Ag-Vi-ADH); mientras que por otro lado las porinas fueron activadas con carbodiimida. A esta mezcla de reacción se le adicionó el producto Ag-Vi-ADH.

La purificación de los productos de ambos ensayos se realizó mediante filtración en gel (Sephacryl S-1000). La caracterización de las fracciones obtenidas se efectuó midiendo primero, la absorbancia (a 280 nm para proteínas y a 260 nm para el Ag-Vi); y por medio de la técnica de ELISA empleando suero humano anti-Vi, suero de burro anti-Vi y suero de conejo anti-porinas. Las fracciones con los conjugados se dializaron y se conservaron por liofilización.

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 INTRODUCCION

La fiebre tifoidea constituye un problema importante de salud pública en los países subdesarrollados, pero no puede descartarse el riesgo para los países desarrollados de importar la enfermedad o de que se presenten brotes y epidemias (17).

El tratamiento con antibióticos específicos ha permitido mejorar el pronóstico y reducir la mortalidad, sin embargo, la fiebre tifoidea sigue siendo una enfermedad grave, que necesita en algunos casos hospitalización.

La tardanza en el inicio del tratamiento y la aparición de cepas resistentes, explican en parte los casos mortales por esta enfermedad, por lo tanto es importante intentar prevenirla a través de la vacunación (23).

Actualmente existen tres vacunas en el comercio. La preparada con microorganismos inactivados necesita ser aplicada en varias dosis y ocasiona efectos secundarios importantes. La vacuna oral hecha a base de una cepa viva atenuada, presenta un esquema de aplicación que la hacen poco practica en los programas de vacunación y se ha reportado que el porciento de protección es bajo en zonas endémicas (26,28). En estos momentos la mejor vacuna es la hecha con el antígeno capsular Vi, ya que puede aplicarse sin restricciones y la protección que confiere es buena; sin embargo, debido a su naturaleza polisacáridica es incapaz de inducir memoria por lo que se necesita de varios esquemas de inmunización que la hacen costosa y difícil de aplicarse en programas masivos de vacunación. Para disminuir el costo de la vacuna y hacerla de uso general, lo ideal sería unir el antígeno Vi a una proteína.

En este trabajo se realizó la conjugación de forma covalente del polisacárido Vi a las porinas de *S. typhi*, las cuales han demostrado ser inmunógenos protectores contra el reto de la cepa homóloga de hasta 500 veces la  $DL_{50}$  en el modelo murino (58).

## 2.2 FIEBRE TIFOIDEA

### 2.2.1 Generalidades

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión masiva de Salmonella typhi. Se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen la hemorragia intestinal en el 2 a 8 % de los casos y la perforación intestinal que se representa en el 3 al 4% (1).

### 2.2.2 Agente causal

La Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, gram negativo, móvil, mide dos a tres micras, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos (6).

La bacteria tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno "H" o flagelar y el antígeno somático "O" que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica. De acuerdo con la clasificación de Kauffman y Wite, S. typhi pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9,12; los flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie se encuentra el antígeno "Vi", el cual es de naturaleza polisacáridica, forma parte de la membrana externa y es indicador de virulencia (6).

Existen otros antígenos que han sido poco estudiados, estos forman parte de la membrana externa, como la lipoproteína de Braun y las porinas.

### 2.2.3 Penetración del microorganismo y respuesta inmune.

La Salmonella typhi entra al organismo a través de la boca, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, y penetra la membrana basal sin causar daño importante en los tejidos, es fagocitada por los macrófagos y transportada a los ganglios linfáticos regionales donde se multiplica activamente. Los sujetos infectados presentan una fase de bacteremia, por medio de la cual los bacilos se distribuyen en el sistema fagocítico mononuclear, en donde se reproducen y son liberadas nuevamente al sistema circulatorio.

La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con muy escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares, en el interior de los cuales es capaz de proliferar (3,10).

Aunque la fisiopatología del padecimiento no está totalmente esclarecida, se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas son provocadas por la liberación de endotoxina; entre otros efectos se ha comprobado que induce fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (5). La fiebre se produce por un mecanismo que involucra a una sustancia conocida como "pirógeno endógeno" y que se sabe corresponde a la actual interleucina 1 (IL-1) (87).

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra diversas partes antigénicas de S.typhi, las cuales parecen no correlacionar con el desarrollo de protección contra las recaídas o reinfecciones, a excepción de algunos estudios que sugieren que los anticuerpos contra el antígeno "H" son un indicador de resistencia a la fiebre tifoidea (7).

Se ha descrito que los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de S.typhi a la pared intestinal; sin embargo, sólo son protectores ante inóculos pequeños de la bacteria. Frente a la invasión por grandes cantidades de Salmonella, los mecanismos de inmunidad celular,

fundamentalmente la activación de macrófagos, son indispensables para el control de la infección (8,9).

#### **2.2.4 Epidemiología**

La infección se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria; ya que este microorganismo afecta sólo al ser humano y no se conocen reservorios animales, el elemento más importante en la cadena de transmisión es el portador asintomático (4).

##### **Distribución geográfica**

La fiebre tifoidea está presente en los cinco continentes, pero especialmente en Asia, África y América Latina. Es difícil conocer su incidencia exacta, la cual generalmente es muy subestimada. No existen datos epidemiológicos precisos en los países más afectados, puesto que esta enfermedad no es de declaración obligatoria para la Organización Mundial de la Salud (OMS). Así, las informaciones disponibles sólo representan una fracción de los casos reales. De ésta forma, se han estimado 12 millones de casos anuales con una incidencia de 500 casos/100,000 habitantes en África y Asia (2).

En la región de las Américas en 1990, se presentaron 89,591 casos, que representan una incidencia de 20.8 casos/100,000 habitantes; la incidencia a llegado a ser hasta de 150 casos /100,000 habitantes en Chile. En México se reportaron 11,078 casos en 1987, con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes (2).

La fiebre tifoidea en el mundo se presenta de las siguientes formas:

En forma endémica en Asia del Sur, en Medio Oriente, en África del Este, Central, Oeste y en América Latina.

En forma endemo-epidémica en algunos países del Sureste Asiático, así como en algunos países europeos del contorno mediterráneo.

En forma esporádica en América del Norte y en la mayoría de los países de Europa. La aparición de casos aislados puede dar lugar a diseminaciones limitadas.

### Poblaciones afectadas

Uno de los grupos de edad más afectado por la enfermedad es el de los 15 a 44 años, donde se presentan aproximadamente el 58.62% de los casos, lo cual representa más de 500,000 días laborales perdidos.

Los niños menores de 5 años, y particularmente los lactantes están menos implicados con esta afección. La enfermedad se manifiesta en ellos bajo formas clínicas primitivas de diagnóstico delicado. Es entonces difícil evaluar el impacto exacto de la enfermedad en los niños que pueden sin embargo, ser vectores del germen y contribuir a su diseminación.

Los viajeros y militares de países donde la tifoidea existe en estado esporádico, tienen el riesgo de adquirir la infección, al visitar las zonas afectadas por el padecimiento. Otros grupos de población pueden ser el origen de epidemias localizadas, como el personal de restaurantes y de la industria de alimentos.

## **2.3 VACUNAS CONTRA LA FIEBRE TIFOIDEA**

### **2.3.1 Vacunas de células muertas.**

La primera inmunización experimental contra la infección por Salmonella typhi se realizó en 1886. Frankel y Simmons lograron proteger a conejos inyectándoles dosis subinfectantes de bacteria

viva. Un año después, Bauner y Peiper reportaron resultados semejantes en ratones. Mas tarde, Klikovich demostró que los bacilos muertos también son capaces de inducir protección. Con estas observaciones, Wright en Inglaterra y Pfeiffer y Kölle en Alemania en 1887, decidieron administrar bacterias inactivadas en humanos con el objetivo de generar protección. La vacuna de Pfeiffer, por ejemplo, se preparaba en medio sólido, con la bacteria muerta por calor y fenol (17).

La utilización masiva de estas vacunas resultó exitosa, pues la morbilidad por fiebre tifoidea disminuyó al aplicarla en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica. Además, los individuos vacunados que adquirieron la enfermedad presentaron cuadros clínicos menos severos (14). Así, el uso de las vacunas contra la tifoidea elaboradas con bacterias muertas continuó durante décadas. Sin embargo, no era posible comparar la eficacia de las diferentes preparaciones, debido a que no había modelos experimentales animales, a la falta de correlación entre el estado de inmunidad y algún indicador serológico, así como la ausencia de estudios epidemiológicos controlados.

Por la razón anterior, en 1955, la Organización Mundial de la Salud (OMS), promovió la realización de estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética, para determinar la eficacia de tres vacunas preparadas con células enteras de Salmonella typhi; inactivadas con acetona, calor-fenol o alcohol. La vacuna "K", inactivada con acetona, confirió mayor protección. La vacuna "L", inactivada con calor y fenol, mostró eficacia intermedia y la inactivada con alcohol fué la menos efectiva. Algunos investigadores han atribuido la propiedad protectora mas eficiente de la vacuna inactivada con acetona a su mayor contenido de antígeno "Vi" (15-20).

La protección que confiere una sola dosis de las vacunas "K" y "L" es aceptable, pero el empleo de dos dosis proporciona una inmunidad más confiable (21,22). Sin embargo, estas vacunas que se administran por vía parenteral, tienen diversos inconvenientes pues producen reacciones secundarias importantes, debido a que contienen la endotoxina, y sólo protegen en forma efectiva ante inóculos menores o iguales a  $10^5$  bacterias, por lo que no se recomienda emplearla en forma rutinaria.

### 2.3.2 Vacunas elaboradas a partir de cepas atenuadas de Salmonella.

Hasta la fecha se han estudiado diversas vacunas que se administran por vía oral y que se elaboran con bacterias vivas. Una de ellas se prepara con una mutante de Salmonella typhi dependiente de estreptomycin (24) y aunque a principios de los años 70 mostró ser segura y efectiva (25,26), se abandonó su estudio debido a que no confirió protección cuando se utilizaron microorganismos liofilizados reconstituidos (26).

#### Salmonella typhi Ty21a.

La cepa de Salmonella typhi Ty21a, fue desarrollada por Germanier y Furer en 1975; tiene una mutación en el gene *galE* que causa una deficiencia en la enzima UDP-4-galactosa epimerasa (27), aunque actualmente se ha comprobado que tiene otras mutaciones.

En un ensayo controlado realizado a mediados de la década de los años 70 en Alejandría, Egipto, la administración de la bacteria ( $1-8 \times 10^9$ ) con bicarbonato de sodio, no produjo reacciones colaterales y logró inducir protección en el 95% de la población estudiada. La forma de administración utilizada en ese estudio era impráctica para la aplicación rutinaria de la vacuna, por lo que se evaluaron diferentes formulaciones. Así, en una prueba de campo realizada en una población escolar de Chile entre 1983 y 1986, la administración de tres dosis de vacuna en cápsulas con capa entérica, con intervalos de 2 o 21 días entre cada dosis, solo indujo protección entre el 51 y el 67% durante el período de observación (28-30), y se produjo mucho menor protección al administrar la vacuna en cápsulas de gelatina con bicarbonato de sodio.

Por ello, se ha intentado incrementar la eficiencia de la vacuna mediante una presentación liofilizada para ser disuelta en una solución amortiguadora que neutraliza el ácido gástrico. Con esta formulación se realizan actualmente pruebas de campo en Indonesia y Chile.

En el comercio existe una vacuna llamada "Vivotif" realizada por el Instituto Suizo de Sueros y Vacunas que emplea la cepa Ty21a de Salmonella typhi.

#### Salmonella typhi 541Ty y 543Ty.

Las cepas de Salmonella typhi 541Ty y 543Ty fueron desarrolladas por Stocker en 1981, induciendo deleciones en dos genes (*aro A* y *pur A*), de manera similar a lo anteriormente reportado en Salmonella typhimurium. Estas mutaciones causan la dependencia nutricional de la bacteria por metabolitos que no se encuentran en los tejidos de los mamíferos, por lo que no son capaces de sobrevivir en ellos.

Después de administrar una sola dosis de la cepa 541Ty de S. typhi a voluntarios, se recuperaron bacterias en las heces de la mayoría de los vacunados, pero en ninguno se aisló del hemocultivo. La vacuna generó respuesta inmune celular específica. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos contra los antígenos "O", "H" o "Vi" fue muy débil, debido a esto se consideró que las dos mutaciones causan una sobreatenuación de la bacteria; por lo que se han tratado de desarrollar cepas bacterianas que contengan una sola mutación.

#### **2.3.3 Vacunas elaboradas a partir de fracciones de S. typhi.**

Las investigaciones encaminadas a identificar antígenos de S. typhi relacionados directamente con la protección, han sido numerosas; la mayoría se han dirigido hacia el estudio de los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el somático "O", el flagelar "H", el capsular "Vi" y las proteínas de la membrana externa.

### Antígenos somático, flagelar y fracciones ribosomales.

Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático "O", constituido por el lipopolisacárido (LPS), participaba en la inducción de la inmunidad protectora. Sin embargo, una vacuna a base del oligosacárido de repetición del LPS, a pesar de estar conjugado a proteínas, generó escasa protección en el modelo murino (39).

El antígeno flagelar "H" tampoco parece estar relacionado directamente con la inmunidad protectora, pues Tully y cols. en 1962, demostraron que los anticuerpos contra los flagelos, no tienen efecto protector, pues al inmunizar chimpancés con una cepa rugosa de S. typhi lograron inducir títulos altos de anticuerpos contra el antígeno "H", pero no evitaron la infección con la bacteria (7). Anderson en 1968, encontró que mutantes de S. typhi sin flagelos genera el mismo grado de protección en ratones que-cepas móviles (40).

En 1970, Venneman y cols. reportaron que las fracciones ribosomales de Salmonella typhimurium generaban protección contra la bacteria virulenta para el ratón (41). Posteriormente, Molinari y cols. obtuvieron resultados similares con las fracciones ribosomales de S. typhimurium y de S. typhi (42,43).

El efecto protector de estas fracciones se acreditó a diferentes antígenos: al ARN ribosomal (41), a las proteínas ribosomales (44); o a la combinación de ambos (45); sin embargo, estos antígenos se encontraban contaminados con LPS y proteínas de la membrana externa (PME) (46,47). Considerando que las PME protegen a los ratones contra la infección por Salmonella typhimurium en forma semejante a las fracciones ribosomales (48,49), se duda de la efectividad de estas fracciones y más bien se le atribuye la protección a los antígenos de la superficie bacteriana.

### Vacuna Parenteral hecha a base de Polisacárido Capsular Vi (Ag-Vi).

El polisacárido "Vi" es un homopolímero lineal de ácido  $\alpha$ -1,4-2-desoxi-2-N-acetilgalacturónico que cubre a la bacteria como un antígeno capsular y que se ha relacionado con la virulencia. Aunque varios investigadores han demostrado la falta de correlación entre los anticuerpos anti-Vi y un estado inmune protector, otros estudios revelan que el antígeno "Vi" por sí solo es capaz de inducir protección (31-33). En 1934 Felix y Pitt informaron la presencia de anticuerpos contra el Ag-Vi en el suero de los pacientes con fiebre tifoidea, así como también reportaron la presencia de dicho antígeno en cepas de Salmonella typhi aisladas de estos pacientes (34).

En los años 70, Wong demostró en un modelo murino que la mayor efectividad de la vacuna inactivada por acetona sobre la inactivada por calor-fenol se debe al mayor contenido de antígeno "Vi" en la primera. Más tarde, el mismo investigador logró purificar el antígeno "Vi" sin desnaturalización y demostró que continuaba siendo inmunogénico y seguro.

En 1984, Robbins y Robbins lograron preparar dos lotes de antígeno "Vi". Ambos resultaron buenos inmunógenos; sin embargo, uno de ellos generó reacciones adversas, debido a su contenido de lipopolisacárido contaminante. El lote que se obtuvo a través del Instituto Merieux, en Francia, fue utilizado para realizar pruebas de campo en Nepal y en Sudáfrica. La administración de una sola dosis (25  $\mu$ g) de antígeno "Vi" por vía parenteral indujo títulos elevados de anticuerpos "anti-Vi" y mostró una eficacia del 70% (35,36).

El inconveniente de esta vacuna es que por su naturaleza polisacáridica se comporta como antígeno T-independiente y por tanto no induce memoria (32).

### Proteínas de membrana externa (PME).

Se han realizado múltiples estudios sobre las propiedades inmunogénicas de las PME, Frasch y cols. encontraron que las PME de Neisseria meningitidis grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos. Los anticuerpos anti-PME presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento (50). Estudios subsecuentes han demostrado que la inmunización con PME derivadas de otras bacterias gram negativas, como Haemophilus influenza (51), Shigella flexneri (52) y Pseudomonas aeruginosa (53) también confieren protección contra la infección en animales experimentales.

Por otro lado, Kussi y cols. demostraron que las porinas, proteínas principales de la membrana externa, extraídas de una cepa rugosa de Salmonella typhimurium protegen al ratón de un reto con una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos (54,55).

Los antígenos proteicos ofrecen la ventaja sobre los de naturaleza polisacáridica de inducir anticuerpos de mayor afinidad y favorecer una respuesta inmune celular (37,56). Esta, además de generar una inmunidad más prolongada, es crucial en la defensa contra patógenos intracelulares, como Salmonella typhi, Mycobacterium tuberculosis y Listeria monocytogenes entre otros (57).

Actualmente se encuentra disponible una vacuna desarrollada en Cuba, contra la Meningitis meningococcica del tipo B que se prepara a partir de PME.

En la División de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica del Distrito Federal, CMN S.XXI, IMSS., y en el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Higiene de la Gerencia general de Biológicos y Reactivos, S.S., se realizan estudios tendientes a la obtención de una vacuna contra la fiebre tifoidea a partir de porinas de S. typhi.

Algunos de los resultados más relevantes se enumeran a continuación:

1.- Los pacientes con fiebre tifoidea produjeron anticuerpos de clase IgM hacia una PME de 28 KDa durante la fase aguda de su padecimiento. En la convalecencia, la respuesta fue de IgG y se dirigió hacia las porinas (36-41 KDa) (61).

2.- La vacunación de ratones NIH con 10 a 30  $\mu$ g de PME de S. typhi indujo protección del 100% al reto con 500 DL<sub>50</sub> de la bacteria homóloga, y del 30% al reto con la misma dosis de S. typhimurium (59).

3.- La administración pasiva de suero de conejo anti-PME de S. typhi 9,12,Vi:d, confirió protección del 100% al reto con 100 DL<sub>50</sub> de la bacteria homóloga y S. typhi Ty2; y del 80% al reto de S. typhimurium (59).

4.- El suero de conejo anti-PME utilizado en el ensayo de protección pasiva reconoció por inmunoelectrotransferencia, todas las PME de ambas cepas de S. typhi empleadas en el reto, pero solamente a las porinas de S. typhimurium (59).

5.- Las porinas de S. typhi 9,12,Vi:d purificadas por cromatografía de exclusión molecular, electroelución e inmunoabsorbente tuvieron un pI de 4.0 a 5.0 y pesos moleculares de 114 a 128 KDa en estado nativo (cuando se encuentran asociados en forma de homotrímeros) y de 36 a 41 KDa en su forma monomérica, con una contaminación por LPS del 0.04% (60).

6.- Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de S. typhi 9,12,Vi:d confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL<sub>50</sub> de S. typhi 9,12,Vi:d (63), mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no produjeron ningún efecto (64).

7.- La vacunación de ratones NIH con  $\mu$ g de PME de S. typhi, indujo respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos, en presencia de porinas de S. typhi, S. typhimurium o E. coli (66).

8.- La respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos de ratones NIH inmunizados con PME de S. typhi persistió hasta tres meses después de la inmunización y no se debió a la presencia de LPS (66).

9.- La inmunización con ratones C57B1/6 con PME de *S. typhi* indujo una respuesta proliferativa *in vitro* específica de linfocitos T (66).

10.- La administración de vacuna antitifoídica oral indujo, en las personas estudiadas, la producción de anticuerpos anti-porinas cuantificados por el método de ELISA (62).

11.- La vacunación de ratones NIH con 10  $\mu$ g de porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d indujo una protección de 100% contra el reto de 500 DL<sub>50</sub> de la misma bacteria (58).

12.- Los esplenocitos de ratones NIH con 10  $\mu$ g de PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d se activaron *in vitro* al cultivarse en presencia de péptidos de porinas de *S. typhi* obtenidas por rompimiento con bromuro de cianógeno (67).

En estos momentos, la vacuna experimental hecha a base de porinas ha cumplido con los controles que exige la Secretaría de Salud. Lo que da lugar a que se puedan desarrollar los ensayos que corresponden a título de anticuerpos, eficacia e inocuidad en humanos, estos estudios son preliminares a la fase I de desarrollo de vacunas.

## **2.4 PERSPECTIVAS PARA EL DESARRO DE MEJORES VACUNAS.**

Para la búsqueda de un mejor inmunógeno protector contra la fiebre tifoidea se deben tomar en cuenta los conceptos modernos en investigación y desarrollo de vacunas como lo son:

1.- Definir los mecanismos inmunológicos por medio de los cuales se genera la protección después de la adquisición natural de la enfermedad.

2.- Identificar las partes antigénicas del organismo que inducen la protección.

3.- Identificar a los genes que codifican para la expresión de los antígenos importantes para la generación de inmunidad.

4.- Utilizar las nuevas técnicas de biotecnología para producir dichos antígenos.

5.- Optimizar el diseño y los sistemas de producción de la vacuna para incrementar su eficacia y distribución.

6.- Diseñar modelos adecuados para la evaluación de la capacidad protectora de la vacuna.

Estos conceptos han dado origen a la elaboración de las vacunas modernas como lo son:

a) Las vacunas de péptidos sintéticos, elaboradas en base a la secuencia de aminoácidos de los determinantes antigénicos involucrados en la inducción de inmunidad (90).

b) Vacunas recombinantes, producidas mediante la expresión en bacterias o virus no patógenos, de los antígenos responsables de la inducción de inmunidad (90).

c) Vacunas anti-idiotípicas, basadas en el concepto teórico de la red de idiotipos propuesto originalmente por Jerne, en las cuales uno de los anticuerpos (anti-idiotipo) representa al antígeno, éste se emplea para inducir el estado de inmunidad protectora (11-13,90)

d) Vacunas de subunidades, elaboradas con fracciones del organismo responsable de la enfermedad (41-50,90).

e) Vacunas conjugadas, diseñadas para incrementar la inmunogenicidad de las vacunas de subunidades, en donde se pueden unir químicamente porciones antigénicas de diversos organismos. Dentro de éste grupo se encuentran los conjugados proteína-proteína y polisacárido-proteína (17,32,38,65,90).

Como ejemplos de lo anterior tenemos a las vacunas conjugadas polisacárido-proteína contra Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae (80).

Para la infección por H. influenzae, se cuenta con varias vacunas conjugadas elaboradas con el polisacárido capsular polirribosilribitol-fosfato (PRP), unido a diferentes proteínas como es el caso del toxoide diftérico (D). Esta vacuna PRP-D fue aceptada en 1987 y desde 1988 se emplea en niños de 18 meses de edad o mayores (68,69). Las Proteínas de membrana externa (PME) de Neisseria

meningitis del grupo b han sido empleadas también en la elaboración de este tipo de conjugados. Esta vacuna (PRP-PME) ha demostrado ser segura e inmunogénica en los estudios de campo realizados (71-73).

En un segundo ejemplo, el oligosacárido derivado de H. influenzae tipo b, fue acoplado a una proteína mutante no tóxica de la toxina diftérica, su empleo fue autorizado en 1988 y es considerada una alternativa a PRD-D (70).

Las principales observaciones reportadas en los ensayos de campo han sido alentadoras y han permitido estudiar principalmente los mecanismos humorales involucrados en la protección (74-79).

Para el caso de S. pneumoniae se han producido vacunas conjugadas hechas a base de polisacáridos de varios serotipos conjugados a proteínas. Estas vacunas han demostrado su inocuidad y efectividad en adultos y se planean más estudios en niños en donde se han reportado resultados alentadores (81-83).

En base a estos antecedentes y como alternativa en el desarrollo de una vacuna contra la fiebre tifoidea se pensó en la conjugación química entre las porinas y el antígeno-Vi de S. typhi. Esto se propuso con el fin de conferir características timo-dependientes al antígeno Vi, que ya es una vacuna aprobada para el uso en humanos, e incrementar la inmunogenicidad de las porinas, que se son un modelo experimental de vacuna contra esta enfermedad. La tecnología desarrollada representa una nueva estrategia en el desarrollo de vacunas. Los conjugados forman parte de una nueva generación de inmunógenos semisintéticos, de los cuales algunos ya demostraron su seguridad e inocuidad y han recibido autorización para ser aplicados en humanos, por lo cual se considera que un conjugado antígeno Vi-porinas de S. typhi es un buen candidato para la prevención de la fiebre tifoidea.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General.**

**Elaborar un inmunógeno bivalente antigéno Vi-porinas.**

#### **3.2 Objetivos particulares.**

**Obtención de porinas de Salmonella typhi 9,12,Vi:d.**

**Obtención del conjugado antigéno Vi-porinas de S.typhi.**

**Caracterización inmunoquímica del conjugado.**

## 4.0 MATERIAL Y METODOS.

### 4.1. METODOS BACTERIOLOGICOS.

#### 4.1.1 Cepas bacterianas.

Se empleó la cepa Salmonella typhi 9,12,Vi:d aislada de un paciente con fiebre tifoidea, tipificada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE).

#### 4.1.2 Cultivo de bacterias.

La bacteria se creció en medio mínimo "A" ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g/l, Citrato de Sodio 0.5 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/l,  $\text{MgSO}_4$  1 g/l) durante 16-18 hrs en cultivo estacionario y posteriormente se pasó la semilla a garrafones de 4 l, los cuales se cultivaron en agitación durante 8 h (fase de crecimiento logarítmico) a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A (59) suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1650 x g durante 15 min a 4°C. El sedimento que contiene a las bacterias se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

## 4.2 METODOS BIOQUIMICOS

### 4.2.1 Obtención de las porinas.

La obtención de las porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido (84). Las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompieron por sonicación (Lab line Ultratrip Labsonic system, sonicator) en períodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. Seguido de la eliminación de las bacterias enteras por centrifugación a 7000 x g/15 min, se concentró por ultracentrifugación la envoltura celular a 100 000 x g/30 min a 20°C, ésta se homogenizó en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado de SDS al 2% y se incubó 30 min a 32°C, posteriormente se ultracentrifugó y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contenía la peptidoglicana, de donde se extrajeron las proteínas unidas a ella con amortiguador de Nikaido (Tris 50 mM, pH 7.7, SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.05%); después de un período de incubación de 2 h a 37°C, se ultracentrifugó a 100 000 x g/30 min a 25°C y el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4 ml/h. Se recuperó la fracción que eluye inmediatamente después del volumen vacío, detectada por absorbancia a 280 nm. Para reutilizar la columna, ésta se lavó con solución de Nikaido con un volumen equivalente a dos veces el volumen total del gel .

#### 4.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida:

La electroforesis se realizó en presencia de dodecil sulfato de sodio, en condiciones reductoras y un sistema amortiguador discontinuo, según la técnica descrita por Laemmli (91) en una unidad de electroforesis vertical (LKB Instruments, Inc., Rockville, MD.). El gel introductor contenía una concentración final de 5% de acrilamida, 0.13% de bis acrilamida, 0.1% de SDS en Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8; el gel separador estuvo formado por 11.2% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en Tris-HCl 0.35 M a pH 8.8. El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.192 M pH 8.3, SDS 0.1%.

#### 4.2.3 Cuantificación de proteínas:

La cuantificación del contenido de proteínas en el extracto de la purificación de porinas se realizó de acuerdo al método de Lowry (85), empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

#### 4.2.4 Reacción del O-acetilo (O-Ac).

A 1 ml de la muestra (fracciones con el antígeno Vi) se le adicionó una mezcla de partes iguales de hidroxilamina-HCl 1M y NaOH 3.5 M, se mezclaron, y después de 4 min a temperatura ambiente se agregó agitando constantemente, 1 ml de HCl diluido 1:3 con el fin de tener un pH final de 1.2 +/- 0.2, posteriormente se adicionó 1 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.37 M, el producto de reacción se leyó a 540 nm (86).

#### 4.2.5 Obtención y purificación de conjugados Ag Vi-Porinas.

En el presente trabajo se realizaron dos técnicas diferentes para la obtención del conjugado Ag Vi-Porinas.

##### 4.2.5.1 Conjugado con SPDP como molécula espaciadora:

El primer ensayo realizado, involucró al N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) y a la cistamina como moléculas espaciadoras.

Primeramente se hizo reaccionar a las porinas con SPDP, a pH 7.5 en 0.15M Hepes y 5mM EDTA (HE-buffer) durante toda la noche, obteniéndose el derivado Porinas-SPDP con liberación de N-hidroxisuccinato. La mezcla de reacción así obtenida, fue dializada en HE-buffer durante toda la noche.

Por otra parte se hizo reaccionar al polisacárido Vi (homopolímero del ácido N-acetil galacturónico O-acetilado en la posición 3) con cistamina en presencia de 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (EDAC), a un pH de 4.9 ajustado con HCl 0.1 N y a 37°C, obteniéndose el polisacárido cistaminado, éste producto de reacción fue dializado contra agua destilada de 3-8°C. Acto seguido, el polisacárido cistaminado fue sometido a una reducción química, por medio de ditioneitol (DTT), la mezcla fue sometida a diálisis en HE-buffer durante 2 hrs. Una vez terminado el proceso, este compuesto cistaminado se hizo reaccionar con el derivado Porinas-SPDP bajo presión de N<sub>2</sub>, durante 1 hora a temperatura ambiente, y 24 h de 3-8 °C. La reacción se hace evidente por la liberación de 2-mercapto piridina.

El producto obtenido se dializó contra NaCl 0.15 M durante toda la noche.

#### **4.2.5.2 Conjugado con ADH como molécula espaciadora:**

El segundo método utilizado para la obtención del conjugado Vi-Porinas, involucra como molécula espaciadora a la dihidrazida del ácido adípico (ADH) en presencia de carbodiimida (EDAC).

Primeramente se hizo reaccionar 10.8 g de antígeno Vi, disuelto en buffer de de fosfatos pH 6.5 ( $K_2HPO_4$  0.0055 M,  $KH_2PO_4$  0.0045 M, disueltos en sol. de NaCl 0.2 M), con 25 mg ADH en presencia de 25 mg de carbodiimida, durante 4 hrs a 20 °C, cuidando que el pH fuese de 6.5. Al terminar el tiempo de la reacción, se colocó éste producto en una bolsa de nitrocelulosa y se dializó contra buffer de fosfatos pH 6.5 durante toda la noche.

El antígeno Vi-ADH, se sacó de la diálisis y se colocó en un frasco vial, se le adicionó 4.5 ml de porinas conteniendo 5.8 mg de las mismas, adicionando a la vez, 25 mg de EDAC, se agitó durante 6 horas manteniendo el pH en 6.5. Al término de éste el producto obtenido se concentró por medio de membrana (Amecon valor de corte:  $PM > 10,000$ ), y se colocó en diálisis contra buffer de fosfatos pH 6.5.

La purificación de ambos conjugados se realizó por medio de cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Sephacryl S-1000 (78.5 cm X 1.5 cm) empleando como fase móvil, para el primer caso de síntesis NaCl 0.2 M. Mientras que para el segundo caso se utilizó buffer de fosfatos pH 6.5.

#### **4.2.6 Caracterización de los conjugados Ag Vi-Porinas.**

Las fracciones producidas en la purificación del conjugado fueron monitoreadas a 280 nm para proteínas (porinas), y se empleó el método de ELISA (98) para detectar al Ag-Vi.

Para esto último, se recubrieron dos placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.), con 100  $\mu$ l de cada una de las fracciones mencionadas en amortiguador de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio pH 9.6), durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se lavó dos veces con PBS-Tween al 0.1% (PBS-T) y se llenaron los pozos con solución de bloqueo (PBS-gelatina al 2%) y se dejaron dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 100  $\mu$ l del primer anticuerpo, anti-Vi obtenido de humano dil: 1:200 para el conjugado con SPDP como molécula espaciadora, mientras que para el conjugado con ADH como molécula espaciadora utilizamos el suero de burro anti-Vi absorbido con *S. typhi* O901. Se incubó la placa durante 1.0 hr. a 37°C y después de cuatro lavados con PBS-T se adicionó el segundo anticuerpo, 100  $\mu$ l de conjugado inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de humano unidas a peroxidasa (Sigma Co.) correspondientes al primer caso de conjugación. Mientras que para el segundo se utilizó el suero de conejo anti-burro unido a peroxidasa preparada por nosotros; se incubó la placa 1.5 h a 37°C y después de 4 lavados con PBS-T se agregaron 100  $\mu$ l de solución de sustrato (o-fenilendiamina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) al 0.04% en amortiguador de citratos pH 5.0) y a los 10 min, la reacción se detuvo agregando 1 gota de ácido sulfúrico 2.5 M. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II Dynatec).

Para el conjugado con ADH como molécula espaciadora se utilizó la técnica de ELISA para monitorear a las porinas; siguiendo el procedimiento arriba descrito, utilizando un suero de conejo anti-porinas dil. 1:100 como primer anticuerpo e IgG de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa (Biorad) dil. 1:1000.

### 4.3 METODOS INMUNOQUIMICOS

#### 4.3.1 Purificación de porinas de S.typhi por Cromatografía de Afinidad.

Esta se realizó en el laboratorio de acuerdo a la técnica de inmunoadsorbente (60).

#### 4.3.2 Evaluación del antígeno Vi.

El antígeno Vi (Ag-Vi) fue proporcionado por el Dr. John Robbins del National Institute of Health USA.

Se tomaron 10 mg de Ag-Vi y se pasaron por una columna de (Sephacryl S-1000) equilibrada con amortiguador de fosfatos pH 6.5 a una velocidad de flujo de 2 ml/min, las fracciones colectadas fueron monitoreadas a 260 nm en el espectrofotómetro (Beckman DU-7). Estas mismas fracciones con el Ag-Vi, fueron sometidas a las pruebas de ELISA y de O-acetilo (86).

#### 4.3.3 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

##### 4.3.3.1 Valoración del cruce con porinas del suero de burro anti-Vi después de ser absorbido con S. typhi O901.

Se realizó mediante la técnica de ELISA (87), utilizando porinas a una concentración de 20, 10, 5 y 2.5 µg/ml como antígeno, suero de burro anti-Vi antes y después de ser absorbido con S. typhi O901, a las diluciones de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 y 1:12800 como primer anticuerpo, y el conjugado de inmunoglobulinas de conejo anti-burro marcadas con peroxidasa en glicerol, arriba mencionado, dil 1:1000 como segundo anticuerpo. Como testigo se utilizó en el sistema, inmunoglobulinas de conejo anti-porinas dilución 1:1000 como primer anticuerpo, y como segundo anticuerpo se utilizó IgG anti-conejo marcada con peroxidasa (Biorad) dilución 1:2000.

#### 4.3.3.2 Preparación del conjugado anticuerpo-peroxidasa.

Se disolvieron 12.7 mg de peroxidasa (Sigma) en una solución de glutaraldehído al 1% y se mantuvo a temperatura ambiente durante 18 h, al término de las cuales se hizo pasar esta solución por una columna de Sephadex G-25 (78.5 cm X 1.5 cm); se colectaron las fracciones coloridas dando un volúmen total de 2.6 ml. A 2 ml de esta peroxidasa se le adicionó 200  $\mu$ l de inmunoglobulinas de conejo anti-burro (Laboratorio de Inmunoquímica IMSS), previamente dializadas en NaCl 0.15 M, a su vez se agregaron 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de carbonatos pH 9.5. La mezcla se guardó a 4°C durante toda la noche, al término de ésto se adicionaron 0.15 ml de una solución 1 M de lisina en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4. La mezcla de reacción se dializó contra PBS toda la noche. Al término de la diálisis el producto se dividió en dos porciones, la primera de 0.8 ml a la cual se le adicionó 0.8 ml de glicerol; mientras que la segunda porción se dejó sin cambio.

#### 4.3.3.3 Evaluación del conjugado anticuerpo-peroxidasa.

En una placa de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co), se fijó el antígeno (inmunoglobulinas de burro anti-Vi) disueltas en amortiguador de carbonatos pH 9.5, utilizando dos concentraciones diferentes de antígeno: 20 y 10  $\mu$ g/ml. Ambas se probaron por separado a las diluciones de 1:500, 1:1000, 1:200, 1:4000, 1:8000, con el anticuerpo marcado con peroxidasa en glicerol y sin glicerol, mediante la técnica de ELISA (87).

Una vez obtenidos y probados todos los elementos de nuestro sistema, se procedió a realizar la prueba de ELISA a las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular (Sephacryl S-1000). Se utilizó como primer anticuerpo el suero de burro anti-Vi arriba mencionado, y como segundo anticuerpo, el suero de conejo anti-burro unido a peroxidasa arriba descrito.

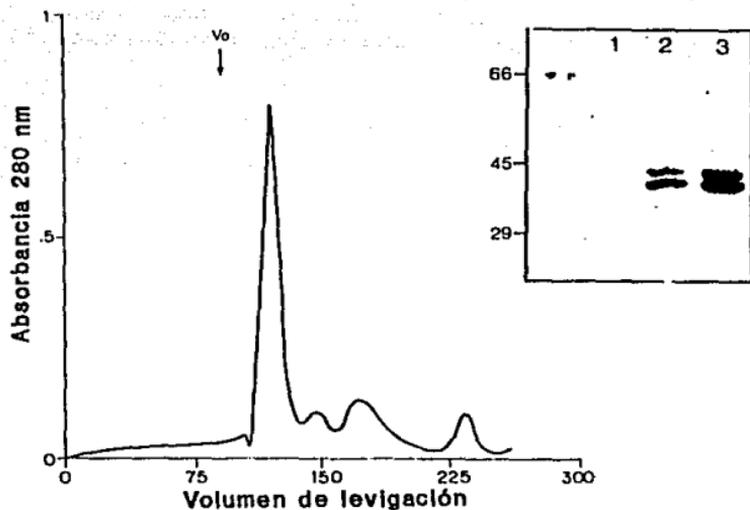
## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Obtención de porinas de S. typhi 9,12 Vi:d.

Las porinas se purificaron empleando el método de Nikaido (84); en la figura 1, se muestra el perfil cromatográfico de la purificación de las porinas de S. typhi 9,12,Vi:d. En él se observa que la fracción que eluyó inmediatamente después del volumen vacío contenía a las porinas en forma de trímeros (114 Kd a 12 Kd). Esto se demuestra por electroforesis (ver recuadro), ya que después del calentamiento de éstas proteínas solamente se observan dos bandas protéicas con corrimiento relativo electroforético de 38 Kd a 41 Kd, característico de las porinas.

### -5.2 Obtención de gama globulinas de burro anti-VI, y de conejo anti-burro.

Las gama globulinas se obtuvieron de los respectivos sueros por medio de la precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio, de tal forma que la mezcla tenga una concentración final de saturación del 33%. El producto se dializó contra una solución salina amortiguada con boratos, hasta que no se encontró presencia de sulfatos en la solución de diálisis.



**Figura No.1 PURIFICACION DE PORINAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR (Sephacryl S-200).**

En el recuadro se observa el corrimiento electroforético (SDS-PAGE) de las porinas en concentraciones crecientes (carriles 1, 2 y 3); previo a estos se muestran los estándares de peso molecular. El pico principal del cromatograma de elución corresponde a las porinas éstas eluyen a continuación del volumen vacío ( $V_0$ ).

### 5.3 Unión de las gama globulinas de conejo anti-burro con la peroxidasa.

Se determinó la concentración de proteínas totales de las gama globulinas de conejo anti-burro, por el método de Lowry (85), obteniéndose un valor de 3.25 mg/ml.

De acuerdo a la figura 2, las diluciones más adecuadas para trabajar son los siguientes: para el conjugado sin glicerol 1:2000, mientras que para el conjugado con glicerol fue de 1:1000.

### 5.4 Valoración del suero de burro anti-Vi (cruce con porinas).

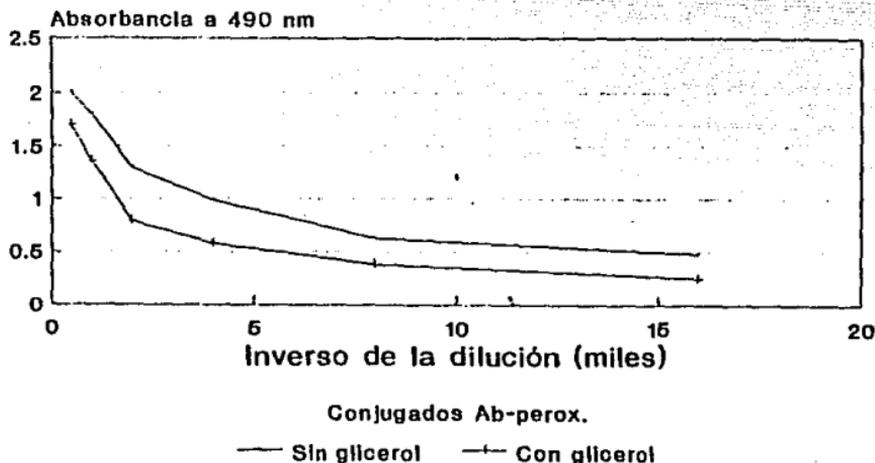
El suero de burro anti-Vi después de ser absorbido con S. typhi O901, muestra una considerable disminución de la reacción cruzada con las porinas con respecto al suero no absorbido, como se puede apreciar en la figura 3, los títulos más altos de ésta reacción se presentan en la dilución 1:50 y con la concentración más alta del antígeno (20 µg/ml).

### 5.5 Purificación cromatográfica del conjugado Ag-Vi-Porinas con SPDP como molécula espaciadora.

El perfil cromatográfico, nos muestran la formación de un componente de alto peso molecular, en el cual se detectan tanto el antígeno Vi como las porinas, éste conjugado se puede observar entre los 50 a 70 ml de levigación de la muestra (figura 4). Se pueden detectar a su vez otros componentes proteicos de menor peso molecular, entre los cuales es notable la presencia de uno que eluye entre los 130 y los 150 ml. El perfil del antígeno Vi se observa como una serie de fracciones de diferentes pesos moleculares, entre las que destaca la región que eluye entre los 150 y los 170 ml.

### **5.6 Purificación cromatográfica del conjugado con ADH como molécula espaciadora.**

En el perfil de elución de la figura 5 se puede observar la presencia del conjugado de porinas y antígeno Vi, en las fracciones que eluyen entre los 60 y 90 ml; así como la presencia de una serie de fracciones que corresponden a porinas, que agregadas o solas, eluyen hasta los 300 ml. El antígeno Vi se logró detectar hasta los 150 ml.



**Figura No.2 TITULACION DEL CONJUGADO Ab-PEROXIDASA.**

El conjugado fue hecho con gamaglobulinas de conejo anti-burro y peroxidasa. El producto obtenido fue dividido en dos porciones, a una de éstas se le adicionó glicerol, y ambas fueron tituladas por medio de la prueba de ELISA, utilizando gamaglobulinas de burro anti Vi. En la gráfica se observa que los títulos mayores corresponden al conjugado sin glicerol. Con lo anterior se determinaron las diluciones más adecuadas para trabajar, siendo para el conjugado sin glicerol de 1:2000, y con glicerol de 1:1000.

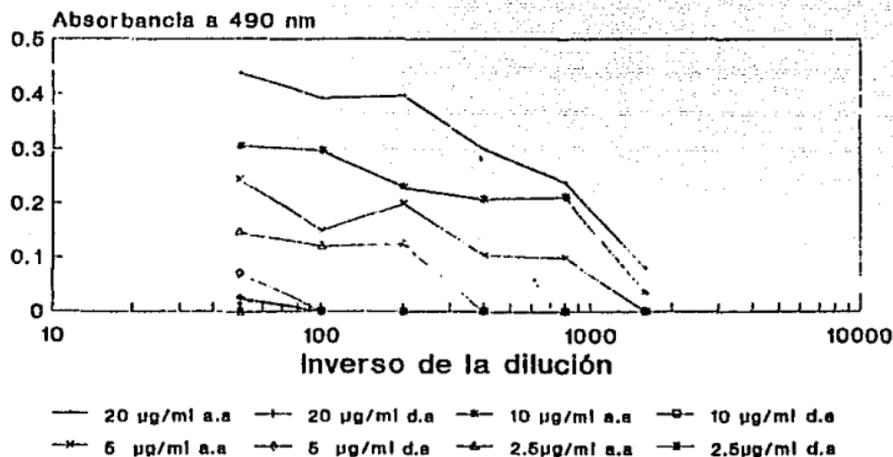
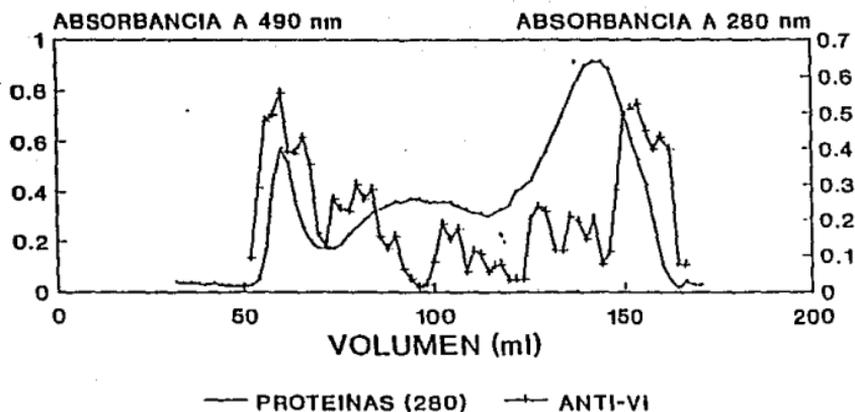


Figura No.3 VALORACION DEL SUERO DE BURRO ANTI-Vi.

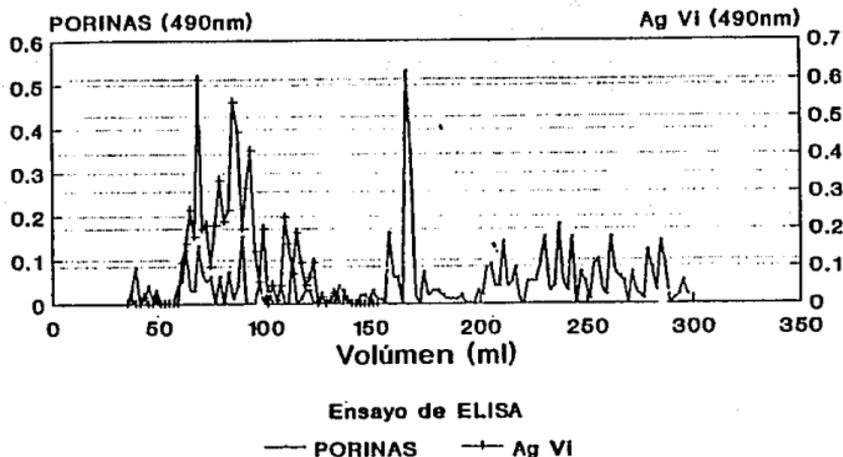
(CRUCE CON PORINAS).

El suero fue absorbido con *S. typhi* O901 que carece de antígeno Vi. a.a= antes de absorber, d.a= después de absorber. La valoración se realizó por medio de la prueba de ELISA, utilizando a las porinas como antígeno en concentraciones de 20, 10, 5 y 2.5 µg/ml; como sistema de revelado se utilizó el suero de conejo anti-burro marcado con peroxidasa (Fig. 2).



**Figura No.4 CONJUGADO ANTIGENO VI-PORINAS CON SPDP COMO MOLECULA ESPACIADORA.**

Las fracciones colectadas de la elución por la columna de Sephacryl S-1000 (78.5 X 1.5 cm) (2 ml/tubo), fueron analizadas midiendo su absorción a 280 nm, y por medio de la prueba de ELISA, utilizando suero humano anti-Vi y suero de conejo anti-porinas. En la gráfica se puede observar un componente de alto peso molecular entre los 50 y 70 ml de elución, el cual corresponde al conjugado.



**Figura No.5 CONJUGADO ANTIGENO Vi-PORINAS CON ADH COMO MOLECULA ESPACIADORA.**

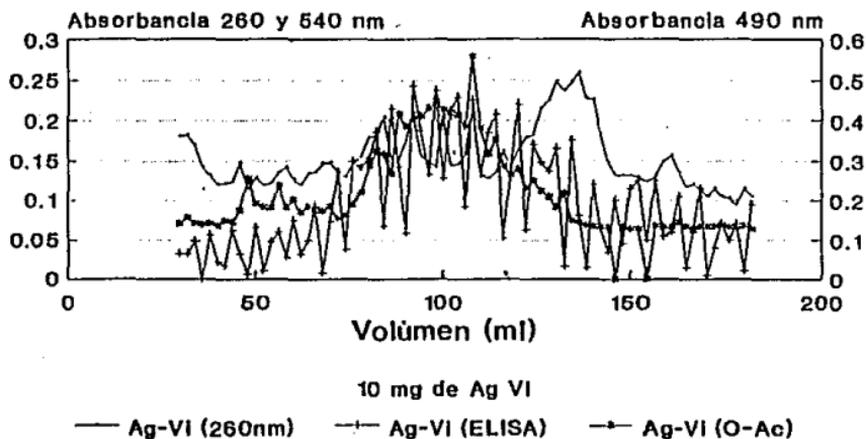
Las fracciones colectadas después de la elución del conjugado por la columna de Sephacryl S-1000 (78.5 X 1.5 cm),(2 ml/tubo) fueron analizadas midiendo su absorbancia a 280 nm y por medio de la prueba de ELISA, utilizando suero de burro anti-Vi absorbido con *S. typhi* O901, y suero de conejo anti-porinas. Como sistema de revelado se utilizó el conjugado gamaglobulina de conejo anti-burro marcado con la peroxidasa (Fig.2). En la gráfica se puede observar un componente de alto peso molecular similar al de la figura 4, que en este caso se encuentra entre los 60 y 90 ml de elución.

### **5.7 Purificación cromatográfica del antígeno Vi en Sephacryl S-1000.**

La identificación del antígeno Vi se realizó por medio de las técnicas de ELISA, absorbancia a 260 nm y reacción del grupo O-acetilo, en la figura 6 se observa el perfil de elución de éste antígeno, en donde se puede ver la gran heterogenicidad de pesos moleculares presentes en la muestra, lo cual es característico en éste tipo de antígenos.

### **5.8 Purificación cromatográfica de las porinas en Sephacryl S-1000.**

En la figura 7 se muestra que las porinas presentan un volumen de levigación principal entre los 130 y 150 ml, junto con una fracción menor, la cual cluye entre los 150 y 160 ml.



**Figura No.6 PERFIL CROMATOGRAFICO DEL ANTIGENO VI EN LA COLUMNA DE SEPHACRYL S-1000 (78.5 x 1.5 cm).**

Las fracciones colectadas de la elución del antígeno Vi (2 ml/tubo), fueron analizadas por tres técnicas: ELISA (leído a 490 nm), O-acetilo (leído a 540 nm) y midiendo su absorbancia a 280 nm.

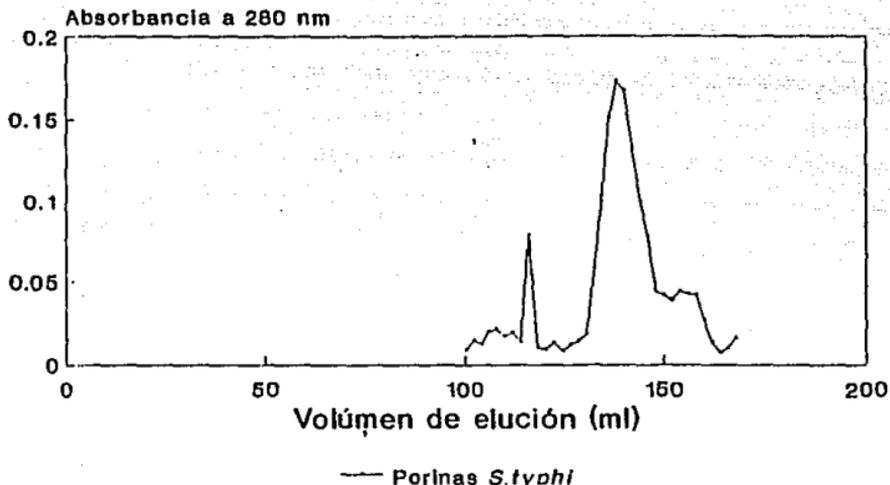


Figura No.7 PERFIL CROMATOGRAFICO DE LAS PORINAS EN LA COLUMNA DE SEPHACRYL S-1000.

Las fracciones producidas por la elución de las porinas en la columna (2 ml/tubo) fueron analizadas midiendo su absorbancia a 280 nm. Las porinas eluyen entre los 130 y 150 ml, lo cual se puede observar dentro de los productos de la separación de los conjugados (fig.4).

## 6.0 DISCUSION

El control epidemiológico de las diarreas depende, entre otros aspectos, del mejoramiento de la infraestructura sanitaria, del saneamiento básico y del manejo adecuado de los alimentos. Para esto es necesario no sólo mejorar el nivel económico de la población, sino elevar su nivel de educación para la salud.

Debido a la dificultad que implica el logro de estos objetivos, y a pesar de sus imperfecciones técnicas, las vacunas continúan siendo una alternativa en la lucha contra las enfermedades diarreicas.

Aunque algunas vacunas desarrolladas hasta ahora han demostrado su eficacia en el control y erradicación de padecimientos como la viruela, no es factible esperar resultados espectaculares en un futuro cercano en la elaboración de otras vacunas (90). Para lograr productos que generen inmunidad efectiva, será necesario comprender con profundidad tanto los mecanismos patogénicos, como la naturaleza de la respuesta inmune que se produce en contra de los microorganismos responsables de las enfermedades diarreicas.

Dada la incidencia de fiebre tifoidea en los países en vías de desarrollo y el carácter invasivo de S. typhi, resulta importante desarrollar una vacuna que confiera una inmunidad duradera y que no produzca efectos colaterales.

En el presente trabajo se aborda una nueva estrategia en el desarrollo de una vacuna contra la fiebre tifoidea, para la cual se tuvieron que diseñar las pruebas necesarias para identificar a los productos de la conjugación, como lo fue el caso de la prueba de ELISA, hecha para identificar al antígeno Vi. Con este antígeno se formaron anticuerpos de burro anti-Vi, los cuales para poder ser identificados se necesitó producir anticuerpos de conejo contra gamaglobulinas de burro, éstas fueron marcadas con peroxidasa para utilizarse como sistema de revelado. Este tipo de tecnología nos ha

permitido tener mayor campo de acción en la realización de otras pruebas de identificación de antígenos para las cuales no existen reactivos comerciales.

Una vez con la tecnología necesaria para la identificación del conjugado se procedió a la preparación de los antígenos a conjugar.

Al realizar la evaluación del antígeno Vi, se pudo observar que este antígeno está constituido por un grupo de fracciones de diverso peso molecular. lo cual ha sido reportado en otros trabajos (31,32,36,38). Los métodos utilizados para la evaluación coincidieron con lo mencionado en dichos reportes, y además se pudo observar que existe una mayor correlación entre los picos obtenidos por las pruebas de ELISA y la lectura a 260 nm, que de estos picos con los detectados en la prueba del O-acetilo donde sólo encontramos una curva tipo campana de Gauss.

El poder identificar varias agrupaciones del antígeno Vi por diversos métodos, nos da la capacidad de evaluar las condiciones del antígeno, ya que el antígeno que se busca utilizar para la conjugación debe estar en su forma más inmunogénica. dicha inmunogenicidad se le ha atribuido a la presencia del grupo O-acetilo (31,36), sin embargo, como pudimos constatar, no todas las fracciones de esa mezcla heterogenea de antígeno, contienen al grupo O-acetilo, por lo cual en futuros ensayos se tratará de separar las fracciones que reporten la mayor cantidad de dicho grupo para optimizar la conjugación.

En el caso de la producción de las porinas el desarrollo de la tecnología se enfocó en dos puntos principales: La producción de bacteria a gran escala y la obtención y purificación de las porinas a partir de la biomasa obtenida.

Para la producción de las porinas se requiere cultivar una gran cantidad de bacterias, y se busca no sólo la presencia de biomasa bacteriana sino que en ésta se esté expresando la mayor cantidad de porina posible, esto se debe a que no hay una relación directa entre estos dos parámetros, ya que dicha expresión es un evento que tiene un complejo sistema de regulación el cual

depende de factores como la osmolaridad, pH, temperatura, aereación, etc., que además no están totalmente estudiadas. En el presente trabajo se utilizó el cultivo agitado en garrafones con el cual se obtienen bajos rendimientos de producción, expresados en biomasa y en cantidad de porinas, por lo cual se están ensayando mejores métodos de cultivo, como lo es el uso de fermentadores en donde podemos controlar, de manera más eficiente los parámetros involucrados en el cultivo, así pues podremos incrementar no sólo la cantidad de biomasa bacteriana producida, sino también la cantidad de porina.

En el caso de la extracción y purificación de las porinas se presentan varios problemas: las porinas por ser proteínas de membrana son de naturaleza hidrofóbica, esto hace que sean insolubles en soluciones reguladoras comunes, por lo cual se requiere de un detergente y de soluciones de fuerza iónica elevada para solubilizarlas. Para extraerlas es indispensable realizar varios pasos, al final de los cuales se recupera una mezcla de proteínas que acompañan a la porina, ésto hace necesario de adicionales etapas de purificación las cuales encarecen el proceso; actualmente, se están mejorando dichos sistemas. Una posible solución a estos problemas sería el hacer una porina soluble, mediante una fusión génica con una proteína de expresión como lo es la subunidad B de la toxina del cólera.

Para la elaboración del conjugado se han ensayado varios métodos, dos de los cuales se presentan en este trabajo, éstos han sido los mejores en cuanto a que han sido los únicos en los cuales se ha podido observar la unión, sin embargo, no se ha llegado a las condiciones de reacción óptimas que nos permitan superar los rendimientos obtenidos, por lo cual se sigue ensayando con las condiciones de reacción y se esta buscando el desarrollo de nuevas moléculas espaciadoras que faciliten la reacción.

En la cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-1000), desarrollada para la purificación e identificación del conjugado, se obtuvieron fracciones definidas de conjugado (50-70 ml), porinas

(130-150 ml) y de antígeno Vi (70-120 ml y 130-150 ml), éste último presentó una vez más la heterogeneidad característica de los polisacáridos, coincidiendo con lo descrito por Szu et al (38), cuando clasifica a dicho antígeno en fracciones de alto y bajo peso molecular.

El hecho de que los conjugados eluyan en el volumen vacío de la columna de Sephacryl S-1000 y de que este producto no entre al gel de acrilamida al 11% y en condiciones reductoras (SDS-PAGE), sugiere que se forma un enlace covalente entre el carbohidrato y la proteína, sin embargo, la demostración del mismo se comprobará hasta realizar el análisis correspondiente por medio de la espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear. El hecho de que el conjugado no-entre al gel de poli(acrilamida) se ha observado previamente en el caso de los conjugados polisacárido-proteína de Vibrio cholerae (100) y en el caso del conjugado antígeno Vi-Albúmina sérica bovina (32).

El presente trabajo presenta los resultados preliminares que demuestran que es posible unir a la porina con el antígeno Vi, lo cual nos da la pauta para seguir intentando el desarrollo de una vacuna con esta tecnología; el desarrollo de esta tecnología y las mejoras en las condiciones de reacción, permitirán lograr un rendimiento aceptable que nos lleve a la evaluación de la capacidad inmunogénica del conjugado. Estas evaluaciones indicarán la factibilidad de emplearlo como una vacuna contra la fiebre tifoidea, ya que la conjugación química ha permitido unir, por un lado al antígeno Vi que ya es usado como vacuna parenteral (35,36), con las porinas que son inmunógenos protectores en el modelo murino (58). Esperamos que con esto, tengamos una vacuna que no solamente proteja, sino que sea de larga duración, produzca memoria y pueda emplearse en ancianos y en menores de 18 meses de edad.

## 7.0 CONCLUSIONES

- Se obtuvo un conjugado de unión covalente entre el antígeno Vi y las porinas de Salmonella typhi.
- Con nuestro métodos de evaluación y rastreo del conjugado no encontramos diferencia en el producto final con los dos procedimientos utilizados.
- Las propiedades antigénicas de las porinas y del antígeno Vi no se ven modificadas en el conjugado, ya que siguen siendo reconocidos por los anticuerpos correspondientes.

## 8.0 BIBLIOGRAFIA.

- 1.- KUMATE, J. 1980. Fiebre Tifoidea. En: Manual de Infectología. Editado por Kumate, J. y Gutiérrez G. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
- 2.- ANUARIO ESTADISTICO 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S.
- 3.- HORNICK,R.B., GREISMAN,S.E., WOODWARD,T.E., DUPONT, H.L., DRAWKINGS,A.T. y SAJDER,W.J. 1970. Typhoid fever pathogenesis and immunological control. N. Engl. J. Med. 283:686-691.
- 4.- SANDFORD,G.R. 1979. Infectious diseases. Ed. Burgess Pub. Co. USA. pp. 55-130.
- 5.- HUCKSTEP,R.L. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. E. y S. Livingstong, L.T.D., London. pp.4-9.
- 6.- DAVIES,B.D., DULBECO,R., EISEN,H.N., GINGBERG,H.S. y WOOD,W.B. 1983. Tratado de Microbiología. Barcelona, España. Editorial Salvat Editores.
- 7.- TULLY,J.G., GAINES,S. y TIGERTT,W.D. 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. J. Infect. Dis. 112:118-124.
- 8.- KUMATE,J. 1979. Inmunidad, Inmunización y Vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México pp. 227-247.
- 9.- MAKELA,P.H., SAXEN,H., VALTONEN,M. y VALTONEN,V. 1988. *Salmonella*, Complement and mouse-macrophages. Immunol. Lett. 19:217-222.
- 10.- RAJAGOPALAN,P., KUMAR,K. y MALAVIYA,A.N. 1982. Immunological studies in typhoid fever. II. Cell-mediated immune responses and lymphocyte subpopulations in patients with typhoid fever. Clin. Exp. Immunol. 47:269-274.
- 11.- BONA,C. y MORAN,T. 1975. Idiotypic vaccine. Ann. Int. Pasteur-Immunologic. 136:299-312.
- 12.- HIERNAVE,J.R. 1988. Idiotypic vaccine and infectious disease. Infect. Immun. 56:1407-1413.
- 13.- LEVINE,B., KAPER,B.J. y BLACK,R. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. Microbiol. Rev. 47:510-519.

- 14.- PEREZ,M.A. y CABRERA,R. 1974. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. Rev. Sal. Púb. Méx. 15:185-194.
- 15.- CUJETANOVIC,B. y VEMUN,K. 1965. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. Bull. WHO. 32:29-36.
- 16.- HEJFEC,L.B., SALMIN,L.V., LEJTMAN,M.Z., KUZMINOVA, M.L., VASILEVA,A.V., LEVINA,L.A., BENCIANOVA,T.G., PAVLOVA,L.A., y ANTANOVA,A.A. 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the URSS. Bull WHO. 30:321-339.
- 17.- LEVINE,M.M., FERRECCIO,C, BLACK,R.E, TACKET,C.O., GERMANIER,R. y the CHILEAN TYPHOID COMITE. 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 11:8552-8567.
- 18.- MATSUI,K. y ARAI,T. 1989. Specificity of *Salmonella* Porin as an Eliciting Antigen for Cell-Mediated Immunity (CMI) Reaction in Murine Salmonellosis. Microbiol Immunol. 33:1063-1067.
- 19.- POLISH TYPHOID COMMITTEE. 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. Bull WHO. 32:15-27.
- 20.- TYPHOID PANEL, U.K. 1964. Departement of Technical Cooperation. A controlled field trail of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in British Gullana. Bull WHO. 30:631-634.
- 21.- JOO,I. 1970. Present status and perspectives of vaccination against typhoid fever. International Conference on the Aplication of Vaccines Against Viral, Rickettsial and Bacterial Disease of Man, Washington, D.C. PAHO Sci. Publ. 226:339-341.
- 22.- HORNICK,R.B., DUPONT,H.L., DAWKINS,A.T., SNYDER,M.J. y WOODARD,T.E. 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Symposia Series in Immunobiological Standardization. 15:143-150.
- 23.- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1990. Typhoid Immunization. Recommendations of the Immunization. -Practices Advisory Committee-. Morbidity and Mortality Weekly Report. 39:1-5. Atlanta, Georgia, USA.

- 24.- REITMAN,M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhi*. J. Infect. Dis. 117:101-107.
- 25.- DUPONT,H.L., HORNICK,R.B., SNYDER,M.J., LIBONATTI,J.P. y WOODWARD,T.E. 1970. Immunity in typhoid fever: evaluation of live streptomycin-dependent vaccine. Antimicrob. Agents Chemother. 1971:236-240.
- 26.- LEVINE,M.M., DUPONT,H.L., HORNICK,R.B., SNYDER,M.S., WOODWARD,W., GILMAN,H.R. y LIBONATTI,J.P. 1976. Attenuated streptomycin-dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: potential deleterious effects of lyophilization. J. Infect. Dis. 133:424-429.
- 27.- GERMANIER,R. y FURER,E. 1975. Isolation and characterization of *S. typhi* gal E mutant Ty21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 131:553-558.
- 28.- GERMANIER,R. 1984. Typhoid fever. In Bacterial vaccines. Ed. Germanier,R. Academic Press. pp.137-165.
- 29.- GERMANIER, R. 1977. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. Bol. Sanit. Panam. 82:300-311.
- 30.- WAHDAN,L.I., SERIE,C., CERISIER,Y., SALLAM,S. y GERMANIER,R. 1982. Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: Three years results. J. Infect. Dis. 145:292-293.
- 31.- ROBBINS,J.D. y ROBBINS,J.B. 1984. Re-examination of the immunopathogenic role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. J. Infect. Dis. 150:436-449.
- 32.- SZU,S.C., STONE,A.L., ROBBINS,J.D., SCHNEERSON,R. y ROBBINS,J.B. 1987. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. J. Exp. Med. 166:1510-1521.
- 33.- WARREN,J.W. y HORNICK,R.B. 1979. Immunization against typhoid fever. Ann. Rev. Med. 30:457-472.
- 34.- FELIX,A., KRIKORIAN,K.S. y REITLER,R. 1935. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J. Hyg. 35:421-427.

35.- ACHARYA,I.L., LOWE,C.L., THAPA,R., GURUBACHARYA, V.L.; SHRESTA,M.B., BACT,D., CADOZ,M., SCHULZ,D., ARMAND,J., BRYLA, D.A., TROLLIFORS,B., CRAMTON,T., SCHEERSON,R. y ROBBINS,J.B. 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. N. Engl. J. Med. 317:1101-1104.

36.- KLUGMAN,K.P., KOORNHOF,H.J., GILBERSTON,I.T., ROBBINS,J.B., SCHNEERSON,R., SCHULTZ,D., CADOZ,M., ARMAND, J. y THE VACCINATION ADVISORY COMMITTEE. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. Lancet. ii:1165-1169.

37.- EINSEN,H.N. y SISKIND,G.W. 1969. Variations in affinities of antibodies during the immune response. Biochemistry 3:996-1008.

38.- SZU,S.C, LI,X., SCHNEERSON,R., VICKERS,H.J., BRYLA,D. y ROBBINS,J.B. 1989. Comparative immunogenicities of Vi polysaccharide-protein conjugates composed of cholera toxin or its B subunit as a carrier bound to high -or lower- molecular weight Vi. Infect. Immun. 57:3823-3827.

39.- SVENSON,S.B., NURMINEN,M. y LINBERG,C.A. 1981. Artificial *Salmonella* vaccines: O-Antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 34:328-332.

40.- ANDERSON,E.S. 1968. Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposio Series in Immunobiological Standarization. 15:79-86.

41.- VENNEMAN,M.R., BRIGLEY,N.J. y BERRY,L.J. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 1:574-582.

42.- MOLINARI,J. y LARRALDE, C. 1974. Acquired Immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16:189-197.

43.- MOLINARI,J. y CABRERA,R. 1974. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16:199-204.

44.- JOHNSON,W. 1972. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fraction isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 5:947-952.

- 45.- SMITH,R.A. y BIEGLY,M.J. 1972. Ribonucleic acid protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogen. *Infect. Immun.* 6:373-383.
- 46.- EISENSTEIN,T.K. 1975. Evidence for O antigen as the antigenic in "ribosomal vaccines" prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 12:364-367.
- 47.- MISFELDT,M.L. y JOHNSON,W. 1976. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 14:652-659.
- 48.- MISFELDT,M.L. y JOHNSON,W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 24:808-816.
- 49.- MISFELDT,M.L. y JOHNSON,W. 1977. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 17:98-104.
- 50.- FRASCH,C.E. y ROBBINS,J.D. 1978. Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. *J. Exp. Med.* 147:629-644.
- 51.- GULING,P.A., McCRACKEN,G.H., FRICH,C.F., JOHNSTON, K.H. y HANSEN,E.J. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infect. Immun.* 37:82-88.
- 52.- ADAMUS,G., MULCZKA,M., WITKOWSKA,D. y ROMANOWSKA,E. 1980. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. *Infect. Immun.* 30:321-324.
- 53.- GILLELAND,H.E., PARKER,M.G., MATTHEWS,J.W. y BERG, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* 44:49-54.
- 54.- KUSI,N., NURMIEN,M., SAXEN,H., VALTONEN,M. y MAKELA,P.H. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25:857-862.

- 55.- KUSSI,N., NURMIEN,M., SAXEN,H. y MAKELA,P.H. 1982. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in Experimental murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.
- 56.- UNANUE,E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2:395-428.
- 57.- KAUFMANN,S.H.E., MUNK,M.E., KOGA,T., STEINHOFF,U., WAND-WÄRTTENBERGER,A., GATRILL,A.J., FLEŠCH,I. y SCHOEL,B. 1989. Effector T cells in bacterial infections. En: *Progress in Immunology VII. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of Immunology.* Editado por Melchers, F. et al. Springer-Verlag, RFA pp. 963-970.
- 58.- ISIBASI,A., ORTIZ-NAVARRETE,V., PANIAGUA,J., PELAYO, R., GONZALEZ,C.R., GARCIA,J.A. y KUMATE,J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine.* (En prensa).
- 59.- ISIBASI,A., ORTIZ,V., VARGAS,M., PANIAGUA,J., GONZALEZ,C., MORENO,J. y KUMATE,J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
- 60.- PELAYO,R., ISIBASI,A., PANIAGUA,J., ORTIZ,V., MUZY,M., GONZALEZ,C., ISLAS,S. y KUMATE,J. 1989. Elaboración de un inmunoadsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. *Arch. Invest. Med. (Mex.).* 20:279-286.
- 61.- ORTIZ,V., ISIBASI,A., GARCIA-ORTIGOZA,E. y KUMATE, J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 27:1640-1645.
- 62.- BLANCO,F., ARREGUIN,C., GONZALEZ,C.R., PANIAGUA,J., PELAYO,R., MUZY,M., ISIBASI,A. y KUMATE,J. 1989. Respuesta inmune celular a antígenos de *Salmonella typhi* en humanos. VIII Congreso Nacional de Inmunología, SLP, México.

- 63.- ISIBASI,A., ORTIZ,V., MORENO,J., PANIAGUA,J., VARGAS,M., GONZALEZ,C. y KUMATE,J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccine with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* porins. En Cell function and diseases. Editado por Todd L, Jaz J. y Parker,L. Plenum Press, New York. pp 281-292.
- 64.- PANIAGUA,J., ISIBASI,A., PELAYO,R., ORTIZ,V., MUY,M., GONZALEZ,C., GARCIA,J.A., ISLAS,S. y KUMATE,J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Ensayo de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. Arch. Invest. Med. (Mex.). 20:315-320.
- 65.- PANIAGUA,J., GARCIA,J.A., LOPEZ,C.R., GONZALEZ, C.R., ISIBASI,A. y KUMATE,J. 1991. Vacunas conjugadas contra infecciones bacterianas. Rev. Sal. Páb. (Méx.). 34:268-273.
- 66.- GONZALEZ C, ISIBASI A, ORTIZ V, BLANCO F, MORENO J, Y KUMATE J. 1989. Cell mediated immune response to porins from *Salmonella typhi* in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA.
- 67.- PANIAGUA J., PATLAN O.A., PELAYO R., ORTIZ V., GONZALEZ C.R., ISLAS S., ISIBASI A. y KUMATE J. 1990. Respuesta Celular a péptidos de porinas de *S. typhi* por esplenocitos de ratón a C3HcB/Fej. XXI Congreso Nacional de Inmunología, Villahermosa Tab.Mex.
- 68.- WEINBERG,G.A. y GRANOFF,D.M. 1988. Polysaccharide-protein conjugate vaccines for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. J. Pediatr. 113:621-631.
- 69.- ROBBINS,J.B., PARKE,J.C., SCHEERSON,R., WHISNANT, J.K. 1973. Quantitative measurement of "natural" and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies. Pediatr. Res. 7:103-110.
- 70.- GRAY,B.M., CONVERSE,G.M. III, HUHTA,N., et al. 1981. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody response to nasopharyngeal carriage of types 3, 19, and 23. J. Infect. Dis. 144:312-318.

- 71.- LENOIR,A.A., GRANOFF,P.D., GRANOFF,D.M. 1987. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein conjugate vaccine in 2- to 6-month-old infants. *Pediatrics*. 80:283-287.
- 72.- EINHORN,M.S., WEINBERG,G.A., ANDERSON,E.L., et al. 1986. Immunogenicity in infants of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide in a conjugate vaccine with *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein. *Lancet*. 2:299-302.
- 73.- GRANOFF,D.M., WEINBERG,G.A., SHACKELFORD,P.G. 1988. IgG subclass response to immunization with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-outer membrane protein conjugate vaccine. *Pediatr. Res.* 24:180-185.
- 74.- AHONKHAI,V.I., LUKACS,L.J., JONES,L.C., et al. 1990. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate) (PedvaxHIB™): clinical evaluation. *Pediatrics* 85 (suppl):676-681.
- 75.- VELLA,P.P., STAUB,J.M., ARMSTRONG,J. et al. 1990. Immunogenicity of a new *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate) (PedvaxHIB™). *Pediatrics* 85: (suppl):668-675.
- 76.- SCHNEERSON,R., RODRIGUES,L.P., PARKE,J.C. Jr. 1971. Immunity to disease caused by *Haemophilus influenzae* type b: II. Specificity and some biologic characteristics of "natural", infection-acquired and immunization-induced antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Immunol.* 107:1081-1089.
- 77.- KAYTHY,H., PETOLA,H., KARANKO,V., et al. 1983. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect. Dis.* 147:1100.
- 78.- GRAY,B.M. 1990. Opsonophagocytic activity in sera from infants and children immunized with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Pediatrics* 85 (suppl):694-697.
- 79.- KAYTHY,H., KARANKO,V., PETOLA, H., et al. 1984. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and response to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. *J. Pediatr.* 74:857-865.

- 80.- SHANN, F. 1990. Modern Vaccines. Pneumococcus and Influenza. Lancet 335:898-901.
- 81.- Organización Panamericana de la Salud. Las condiciones de salud en la Américas. Washington, D.C. U.S.A. 1990.
- 82.- AUSTRIAN, R. 1989. Pneumococcal polysaccharide vaccines. Rev. Infect. Dis. 11:S598-602.
- 83.- ANDERSON, P., BETTS, R. Human adult immunogenicity of protein-coupled pneumococcal capsular antigens of serotypes prevalent in otitis media. Pediatr. Inf. Dis. 1989. 8:550-53.
- 84.- NIKAIDO, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. Methods in Enzymology. 97:85-100.
- 85.- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. J. Biol. Chem. 193:265-276.
- 86.- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991. Consultation on Typhoid Fever Vaccine (Vi Capsular polysaccharide) Geneva, July 1991.
- 87.- ENGVALL, E., y LPERLMANN. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochemistry 8:874-879.
- 88.- KABIR, S. 1987. Preparation and immunogenicity of a bivalent cell-surface protein-polysaccharide conjugate of *Vibrio cholerae*. Med. Microbiol. 23:9-18.
- 89.- SCOTT K. Y JOOST J. OPPENHEIM. 1989. Macrophage-Derived Mediators: Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor, Interleukin 6, Interferon, and Related Cytokines. En Fundamental Immunology, Second Edition, Raven Press, New York.
- 90.- WOODROW G.C. 1990. An Overview of Biotechnology As Applied to Vaccine Development. En New Generation Vaccines. Woodrow G.C. y Levine M.M. (Eds). Ed. Marcel Dekker, Inc. USA.
- 91.- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.