

11261

8

5/2

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

**"RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS PROTEICOS DE
Salmonella typhi EN MUESTRAS DE PACIENTES CON
FIEBRE TIFOIDEA".**

T E S I S

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

I N M U N O L O G I A

CARLOS PEREZ MUÑOZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO D.F., 1993.



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

	PAGINA
ABREVIATURAS	ii
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iv
INTRODUCCION	1
Antecedentes historicos.....	2
Clasificación.....	3
Características de la enfermedad.....	3
Síntomas.....	3
Curso de la infección.....	4
Factores de virulencia.....	6
Vacunas experimentales y respuesta inmune.....	12
Vacunas empleadas en humanos.....	20
Vacunas parenterales.....	20
Vacunas orales con el microorganismo inactivado.....	21
Vacunas orales atenuadas.....	21
HIPOTESIS	27
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y METODOS	29
Grupos de estudio.....	29
Cepa bacteriana.....	30
Antígenos.....	30
Extracto proteico cetónico (STA).....	30
Extracto proteico obtenido con urea (STB).....	31
Electroforesis.....	32
Inmunoelectrotransferencia.....	33
Tinciones.....	34
Tinción irreversible.....	34
Tinción reversible.....	34
Preparación del antígeno en suspensión.....	34
Determinación de pesos moleculares.....	36
Análisis de frecuencia de reconocimiento antigénico.....	36
Obtención de plasma y células mononucleares.....	36
Estimulación linfocitaria con partículas antigénicas.....	37
Estadística.....	38
RESULTADOS	39
Inmunidad humoral.....	42
Inmunidad celular.....	52
DISCUSION	59
BIBLIOGRAFIA	69

PRINCIPALES ABREVIATURAS

ADN	Acido deoxirribonucleico.
Ag	Antígeno.
Ag H	Antígeno flagelar H.
Ag O	Antígeno somático O.
Ag Vi	Antígeno capsular Vi.
ARN	Acido ribonucleico.
AST	Agar soya tripticasa.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad.
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica.
cpm	Cuentas por minuto.
CST	Caldo soya tripticasa.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
FT	Grupo con antecedentes de fiebre tifoidea.
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl) 1-piperazin-etanosulfónico.
Ig	Inmunoglobulina.
IMC	Respuesta inmune celular.
kDa	Kilodaltons.
KDO	Acido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico.
LPS	Lipopolisacárido.

MAC	Complejo de ataque a la membrana.
M	Molar.
ml	mililitro.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Polisácarido O.
PABA	Acido para amino benzóico.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PME	Proteínas de membrana externa.
RHT	Respuesta de hipersensibilidad retardada.
RIC	Respuesta inmune celular.
RIH	Respuesta inmune humoral.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
SSI	Solución salina isotónica.
STA	Extracto proteico cetónico.
STB	Extracto proteico obtenido con urea.
TB	Tris-HCl.
TBS	Tris-HCl-NaCl.
TBSL	Tris-HCl-NaCl-leche descremada.
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilén diamino.
TESTIGO	Grupo sin antecedentes de fiebre tifoidea.

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

PAGINA

FIG 1	Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS 11% de los antígenos STA y STB	40
FIG 2	Electrotransferencia a papel de nitrocelulosa de los antígenos STA y STB de <i>s. typhi</i> .	41
CUADRO 1	Patrón de bandas para el antígeno STA de <i>s. typhi</i> .	43
FIG 3	Inmunolectrotransferencia plasma IgG del grupo FT y TESTIGO.	44
FIG 4	Inmunográfica de la frecuencia de reconocimiento por anticuerpos IgG para el antígeno STA.	45
FIG 5	Inmunolectrotransferencia plasma IgA del grupo FT y TESTIGO.	47
FIG 6	Inmunográfica de la frecuencia de reconocimiento por anticuerpos IgA para el antígeno STA.	48
FIG 7	Inmunolectrotransferencia plasma IgM del grupo FT y TESTIGO.	49
FIG 8	Inmunográfica de la frecuencia de reconocimiento por anticuerpos IgM para el antígeno STA.	50
CUADRO 2	Principales bandas reconocidas por anticuerpos presentes en el plasma del grupo FT.	51
FIG 9	Respuesta proliferativa de CMSP de individuos del grupo FT y TESTIGO a fracciones del antígeno STA de <i>s. typhi</i> .	53
FIG 10	Respuesta proliferativa de CMSP de individuos del grupo FT y TESTIGO a fracciones del antígeno STB de <i>s. typhi</i> .	54

- FIG 11 Promedio del índice de estimulación (más el error estandar) de CMSP de individuos del grupo FT y TESTIGO a las fracciones del antígeno STA y STB de *s. typhi*. 56
- CUADRO 3 Peso molecular de fracciones reconocidas con mayor frecuencia por los individuos del grupo FT en los antígenos STA y STB. 58

INTRODUCCION:

En México, como en otros países en vías de desarrollo, las infecciones que se localizan, o invaden, vía el tracto gastrointestinal, son causas importantes de morbilidad y mortalidad en humanos y animales. En estos países, la fiebre entérica mas frecuente y grave, es la fiebre tifoidea causada por *Salmonella typhi* (1).

La alta incidencia de fiebre tifoidea en México, puede atribuirse al elevado fecalismo al aire libre, así como a la existencia de un gran número de portadores asintomáticos. El mecanismo de transmisión es principalmente por contaminación de agua, leche de abasto público, verduras, mariscos crudos y otros alimentos, las moscas pudieran jugar un papel de tipo mecánico (2).

No existen datos adecuados sobre la incidencia de la enfermedad a nivel mundial, sin embargo Barua (3), estima 12.5 millones de casos (excluyendo china); con una incidencia de 365 casos por cada 100,000 habitantes en el mundo contra 540 casos por cada 100,000 en la población de los países tercermundistas. En México la morbilidad anual es de aproximadamente 20 casos por cada 100 000 habitantes (4).

ANTECEDENTES HISTORICOS

Salmonella typhi y *Salomella paratyphi* A, B y C son las especies que se han adaptado específicamente para infectar y enfermar al humano, ningún otro ser vivo es conocido que sea infectado por estas especies en forma natural.

Los signos y síntomas clínicos que caracterizan a la fiebre tifoidea fueron confundidos con los del tifo, en 1659 Willis (5) intentó describirlos por primera vez; pero no fue sino hasta 1829, cuando en Paris Louis (3) describió en forma muy detallada la enfermedad, separándola claramente de otras fiebres y asoció la expresión clínica de la infección con las lesiones patológicas que se encuentran en el intestino, nódulos linfáticos mesentéricos y bazo, describiendo además la roseola tífica. Desde entonces, se puede decir que ningún otro factor clínico o patológico importante se ha adicionado a la lista. En ese mismo año Bretonneau en Francia y Smith en los Estados Unidos (3), reconocieron que la enfermedad se transmitía por contagio y que ésta confería inmunidad frente a una nueva infección.

En 1856 Budd (5,3), aportó evidencias de que las descargas intestinales, eran las principales fuentes de infección; y que la leche, el agua y los alimentos, eran las principales fuentes de diseminación. En esa época y sin pruebas directas, mencionó por primera vez que la fiebre tifoidea es causada por un "germen" específico.

Fue en 1880, cuando Eberth (5), describió la presencia del bacilo tifoídico, en secciones histológicas de ganglios linfáticos mesentéricos y en hígado de individuos muertos por fiebre tifoidea. Gaffkey en 1884, cultivó por primera vez a *Salmonella typhi* en forma pura a partir del bazo de pacientes infectados y poco tiempo después, otros investigadores aislaron la bacteria de otros fluidos y órganos corporales. (3).

CLASIFICACION:

En 1920, Schetza hizo un primer intento por clasificar a este género, posteriormente Kauffman y White en 1925, lo clasificaron en grupos dependiendo de los antígenos "O" (Ag O) comunes, con letras mayúsculas de la A a la I y en especies considerando otros antígenos "O" y "H" estos últimos tanto en fase 1 como en fase 2; correspondiéndole a *Salmonella typhi* la fórmula 9, 12, Vi: d. (6). Sin embargo la clasificación más aceptada fue la de Ewing, con tres especies: *S. typhi*, *S. choleraesuis*, y *S. enteritidis*. El resto de las especies reconocidas por Kauffman y White se consideran como variedades o biotipos de la especie (7,8).

En 1983, el Comité Internacional de Taxonomía de Enterobacterias propuso una nueva clasificación, la cual se basó fundamentalmente en pruebas de hibridación del DNA. En esta clasificación, se considera al género salmonella como perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* a la tribu *Salmonellae* con seis subespecies: entérica, salamae, arizonae, diariconae, houtonae y bongori (9).

CARACTERISTICAS DE LA ENFERMEDAD

SINTOMAS:

La enfermedad usualmente comienza después de un período de incubación que puede fluctuar de 24 horas a 7 ó 21 días, con malestar general, anorexia y dolor de cabeza, seguido por la aparición de fiebre que se acompaña generalmente con relativa bradicardia, la postración está usualmente presente y

las distenciones son comunes. Pueden existir tos y signos de bronquitis, la esplenomegalia y leucopenia son comunes.

En los casos de muerte, las lesiones más prominentes encontradas en las autopsias son: hiperplasia linfoide, ulceraciones de las placas de Peyer con hemorragias o perforación del intestino (10,11).

CURSO DE LA INFECCION

La infección se establece después que el individuo ha ingerido una dosis mínima que fluctúa entre 10^4 y 10^7 microorganismos, los cuales deben sobrevivir a los mecanismos inespecíficos y específicos de defensa del hospedero (15,16).

Una vez que *S. typhi* ha sobrevivido a la acción bacteriolítica del jugo gástrico (cuya eficacia es parcialmente neutralizada por los alimentos), pasa al intestino delgado donde invade la pared intestinal del Ileon terminal preferentemente. La mayoría de las bacterias del inóculo inicial no tienen importancia patogénica, ya que solo unos pocos microorganismos logran pasar a través de la mucosa del Ileon durante las primeras horas de la infección. No obstante, esta pequeña cantidad es capaz de desarrollar una infección sistémica mortal (12). En estudios realizados con voluntarios, se ha visto que *S. typhi* puede localizarse también en las vías biliares durante las primeras etapas de la infección, sin que se demuestre su presencia en heces o sangre (3,13).

La vía de penetración de la bacteria es a través de las células epiteliales y células M, por medio de una fagocitosis no profesional. El contenido de las vacuolas pinocíticas es liberado a la lámina propia, donde la bacteria se multiplica induciendo una respuesta inflamatoria que produce daño a la pared intestinal. Una vez que se encuentra en lámina propia, la bacteria pasa

rápidamente a los vasos linfáticos y ganglios mesentéricos donde coloniza las células del sistema retículo endotelial de hígado, bazo y pulmones. Todos los eventos antes mencionados, ocurren en el periodo de incubación. Las primeras manifestaciones de la enfermedad constituyen el segundo periodo de la infección, caracterizada por la liberación del bacilo (que se reproduce intracelularmente en los macrófagos) a la circulación sanguínea junto con una gran cantidad de endotoxina y finalmente reinfecta las placas de peyer y el sistema del fagocito mononuclear de hígado, bazo y pulmones. La tercera etapa de la infección se caracteriza básicamente por las lesiones producidas localmente. En placas de peyer y folículos linfáticos principalmente del íleon, las lesiones se originan primero por su hiperplasia y tumefacción y posteriormente (de 7 a 10 días), su ulceración y necrosis. Los macrófagos abundan en el lecho y márgenes de las úlceras y existe una falta de polimorfonucleares a nivel local, que es el reflejo de una leucopenia (signo característico de la enfermedad). Las lesiones de necrosis focal también se presentan en el bazo e hígado. Por último, en la etapa de lisis, los síntomas comienzan a ceder paulatinamente, principalmente por la aparición de una inmunidad específica que elimina a la bacteria. El periodo de convalecencia es variable en cuanto a su duración, pero en promedio se considera de un mes (12,14,15,16,).

La patogénesis de la enfermedad es poco entendida y durante los años 70, la mayoría de los efectos de la enfermedad fueron atribuidos a la endotoxina circulante, sin embargo estudios realizados por diferentes grupos de investigadores (3) en los Estados Unidos parecen indicar que no son debidos a ésta.

Hoffman (3,17,18) ha propuesto que las manifestaciones de la enfermedad, pudieran ser causadas por metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres de oxígeno y otros radicales libres de las células mononucleares, principalmente los

macrófagos. Por lo tanto, los pacientes que desarrollan una enfermedad grave deben haber ingerido un número muy grande de bacilos, que dentro de los macrófagos originan la producción de una serie de mediadores y un factor supresor. Los mediadores causan las manifestaciones de la enfermedad y el factor supresor, lo lleva a la inmunosupresión y virtual reproducción incontrolada de *S. typhi*, que a su vez liberan endotoxina intra y extracelularmente, aumentan los mediadores y una mayor inmunosupresión, lo que finalmente lleva al individuo a la muerte (3,17,18).

FACTORES DE VIRULENCIA:

El término "patogenicidad" generalmente es aceptado para indicar la capacidad potencial de un microorganismo de producir una enfermedad en un organismo susceptible, mientras que "virulencia" se refiere al grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie. Así, es posible hablar de cepas avirulentas, virulentas, altamente virulentas etc., dentro de grupos o especies. Factor de virulencia, se refiere generalmente a las características de una bacteria que le permite ser patógena y cuya pérdida por mutación etc., causa la pérdida o reducción de la virulencia.

Una etapa crucial en la patogénesis de bacterias enteroinvasivas, es la capacidad de éstas para penetrar la capa de células epiteliales en la mucosa del intestino. Para estudiar las características de las propiedades enteroinvasivas en bacterias tales como *Shigella spp* (19,20,21), *Escherichia coli* (22,23) y *Yersinia enterocolitica* (24), se han realizado numerosos trabajos en los cuales se ha podido establecer una buena correlación entre la virulencia "in vivo" y la

invasión en cultivo de células HeLa o HEp-2 (27).

En la mayoría de las bacterias estudiadas su capacidad para invadir está asociada con plásmidos. Los mecanismos invasivos de bacterias como *S. typhi* en cambio, han sido poco documentados (27). Se ha reportado que las cepas de *S. typhi* aisladas de sangre de pacientes con fiebre tifoidea, contienen el antígeno Vi (25), sin embargo su participación en la virulencia no parece estar relacionada con la capacidad de la bacteria para invadir las células epiteliales, sino más bien, como un factor protector de la acción de los anticuerpos y el complemento, sobre el antígeno "O" (26,27).

En experimentos de invasividad "in vitro" con *Salmonella typhimurium* a células HeLa, usando cepas sin movilidad, no se estableció el contacto entre las dos células. La invasión solo se logró al ser centrifugadas, dejando ver que la movilidad es importante para poder establecer el primer contacto "in vivo" con las células epiteliales y su posterior invasión. Para *S. typhi*, se requiere una movilidad intrínseca e intacta, como lo establecieron los experimentos realizados por Liu y cols (27), dicha movilidad no puede ser sustituida por fuerzas mecánicas.

Los flagelos, que presentan el antígeno "H" (Ag H) en su superficie, parecen ser ventajosos para la bacteria, principalmente en los fenómenos de adherencia e invasión "in vitro" (28,29,30). Sin embargo, su participación "in vivo" no ha podido ser aclarada. Carsiotis y Weinstein (28) observaron que cepas de *S. typhimurium* flageladas, son más virulentas para el ratón (modelo experimental que presenta un cuadro muy parecido a la fiebre tifoidea en humanos) y tienen una mayor capacidad de sobrevivir en macrófagos; sin embargo, tanto las cepas flageladas como las no flageladas fueron igualmente capaces de colonizar el tracto gastrointestinal.

La movilidad "in vivo" parece ser irrelevante como factor de virulencia e invasividad, ya que cepas móviles de *S. typhimurium*, son inmovilizadas por la viscosidad del moco en el epitelio gastrointestinal (31). Elsingerhorst y cols (32) clonaron una región del cromosoma de *S. typhi* que confirió a una cepa de *E. coli* HB101 la capacidad de invadir células Henle-407. Galán y Curtis (33) mostraron que la adherencia y la invasividad son fenómenos independientes y clonaron un grupo de genes de *S. typhimurium* (inv A, B, C y D), los cuales están relacionados con la capacidad de la bacteria para invadir tejido intestinal. Recientemente estos mismos autores reportaron que existe una alta similitud en la secuencia de éstos genes para diferentes especies y serotipos de *Salmonella*, incluyendo *S. typhi*. Utilizando mutantes encontraron que éstos genes, eran funcionales en todas las especies analizadas (34).

Se han reportado numerosos factores del crecimiento que están involucrados en la virulencia de microorganismos. La obtención y metabolismo del hierro es un factor que controla la multiplicación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en los tejidos (35). El género *salmonella* utiliza sideróforos como la enteroquelina y aerobactina, para la trasferencia del hierro al interior de la célula, y se piensa que éste interviene en el control de la multiplicación de *S. typhimurium* en el líquido peritoneal y posiblemente en líquidos intersticiales, pero no en células fagocíticas del hígado y bazo.

La presencia de mecanismos que permitan superar la inhibición del crecimiento en condiciones de baja concentración de hierro, parecen ser cruciales para la multiplicación de *S. typhi* en el espacio subepitelial y así alcanzar el número necesario para invadir la sangre y el sistema retículo endotelial. Fernandez-Beros (36) reportó que bajo estas condiciones, en *S. typhi* se induce la síntesis y expresión de algunas proteínas de membrana externa, como la enteroquelina que facilitan la obtención de éste elemento.

Las mutaciones que afectan la síntesis de purinas o de vitaminas tales como la B1, también causan una disminución en la virulencia de *S. typhi* (35), al igual que en los requerimientos del ácido paramino benzoico (PABA). El PABA participa en la biosíntesis de compuestos aromáticos por intermedio del ácido corísmico, además es el precursor del ácido fólico. Los vertebrados no pueden sintetizar el ácido fólico, por lo tanto lo tienen que obtener a través de la dieta; por el contrario, microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella* no pueden asimilar el ácido fólico y lo tienen que sintetizar a partir del PABA, pteridina y ácido glutámico (35).

En *S. typhimurium* y *S. dublin* (37,38,39), se encontró que el bloqueo completo de la síntesis del ácido corísmico por inserción de un transposón y una mutación secundaria en el gen *aro-A*, causó la pérdida de su capacidad para producir infección en el ratón. Resultados similares han sido reportados también para *S. typhi* (40).

Otra molécula relacionada con la virulencia es el lipopolisacárido (LPS) que es la endotoxina presente en la pared celular de las bacterias Gram negativas. Su toxicidad y la respuesta a sus efectos más evidentes son: fiebre y la alteración de la permeabilidad capilar.

La molécula de LPS ocupa aproximadamente el 45% de la superficie de la membrana externa y está estructuralmente compuesta de tres regiones: una de naturaleza lipídica (lipido A), que es responsable de los efectos tóxicos del LPS y dos regiones de naturaleza polisacáridica, la región "core" y las cadenas laterales o antígeno "O" que dan la especificidad serológica del complejo. El lipido A de *Salmonella*, es un glicofosfolípido, constituido por unidades en cadena de disacáridos de β -1-6-D-glucosamina, conectados por medio de puentes de fosforo beta 1-6 y de fosfopirofosfatos-1-4, que tienen todos sus grupos hidroxilos substituidos. Uno de los substituyentes es el polisacárido del LPS y el

otro son ácidos grasos de cadena larga. El ácido 2-ceto-3-oxi-D-monooctanoíco o KDO, sirve como puente de unión entre el lípido A (del cual se considera parte) y la región polisacáridica.

La composición de la región "core" es relativamente constante y se ha visto que cinco azúcares son comunes a todas las cepas silvestres de salmonella lisas, y también está presente en ciertas mutantes rugosas las cuales han perdido sus antígenos "O" específicos. En un LPS determinado, todas las cadenas laterales contienen la misma secuencia de repetición, en la cual la subunidad es un tri, tetra o penta-sacárido lineal. Las cadenas varían en longitud (aún en el mismo organismo), promediando más de 40 unidades de repetición. El antígeno "O" es así, una maraña de cadenas polisacáridicas, unidas al lípido A por medio de la región "core" y la porción hidrofóbica (lípido A) que se encuentra embebida en la membrana externa (41).

El LPS puede activar la vía clásica del complemento sérico a través de la unión del lípido A a C1q o por la vía alterna, uniéndose directamente a C3. En el caso de *Salmonella* se ha visto que las cadenas laterales de polisacáridos, recubren las moléculas activadoras (42,43).

Se ha mostrado que el antígeno "O" aumenta la virulencia de la bacteria. En el modelo murino, *S. typhimurium* es resistente a la acción del complemento, ya que el antígeno "O" previene la integración del complejo lítico de ataque a la membrana (MAC) en su superficie (44). En estudios realizados con cepas mutantes de *S. typhimurium* galE, que carecen de Ag "O", pero lo sintetizan parcialmente en un medio que contiene galactosa, se vió que estas cepas despiertan una respuesta inmune específica y además son avirulentas (45,46). Sin embargo Hone en 1988, demostró que una mutante de *S. typhi* gal E fue capaz de causar la enfermedad en humanos (47).

Evidencias experimentales indican que el Ag "O" afecta la virulencia principalmente por modular la activación del complemento y la fagocitosis en los tejidos del hospedero. Sin embargo, un estudio reciente realizado en ratones con *Salmonella choleraesuis*, parece indicar que su principal papel como factor de virulencia, es el de facilitar su sobrevivencia en el tracto gastrointestinal y su entrada a los tejidos (48).

Los mecanismos que presentan microorganismos intracelulares para poder sobrevivir en células fagocíticas, son considerados factores muy importantes de virulencia. Entre éstos podemos señalar: el escape del fagosoma hacia el citoplasma por *Trypanosoma cruzi*, la resistencia o inactivación de los intermediarios del oxígeno y enzimas lisosomales por *Mycobacterium lepraemurium* o mecanismos que impiden el estallido respiratorio completo por *Toxoplasma gondii* (49), y la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma por *Mycobacterium tuberculosis* (50).

Los estudios realizados para tratar de dilucidar los mecanismos por los cuales *Salmonella* evade la acción microbicida de los macrófagos han sido realizados principalmente en el ratón. En dichos estudios, se ha observado que *S. typhimurium* es capaz de inhibir la fusión fagolisosomal (50) y que dicha inhibición, se presenta sólo cuando el microorganismo es viable; no requiere de un LPS completo, ni es afectado por la opsonización con suero normal. Joiner y cols (51) mostraron que salmonellas opsonizadas con moléculas C3 del complemento, o inmunoglobulinas G, influyen la fusión con gránulos neutrófilos pero no con los azurófilos. Al parecer la interacción ligando-receptor mantiene alejado a los fagosomas que contienen salmonella apartados del lisosoma secundario, de esta manera, contribuye a la sobrevivencia intracelular observada en salmonellas opsonizadas (50).

La capacidad de la bacteria para sobrevivir en macrófagos depende de la

procedencia de las células; se ha visto un mayor crecimiento en macrófagos esplénicos que en macrófagos peritoneales, lo cual concuerda con que el bazo es un sitio muy importante de infección y replicación de *Salmonella*, pero también depende de factores genéticos propios de la bacteria (49).

En *S. typhimurium* se encontró que mutaciones en el locus regulador *phoP* (que codifica para una fosfatasa ácida periplásmica), la convierten en avirulenta. Este locus está compuesto de dos genes, *phoP* y *phoQ*, presentes en un operón y regulan la expresión de genes involucrados en la virulencia, estos genes codifican proteínas de superficie, aumentando su resistencia a factores microbicidas de los macrófagos (52,53).

Diversas proteínas de membrana externa (PME), se han descrito estar involucradas en la patogenia de bacterias. Algunas PME de *S. typhimurium* son tóxicas para macrófagos y son capaces de reducir la fagocitosis y la muerte intracelular de las bacterias, en concentraciones subtóxicas (54,55). También pueden activar al complemento por la vía clásica y la alterna (56). Cuando se unen a leucocitos polimorfonucleares de humanos, alteran la integridad de su membrana y su actividad funcional (57), así mismo parecen estar relacionadas con la adherencia de las bacterias a células epiteliales (133).

VACUNAS EXPERIMENTALES Y RESPUESTA INMUNE

A partir de 1896, fecha en que Pfeifer y Kolle (3) hicieron la primera vacuna para la fiebre tifoidea para uso en humanos (a base de organismos muertos por calor), comenzaron también a aparecer en la literatura, reportes contradictorios acerca de los mecanismos fundamentales de la respuesta del

hospedero a la infección y como consecuencia, la clase de vacuna que debe ser usada para desarrollar una respuesta inmune protectora sin la presencia de efectos secundarios indeseables.

Existen en la actualidad varios preparados antigénicos de *Salmonella typhi*, como posibles candidatos para producir una vacuna contra la fiebre tifoidea y la mayoría de ellos, han sido probados con buenos resultados en modelos animales. Entre estos podemos mencionar antígenos como el LPS, Ag"O", Ag"H", Ag"Vi", fracciones subcelulares, extractos protéicos crudos y proteínas que se encuentran en la membrana externa.

Se acepta en general que la inmunización activa de humanos ó animales de experimentación, con endotoxina purificada o con la bacteria completa, induce la producción de anticuerpos específicos dirigidos principalmente contra la región oligosacáridica (41). Diversos investigadores (58,59), han reportado que el LPS se encuentra asociado a proteínas (60). Morrison y Killion (61) lograron proteger ratones C3H/HeJ (que son hipersusceptibles a la infección con salmonella e hiporrespondedores al LPS), a retos posteriores con la bacteria, empleando un complejo de LPS-proteína.

El Ag"O" también ha sido empleado para inducir protección, Nakano y Saito (62) indican que los anticuerpos dirigidos contra éste, no tienen un papel importante para conferir protección. Sin embargo, Svenson y cols. (63) reportaron que algunos conjugados de sacáridos representativos del Ag"O", de diferentes serotipos de *Salmonella*, unidos covalentemente a diferentes proteínas acarreadoras, confieren protección serotipo específica en conejos y dicha protección puede ser transferida a ratones por medio de suero hiperinmune. En otra serie de experimentos empleando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el determinante antigénico serogrupo específico "O4", se pudo proteger a ratones contra un reto con *Salmonella typhimurium*, enfatizando estos resultados la

importancia de estudios estructurales y conformacionales en antígenos de naturaleza sacarídica, para identificar los epítopes importantes inductores de una inmunidad protectora (3).

Murphy y cols (173) midieron la respuesta inmune celular contra el polisacárido "O" (OPS), de *S. typhi*, *S. enteritidis* y *S. thompson*, en individuos sanos, en vacunados con *S. typhi* Ty21a o recuperados de la enfermedad en los Estados Unidos, así como chilenos que tuvieron la enfermedad e individuos sanos sin antecedentes de la enfermedad o de haber sido vacunados. No encontraron inmunoconversión en los individuos residentes en Estados Unidos vacunados o recobrados de la infección. En los chilenos la respuesta al OPS fue más alta que en los individuos de Estados Unidos, pero la prueba no fue capaz de discriminar entre los testigos y los que se recuperaron de la enfermedad.

Por otra parte, diversos estudios realizados por Eisenstein y cols. (64,65) en el modelo murino, indicaron que la respuesta de hipersensibilidad retardada (RHT) dirigida contra la salmonella virulenta, presenta una marcada diferencia entre las distintas cepas de ratones. Este grupo de investigadores concluyó de estos experimentos, que la diferencia está relacionada con la resistencia o susceptibilidad innata del ratón a la infección con la salmonella virulenta, pero no a la ausencia o presencia de reactividad al LPS. La anergia observada no fue causada por una sobredosis en las cepas de ratones no respondedores y se puede presentar en cepas respondedoras junto con una inmunidad protectora, si la dosis inmunizante de la vacuna es baja. Estos estudios parecen indicar que la prueba para medir RHT o que por si misma ésta pueda no ser un método sensible para evaluar la inmunidad celular inducida por un antígeno contra la fiebre tifoidea.

Otro antígeno ampliamente estudiado como candidato para producir una vacuna protectora, ha sido el antígeno flagelar "H". Sin embargo, se ha podido demostrar en modelos experimentales, que no participa directamente para

generar una inmunidad protectora, ya que chimpancés inmunizados con una cepa rugosa de *S. typhi*, presentaron niveles altos de anticuerpos antflagelares, los cuales no correlacionaron con la protección (66). También se ha demostrado en ratones inmunizados con cepas sin flagelos de *S. typhi*, una protección similar a la presentada por animales inmunizados con la cepa móvil (67).

El antígeno "Vi", es un polisacárido capsular que se encuentra exclusivamente en las cepas de *S. typhi*; estructuralmente está constituido del "1,4,2,deoxi-2-N ácido acetilgalacturónico (68). Los estudios realizados tanto en animales como en humanos han mostrado que las cepas Vi(+), son más virulentas que las cepas Vi (-) (5,69). Sin embargo, numerosos trabajos indican que no existe una relación entre los anticuerpos séricos anti-"Vi" y la susceptibilidad o resistencia para adquirir la enfermedad (5,69,70,71,72).

Los estudios que indican una falta de correlación entre los anticuerpos séricos anti "Vi" y la protección a la enfermedad parecen ser debidos a la forma de extracción del antígeno empleado como inmunógeno. Recientemente Robbins (68) mostró que si al preparar el antígeno "Vi" se emplean condiciones desnaturalizantes se reduce su inmunogenicidad. Sin embargo cuando este investigador lo purificó sin desnaturalizarlo, pudo proteger a ratones frente al desafío con una dosis letal de *S. typhi*.

Estudios realizados en humanos empleando antígeno "Vi" no desnaturalizado, demostraron la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-Vi, mismos que correlacionaron con la protección (73,74).

No obstante los resultados antes mencionados se ha cuestionado mucho el empleo del Ag"Vi" como vacuna, ya que su naturaleza polisacárida, le confiere una propiedad de antígeno timo independiente, igual que sucede con el antígeno "O" y el OPS. Este hecho como es sabido, da lugar a que no se presente memoria inmunológica y por lo tanto no se genere protección de larga duración. Para

salvar este obstáculo se ha conjugado covalentemente con proteínas acarreadoras, con el fin de inducirse T-dependencia (75,76,68). Sin embargo otros estudios señalan que la participación del antígeno Vi en la protección no parece ser esencial, ya que se ha logrado inducir protección satisfactoria con cepas carentes del Ag"Vi" (3) y, estudios realizados en humanos voluntarios con una variante Vi(+) de la cepa Ty21, no mejoró la protección conferida con la cepa Vi(-) y tampoco se pudo mostrar la presencia de anticuerpos dirigidos contra este antígeno en las personas vacunadas (77).

Fracciones ribosomales empleadas como vacunas, fueron reportadas por primera vez por Youmans y Youmans en 1965 (78) con *Mycobacterium tuberculosis*. Desde entonces, diferentes estudios han sugerido la acción protectora de dichas fracciones en diversos microorganismos.

Numerosos antígenos de origen similar han sido derivados de *Salmonella typhimurium* (79,80,81,82). Molinari y Larralde (83) y Smith (81), reportaron la inducción de protección en ratones inmunizados con fracciones ribosomales de *S. typhimurim*. Posteriormente se mostró que las fracciones ribosomales de *S. typhi* también fueron capaces de inducir una buena protección en el modelo murino y pruebas de tolerancia con esta vacuna realizadas en humanos voluntarios, mostraron una baja inducción de efectos secundarios (84).

En ninguno de los casos señalados, el componente antigénico fue químicamente identificado, existiendo un considerable desacuerdo entre diversos grupos que intentaron caracterizar dicho componente en *S. typhimurium* (85,79,80,86,87,81,88).

Se propusieron como candidatos: las proteínas ribosomales, el ácido ribonucleico (ARN) ribosomal, una mezcla de los anteriores, etcétera; sin embargo Eisenstein y cols (85,89) reportaron que el antígeno "O" junto con las proteínas de membrana externa que se encontraban contaminando dichas

fracciones, eran las responsables de la inmunidad conferida, lo cual fue confirmado posteriormente por otros investigadores (86,90).

Los trabajos realizados por Molinari y cols.(91) empleando complejos antigénicos de *S. typhimurium* y *S. typhi* (prácticamente exentos de pared celular y de ácido deoxirribonucleico (ADN), así como de fosfolípidos); mostraron que dichos extractos, fueron capaces de inducir una respuesta inmune protectora del 100% en ratones. Estas vacunas también fueron mejor toleradas por humanos voluntarios que la vacuna tifoídica inactivada con fenol. En estos trabajos no se identificó cuál o cuáles componentes eran los responsables de la protección inducida.

Por otra parte Schlecht y cols. (92) reportaron que un extracto proteico libre de LPS proveniente de cepas mutantes-R de *S. typhimurium*, *S. minnesota* y *S. dublin*, así como de la forma *S* de *S. typhimurium*, fueron capaces de inducir respuesta inmune protectora contra la infección experimental. La purificación de dicho extracto por cromatografía de intercambio iónico y/o filtración en gel, indujo menor protección que la generada por el extracto total. Por otro lado, al ser reconstituidas estas fracciones con LPS y con fosfolípidos se aumentó su eficacia protectora (58,92).

Recientemente se han propuesto a las proteínas de membrana externa (PME), como posibles candidatos para producir una vacuna, ya que su participación en la relación hospedero-parásito es clave. Estas proteínas participan en los mecanismos de adherencia e invasividad, así como, en la resistencia de la bacteria a los efectos bactericidas del suero, entre otros (53,54,56,57).

Estudios realizados en el ratón, mostraron que la inmunización con PME de *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* protegieron a los animales de la infección causada por estas bacterias (93,94). Las PME obtenidas de otros

microorganismos gram negativos, tales como *Haemophilus influenzae* (95), *Shigella flexneri* (96) y *Pseudomona aeruginosa* (97), también indujeron una respuesta protectora en animales de experimentación, resultados similares han sido reportados también en el ratón para *S. typhimurium* (98,99).

Se pensó que los anticuerpos séricos dirigidos contra PME, eran los responsables de la protección durante la primera fase de la infección (primeros 10 días), ya que se pudo transferir la protección por medio de suero hiperinmune de conejo al ratón, dicha protección se perdió cuando el suero fue adsorbido previamente con PME de *S. typhimurium* (101), y de *S. typhi* (100).

Muchos de los estudios encaminados a dilucidar el papel de los antígenos proteicos en la protección contra la enfermedad, han empleado extractos contaminados con diversos componentes celulares de naturaleza no proteicas tales como: LPS, fosfolípidos y ácidos nucleicos (102,103,91).

Kuusi y cols (101), buscando los antígenos responsables de la protección en un extracto crudo de PME, purificó las proteínas, eliminando al máximo las impurezas de LPS y fosfolípidos; sus resultados en experimentos de inmunización pasiva indicaron que la pérdida principalmente de LPS en el extracto, redujo la capacidad protectora del suero, la cual fue restaurada cuando se empleó como vacuna las PME reconstituidas con LPS. De estos mismos experimentos se concluyó que la protección no fue mediada por anticuerpos dirigidos contra el LPS, ya que su previa adsorción no indujo pérdida de la protección, además de que la cepa rugosa de *S. typhimurium* empleada para la inmunización, carecía de la región del Ag "O", la cual es reconocida como la inductora de anticuerpos protectores (104,105).

Otros estudios (106) también indicaron que la respuesta protectora está dirigida contra PME y no contra la fracción de LPS. Las PME de cepas rugosas y lisas de *S. typhimurium*, inducen una respuesta protectora similar, sin embargo,

la cepas lisas parecen inducir una respuesta más duradera (106). Al parecer, la influencia del LPS en la respuesta inmune puede ser por dos mecanismos. Actuando como un adjuvante, aumentando la respuesta inmune contra las PME (107,108), y/o formando un complejo antigénico inmunodominante de LPS-proteína presente solo en la forma nativa (109,110).

Las proteínas de membrana externa también pueden inducir una respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) en ratones, indicando la presencia de una respuesta inmune celular (IMC). Hasta el momento no ha sido reportada ninguna otra vacuna no viable (excepto la vacuna ribosomal) capaz de generar dicha respuesta (IMC) (111,112), lo cual las hace candidatas idónea y pone de manifiesto la posible participación tanto de la inmunidad humoral como celular en la respuesta protectora (106).

Estudios recientes encaminados a identificar el componente o componentes de PME involucrados en la protección, han mostrado que las porinas podrían ser uno de estos (106), pudiéndose emplear como antígeno libre de LPS para generar una RHT en el modelo murino (113). Sin embargo, el LPS parece ser importante en las porinas para que se genere una adecuada protección (106). No obstante, otros estudios han reportado que porinas prácticamente exentas de LPS, pueden inducir una respuesta protectora en el modelo murino (100).

La aparente necesidad del LPS en las PME puede ser un serio inconveniente, debido a sus propiedades pirogénicas y su toxicidad. Sin embargo, pueden ser aplicados estudios conformacionales, para substituir el LPS con otras moléculas menos tóxicas, conservando su capacidad protectora como ya han sido desarrollados con otros antígenos (114).

VACUNAS EMPLEADAS EN HUMANOS

VACUNAS PARENTERALES:

En las décadas de 1950 y 1960 la Organización Mundial de la Salud (OMS), auspició una serie de pruebas de campo en varias ciudades, con el fin de evaluar la eficacia de vacunas parenterales contra la fiebre tifoidea, empleando al microorganismo completo en forma no viable.

En 1957 los resultados de la prueba de campo realizada en Yugoslavia mostraron que la vacuna inactivada por calor y preservada en fenol (vacuna L), fue superior para conferir protección comparada con una vacuna inactivada y preservada en alcohol (115,116).

Estudios posteriores realizados por la OMS, esta vez comparando la eficacia protectora de la vacuna L con la inactivada con acetona (vacuna K), fueron realizados en Yugoslavia y Guyana (117,118). La vacuna K se probó también en Polonia y la L en la URSS (119,120). Los resultados mostraron que ambas vacunas confirieron una protección significativa; en todas las pruebas de campo efectuadas la vacuna K, indujo una protección significativamente más alta (86%) que la vacuna L (66 %) (121).

A pesar de los resultados arriba señalados las vacunas parenterales no son empleadas comunmente por la mayoría de los países en programas sistemáticos para controlar la fiebre tifoidea, con excepción de Tailandia (122); debido a las reacciones adversas reportadas en estos estudios (117,120). Pero cuando son aplicadas la vacuna que normalmente se encuentra disponible es la L (121).

VACUNAS ORALES CON EL MICROORGANISMO INACTIVADO:

A pesar de que se ha mostrado que las vacunas orales a base del microorganismo completo en forma no viable, no inducen la presencia de efectos secundarios colaterales tan severos como las parenterales; su eficacia en estudios realizados con voluntarios humanos y en pruebas de campo en zonas endémicas, han mostrado su baja capacidad para inducir una adecuada protección a la enfermedad, por lo que las investigaciones sobre este tipo de vacunas prácticamente han sido abandonadas (123,124).

VACUNAS ORALES ATENUADAS:

Germanier y Fürer (125) desarrollaron una vacuna oral, empleando una cepa de *S. typhi* Ty2la, la cual fue evaluada por Wahdan y cols. (126) con una prueba de campo efectuada en Alexandria, Egipto.

En esta prueba la vacuna se administró oralmente 3 días consecutivos y antes de ingerir la vacuna los individuos tomaron una tableta de 1.0 g de NaHCO_3 para neutralizar la acidez gástrica. Esta vacuna no indujo reacciones secundarias notables y durante al menos 36 meses la protección conferida fue del 96% (126).

Una vez que se estableció la eficacia y estabilidad biológica de la vacuna Ty21a en Egipto; se comenzó en Suiza a producir una vacuna comercial a base de cápsulas de gelatina con bicarbonato que contenían a la bacteria liofilizada (121).

Sin embargo estudios realizados por Hirschel y cols (127) y pruebas de campo efectuadas en Chile (121), establecieron su pobre eficacia para inducir protección substituyéndose finalmente su producción por la presentación de cápsulas entéricas. Con ésta presentación en Chile se estableció que tres dosis administradas durante una semana, indujeron una protección de 69 % por lo menos durante 4 años (128).

Los diferentes niveles de protección obtenidos en los estudios de Egipto y Chile pueden ser el resultado de numerosos factores tales como: Diferencias genéticas entre ambas poblaciones, la incidencia de la enfermedad, la cual puede ser aproximadamente del doble en Chile, expresión de diferentes antígenos por parte de la bacteria en zonas endémicas etc. Sin embargo, estudios recientes parecen apuntar a la presentación de la vacuna como el más importante (129).

Levine y cols (129) en una prueba de campo comparando los efectos protectores de la presentación de la bacteria en cápsulas entéricas con la forma líquida, encontró que la última fue superior principalmente en niños con edades de 5 a 9 años (82.3 %), así como en niños mayores de 10 años (69.3 %).

El intervalo de confianza del 95 % mostró que el 82.3 % se sobrelapó con el 96 % encontrado en Alexandria, Egipto. Se han propuesto varias causas que podrían explicar las diferencias en la capacidad protectora de ambas presentaciones de la vacuna: como es el caso de que en la presentación líquida el microorganismo se encuentre completamente rehidratado al momento de ser ingerido, lo que puede favorecer un comportamiento más parecido al de la infección natural en el intestino, que cuando éste es liberado de la cápsula entérica y se pone en contacto directamente con los acidos biliares, enzimas digestivas, etc; además, una presentación líquida permite poner en contacto a la bacteria con las amígdalas (un órgano del sistema inmune), lo cual no ocurre en la presentación entérica.

Los resultados preliminares de otra prueba de campo realizada en Plaju, Indonesia mostraron una ligera superioridad de la vacuna en presentación líquida que en la forma entérica, pero estos valores no fueron significativos. Una posible explicación a estos resultados, con los encontrados por el grupo de Levine podría ser la mayor incidencia de la enfermedad en Indonesia, así como, variaciones en el esquema de inmunización empleado (129).

Datos definitivos de esta última prueba, así como de otras realizadas en diferentes países, son necesarios para poder establecer la importancia de la presentación líquida de la vacuna Ty21a, para conferir una protección adecuada contra la fiebre tifoidea.

Por otra parte, la técnica inespecífica por la cual la cepa mutante de *S. typhi* Ty21a fue originada con el agente químico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (125), pudo provocar una serie de mutaciones no controladas, aparte de la deficiencia en la UDP-glucosa-4-epimerasa; la cual es una de las principales razones, para que no sea aceptada como vacuna en muchos países. Además, se ha reportado que la cepa Ty 21a mantenida en el laboratorio, puede presentar otras mutaciones ya que al revertir la mutación original, la vacuna continua avirulenta (133,134), lo cual indica su poca estabilidad genética y podría ser un factor más que explique las diferencias encontradas en diversos estudios.

En la década de los 80, métodos modernos de manipulación genética permitieron desarrollar cepas mutantes de *S. typhi* atenuadas con alteraciones genéticas bien definidas. La cepa 541 Ty, fue generada por Stocker y cols (132) de una cepa silvestre de *S. typhi*, que presenta una delección de dos genes separados, cada uno, caracterizados previamente en *S. typhimurium*. La mutación en el gene aro A creó un requerimiento para numerosos compuestos aromáticos tales como: el ácido P-amino benzóico y el ácido 2,4-dihidrobencóico,

los cuales no son metabolitos presentes en los tejidos de los mamíferos. La segunda, en el gene pur A generó un requerimiento específico para adenina (o un compuesto asimilable tal como la adenosina). La cepa 543 Ty es una mutante espontánea de 541 Ty y carece del Ag Vi (132).

Los resultados preliminares de un estudio realizado en humanos con estas dos vacunas, mostraron que son seguras en administración oral y fueron capaces de inducir una respuesta inmune celular. Sin embargo, no indujeron una respuesta humoral adecuada (133).

Un estudio realizado por O'Callaghan y cols.(134) con una mutante similar de *S. typhimurium*, mostró que la doble mutación originó una vacuna inefectiva administrada oralmente o por vía intravenosa, aún cuando la bacteria sobrevivió por largos periodos en el bazo e hígado de los ratones. Mientras que la cepa con una sola mutación en el gene aro A mostró ser una buena vacuna por vía oral o intravenosa.

De los trabajos anteriores así como el realizado por el grupo de Linde y cols (135), se puede sugerir, que la doble mutante empleada en los estudios con humanos, estuvo sobre atenuada y es necesario realizar un estudio con una cepa que solo exprese una mutación para establecer su valor real como medida profiláctica.

Debido a que las vacunas orales han mostrado ser bien toleradas y capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular (121), se han empleado también para producir vacunas bivalentes que expresen antígenos de otras especies. La cepa *S. typhi* Ty21a ha sido modificada para expresar antígenos "O" de *Shigella sonnei* (136), la subunidad B de la enterotoxina termolabil de *E. coli* (137), o antígenos de *Vibrio cholerae* (138) entre otros. La vacuna bivalente *S. typhi/S. sonnei*, fue sometida a extensas pruebas clínicas en humanos, mostrando ser segura, inmunogénica y protectora (aunque algunas variaciones de lote a lote

fueron descritas) (139,140,141). La vacuna Ty21a expresando Ag "O" de *V. cholerae*, también fue bien tolerada y estimuló la síntesis de anticuerpos sistémicos y a nivel intestinal, tanto para *S. typhi* como para *V. cholerae* (138).

Una de las posibles ventajas que pueden presentar las vacunas preparadas a partir de bacterias manipuladas genéticamente, es que las cepas resultantes muestran una estructura antigénica muy similar a la de la bacteria normal. Sin embargo, para este tipo de vacunas también se han descrito la aparición de mutaciones secundarias cuando son mantenidas en el laboratorio (142).

Los estudios mencionados, indican que tanto la respuesta inmune humoral (RIH) como la celular (RIC) están participando en la protección del individuo contra la fiebre tifoidea. Sin embargo, en la actualidad no se cuenta todavía con una vacuna ideal en contra de la enfermedad, que proteja al individuo durante un periodo largo y no genere efectos secundarios severos.

Hasta el momento las vacunas administradas por vía oral o parenteral inducen una respuesta protectora variable y de corta duración. Además, se conoce poco acerca de los mecanismos protectores, así como de los antígenos involucrados, ya que en la mayoría de los estudios se han empleado extractos antigénicos crudos o la bacteria completa.

Por otra parte, se ha observado que los individuos con antecedentes de fiebre tifoidea poseen una menor tendencia para adquirir nuevamente la enfermedad. Numerosos trabajos en el modelo murino y en el humano, han reportado algunos antígenos proteicos como los involucrados en la protección; por lo tanto, se podría pensar que las fracciones de un antígeno proteico crudo de *Salmonella typhi* que sean reconocidas con mayor frecuencia por ambas respuestas (RIH y RIC) en estos individuos, estén involucradas en la protección frente a la enfermedad.

La identificación y caracterización de estos antígenos, podría servir para

instrumentar estudios epidemiológicos; así como para generar pruebas inmunológicas adecuadas, que permitan evaluar de una manera rápida y eficaz, el poder protector de las vacunas experimentales contra *S. typhi*. Así mismo, podría ayudar a entender mejor el mecanismo para generar la protección y, por ende, la creación de una vacuna más eficaz contra la fiebre tifoidea.

HIPOTESIS

Los individuos que han presentado un cuadro de fiebre tifoidea generan una respuesta inmune tanto humoral como celular variable, a componentes proteicos de *Salmonella typhi*. Se esperaría que algunos de estos componentes, sean reconocidos con mayor frecuencia por anticuerpos y/o linfocitos de estos individuos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia con que son reconocidos diferentes componentes de un extracto proteico de *Salmonella typhi* por anticuerpos y linfocitos de individuos con antecedentes de fiebre tifoidea.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar si en una población abierta, es posible diferenciar entre los individuos con antecedentes de fiebre tifoidea e individuos sanos testigos, mediante el análisis de reconocimiento antigénico, tanto por anticuerpos como por la respuesta inmune celular.

2.- Determinar si en un mismo extracto antigénico, algunos de sus componentes son reconocidos con mayor frecuencia por ambas respuestas (RIC y RIH).

MATERIALES Y METODOS.

GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPO CON ANTECEDENTES DE FIEBRE TIFOIDEA (FT).- Este grupo se conformó con 10 individuos de ambos sexos, cuyas edades fluctuaron entre los 7 y 58 años de edad. Estos ingresaron al Hospital General 20 de Noviembre y fueron diagnosticados clínicamente y confirmados mediante hemocultivo y/o coprocultivo positivo con fiebre tifoidea. Los pacientes accedieron voluntariamente a participar en el estudio. Para el estudio se tomó una muestra de sangre periférica en un periodo entre 2 a 8 meses después de haber terminado el tratamiento.

GRUPO SIN ANTECEDENTES DE FIEBRE TIFOIDEA (TESTIGO).- Se conformó con 15 individuos de ambos sexos aparentemente sanos sin datos clínicos de fiebre tifoidea al momento de tomar la muestra, cuyas edades fluctuaron entre los 15 y 40 años. Todos los integrantes de este grupo manifestaron no haber presentado un cuadro de fiebre tifoidea en su vida y tampoco de haber sido inmunizados para prevenir dicha enfermedad.

CEPA BACTERIANA

Se utilizó la cepa de *S. typhi* JM 1301, donada por el Dr. Guillermo Alfaro, cuyas características han sido previamente reportadas (143).

A partir de una colonia de *S. typhi* JM 1301, se obtuvo un precultivo de 12 hrs. en 10 ml de caldo de soya tripticasa (CST) (Bioxón de México); del cual se transfirieron 3 ml a 300 ml de CST, incubándose 18 hrs. a 37°C. Este cultivo fue sembrado posteriormente en 6 litros de CST y se mantuvo por 3 hrs en agitación a 1500 rpm a 37°C obteniéndose posteriormente el paquete celular por centrifugación a 700 x g durante 20 min a 4°C. El paquete celular fue resuspendido en 300 ml de solución salina isotónica (SSI) estéril, centrifugándose nuevamente según las condiciones ya mencionadas.

ANTIGENOS

EXTRACTO PROTEICO ACETONICO (STA).

El extracto proteico crudo de la cepa de *S. typhi* JM 1301, se obtuvo según el método descrito por Tato y cols (91). El paquete celular bacteriano siguiendo la técnica descrita se resuspendió en 30 ml de acetona fría previamente deshidratada con cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) y se mantuvo en agitación durante 10 min, la suspensión se filtró con papel Whatman No. 2 y se lavó con acetona en tres ocasiones como ya se describió, posteriormente se agregaron 30 ml de cloroformo a la suspensión y se filtró nuevamente. El sedimento obtenido

fue colocado en forma dispersa en una caja de Petri en un desecador al vacío por 48 hrs a temperatura ambiente.

Los polvos obtenidos fueron disueltos en 30 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, pH 7.2 conteniendo cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 0.012M, sacarosa 0.25M, desoxicolato de sodio al 0.4% y cloruro de potasio (KCl) 0.1M (Merck de México); finalmente se agregó desoxirribonucleasa I (Sigma Chemical, St. Louis Mo. USA) 20 μ g/ml, y se mantuvo en agitación a 37°C durante 1 hora en baño María.

La solución obtenida se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.01M, pH 7.2 conteniendo KCl 0.1M con cambios frecuentes durante 5 días. El material dializado se centrifugó a 14000 x g durante 15 min a 4°C, el sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración a través de una membrana millipore 0.22 μ m y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (144), almacenándose en congelación a -20°C hasta su uso.

EXTRACTO PROTEICO OBTENIDO CON UREA (STB).

Se obtuvo también de la cepa de *S. typhi* JM 1301 según el método descrito por Schlecht y Bhatnagar (145). La bacteria se cultivo de acuerdo al método descrito previamente, las células se cosecharon por centrifugación a 700 x g durante 20 min a 4°C y se lavaron con trisma-base pH 7.2. Se realizó una precipitación en presencia de 15 ml de amortiguador 6M de urea conteniendo 10mM de tris-HCl pH 7.5 y 5mM de EDTA, por una hora en agitación. El extracto se dializó por 5 días con cambios frecuentes contra agua desionizada, posteriormente la suspensión fue separada por centrifugación a 34800 x g durante 60 min en una fracción soluble y otra insoluble. La fracción soluble se liofilizó y

se resuspendió en un volumen final de 4 ml con agua desionizada. Se determinó la concentración de proteína de acuerdo al método de Lowry, almacenándose a -20 °C hasta su uso.

ELECTROFORESIS.

Se realizó una electroforesis para ambos antígenos (STA y STB) en un gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), según la técnica de Laemmli y cols (146). Se utilizó un gel concentrador al 3.5% y un gel separador al 11%, ambos se polimerizaron con persulfato de amonio y TEMED. Las muestras con los antígenos se resuspendieron vol/vol en una mezcla de tris-HCl 0.05M pH 6.8, SDS al 10%, glicerol al 10%, EDTA 0.001 mg, mercaptoetanol al 1% y azul de bromofenol; la concentración final de antígeno fue de 80 µg de proteína por cada carril. Se corrió un carril con marcadores de pesos moleculares altos: Fosforilasa b (97 kDa), Albumina Sérica Bovina (BSA) (67 kDa), Ovalbúmina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (31 kDa), Inhibidor de Tripsina (21 kDa) y Lactoalbúmina (Pharmacia, B.A), los cuales se utilizaron de acuerdo a las especificaciones de fábrica.

El corrimiento del gel se realizó en una cámara de electroforesis (LKB Bromma, Co. USA) en presencia de un amortiguador de tris 0.02M, glicina 0.15 M y SDS al 0.1%. El corrimiento se realizó a 20 mA para el gel concentrador y a 40 mA para el gel separador. Para observar el patrón de corrimiento fueron utilizados indistintamente las técnicas de tinción con nitrato de plata y azul de Coomasie.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Después de realizado el corrimiento electroforético para el antígeno STA, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa de 0.45 μm según el método de Towbin (147). La transferencia se realizó en presencia de amortiguador tris-base 20mM, glicina 150mM y metanol al 16% pH 8.3, por 1 hr 30 min a 4°C a 1 amperio, en una cámara de transferencia (Hoefer, Scientific Instruments Co. USA), colocándose el filtro de nitrocelulosa hacia el cátodo y el gel SDS-PAGE hacia el ánodo, ambos cubiertos por tela Scotch-brite 3M y papel filtro.

El filtro de nitrocelulosa con el antígeno transferido se lavó con una solución de Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM (TBS) y se bloqueó con una solución de leche descremada al 5%-TBS (TBSL) pH 7.4 por 12 hrs. Posteriormente se cortaron tiras de 2 mm de ancho y se lavaron por 5 min con TBS, cada tira se incubó por 12 hrs a 4°C con 1 ml de plasma de ambos grupos, diluido 1:25 en TBSL para detectar anticuerpos IgG ó 1:10 en TBSL para anticuerpos IgA e IgM. Las tiras se lavaron 2 veces durante 5 min con TBS y se incubaron durante 12 hrs a 4°C con anticuerpos de carnero anti-inmunoglobulinas humanas conjugados a peroxidasa (IgG, IgA e IgM) (Zymed laboratories Inc. San Francisco, USA). Los anticuerpos anti IgG y anti IgM fueron diluidos 1:3000 y los anti IgA 1:2000 en TBSL. Transcurrido el periodo de incubación, las tiras se lavaron 3 veces durante 10 min en TBS y 5 min en una solución tris-HCl 10mM pH 6.8 (TB), se revelaron con una solución de 4-chloro-1-naphtol (Sigma Chemical,Co.) al 3%, metanol vol/4vol en TB y 0.33 μl de H_2O_2 al 30% durante 5 min a 1 hr. La reacción fue bloqueada con H_2O .

TINCIONES:

TINCION IRREVERSIBLE: El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fue teñido sumergiéndolo en una solución con 0.1% de amido negro disuelto en 45% de metanol, 10% de ácido acético y 45% de agua desionizada y revelado con una solución de metanol al 90%, ácido acético al 2% y agua desionizada al 8%, según la técnica descrita por Towbin (147). La reacción se detuvo con agua, dichas tinciones fueron conservadas en la obscuridad, 0 para tener un patrón permanente de cada transferencia realizada.

TINCION REVERSIBLE: Para comprobar el corrimiento electroforético y localizar exactamente las zonas en donde se encontraban presentes las proteínas, el papel de nitrocelulosa fue teñido reversiblemente por inmersión en una solución de amido negro 0.01% con ácido acético 0.5% durante algunos segundos, según la técnica descrita por Lamb (148). Para quitar el colorante residual y el SDS, el papel se lavó con cambios alternos de PBS (0.1M, pH= 7.4) y agua desionizada, hasta que quedaron completamente blancos.

PREPARACION DEL ANTIGENO EN SUSPENSION.

La electrotransferencia a papel de nitrocelulosa de los antígenos STA y STB se realizó de acuerdo a la técnica ya descrita (147). Se incluyó un carril con

los marcadores de peso molecular y otro con los antígenos STA o STB los cuales se tiñeron de manera irreversible y se marcó sobre ellos el patrón de fraccionamiento para cada antígeno. Este patrón se conservó para establecer los pesos moleculares de cada fracción. El filtro de nitrocelulosa con el resto de los carriles para ambos antígenos (STA y STB) fue teñido de manera reversible, para identificar de una manera segura las regiones y corroborar la similitud de corrimiento en cada carril.

El antígeno STA se dividió en 18 fracciones y el antígeno STB en 16 fracciones de aproximadamente 40 mm^2 cada una. El testigo positivo se preparó empleando papel de nitrocelulosa al cual se le adicionó $10 \mu\text{g}$ del antígeno STA o STB completo por cada 10 mm^2 , respectivamente. El testigo negativo se preparó empleando membrana de nitrocelulosa sin antígeno.

Las fracciones obtenidas del antígeno STA, STB, el testigo positivo y el testigo negativo, fueron tratadas según el método descrito por Aboud-Zeid y cols (151). Cada una de las fracciones se colocaron en tubos de vidrio de $11 \times 75 \text{ mm}$ y se les agregó $250 \mu\text{l}$ de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical.Co.) por cada 20 mm^2 , se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación esporádica para asegurar la disolución completa del papel y su esterilidad; posteriormente se precipitó el papel disuelto mediante la adición de un volumen igual al contenido de DMSO, de una solución amortiguadora de carbonatos 0.05M , pH 9.6. El precipitado obtenido se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a $10000 \times g$ durante 10 min; el botón obtenido se lavó 3 veces más con RPMI 1640 (Gibco, Co. USA). Por último se resuspendió en el mismo medio (1ml de RPMI por cada $250 \mu\text{l}$ de DMSO o solución amortiguadora de carbonatos utilizada) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES.

La determinación de pesos moleculares tanto para el corrimiento electroforético de los antígenos como para las bandas reconocidas en la inmunolectrotransferencia (Ag STA) y las fracciones de los antígenos STA y STB, se realizó mediante el método de Weber y Osborn (149) empleando el paquete estadístico por computadora "Statgraf".

ANALISIS DE FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO.

Para analizar la frecuencia de reconocimiento para cada banda (%) por anticuerpos de los isotipos (IgG, IgA e IgM), de ambos grupos (FT y TESTIGO), se graficó en el eje de las abscisas el porcentaje de reconocimiento del grupo TESTIGO y en el eje de las ordenadas el porcentaje de reconocimiento del grupo de pacientes, el análisis se realizó de acuerdo al método descrito por Larralde y cols. (150).

OBTENCION DE PLASMA Y CELULAS MONONUCLEARES.

Se extrajeron 20 ml de sangre periférica heparinizada en condiciones estériles a cada individuo de los grupos FT y TESTIGO. La sangre se diluyó 1:3 en PBS 0.15 M pH 7.2, las células mononucleares (CMSP) se separaron por la técnica de Ficoll-hypaque modificada por melendro y col (152). Las células obtenidas en la interfase fueron resuspendidas en PBS 0.15 M pH 7.2 y se

centrifugaron a 250 x g durante 10 min a 20°C; se lavaron una vez más con PBS y otra con RPMI 1640 (Gibco Co., Grand Island, NY. USA). Finalmente el paquete celular obtenido se resuspendió en RPMI 1640 adicionado con piruvato de sodio 100 mM al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, aminoácidos esenciales al 0.5%, L-glutamina 200 mM al 1%, penicilina-estreptomicina al 1%, suero AB humano al 10% y hepes 25mM al 1% (Gibco Co., Grand Island, NY. USA).

El plasma obtenido en el gradiente de Ficoll-Hypaque se dializó contra un amortiguador de TBS conservando el volumen original. Este se empleó en la técnica de inmunoelectrotransferencia.

ESTIMULACION LINFOCITARIA CON PARTICULAS ANTIGENICAS.

Las células mononucleares se distribuyeron en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Co. USA) a una concentración de 1.5×10^5 células por pozo en 200 μ l de medio RPMI 1640 completo, se agregaron 5 o 10 μ l de cada una de las fracciones en suspensión de los antígenos STA o STB a cada pozo, cada condición fue hecha por triplicado. Los cultivos celulares se incubaron por 7 días a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda (CO₂ Incubator, Napco Co. USA), los primeros tres días las cajas se colocaron con una inclinación de 45° (para facilitar el contacto celular con las partículas de antígeno) y los otros 4 días en forma horizontal. Posteriormente se dio un pulso de 0.1 μ Ci de timidina tritiada, (actividad específica 6.7 Ci/mMol) (NEN-Research, Prod. USA) por pozo, durante las últimas 16 horas de cultivo. Transcurrido este lapso de tiempo los

cultivos se cosecharon (Cell harvester Brandel Co. USA) en filtros de fibra de vidrio (Whatman, 934-AH) y se determinó la incorporación de Timidina- H^3 en un contador de centelleo.

ESTADISTICA

Los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación celular contra los antígenos STA y STB fueron comparados en los dos grupos de estudio, usando la prueba de t de Student mediante el paquete estadístico statgraf.

Los valores se consideraron significativos cuando la P fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

Del grupo de 10 individuos que habian presentado un cuadro de fiebre tifoidea (FT); 6 fueron mujeres con un intervalo de edad entre 15 y 45 años con una media de 29, los 4 restantes del sexo masculino con edades entre 7 y 58 años con media de 32.3; el grupo en general tuvo un rango de edades entre 7 y 58 años y una media de 30.3.

De los 15 individuos del grupo TESTIGO 10 fueron mujeres (rango= 22-52 años, $X= 29.3$) y 5 hombres (rango= 23-47 años, $X= 32.8$). El grupo tuvo un intervalo de edad entre 22 y 52 años con una media de 30.5.

Todos los individuos que ingresaron en el estudio en ambos grupos (FT y TESTIGO), tuvieron un nivel socio-económico de medio a alto.

La cepa JM-1301 de *Salmonella typhi* empleada en este estudio conservó en todo momento sus características bioquímicas, así como la fórmula serológica particular del género (9,12,Vi:d), la cual fue confirmada por el grupo del Dr Cravioto (Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina. UNAM).

Las figuras 1A Y 1B muestran respectivamente el patrón de corrimiento electroforético de los antígenos STA y STB, así como el corrimiento de los marcadores de pesos moleculares. La electrotransferencia de ambos antígenos se muestra en la figura 2A y 2B respectivamente.

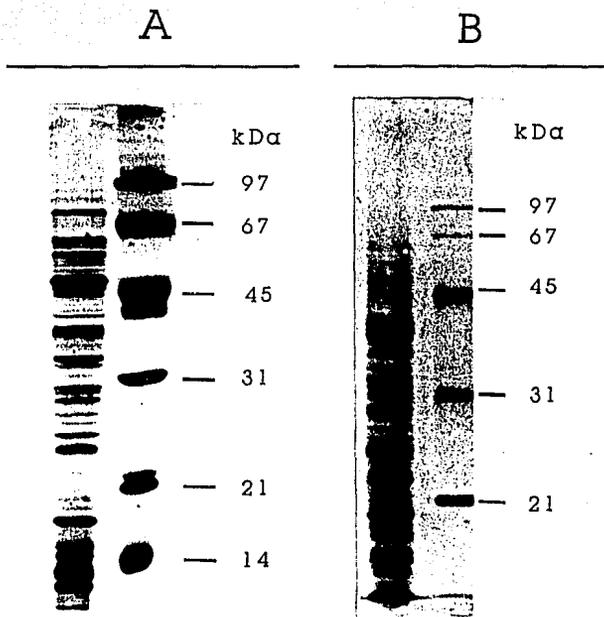


Fig 1. Electroforesis en gels de poliacrilamida SDS 11% de los antígenos STA (A) y STB (B) de *S. typhi*. Marcadores de pesos moleculares: Fosforilasa b (97 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anhidrasa Carbónica (31 kDa), Inhibidor de Tripsina (21 kDa) y Lactoalbúmina (14 kDa).

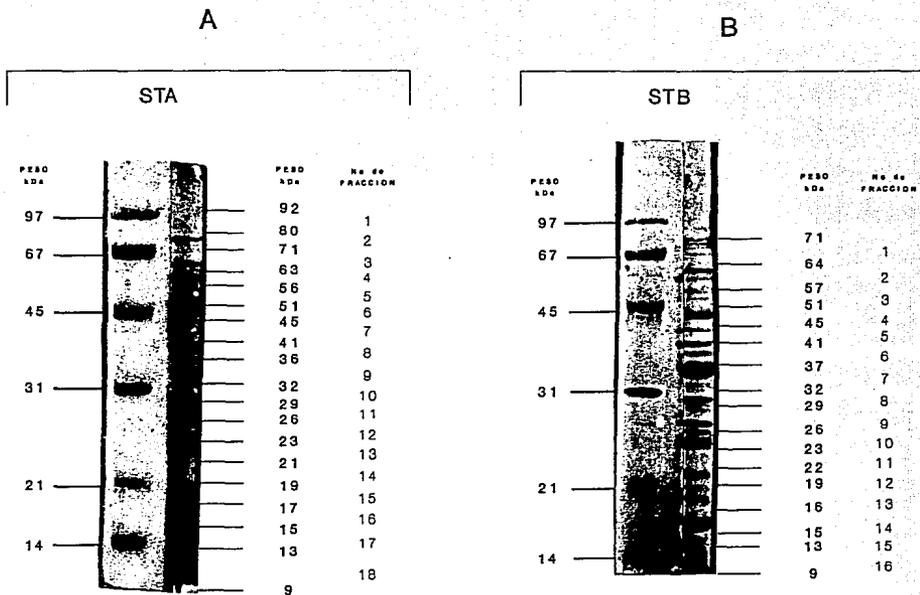


Fig 2. Electrotransferencia a papel de nitrocelulosa de los antígenos STA (A) y STB (B) de *S. typhi*. Se muestran las fracciones utilizadas para las pruebas de proliferación celular y el peso molecular correspondiente.

INMUNIDAD HUMORAL

Las figuras 3, 5 y 7, muestran las inmunolectrotransferencias para la detección de los anticuerpos de isotipos IgG, IgA e IgM en los grupos FT (A) y TESTIGO (B). En el cuadro 1 aparecen el número de bandas reconocidas en total así como sus pesos moleculares. Las Figuras 4, 6 y 8 muestran las inmunográficas correspondientes (IgG, IgA e IgM) con las frecuencias de reconocimiento para cada una de las bandas. En el eje X se graficó el porcentaje de reconocimiento para el grupo TESTIGO y en el eje Y el porcentaje de reconocimiento para el grupo FT.

En las figuras 3, 5 y 7, se observa que hay una gran heterogeneidad en la respuesta de los individuos de ambos grupos y varias bandas son reconocidas tanto por el grupo FT como por el grupo TESTIGO. En la figura 4 se muestra la frecuencia de reconocimiento para cada banda, por anticuerpos de la clase IgG; en el cuadrante superior derecho se observan aquellas bandas que fueron reconocidas por más del 50 % de los individuos de ambos grupos. En el cuadrante superior izquierdo están las bandas reconocidas principalmente por el plasma del grupo FT. Entre ellas podemos mencionar las bandas 39, 41, 44, 29, 18, 34, 35, 37, 22, 25, 36, 42, 31 y 32, reconocidas con una frecuencia mayor del 50 % exclusivamente por el grupo FT. En la figura 3 se muestra la posición en la electrotransferencia de cada una de las bandas antes mencionadas, así como el peso molecular aproximado que les corresponde. De éstas, las bandas 39, 41 y 44 (16, 14 y 10 kDa de peso molecular respectivamente) y la 29 (33 kDa), fueron reconocidas por el 100 % y 90 % respectivamente de los individuos del grupo FT.

CUADRO 1

PATRON DE BANDAS PARA EL ANTIGENO STA DE *S. typhi*.

NUMERO BANDA	PESO MOLEC. kDa	NUMERO BANDA	PESO MOLEC. kDa
1.-	109	23.-	43
2.-	100	24.-	40
3.-	97	25.-	39
4.-	95	26.-	38
5.-	93	27.-	36
6.-	90	28.-	34
7.-	88	29.-	33
8.-	84	30.-	30
9.-	80	31.-	28
10.-	77	32.-	27
11.-	75	33.-	26
12.-	71	34.-	24
13.-	68	35.-	21
14.-	66	36.-	20
15.-	63	37.-	20
16.-	60	38.-	18
17.-	58	39.-	16
18.-	53	40.-	15
19.-	51	41.-	14
20.-	49	42.-	14
21.-	48	43.-	13
22.-	46	44.-	10

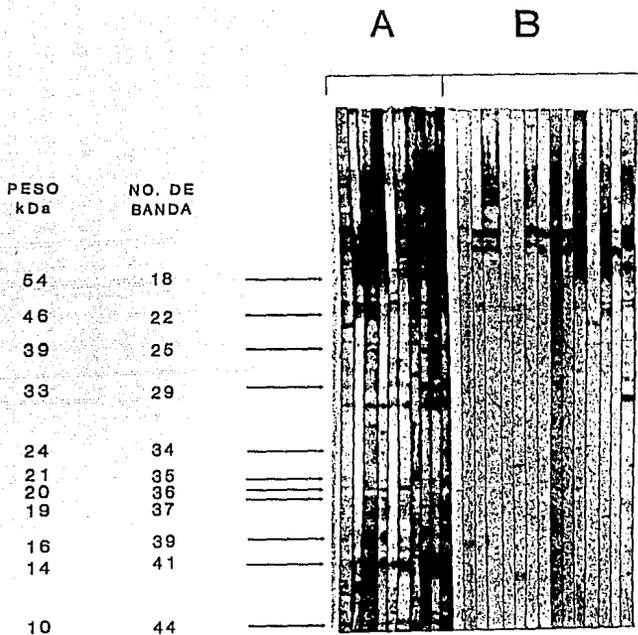


Fig 3. Reactividad por inmunoelectrotransferencia de anticuerpos IgG en el plasma de individuos con antecedentes de fiebre tifoidea (A) e individuos sanos (B) contra el antígeno STA de *S. typhi*.

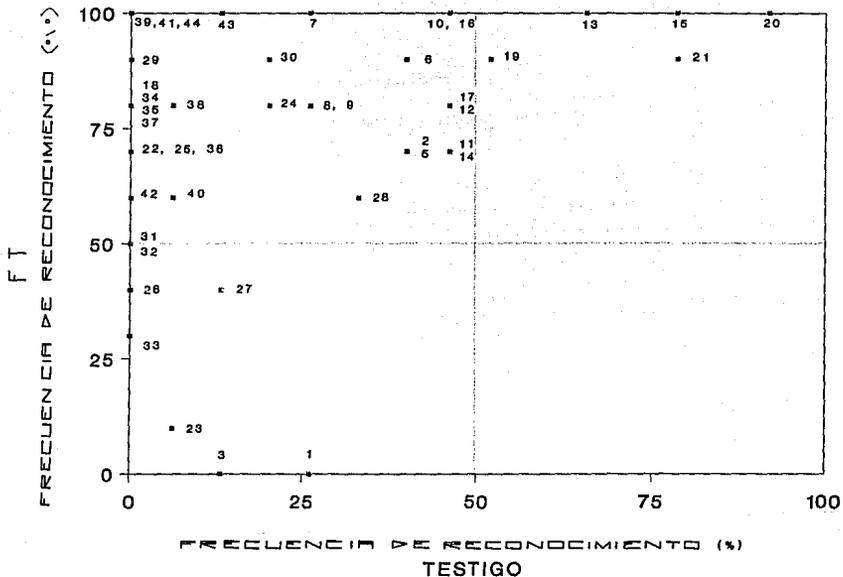


Fig 4. Inmunográfica de la frecuencia de reconocimiento por anticuerpos IgG para el patrón de bandas del antígeno STA.

En la figura 5 se ven los resultados para la IgA, así como las bandas principalmente reconocidas por el grupo FT y sus pesos moleculares aproximados. La figura 6 muestra la inmunográfica correspondiente, donde se ve que las bandas exclusivamente reconocidas por el grupo FT fueron la 24, 22, 25 y 29 con pesos moleculares de 40, 46, 39 y 33 kDa respectivamente. La banda 24 fue reconocida a una frecuencia mayor (80%) que el resto de las bandas mencionadas, las cuales tuvieron un 50% de reconocimiento.

Las figuras 7 y 8 muestran respectivamente, la inmunoelctrotransferencia (señalando las principales bandas) y la inmunográfica para los anticuerpos de clase IgM. Las bandas importantes para el grupo FT fueron la 24, 17, 16, 9 y 13 (40, 57, 60, 79 y 67 kDa respectivamente) con un 60% de reconocimiento y la 8 y 11 (83 y 74 kDa) con un 50%.

Un resumen de las bandas principalmente reconocidas por los anticuerpos de los 3 isotipos en el grupo FT se muestra en el cuadro 2. La inmunoglobulina que más bandas reconoció fue la IgG y también fue la que tuvo los porcentajes más altos de reconocimiento (bandas 39, 41 y 44 con el 100% y la 29 con 90%).

Las bandas 29, 25 y 22 con pesos moleculares de 33, 39 y 46 kDa respectivamente, fueron reconocidas también por anticuerpos del isotipo IgA aunque con un porcentaje menor. Los anticuerpos del isotipo IgM, reconocieron principalmente bandas de pesos moleculares entre los 40 y 83 kDa; y solamente la banda 24 (40 kDa), fue reconocida también por anticuerpos de clase IgA.

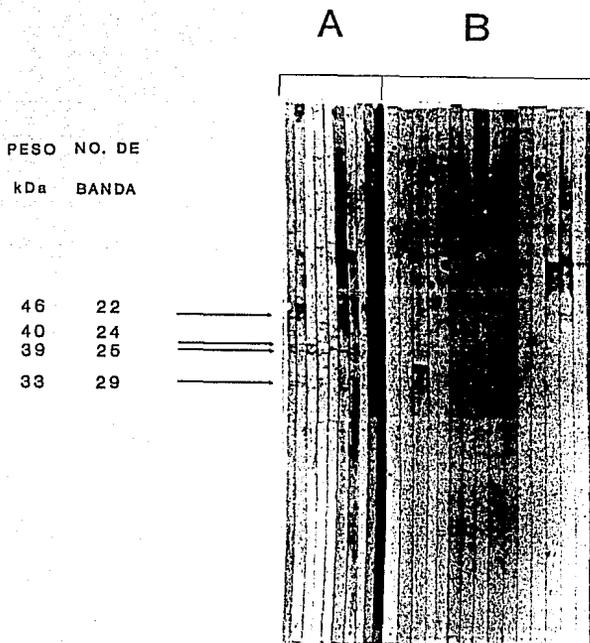


Fig 5. Reactividad por Inmunoelectrotransferencia de anticuerpos IgA en el plasma de individuos con antecedentes de fiebre tifoidea (A) e individuos sanos (B) contra el antígeno STA de *S. typhi*.

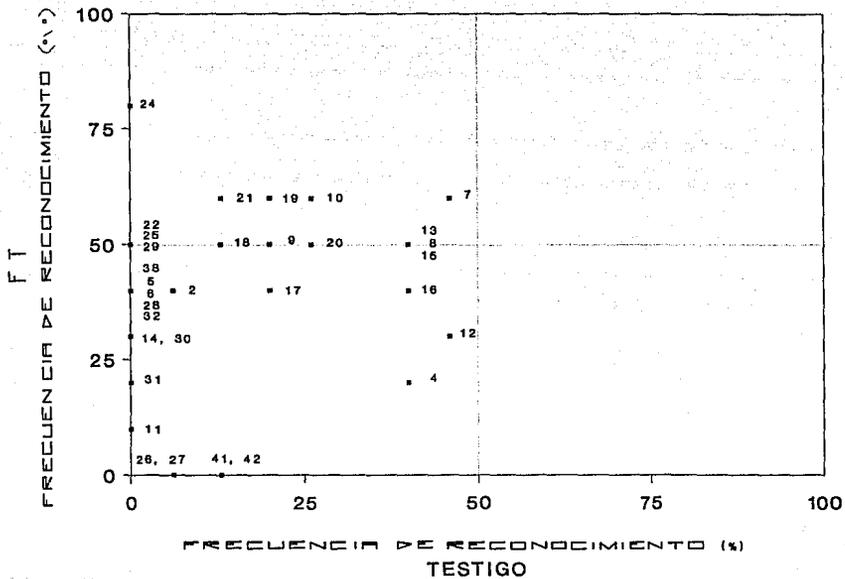


Fig 6. Inmunográfica de la frecuencia de reconocimiento por anticuerpos IgA para el patrón de bandas del antígeno STA.

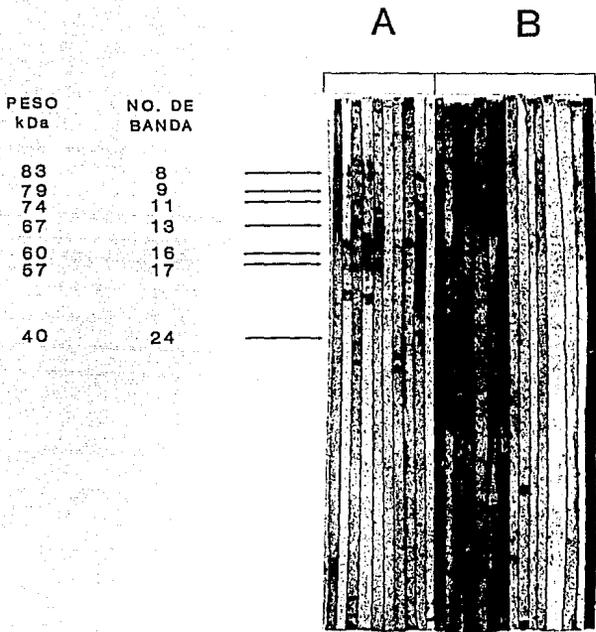


Fig 7. Reactividad por Inmunoelctrotransferencia de anticuerpos IgM en el plasma de individuos con antecedentes de fiebre tifoidea (A) e individuos sanos (B) contra el antígeno STA de *S. typhi*.

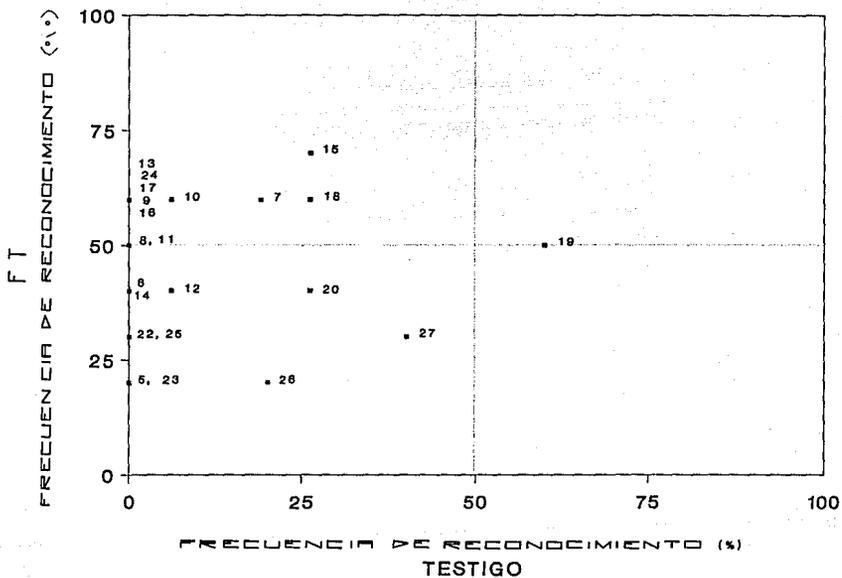


Fig 8. Inmunográfica de la frecuencia de reconocimiento por anticuerpos IgM para el patrón de bandas del antígeno STA.

CUADRO 2

**PRINCIPALES BANDAS DEL ANTIGENO STA RECONOCIDAS EXCLUSIVAMENTE
POR ANTICUERPOS PRESENTES EN EL PLASMA DEL GRUPO FT.**

IgG			IgA			IgM		
No de banda	%	kDa	No de banda	%	kDa	No de banda	%	kDa
39	100	16	■ 24	80	40	■ 24	60	40
41	100	14	* 22	50	46	17	60	58
44	100	10	* 25	50	39	16	60	60
* 29	90	33	* 29	50	33	9	60	80
18	80	53				13	60	68
34	80	24				8	50	84
35	80	21				11	50	75
37	80	20						
* 22	70	46						
* 25	70	39						
36	70	20						
42	60	14						
31	50	28						
32	50	27						

* = Bandas reconocidas por anticuerpos IgG e IgA

■ = Bandas reconocidas por anticuerpos IgA e IgM

INMUNIDAD CELULAR

Las figuras 2 A y 2 B muestran la electrotransferencia a papel de nitrocelulosa de los antígenos STA y STB y las fracciones en que fueron divididos: 18 para el antígeno STA y 16 para el antígeno STB. También se muestra el peso molecular aproximado que le corresponde a cada una de las fracciones, obtenidos por un análisis de regresión ($r = 0.999$).

Las fracciones con el antígeno en suspensión se emplearon a diferentes diluciones en ensayos de proliferación celular, para establecer la óptima. Se encontró para ambos antígenos una dilución de 1:10 y 1:20.

Con las fracciones del antígeno STA y STB se analizaron las respuestas de proliferación celular de 10 individuos del grupo FT y 15 del TESTIGO. Las figuras 9 y 10 muestran respectivamente los resultados obtenidos para los antígenos STA y STB, los cuales fueron clasificados en cuatro grupos: en el primero se incluyeron los resultados con índice de estimulación menor a 2.4, el cual fue considerado como una respuesta negativa; en el segundo grupo se incluyeron valores de 2.5 a 4.9, el cual se consideró como una respuesta débil; el tercero por valores entre 5 a 7.4 (respuesta moderada) y el cuarto con índices de estimulación mayor de 7.5, el cual se consideró como una respuesta intensa.

Aunque los resultados mostraron una gran variabilidad en la respuesta de cada individuo a las diferentes fracciones antigénicas, se observaron diferencias en el patrón de respuesta de los grupos FT y TESTIGO. Los individuos del grupo FT respondieron con índices de estimulación más elevados a un mayor número de fracciones que el grupo TESTIGO ($p < 0.05$).

PESO
MOLECULAR
KDa

92

62

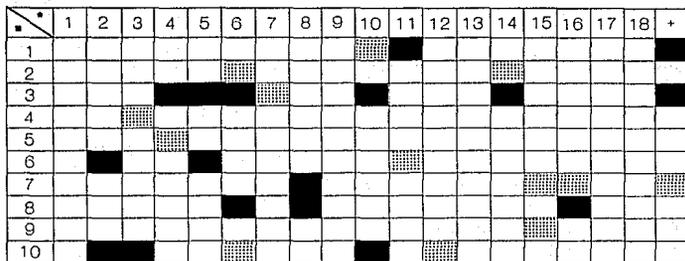
50

29

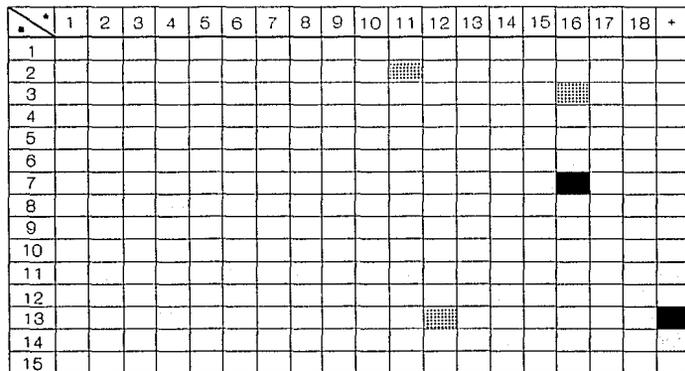
15

9

F
T



T
E
S
T
I
G
O



Indice de estimulación □ < 2.4 □ = 2.5-4.9 ■ = 5-7.4 ■ > 7.5

* = Número de fracciones del antígeno STA ■ = Número de individuos

Fig 9. Respuesta proliferativa de CMSP de individuos del grupo FT y TESTIGO a fracciones del antígeno STA de *S. typhi*. Índice de estimulación: promedio de cpm de las fracciones experimentales / promedio de cpm del papel de nitrocelulosa sólo. El testigo positivo (+) fue el antígeno STA sin fraccionar unido a nitrocelulosa.

PESO
MOLECULAR
KDa

71

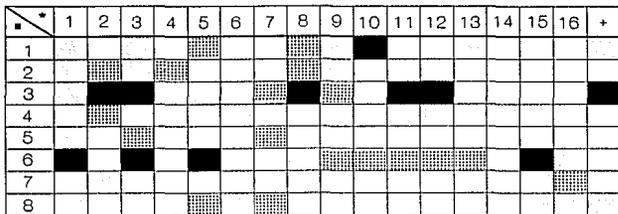
50

29

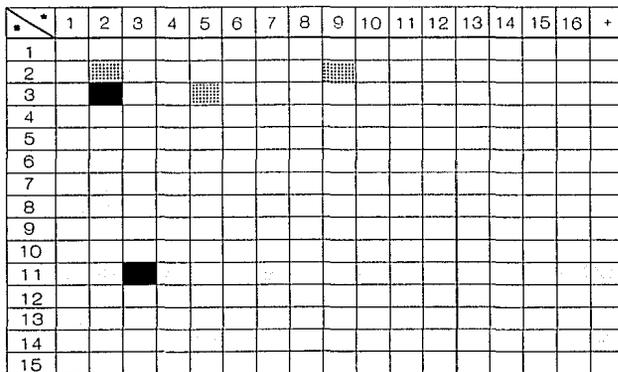
16

9

F
T



T
E
S
T
I
G
O



Índice de estimulación $\square < 2.4$ $\square = 2.5-4.9$ $\square = 5-7.4$ $\blacksquare > 7.5$

* = Número de fracciones del antígeno STB ■ = Número de individuos

Fig 10. Respuesta proliferativa de CMSP de individuos del grupo FT y TESTIGO a fracciones del antígeno STB de *S. typhi*. Índice de estimulación: promedio de cpm de las fracciones experimentales / promedio de cpm del papel de nitrocelulosa sólo. El testigo positivo (+) fue el antígeno STB sin fraccionar unido a nitrocelulosa.

Ninguna fracción indujo proliferación celular en todos los individuos del grupo FT. Sin embargo, en el caso del antígeno STA las fracciones 3, 7, 9 y 10 (con pesos moleculares de 70-63, 44-41, 35-32 y 31-29 kDa) indujeron proliferación exclusivamente en las células provenientes del grupo FT (figura 9). Dos fracciones del antígeno STB: la fracción 8 (31-29 kDa) y la fracción 15 (14-13 kDa) indujeron actividad proliferativa en el 75 % y el 50 % de los individuos del grupo FT. Ninguno de los testigos respondió a estas fracciones (figura 10). Tres de los individuos en el grupo FT no respondieron al control positivo del antígeno STA (individuos 4, 5 y 8) y cuatro al antígeno STB (individuos 2, 4, 5 y 7). Sin embargo estos individuos respondieron a varias de las fracciones de estos antígenos.

Los promedios para cada grupo del índice de estimulación de los cultivos celulares más el error estándar para cada una de las fracciones, se muestran en la figura 11 para el antígeno STA (A) y STB (B). En la figura 11 A, se identificaron 8 fracciones que indujeron una actividad proliferativa significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo FT. Dichas fracciones se localizaron en 4 regiones con pesos moleculares de 70-56, 50-41, 35-29 y 20 a 17 kDa. Para el antígeno STB (figura 11 B) se encontraron cinco regiones; dos con pesos moleculares de 71-64, 56-51 kDa, una región más amplia de 44-29 kDa y dos más de 22-19 y 14-13 kDa. En el caso del antígeno STA las dos fracciones que indujeron índices de estimulación más elevados 50-41 kDa y 35-29 kDa (fig 11 A), fueron reconocidas por el 70 % y el 60 % de los individuos del grupo FT respectivamente. La primera de estas fracciones sólo indujo una respuesta proliferativa débil en dos individuos del grupo TESTIGO, mientras la segunda fracción no estimuló las células de los individuos de este grupo. Para el antígeno STB la fracción de 31-29 kDa que fue reconocida por el 75 % de los individuos del grupo FT exclusivamente, fue también inmunodominante (figs 10 y 11 B).

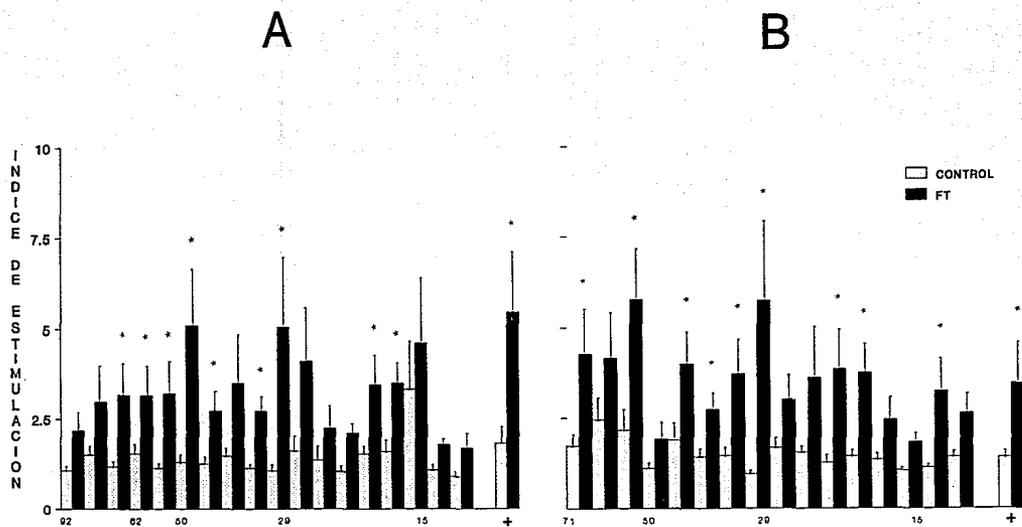


Fig 11. Promedio del índice de estimulación (más el error estandard) de CMSP de individuos del grupo FT y TESTIGO a las fracciones del antígeno STA (A) y STB (B) de *S. typhi*.

* = FT vs CONTROL $p < 0.05$ por t de Student

Los datos de las principales regiones antigénicas reconocidas por el grupo FT, su peso molecular y la frecuencia de reconocimiento en los dos grupos para los antígenos STA y STB se muestran en el cuadro 3. En éste, se puede ver que las regiones inmunodominantes mostradas en la figura 10 A y B, fueron también las fracciones más frecuentemente reconocidas por el grupo FT. En el mismo cuadro se muestran subrayadas cinco fracciones las cuales presentaron un peso molecular semejante y fueron reconocidas por más del 50 % de los individuos del grupo FT.

Cuando se compararon las principales fracciones del antígeno STA que indujeron actividad proliferativa en las células de los individuos del grupo FT y la respuesta de anticuerpos a las bandas contenidas en estas fracciones, se encontró que las fracciones 3 (70-63 kDa), 9 (35-32 kDa) y 14 (20-19 kDa) incluyen bandas que fueron reconocidas a una alta frecuencia por los anticuerpos del grupo FT (cuadros 2 y 3). Sin embargo cuando se hizo un análisis a nivel de cada individuo, no se encontró una buena correlación entre la respuesta humoral y celular.

CUADRO 3

**PESO MOLECULAR DE FRACCIONES RECONOCIDAS CON MAYOR FRECUENCIA
POR LOS INDIVIDUOS DEL GRUPO FT EN LOS ANTIGENOS STA Y STB.**

STA				STB			
		% RECONOCIMIENTO				% RECONOCIMIENTO	
No DE FRAC	PM kDa	FT	TESTIGO	No DE FRAC	PM kDa	FT	TESTIGO
3	<u>70-63</u>	50	0	1	<u>71-64</u>	75	20
4	62-56	50	13	3	56-51	88	13
6	50-45	70	13	5	44-41	75	20
7	<u>44-41</u>	50	0	6	<u>40-37</u>	50	6
9	<u>35-32</u>	50	0	7	<u>36-32</u>	50	6
10	<u>31-29</u>	60	0	8	<u>31-29</u>	75	0
11	28-26	50	13	9	28-26	50	6
14	<u>20-19</u>	60	13	11	22-22	50	6
15	18-17	60	13	12	<u>21-19</u>	75	13
				15	14-13	50	0

Las fracciones con peso molecular semejante en ambos antígenos están subrayadas

DISCUSION

Los estudios realizados en humanos indican que la respuesta inmune humoral (5,6,155) como la celular (153,154), participan en la protección contra la fiebre tifoidea.

En general los estudios encaminados a evaluar la respuesta inmune humoral en contra de *S. typhi*, se han enfocado principalmente a la detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos tales como el O, Vi y H. Se ha reportado que no existe una correlación entre los anticuerpos séricos dirigidos contra estos antígenos y la susceptibilidad, evolución de la enfermedad o complicaciones de la fiebre tifoidea (5,6,77).

Un esfuerzo considerable ha sido realizado durante muchos años para identificar los componentes celulares de *S. typhi* que están participando en la protección a la enfermedad. A nivel experimental se ha logrado inducir buen nivel de protección utilizando extractos proteicos crudos de la bacteria, sin embargo en este campo se conoce poco acerca de los antígenos involucrados, así como de los mecanismos por los cuales se induce dicha protección. En estudios recientes, se ha encontrado que las proteínas de membrana externa, especialmente las porinas juegan un papel importante en la inducción de protección (101,106,162).

En el presente estudio se utilizaron dos extractos proteicos crudos, los cuales han inducido una muy alta protección en el modelo experimental (91,92), además el antígeno STA fue bien tolerado al ser aplicado intradérmicamente en voluntarios humanos, a pesar de contener pequeñas cantidades de LPS (6 %) (91,156).

Los resultados mostraron una gran heterogeneidad en la respuesta inmune humoral dirigida contra los diferentes componentes del antígeno STA, tanto en el plasma del grupo FT como del TESTIGO. Los hallazgos en el grupo TESTIGO pueden ser el resultado de la presencia de anticuerpos de reacción cruzada dirigidos contra antígenos presentes en otros microorganismos (157,158,159) o en otras especies del género *Salmonella* (160), o del mismo microorganismo en infecciones subclínicas (161). Sin embargo para cada uno de los isotipos estudiados se pudieron identificar bandas que fueron exclusivamente reconocidas por el grupo FT (cuadro 2).

Comparando nuestros resultados con los descritos recientemente en la literatura, se podría pensar que algunos de los componentes reconocidos a una alta frecuencia por los individuos del grupo con antecedentes de fiebre tifoidea, podrían ser los mismos a los encontrados por otros autores, ya que coinciden en el peso molecular. Así por ejemplo, se ha descrito la presencia de anticuerpos en el suero de individuos con fiebre tifoidea en fase aguda o convalecientes, dirigidos contra proteínas de pesos moleculares aproximados de 52 kDa (163) y 50 kDa(164). En este estudio se encontró una banda de aproximadamente 53 kDa que fue reconocida en un 80 % por anticuerpos del isotipo IgG presentes exclusivamente en el grupo FT (banda 18 cuadro 2), esto pudiera concordar con lo reportado por Ismail y col (164) quienes encontraron un alto reconocimiento por anticuerpos del isotipo IgG contra una proteína de 50 kDa. Se necesitan sin embargo pruebas posteriores para poder determinar si la proteína de 53 kDa

reportada en este estudio es la misma que las de 50 o 52 kDa ya mencionadas o se trata de otra como la flagelina con un peso molecular aproximado de 52 kDa (165) o alguna otra proteína común para varias especies de *Salmonella* de 55 kDa que inducen una buena protección en el modelo experimental (92).

Recientemente las proteínas de membrana externa han sido objeto de numerosos estudios por su capacidad para inducir protección. Estudios tanto en animales (101,106) como en humanos (162) indican que la fracción proteica de estos extractos está involucrada en la protección conferida por estos antígenos. Dichas proteínas tienen pesos moleculares entre 17 a 80 kDa, entre éstas se encuentran las porinas y la proteína modificable por calor omp A con pesos moleculares entre 36-41 kDa. Isibasi y cols (162) reportaron que la respuesta humoral en convalecientes de fiebre tifoidea está dirigida principalmente contra porinas. Por otra parte Calderón y cols (166), encontraron un aumento de anticuerpos de clase IgM dirigidos contra porinas, en individuos con fiebre tifoidea en fase aguda. En este estudio se encontró una respuesta humoral por anticuerpos de los tres isotipos (IgG, IgA e IgM) dirigida contra antígenos de peso molecular similar al descrito para las porinas, entre estos destacan la banda 25 (39 kDa) para IgG, la banda 24 y 25 (40 y 39 kDa) para IgA y la banda 24 para IgM, las cuales fueron reconocidas en un alto porcentaje exclusivamente por el grupo FT. Es importante señalar que en los trabajos anteriores no se estudió la respuesta de IgA hacia las porinas, observándose en nuestro estudio que las proteínas reconocidas con más alta frecuencia por anticuerpos del isotipo IgA en el grupo FT tuvieron pesos moleculares semejantes a éstas (cuadro 2). Estos resultados pueden ser importantes ya que reportes recientes han indicado que mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos pueden estar involucrados en la resistencia a la infección por bacterias gram negativas en modelos experimentales (163) y en el humano (164,165). Dichos trabajos indican

la presencia de una actividad citotóxica celular expresada por linfocitos T CD4⁺ cubiertos por anticuerpos del isotipo IgA específicos para *S. typhi* (164,165). Aunque es difícil poder decir con los estudios realizados (ya que se trabajó con un extracto antigénico crudo), que se esté reconociendo un epítipo presente en la molécula de una porina, la característica de haber sido reconocidas con una alta frecuencia exclusivamente por el grupo FT, hacen a las fracciones 24 y 25 candidatos idóneos para posteriores estudios.

También se ha reportado que 50 % de los individuos convalecientes de fiebre tifoidea presentan anticuerpos IgG dirigidos contra una PME con peso molecular de 28 kDa (162), una respuesta similar fue encontrada en el presente estudio, banda 31 cuadro 2. En el estudio antes mencionado se encontró además que 50 % de los pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda, tienen anticuerpos de clase IgM dirigidos contra la proteína de 28 kDa, los cuales solamente fueron detectados en 2 individuos durante la convalecencia. Probablemente nosotros ya no detectamos estos anticuerpos debido a que las muestras empleadas en este estudio se tomaron después del periodo de convalecencia.

Es interesante mencionar que las proteínas reconocidas por anticuerpos IgM en el grupo FT, a frecuencias mayores del 50 %, también fueron reconocidas a una alta frecuencia por anticuerpos IgG tanto del grupo FT como por el TESTIGO. Una posible explicación sería que se tratasen de diferentes epitopes en una misma proteína, o proteínas diferentes con pesos moleculares similares. De acuerdo a su peso molecular se asemejan a proteínas de choque térmico, las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza.

En el presente trabajo se encontraron tres proteínas de 10, 14 y 16 kDa de peso molecular que fueron reconocidas por anticuerpos IgG de todos los individuos con antecedentes de fiebre tifoidea. Proteínas de peso molecular semejantes no han sido descritas en ningún trabajo realizado en humanos.

No existe en la actualidad una prueba serológica confiable que pueda ser utilizada en áreas endémicas de fiebre tifoidea. El diagnóstico de esta enfermedad se basa en el aislamiento de la bacteria a partir de heces, sangre u orina o en la prueba de Widal la cual carece de especificidad en áreas endémicas (3).

Recientemente se han reportado dos proteínas; una de 50 kDa (164) y otra de 52 kDa (163) que podrían ser de utilidad para la detección de anticuerpos dirigidos contra ellas en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de 52 kDa no fueron capaces de detectar el antígeno en muestras de orina, heces o sangre de individuos con fiebre tifoidea probablemente porque las cantidades de antígeno presentes sean muy pequeñas.

En el presente estudio nosotros identificamos varias bandas reconocidas a una alta frecuencia exclusivamente por el plasma de individuos con antecedentes de fiebre tifoidea, esta respuesta está dirigida principalmente contra los componentes proteicos de cada banda, ya que a pesar de que el antígeno utilizado tiene una concentración del 6% de LPS, el reconocimiento a las principales fracciones no cambió cuando se utilizaron sueros adsorbidos con LPS. Por lo tanto pensamos que la purificación y caracterización de estas proteínas podría ser de utilidad para el desarrollo de pruebas seroepidemiológicas y de diagnóstico adecuadas que puedan ser empleadas en áreas endémicas para fiebre tifoidea.

Salmonella typhi es una bacteria intracelular facultativa que se disemina dentro del organismo al sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos (50,51). Varios estudios han mostrado la inducción de respuesta inmune celular a partir de la segunda semana de la enfermedad y se ha reportado una falta de dicha respuesta en los casos complicados de fiebre tifoidea (170). Estos datos apoyan la importancia de la RIC en la protección contra la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de estudios realizados en humanos para tratar de determinar la

importancia de la RIC han dado resultados muy variables, una posible explicación podría ser porque se han utilizado extractos antigénicos crudos en la mayoría de estos estudios.

Estudios realizados en regiones no endémicas para fiebre tifoidea con ensayos de proliferación linfocitaria *in vitro* y antígenos de *S. typhi*, han mostrado ser más sensibles para detectar contactos previos con *S. typhi*, que los procedimientos serológicos convencionales (171) sin embargo, en regiones endémicas como sucede en nuestro país los resultados no son muy claros (172). El grupo de Murphy (173) utilizando ensayos de proliferación celular, encontró que en regiones no endémicas, un antígeno de *S. typhi* muerta por calor y conservada en fenol fue mejor para discriminar entre individuos inmunes y no inmunes comparado con un antígeno preparado con la bacteria muerta por calor sin ser fijada en fenol o de antígenos de la bacteria obtenidos rompiendo la bacteria, con los cuales no se pudo diferenciar entre los dos grupos. Sin embargo ninguno de estos antígenos sirvió para diferenciar estos dos grupos cuando las pruebas se realizaron en zonas endémicas para fiebre tifoidea.

La identificación de antígenos involucrados en la respuesta inmune celular a diferencia de la humoral, ha sido más problemática puesto que los linfocitos T no son activados por antígeno libre sino sólo por antígenos unidos a células, en asociación a los productos genéticos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (174). Algunos grupos de investigadores han logrado identificar moléculas reconocidas por clonas de células T a partir de mezclas antigénicas, utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas como los cromatográficos, los cuales son tardados y requieren cantidades relativamente altas de la mezcla antigénica; o con técnicas de ADN recombinante, en cuyo caso es necesaria la selección, mediante anticuerpos monoclonales de colonias que secretan antígenos relevantes. Estos métodos tiene tres grandes inconvenientes:

primero los antígenos seleccionados son los inmunodominantes para los animales utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales y no necesariamente tienen que ser importantes para el humano; segundo, dichos antígenos pueden ser más importantes para la respuesta humoral que para la celular y por último el papel de los carbohidratos no puede ser estudiado.

En el presente trabajo se estandarizó una técnica descrita por Abou-Zeid y cols (151), para estudiar la respuesta inmune celular presente en el grupo FT y TESTIGO en contra de dos extractos antigénicos de *S. typhi* (91,92). Dicha técnica ha sido empleada con éxito para el estudio de la respuesta de células T a componentes individuales de extractos antigénicos crudos; se basa en la separación de proteínas por electroforesis en SDS-PAGE, transferencia a papel de nitrocelulosa y procesamiento de las diferentes fracciones para obtener antígenos unidos a partículas de nitrocelulosa suficientemente pequeñas para que puedan ser fagocitadas por los macrófagos y presentadas a los linfocitos T (151).

El patrón de estimulación celular encontrado en este estudio, mostró una gran variabilidad a nivel individual para los dos antígenos (figura 9 y 10), sin embargo se encontraron diferencias significativas entre el grupo FT y el TESTIGO para los antígenos (STA y STB) (figura 11). La gran variabilidad encontrada con los individuos del grupo FT podría ser en parte el reflejo del polimorfismo en los genes del CMH de cada uno de ellos.

La respuesta proliferativa observada contra varias fracciones del antígeno en los individuos del grupo FT que no respondieron al extracto total en suspensión, podría ser el resultado de la suma de los diferentes efectos para cada uno de los componentes antigénicos y el haplotipo del CMH en cada individuo y/o a la presencia de determinantes inhibitorios o supresores en la mezcla antigénica, los cuales pudieron ser removidos durante el proceso de fraccionamiento como ha sido reportado para otros antígenos (175).

Los resultados obtenidos con el antígeno STA permitieron identificar 4 fracciones que indujeron actividad proliferativa exclusivamente en las células de individuos del grupo FT. Aunque ninguna de estas fracciones estimuló las células de todos los individuos de este grupo, una mezcla de las fracciones 3, 7 y 10, sería capaz de estimular las células del 90 % de los individuos de este grupo. Puesto que estas fracciones no estimularon los linfocitos de los controles pueden ser de utilidad para discriminar entre estos dos grupos en zonas endémicas de la enfermedad.

Los resultados mostraron que las fracciones reconocidas por los linfocitos a alta frecuencia fueron también las inmunodominantes (figura 9, 10 y 11). Sin embargo, al interpretar estos resultados se debe tomar en cuenta que no todos los antígenos pueden estar presentes en cada fracción a una concentración óptima para estimular a los linfocitos T, con lo cual las zonas de inmunodominancia señaladas en la tabla 5 podrían ser el reflejo de una mayor concentración de determinados antígenos, más que el de un mayor número de linfocitos T antígeno específicos. Sin embargo, ya que el patrón de respuesta a cada una de las fracciones a diferentes diluciones no cambió en forma importante, nosotros suponemos que las zonas de inmunodominancia encontradas en ambos antígenos (STA y STB) son más el reflejo de un mayor reconocimiento inmunológico que el de una inadecuada concentración del antígeno en otras fracciones.

Por otra parte, mientras que los anticuerpos dirigidos contra antígenos conformacionales no reaccionan con proteínas desnaturalizadas, los epitopes reconocidos por la mayoría de las células T requieren solo de la integridad en la estructura primaria, sin embargo, la destrucción potencial o modificación de ciertos epitopes inmunodominantes para linfocitos T por el proceso de fraccionamiento no puede ser descartado completamente. Es interesante mencionar que la mayoría de las fracciones inmunodominantes para ambos

antígenos tuvieron un peso molecular semejante, por lo tanto podría tratarse de las mismas proteínas.

No existen reportes en la literatura acerca de proteínas de *S. typhi* capaces de estimular la RIC de humanos, Sin embargo, es interesante comparar nuestros resultados con algunos descritos a nivel experimental.

Dentro de las fracciones reconocidas con mayor frecuencia por los individuos del grupo FT para ambos antígenos (cuadro 3), la fracción 3 para STA y la 1 para STB con un peso molecular aproximado de 70-64 kDa, podrían estar reconociendo una proteína de choque térmico de 65 kDa ampliamente distribuida en bacterias (168,169) la que también ha sido detectada en algunos miembros del género *Salmonella* (176), se ha encontrado que estas proteínas son buenas inductoras de RIC. Dentro de la fracción 3 para el antígeno STB, con un peso molecular aproximado de 56-51 kDa se podría estar reconociendo una proteína de 55 kDa la cual ha sido reportada como inductora de RHT y protección en el modelo murino. Esta proteína se obtuvo a partir de un extracto proteico utilizando la misma técnica usada por nosotros para el antígeno STB (92), es importante señalar que esta fracción fue la que mayor frecuencia de reconocimiento tuvo. Dentro de las fracciones 7 y 9 para STA y 5, 6 y 7 para STB se podrían estar reconociendo a las porinas las cuales en el modelo murino inducen una respuesta RHT (113).

A nivel humoral y celular para el antígeno STA existieron zonas que se sobrepusieron (cuadro 2 y 3) sin embargo, cuando se analizaron las dos respuestas para cada individuo no encontramos una buena relación entre la respuesta de anticuerpos y la RIC, lo cual sugiere que otras funciones distintas a las de cooperación son realizadas por los linfocitos T detectados en el ensayo. Esto mismo ha sido detectado para otros antígenos (175).

Debido a que *Salmonella typhi* es una bacteria intracelular facultativa se

cree que la RIC es indispensable para la eliminación del germen. Nosotros hemos logrado identificar fracciones antigénicas de la *Salmonella* que son reconocidas específicamente por individuos con antecedentes de fiebre tifoidea, es probable que algunas de estas proteínas estén involucradas en la protección contra la enfermedad. Por lo tanto, la purificación y caracterización de las proteínas presentes en las fracciones inmunodominantes permitirá evaluar su capacidad de inducir resistencia contra la fiebre tifoidea.

BIBLIOGRAFIA

1. Hornick RB. 1985. Selective primary health care: Strategies for control of disease in the developing world. XX. Typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 7: 536-546.
2. Carrada Bravo T. 1981. La fiebre tifoidea y la vacunación antitifoídica Salud Pública de México época V volumen XXIII Marzo-Abril , pag 103-158.
3. Edelman R. Levine M. 1986. Summary of and International workshop on Typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 8: 329-349.
4. Epidemiología. Boletín Mensual. 1990. Información estadística de enfermedades transmisibles. Sistema Nacional de Salud. 5: 1-15.
5. Hornick R.B., Greissman S.E., Woodward T.E., DuPont H.L.; Dawkings A.T., Snyder M.J. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunological control. N.Engl. J. Med. 283: 686-691.
6. Hornick R.B. Woodward T.E., Dupont H.L.; Dawkings A.T., Snyder M.J. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunological control. N.Engl. 283: 739-746.
7. Schuardt, T.V. Pathogenic microbiology. J.B. Lippincott Company. Boston (1982).
8. Lennette H.E., Ballows, A. Manual of Clinical Microbiology. 3rd Ed. American Society for Microbiology. Washington (1984).
9. Brenner, D.J. 1983. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 49-58.
10. Davis, E., Dulbecco, R. Microbiology 3rd edition. Harper and Row Published inc. Maryland 1980.
11. Volk, W.A. Wheeler, M.F. Pathogens that enter the body via digestive tracter. Basic microbiology. 5th Edition. Harper and Row, Publishers. New York 1984.
12. Carter P.B., Collins F.M. 1974. The route of enteric infection in normal mice. J. Exp. Med. 139: 1189-1203.
13. Stephen L. Hoffman N.H.P., 1984 Duodenal-String capsule culture compared with bone-marrow blood, and rectal-swab cultures for diagnosing typhoid and paratyphoid fever. J. Inf. Dis. 149: 157-161.

14. Kissane A. Enfermedades bacterianas. cap. 7. Editorial Médica Panamericana. 8^a. edición 1986.
15. Braude A., Davis Ch., Fierer J. 1988. Infectología Ed. Médica Panamericana. pp. 675-685.
16. Torres López F.J. Fisiopatogenia de la diarrea aguda. Introducción a la Pediatría. Edit. Palacios Treviño J. Games Eternod Juan. 5a Edición. México D.F. 1991.
17. Smith S. 1981. Neutrophil bactericidal capability in experimentally induced salmonellosis in pigs. Am. J. Vet. Res. 42: 1332-1334.
18. Hoffman S., Punjabi N. 1984. Reduction of mortality in chloramphenicol-treated severe typhoid fever by high-dose dexametasone. N. Engl. J. Med. 310: 82-88.
19. Gerber, D.F., Watkins, H.M.S. 1961. Growth of *Shigella* in monolayer tissue cultures. J. Bacteriol. 82: 815-822.
20. Hale, T.L., Bonventre, P.F. 1979. *Shigella* infection of henle intestinal epithelial cells: role of the bacterium. Infect. Immun. 24: 879-886.
21. Hale, T.L., Sansonetti, P.J., Shad, P.A., Austin, S., Formal, S.B. 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. Infect. Immun. 40: 340-350.
22. Carter, J.R., Leishbaugh, W.B., Inman, L.R. 1981. Attachment of bacteria to intestinal epithelial cells in diarrhea caused by *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: stages and role of capsule. J. Infect. Dis. 143: 219-230.
23. DuPont, H.L., Formal, S.B., Hornick, R.B., Synder, M.J., Libanoti, J.P., Sheahan, D.J., Labrec, E.H., Kalas, J.P. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med. 285: 1-9.
24. Vesikari, T., Nurmi, T., Maki, M., Skurnik, M., Sundquist, C., Granfors, K., Gronroos, P. 1981. Plasmids in *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:9: correlation with epithelial cell adherence in vitro Infect. Immun. 33: 870-876
25. Felix A., Pitt R.M. 1951. The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. J. Hyg. 49: 92-110.
26. Yabuuchi E., I Kedo M., Ezaki T. 1986. Invasiveness of *Salmonella typhi* strains in HeLa S3 monolayer cells. Microbiol. Immunol. 30: 1213-1224.

27. Liu S.L., Ezaki, T., Miura H., Matsui K., Yabuuchi E. 1988. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion related factor. Infect. Immun. 56: 1967-1973.
28. Carsiotis M., Winstein D., Karch H., Holder I.A., O'Brien A.D. 1984. Flagella of *Salmonella typhimurium* are a virulence factor in infected C57BL/6J mice. Infect. Immun. 46: 814-818.
29. Hohmann, A., Schmidt, G., Rowley, D. 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. Infect. Immun. 22: 763-770.
30. Tomita T., Kanegasaki S. 1982. Enhanced phagocytic response of macrophages to bacteria by physical impact caused by bacterial motility or centrifugation. Infect. Immun. 38: 865-870.
31. McCormick B.A., Stocker B.A.D., Laux D.C., Cohen P.S. 1988. Roles of motility, chemotaxis and penetration through and growth in Intestinal mucus in the ability of an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* to colonize the large intestine of Streptomycin-treated mice. Infect. Immun. 56: 2209-2217.
32. Elsinghorst EA., Baron LS., and Kopecko DJ. 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: Molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 5173-5177.
33. Galan J.E., and R. Curtiss III. 1990. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. Infect. Immun. 58: 1879-1885.
34. Galan J.E, and R. Curtiss III. 1991. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *InvA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. Infect Immun. 59: 2901-2908.
35. Stocker B.A.D., Makälä P.H. 1986. Genetic determination of bacterial virulence with special reference to *Salmonella*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 124: 149-172.
36. Fernández-Beros, M. E., González, C., McIntosh, M., Cabello, F.C. 1989. Immune response to the iron deprivation-induced proteins of *Salmonella typhi* in Typhoid Fever. Infect. Immun. 57: 1271-1275.
37. Hoiseth, S.K., Stocker, B.A.D. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. Nature 291: 238-239.

38. Smith B.P., Reina-Guerra M., Hoiseth S.K., Stocker B.A.D. 1983. Safety and efficacy of aromatic dependent *Salmonella typhimurium* as live vaccine for calves. Am. J. Vet. Res. 45: 59-66.
39. Stocker B.A.D., Hoiseth S.K., Smith B.P. 1983. Aromatic dependent *Salmonella* spp as live vaccine, in mice and calves. Dev. Biol. Stand. 53: 47-62.
40. Levine MM., Herrington D., Murphy JM, Morris JG., Losonsky G., Tall B., Lindberg A., Svenson S., Bagar S., Edwards M., Stocker B. 1987. Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541 Ty and 543 Ty, as live oral vaccines in humans. J. Clin. Invest. 79: 888-902.
41. Morrison DC., and Ryan JL. 1979. Bacterial endotoxins and host immune responses. Adv. Immunol. 28: 293-450.
42. Liang-Takasaka C.J., Grossman N., Leive L. 1982. Phagocytosis of bacteria by macrophages: changing the carbohydrate of Lipopolysaccharide alters interaction with complement and macrophages. J. Immunol. 128: 1229-1235.
43. Valtonen M.V. 1977. Role of phagocytosis in mouse virulence of *Salmonella typhimurium* recombinants with O-antigen 6, 7 or 4, R. Infect. Immun. 18: 574-578.
44. Mäkelä PH., Hovi M., Saxen H., Valtonen M., Valtonen V. 1988. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. Immunol. Lett. 19: 217-222.
45. Germanier, R., Fürer, E. 1971. Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 4: 663-673.
46. Germanier, R. 1972. Immunity in experimental salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 5: 792-797.
47. Hone D.M., Attridge S.R., Forrest B., Morona R., Daniels D., LaBrooy J., Bartholomeusz R., Shcaarman D., Hackett J. 1988. A gal E via (Vi antigen-negative) mutant of *S. typhi* Ty2 retains virulence in humans. Infect. Immun. 56: 1326-1333.
48. Nnalue N.A., Lindberg A.A. 1990. *Salmonella choleraesuis* strains deficient in O antigen remain fully virulent for mice by parenteral inoculation but are avirulent by oral administration. Infect. Immun. 58: 2493-2501.

49. Buchmeier N., Heffron F. 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect. Immun.* 57: 1-7
50. Buchmeier N., Heffron F. 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lisosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 59: 2232-2238.
51. Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H., Mellman, I. 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249: 641-646.
52. Groisman E., Chiao E., Lipps C., Heffron F. 1989 *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7077-7081.
53. Miller S., Kukral A., Mekalanos J. 1989. A two-component regulatory system (*phoPphoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5054-5058.
54. Di Donato A., Draetta G., Illiano G., Tufano M., Sommese L., Galdiero F. 1986. Do porins inhibit macrophage phagocytosing activity by stimulating the adenylate cyclase? *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 11 (2): 87-97.
55. Tufano M., Berlingieri M., Sommese L., Galdiero F. 1984. Immune response in mice and effects on cells by outer membrane porins from *S. typhimurium* *Microbiologica* 7 (4): 353-366.
56. Galdiero F., Tufano M., Sommese L., Folgore A., Tedesco F. 1984. Activation of complement system by porins extracted from *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* 46: 559-563.
57. Tufano, M., Ianniello, R., Galdiero, M., DeMartino, L., Galdiero F. 1989. Effect of *S. typhimurium* porins on biological activities of human polymorphonuclear leukocytes. *Microb. Pathogen.* 7 (5): 337-346.
58. Bhatnagar N. Schlecht S. 1985. Proteins from *Salmonella* R-mutants mediating protection against *Salmonella typhimurium* infection in mice. III. Separation and purification of soluble proteins and their use as vaccines and as precipitating antigens. *Zbl. Bakt. Hyg A* 260: 448-458.
59. Angerman C.R., Eisenstein T.K. 1978. Comparative efficacy and toxicity of ribosomal vaccine, acetone-killed cells, lipopolysaccharide and live cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium* *Infect. Immun.* 19 : 575-532.

60. Morrison D.C., Kline L.F. 1977. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharide (LPS). *J. Immunol.* 118: 362-368.
61. Killion J.W., Morrison D.C. 1986. Protection of C3H/HEJ mice from lethal *Salmonella typhimurium* LT2 infection by immunization with Lipopolysaccharide-Lipid A-Associated protein complexes. *Infect Immun.* 54: 1-8.
62. Nakano P.T., Saito H.U. 1972. Comparative immunogenicity of heat killed and living oral *Salmonella* vaccines. *Infect. Immun.* 6: 451-458.
63. Svenson S.B., Lindberg A.A. 1981. Artificial *Salmonella* vaccines. *Salmonella typhimurium* O-antigen-specific oligosaccharide protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. *Infect. Immun.* 32: 490-496.
64. Killar L.M., Eisenstein T.K. 1984. Difference in delayed-type hypersensitivity responses in various strains in the C3H lineage infected with *Salmonella typhimurium*, strain SL 3235. *J. Immunol.* 133: 1190-1196.
65. Eisenstein T.K., Killarl L.M., Stocker BAD., Sultzer B.M. 1984. Cellular immunity induced by avirulent *Salmonella* in LPS-defective C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* 133: 958-961.
66. Tully J.G., Gaines S., 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.
67. Anderson E.S. 1968. Proposal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. *Simposio Series in Immunobiological Standardization* 15: 79-86.
68. Robbins J.D., Robbins J.B. 1984. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J Infect. Dis.* 150: 436-449.
69. Hornick R.B., Greisman S.E., Woodward T.E., DuPont H.L., Dawkins A.T., Synder M.J. 1970. Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *New. Engl. J. Med.* 283: 739-746.
70. Bokkenheuser V., Smit P., Richerdson N. 1964. A challenge to the validity of the Vi test for the detection of chronic typhoid carriers. *Am. J. Public. Health.* 54: 1507-1513.

71. Schubert J.H., Edwards P.R., Ramsey C.H. 1959. Detection of typhoid carriers by agglutination test. *J. Bacteriol.* 77: 648-654.
72. Ashcroft M.T., Ritchie J.M., Nicholson C.C., Stuart C.A. 1964. Antibody responses to vaccination of British Guyana schoolchildren with heat-killed-phenolized and acetone-killed-lyophilized typhoid vaccines. *Am. J. Hyg.* 80: 221-228.
73. Acharya I.L., Lowe C.L., Thapa R., Gurubacharya V.L., Shrestha M.B., Bact D., Cadoz M., Schulz D., Armand J., Bryla D.A., Trollfors B., Cramton T., Schneerson R., Robbins R.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.
74. Klugman K.P., Koornhof H.J., Gilbertson, I.T., Robbins J.B., Schneerson R., Schulz D., Cadoz M., Armand J. and the Vaccination Advisory Committee. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 11: 1165-1169.
75. Szu S.C., Li X., Schneerson R., Vickers J.H., Bryla D., 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.
76. Morrison D.C., Ryan J.L. 1979. Bacterial endotoxins and host immune response. *Adv. Immunol.* 28: 294-438.
77. Tacket C.O., Losonsky G., Taylor D.N., Baron L.S., Kopecko D., Cryz S., Levine M.M. 1991. Lack of immune response to the Vi component of a Vi-positive variant of the *Salmonella typhi* live oral vaccine strain Ty 21a in human studies. *J. Inf. Dis.* 163: 901-904.
78. Youmans A.S., Youmans G.P. 1965. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 99: 42-50.
79. Houchens D.P., Wright G.L. Jr. 1973. Immunity to *Salmonella typhimurium* infection. Characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis. *Infect. Immun.* 7: 507-511.
80. Johnson W. 1972. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 3: 947-952.
81. Smith R.A., Bigley N.J. 1972. Ribonucleic acid-protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogens. *Infect. Immun.* 6: 390-397.

82. Venneman M.R., Bigley N.J. 1969. Isolation and partial characterization of an immunogenic moiety obtained from *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 100: 140-148.
83. Molinari J.L., Larralde C. 1974. Acquired immunity to murin typhoid induced in mice with ribosomal fractions of *Salmonella typhimurium*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 16: 189-197.
84. Molinari J.L., Cabrera R. 1974. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty 2. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16: 199-204.
85. Eisenstein T.K. 1975. Evidence for O-antigens as the antigenic determinants in "Ribosomal" vaccines prepared from *Salmonella*. Infect. Immun. 12: 364-377.
86. Johnson W. 1973. Ribosomal vaccines. II. Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic acid protein isolated from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 8: 395-400.
87. Margolis J.M., Bigley N.J. 1972. Cytophilic macroglobulin reactive with bacterial protein in mice immunized with ribonucleic acid-protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 6: 390-397.
88. Venneman M.R. 1972. Purification of immunogenically active ribonucleic acid preparations of *Salmonella typhimurium*: molecular-sieve and anion-exchange chromatography. Infect. Immun. 5: 269-282.
89. Hoops P., Prather N.E., Berry L.J., Ravel J.M. 1976. Evidence for an extrinsic immunogen in effective ribosomal vaccines from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 13: 1184-1192.
90. Misfeld M.L., Johnson W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fractions from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 8: 395-400.
91. Tato P., Flisser A., Gavilanes M., Molinari J.L. 1979. Immunogenic complexes obtained from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* Ty 2 by the bacterial acetone powder method. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 130 A: 47-60.
92. Schlecht S., Bhatnagar N. 1985. Proteins from *Salmonella* R-mutants mediating protection against *Salmonella typhimurium* infection in mice. II. Protection test performed with proteins free from lypopolysaccharide. Zbl. Bakt. Hyg. A 259, 367-377.

93. Buchanan T.M., Pearce W.A., Schoolnick G.K., Arko R.J. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. J. Infect. Dis. 136 (suppl): 132-137.
94. Wang L.I. and Frash C.E. 1984. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. Infect immun 46: 408-414.
95. Guling, P.A., McCracken G.H. Jr., Frich C.F., Johnston, H.K., 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.
96. Adamus G., Mulcza M., Witkowska D., Romanowska E. 1980. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. Infect. Immun. 30: 321-324.
97. Gilleland H.E., Parker M.G., Matthews J.W., 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.
98. Kuusi N, Nurminen M., Saxén H., Valtonen M., Mäkelä P.H. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Infect. Immun. 25: 857-862.
99. Svenson S.B., Nurminem M., Lindberg A. 1979. Artificial *Salmonella* vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 25: 863-872.
100. Isibasi A., Ortiz V., Vargas M., Paniagua J., Gonzáles C., Moreno J. and 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.
101. Kuusi N., Nurminen M., Saxén H., Mäkelä P.H. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: Effect of lipopolisaccharide. Infect. Immun. 34: 328-332.
- 102 Barber C., Eylen E. 1976. Cross protection induced in mice by immunizations with proteins of related bacteria species. Zentralbl. Bakteriол. Hyg. I Abt. Orig. A 234: 46-52.

- 103 Muller W., Schlecht S., Westphal O. 1980. Immunization against *Salmonella typhimurium* infection in mice. Chemical composition and protective activity of different extracts from *Salmonella* R mutants. Zentralbl. Bakteriell. Hyg. I Abt. Orig. A 248: 64-80.
- 104 Lyman M. B., Stocker B.A.D., Roantree R. J. 1979. Evaluation of the Immune response directed against the *Salmonella* antigenic factors O4, 5 and O9. Infect. Immun. 26: 956-965.
- 105 Ornellas E.P., Roantree R.J., Steward J.P. 1970. The specificity and importance of humoral antibody in the protection of mice against and intraperitoneal challenge with complement-sensitive and complement-resistant *Salmonella*. J. Infect. Dis. 121: 113-123.
- 106 Muthukkaruppan V.R., Udhayakumar V. 1987. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immun. 55: 816-821.
- 107 Schmidtke J., Dixon F.J. 1972. Immune response to a hapten coupled to a non immunogenic carrier. Influence of lipopolysaccharide J. Exp. Med. 136: 392-397.
- 108 Uchiyama T., Jacobs D.M. 1978. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharide (LPS): Cellular basis of stimulatory and inhibitory effects of LPS on the in vitro IgM antibody response to a T-dependent antigen. J. Immunol. 121: 2347-2351.
109. Tokunaga M., Tokunaga H. Okajima Y., Nakae Y. 1979. Characterization of porins from the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. 2. Physical properties of the functional oligomeric aggregates. Eur. J. Biochem. 95: 441-448.
- 110 Yumada H., Mizushima S. 1980. Interaction between major outer membrane protein (O-8) and lipopolysaccharide in *Escherichia coli* K-12. Eur. J. Biochem. 103: 209-218.
- 111 Angerman C.R., Eisenstein T.K. 1980. Correlation of the duration and magnitude of protection against *Salmonella* infection afforded by various vaccines with antibody titers. Infect. Immun. 27: 435-443.
- 112 Collins F.M. 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. Bacteriol. Rev. 38: 371-402.
- 113 Udhayakumar V., Muthukkaruppan V.R. 1987. An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. Infect. Immun. 55: 822-824.

- 114 Frasch C.E. 1979. Noncapsular surface antigens of *Neisseria meningitidis*, p 304-337. In L. Weinstein and B.N. Fields (ed.), Seminars in infectious disease, vol 2. Stratton International Medical Book corp., New York.
- 115 Yugoslav Typhoid Commission. Field and laboratory studies with typhoid vaccines. Bull WHO 1957; 16: 897-910.
- 116 Yugoslav Typhoid Commission. A controlled field trial of the effectiveness of phenol and alcohol typhoid vaccines. Bull WHO 1962; 26: 357-369.
- 117 Yugoslav typhoid Commission. A controlled field trial of the effectiveness of acetone-dried and inactivated and heat-phenol inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. Bull WHO 1964; 30: 623-630.
- 118 Ashcroft M.T., Nicholson C.C., Balwant S., Ritchie J.M., Soryan E., William F. 1967. A seven-year field trial of two typhoid vaccines in Guiana. Lancet 2: 1056-1060.
- 119 Polish Typhoid Committee. Controlled field trials and laboratory studies on the effectiveness of typhoid vaccines in Poland 1961-1964. Bull WHO 1966; 34: 211-222.
120. Hejfec L.B., Salmin L.V., Lejtman M.Z., Kuz'minova M.L., Vasil'eva A.V., Levina L.A., Bencianova, T.G., Pavlova E.A., Antonova A.A. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. Bull WHO 1966; 34: 321-339.
121. Levine M.M., Ferrecio C., Black R.E., Tacket C.O., Germanier R. and the Chilean Typhoid Fever. Rev. Infect. Diseases. 11; 3: 552-567.
122. Bodhidatta L, Taylor D.N., Thisyakorn U., Echeverria P. 1987. Control of typhoid fever in Bangkok, Thailand, by annual immunization of school children with parenteral typhoid vaccine. Rev. Infect. Dis. 9: 841-845.
123. DuPont L.H., Hornick R.B., Snyder M.J., Dawkins A.T., Heiner G.G., Woodward T.E. 1971. Studies of immunity in typhoid fever. Protection induced by killed oral antigens or by primary infection. Bull WHO 44: 667-672.
124. Chuttani C.S., Prakash K., Vergese A., Sharma U., Shingha P., Ghosh Ray B. 1971. Effectiveness of oral killed typhoid vaccine. Bull WHO 45: 445-450.
125. Germanier R., Fürer E. 1975. Isolation and characterization of gal E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 131: 553-558.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

126. Wahdan M.H., Serie C., Cerisier Y., Sallam S., Germanier R. 1982. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a oral vaccine against typhoid: three-year results. J. Infect. Dis. 145: 292-296.
127. Hirschel B., Wuthrich R., Somaini B., Steffen R. 1985. Inefficacy of the commercial live oral Ty 21a vaccine in the prevention of typhoid fever. Eur. J. Clin. Microbiol. 4: 295-308.
128. Levine M.M., Ferrecio C., Black R.E., Germanier R. 1987. Chilean Typhoid Committee. Large-scale field trial of Ty 21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. Lancet 1: 1049-1052.
129. Levine M.M., Ferrecio C., Cryz S., Ortiz E. 1990. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty 21a typhoid vaccine in randomized controlled field trial. Lancet: 891-894.
130. Silva-Salinas B.A., Rodríguez-Aguayo L., Maldonado-Ballesteros A., Valenzuela-Montero M.E., Seoane-Montecinos M. 1985. Propiedades de dos derivados Gal + de la cepa vacuna *Salmonella typhi* mutante Gal E Ty 21a. Bol. Med. Hosp. Infant. México 42: 234-239.
131. Silva B.A., González C., Mora G.C., Cabello F. 1987. Genetic characteristics of the *Salmonella typhi* strain Ty 21a vaccine. J. Infect. Dis. 155: 1077-1078.
132. Stocker BAD. 1986. Genetics of *Salmonella* and *Shigella* strains used as live vaccines. In: Holmgren J. Lindberg A., Mollby R. eds. Development of vaccines and drugs against diarrhea. Lund, Sweden: Student literature, 127-129.
133. Osborn MJ., and HCP Wu. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34: 369-422.
134. O'Callaghan D., Maskell D., Liew F.Y., Easmon CSF., Dougan G. 1988. Characterization of aromatic-and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: Attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in Balb/c mice. Infect Immun 56: 419-423.
135. Linde K., Beer J., Bondarenko V. 1990. Stable *Salmonella* live vaccine strains with two or more attenuating mutations and any desired level of attenuation. Vaccine 8: 278-282.

136. Formal S.B., Baron L.S., Kopecko D.J., Washington O., Powel C., Life C.A. 1981. Construction of a potential bivalent vaccine strain: Introduction of *Shigella sonnei* form I antigen gives into the gal E *Salmonella typhi* Ty 21a typhoid vaccine strain. *Infect. Immun.* 34: 746-760.
137. Clements J.D., El-Morshidy S. 1984. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-*Escherichia coli*-related diarrheas. *Infect. Immun.* 46: 564-569.
138. Forrest B.D., LaBrooy J.T., Atridge S.R., Boehm G., Beyer L., Morona R., Shearman DJC, Rowley D. 1989. Immunogenicity of a candidate live oral typhoid cholera hybrid vaccine in humans. *J. Infect. Dis.* 159: 145-146.
139. Tramont E.C., Chung R., Berman S., Keren D., Kapfer C., Formal S.B. 1984. Safety and antigenicity of typhoid-*Shigella sonnei* vaccine (strain 5076-1C). *J. Infect. Dis.* 149: 133-136.
140. Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Losonsky G., Herrington D., Berman S., Formal S.B. 1987. Prevention of shigellosis by a *Salmonella typhi-Shigella sonnei* bivalent vaccine. *J. infect. Dis.* 155: 1260-1265.
141. Herrington D.A., Verg L.V., Formal S.B., Hale T.L., Tall B.D., Cryz S.J., Tramont E.C., Levine M.M. 1990. Studies in volunteers to evaluate candidate *Shigella* vaccines: further experience with a bivalent *Salmonella typhi-Shigella sonnei* vaccine and protection conferred by previous *Shigella sonnei* disease. *Vaccine* 8: 353-357.
142. Lockman A., Curtis R. III. 1990. Occurrence of secondary attenuating mutation in avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine strains. *J. Infect. Dis.* 162: 1397-1400.
143. Alfaro G. 1977. Related R plasmids in *Salmonella typhi* strains isolated in México city from clinical samples. *Rev. Lat-amer Microbiol.* 19: 209-215.
144. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Rondall R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
145. Bhatnagar N., Schlecht S. 1985. Proteins from *Salmonella* R-mutants mediating protection against *Salmonella typhimurium* infection in mice III. Separation and purification of soluble proteins and their use as vaccines and as precipitating antigens. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 260: 448-458.
146. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

147. Towbin H., Sfachelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
148. Lamb J.R., O'Hehir R., Young D. 1988. The use of nitrocellulose immunoblots for the analysis of antigen recognition by T lymphocytes. J. Immunol. Methods 110: 1-10.
149. Weber K., Osborn M. 1969. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412.
150. Larralde C., Montoya R.M., Sciutto E., Días M.L., Govezensky T., Coltorti E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from Neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 282-290.
151. Abou-Zeid C., Filley E., Steele J., Rook G.A. 1987. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to estimate lymphocytes *in vitro* after converting bands cut from western blots into antigen-bearing particles. J. Immunol. Methods 98: 5-10.
152. Melendro E.I., Saldade C., Rivero S., Alarcón D. 1983. T cell subpopulations in the peripheral blood of patients with connective tissue diseases as determined by flow cytometry using monoclonal antibodies. Clin. Immunol. Immunopathol. 27 (3): 340-347.
153. Kumar P.R., and A.N. Malaviya. 1982. Immunological studies in typhoid fever. II. Cell mediated immune responses and lymphocyte subpopulations in patients with typhoid fever. Clin. Exp. Immunol. 47: 269-271.
154. Romano M., De Magistris M.T., Villa L., Nuti S., De Leo V., Buraschi D., Nencioni L., and Tagliabue A. 1989. Natural antibacterial activity against *Salmonella typhi* in human cordon blood. J. Immunol. 142: 2513-2518.
155. Sarasombath S., Banchuin N., Sukosui T., Rungpitarangsi B., and Manasatit S. 1987. Systemic and intestinal Immunities after natural typhoid infection. J. Clin. Microbiol. 25: 1088-1093.
156. Molinari JL., Yépes L., Tato P., and Méndez L. 1981. Ribonucleic acid-protein purified from *Salmonella typhi* involved in experimental immunity. Ann. Immunol. (Instituto Pasteur) 132 D: 25-41.

157. Mäki-Ikola O., Leirisalo-Repo M., Kantela A., Toivanen P., and Granfors K. 1991. *Salmonella*-especific antibodies in reactive arthritis. *J. Infec. Dis.* 164: 1141-1148.
158. Stieglitz H., Fosmire S., and Lipsky P. 1988. Bacterial epitopes involved in the induction of reactive arthritis. *Am. J. Med.* 85: 56-60.
159. Lahesmaa R., Skurnik M., Vaara M., Leirisalo-Repo M., Nisilä M., Granfors K., and Toivanen P. 1991. Molecular mimicry between HLA B 27 and *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Klebsiella* within the same region of HLA A1-Helix. *Clin. Exp. Immunol.* 86: 399-404.
160. Schroeder SA. 1968. Interpretation of serologic test for typhoid fever. *JAMA.* 206: 839-840.
161. Ferrecio C., Levine MM., Manterola A., Rodríguez G., Rivara I., Prenzel I., Black RE., Mancuso T., Bulas D. 1984. Benign bacteremia caused by *Salmonella typhi* in children younger than 2 years. *J. Pediatr.* 104: 899-901.
162. Isibasi A., Vianney O, García-Ortigoza E., 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.
163. Sarasombath S., Ekpo P., Banchuin N., and Sisisinha S. 1990. Monoclonal antibodies to 52 kilodalton protein of *Salmonella typhi* *J. Clin. Microbiol.* 28: 1818-1821.
164. Ismail A., Hai O.K., and Kader Z.A. 1991. Demonstration of a antigenic protein specific for *Salmonella typhi*. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 181: 301-305.
165. Sadallah F., Brighouse G, Del Giudice G., Drager-Dayal R., Hosine M., and Lambert H. 1990. Production of specific monoclonal antibodies to *salmonella typhi* flagellin and possible application to immunodiagnosis of typhoid fever. *J. Infec. Dis.* 161: 59-64.
166. Calderón I., Lobos SR., Rojas HA., Palomino C., Rodríguez LH., and Mora GC. 1986. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.* 52: 209-212.
167. Kotlarski I., and Vordermeier HM. 1990. Identification of antigens witch stimulate T lymphocytes of *Salmonella enteritidis* 11RX immunized mice. *Immunol. cell. Biol.* 68: 299-305.
168. Leirisalo-Repo M. 1988. Clinical picture of reactive *Salmonella* arthritis. *J Rheumatol.* 15: 1668-1671.

169. Heffron F., and Buchmeier NA. 1990. Induction of *Salmonella* stress protein upon infection of macrophages. *Science* 248: 730-732.
170. Rojagopalan P., Kumar R., Malaviya AN. 1982. Immunological studies in typhoid fever. II. cell-mediated immuneresponses and lymphocyte subpopulations in patients with typhoid fever. *Clin. Exp. Immunol.* 47:269-274.
171. Espersen F., Mogensen HH., Hoiby N., Hoj L., Greibe J., Rasmussen SN., Gaarsley K. and Danish *Salmonella* carrier study group. 1982. Humoral and cellular immunity in typhoid and paratyphoid carrier state, investigated by means of quantitative immunoelectrophoresis and *in vitro* stimulation of blood lymphocytes. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. (Sect C).* 90 (6): 293-299.
172. Murphy JR., Wasserman SS., Baqar S., Schlesinger L., Ferruccio C., Lindberg AA. 1989. Immunity to *Salmonella typhi*: considerations relevant to measurement of cellular immunity in typhoid-endemic regions. *Clin. Exp. Immunol.* 75: 228-233.
173. Murphy JR., Baqar S., Muñoz C., Schlesinger L., Ferruccio C., Lindberg AA., Svenson S., Losonsky G., Koster F., Levine MM. 1987. Characteristics of humoral and cellular immunity to *Salmonella typhi* in residents of typhoid-endemic and typhoid-free regions. *J. Infect. Dis.* 156: 1005-1010.
174. Rosenthal AS., and Shevach EM. 1973. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138: 1194-1212.
175. Médez-Samperio P., Lamb J., Bothamley G., Stanley P., Ellis C., Ivanyi J. 1989. Molecular study of the T cell repertoire in family contacts and patients with leprosy. *J. Immunol.* 142: 3599-3604.
176. Gaston JSH., Life PF., Bailey LC., and Bacon PA. 1989. In vitro responses to a 65 kDa mycobacterial protein by synovial T cells from inflammatory arthritis patients. *J. Immunol.* 143: 2494-2500.
177. Velazco AG. 1987. Proteínas aisladas de *Salmonella typhimurium* involucradas en la inmunidad. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas área Microbiología. Instituto de Fisiología Celular. UNAM