



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE LA
PORINA Omp C RECOMBINANTE DE
Salmonella typhi 9, 12, Vi:d

T E S I S
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MARTHA PATRICIA ROJO AGUILAR



México, D. F. Diciembre de 1993.

TESIS CON
FOLIO DE ORDEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

- 1. RESUMEN 1**
- 2. INTRODUCCION 2**
 - 2.1. Generalidades 2**
 - 2.2. Proteínas de Membrana Externa 4**
 - 2.3. Estructura de las porinas 5**
 - 2.4. Empleo de la porina OmpC Recombinante como vacuna experimental 6**
- 3. FUNDAMENTACION DEL TEMA 10**
- 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 12**
- 5. OBJETIVOS 13**
- 6. HIPOTESIS 13**
- 7. ESQUEMA DE TRABAJO 14**
- 8. MATERIAL Y METODOS 15**
 - 8.1. Modelos experimentales 15**
 - 8.2. Cepas bacterianas 15**
 - 8.3. Caracterización de las cepas bacterianas 15**
 - 8.4. Cultivo y cosecha de la bacteria 16**
 - 8.5. Purificación de la porina Omp C de E. coli UH302/pst13 16**
 - 8.6. Determinación de proteínas 17**
 - 8.7. Determinación de LPS 18**
 - 8.8. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato**

de sodio (SDS-PAGE)	18
8.9. Electroforesis de LPS en geles de poliacrilamida	19
8.10. Electroforesis bidimensional	20
8.11. Quimioluminiscencia	20
8.12. Inmunización y reto	21
9. RESULTADOS	22
9.1. Caracterización de las cepas bacterianas	22
9.2. Purificación de la porina Omp C recombinante por cromatografía de exclusión molecular	23
9.3. Cuantificación de proteínas y LPS de las fracciones obtenidas en el cromatograma	26
9.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
9.5. Electroforesis de LPS en geles de poliacrilamida	26
9.6. Electroforesis bidimensional	27
9.7. Análisis de la reactividad de un suero de ratón anti-rOmp C hacia la porina rOmp C caracterizada	27
9.8. Cinética de sobrevivencia	32
10. DISCUSION DE RESULTADOS	35
11. CONCLUSIONES	37
12. BIBLIOGRAFIA	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de proteínas y LPS de las fracciones obtenidas en la purificación de la porina rOmp C. 25

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas. 8

Fig. 2. Conformación tridimensional de las porinas. 9

Fig. 3. Perfil cromatográfico de exclusión molecular de la porina rOmp C. 24

Fig. 4. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas en el cromatograma de elución de la porina rOmpC (Tinción para proteínas). 28

Fig. 5. Análisis electroforético del lipopolisacárido presente en las fracciones obtenidas en el cromatograma de elución de la porina rOmp C (Tinción para LPS). 29

Fig. 6. Electroforesis bidimensional de la porina rOmp C de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. 30

Fig. 7. Análisis de la reactividad de un suero de ratón anti-rOmp C por la técnica de Quimioluminiscencia "Tipo Photoblot". 31

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Evaluación de la actividad protectora de la porina rOmp C en ratones C₃H/Fej. 33

Gráfica 2. Evaluación de la actividad protectora de la porina rOmp C en ratones BALB/c. 34

PRINCIPALES ABREVIATURAS

BHI Infusión de cerebro y corazón (por sus siglas en inglés)

DL₅₀ Dosis letal al 50%

DNAasa Desoxirribonucleasa

***E. coli* UH302/pst13** *E. coli* UH302 con el plásmido pst13

EDTA Acido etilén diamino tetraacético

KDO Acido 2-ceto-3-desoxioctulónico

KDa Kilodaltones

LPS Lipopolisacárido

Omp Proteína de membrana externa

rOmp C Proteína de membrana externa C recombinante

pho E Omp inducible a concentraciones bajas de fosfatos

PI Punto isoeléctrico

PME Proteínas de membrana externa

PVDF Difluorido de polivinilideno

RNAasa Ribonucleasa

SDS Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio

Tris Tris-(hidroximetil)-aminometano

1. RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron purificar y caracterizar inmunológicamente la porina OmpC recombinante (rOmp C) de *S. typhi* en su estado nativo y evaluar la protección que induce en el modelo murino ante el reto de 20, 100 y 500 dosis letales medias (DL₅₀) de la cepa homóloga.

La porina rOmp C se aisló de *E. coli* UH302/pST13, mediante la solubilización de la membrana externa y fué extraída con una solución reguladora de fuerza iónica elevada; posteriormente se purificó por cromatografía de exclusión molecular y su perfil cromatográfico mostró cuatro fracciones. A cada fracción se le cuantificó el contenido de proteínas y LPS y en ninguna de ellas hubo contaminación de este último. La segunda fracción fué la que mostró mayor concentración de proteínas y cuando se estudió por electroforesis en geles de poliacrilamida, la banda correspondiente a la porina tuvo un peso molecular de 114 KDa en su estado nativo y de 38 a 41 KDa en su forma monomérica.

La inmunización de ratones C₃H/Fej con dosis de 10 µg de porina rOmp C en su estado nativo, no indujo protección al reto con 20, 100 y 500 DL₅₀; mientras que la inmunización de ratones BALB/c con 10 µg de porina rOmp C en su estado nativo, indujo protección del 50, 37 y 0% al reto de la cepa homóloga con 20, 100 y 500 DL₅₀ respectivamente.

2. INTRODUCCION

2.1. GENERALIDADES

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa aguda y febril causada por *Salmonella typhi*. El agente causal es un bacilo gram-negativo no esporulado, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonellae* y especie *S.typhi*. La envoltura de estas bacterias es de composición compleja y se muestra en la fig 1.

La infección se adquiere mediante la ingestión de alimentos o agua contaminada con la bacteria y no existen reservorios animales, siendo la principal fuente de diseminación los individuos que no presentan sintomatología clínica pero son portadores y excretores activos del agente (portadores asintomáticos). El padecimiento tiene un período de incubación de aproximadamente 10 días. La bacteria penetra en la mucosa intestinal, invade la sangre y conduce a una infección generalizada con manifestaciones clínicas de fiebre, ataque al estado general, diarrea, lesiones ulcerativas del intestino y balance nitrogenado negativo que afecta seriamente el estado nutricional del paciente. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. La infección muestra marcada tendencia a recidivar, a desarrollar complicaciones graves de las vías digestivas y a la eliminación fecal prolongada de la bacteria. Las complicaciones intestinales más importantes incluyen hemorragias (2 al 8% de los casos) y perforación intestinal (3 al 4%) (18).

El diagnóstico definitivo de fiebre tifoidea se realiza por medio del hemocultivo, en donde generalmente se aísla el germen en más del 80% de los casos, cuando la sangre se extrae durante el cuadro febril. El aislamiento del bacilo en heces, orina o bilis es una prueba menos convincente ya que puede estar asociada con el estado de portador. La reacción de Widal, practicada con las cepas *S. typhi* 0-901 y H-901, puede ayudar al diagnóstico cuando el título para ambos antígenos es de 1:160 o más; sin embargo esta prueba solo tiene valor diagnóstico y no sirve para el pronóstico o para guiar el tratamiento pues no permite predecir las recaídas o complicaciones (19).

La prevención de la fiebre tifoidea mediante saneamiento del agua y alimentos; control y reducción del número de portadores y personas infectadas, se debería promover como actividad principal. Sin embargo esto no es posible, a corto y mediano plazo, debido a la crisis económica que afecta a los países pobres. Por todo lo anterior es indispensable promover la vacunación.

Las vacunas parenterales actualmente disponibles no son adecuadas para su aplicación en gran escala porque dan reacciones secundarias indeseables y no generan inmunidad de larga duración. De éstas, las más conocidas son las vacunas "K" y "L" las cuales son preparadas con células completas inactivadas con acetona y calor-fenol respectivamente (15,12).

La vacuna oral elaborada por Germanier, hecha a base de una cepa de *S. typhi* deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa, no induce protección suficiente en regiones endémicas (10).

Existe en el comercio una vacuna efectiva, hecha a base de antígeno Vi, con

protección hasta del 70% (2,17). El inconveniente de esta vacuna es que debido a su naturaleza polisacáridica es tifo independiente, por lo que su efecto protector, al no inducir memoria, es de corta duración (22).

Las investigaciones actuales están enfocadas hacia el desarrollo de nuevas vacunas contra la fiebre tifoidea que además de proteger en forma eficiente sean inocuas e induzcan inmunidad de larga duración. Las proteínas de membrana externa (PME) de *S. typhi* han demostrado, en el modelo murino, que son protectoras a un reto de 500 DL₅₀ con la bacteria viva (20,35,13).

2.2. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

Las PME que más se han estudiado son las de *E. coli* y *S.typhimurium*. Di Rienzo, Nakamura e Inouye en 1978 y Osborn y Wu en 1980, hicieron una revisión extensa de ellas (7,26) y las clasificaron en proteínas principales y menores.

Las proteínas principales pueden estar expresadas con más de 100,000 copias por célula y se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente sólo se expresan 5. Dentro de éstas se encuentran:

- Proteínas matrices o porinas (Omp C, Omp D, Omp F, pho E), que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana (23).

- Proteína modificable por el calor (Omp A), involucrada en los procesos de conjugación y que actúa como receptor para fagos y colicinas (4,6,31) y

- Lipoproteína de Braun, la cuál está unida covalentemente a la peptidoglicana y

cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana (3), ver la fig 1.

Las proteínas menores intervienen como acarreadores en el transporte de sustancias de alto peso molecular y están relacionadas con la división celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de membrana externa que tiene actividad de fosfolipasa A (7,26,23).

Las PME de *S.typhi*, obtenidas mediante la solubilización con un detergente no iónico, tienen pesos moleculares de 14 a 70 KDa con punto isoeléctrico (PI) de 4.0 a 6.0 (13). Las porinas, que constituyen la mayor parte de éstas PME, una vez purificadas por cromatografía de exclusión molecular y electroelución tienen un PI de 4.0 a 5.0 y pesos de 114 a 128 KDa en estado nativo (cuando se encuentran asociados en forma de homotrímeros) y de 36 a 41 KDa en su forma monomérica (27).

2.3. ESTRUCTURA DE LAS PORINAS

Dentro de la familia de las porinas, las más estudiadas son OmpF y PhoE de *E. coli*, pero debido a su gran homología (más del 60%), se considera que la estructura de las otras porinas es muy similar. Están formadas por tres monómeros idénticos de forma cilíndrica semejante a un barril (fig 1). La entrada del poro se encuentra delimitada por largas prolongaciones del cilindro que restringen su acceso al inclinarse hacia el centro del canal. A la mitad de la altura, el diámetro del poro se reduce por el doblamiento de una de sus paredes hacia el interior. Esta zona de restricción determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus

dimensiones hasta el otro extremo, el cual desemboca en el espacio periplásmico de la bacteria (5).

El monómero de las porinas (fig 2) es un polipéptido de 336 residuos en promedio. Los estudios de cristalografía más recientes realizados en OmpF y PhoE, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å respectivamente, muestran que la unidad estructural es un barril β formado por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas α -hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras β de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1 (5).

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal. La entrada del poro está restringida por las asas largas y dispares que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11 Å a 19 Å. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio tiene dimensiones de 15 x 22 Å y está definida por las vueltas β . El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en estas asas y por tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros (5).

2.4. EMPLEO DE LA Omp C RECOMBINANTE COMO VACUNA EXPERIMENTAL.

Se cuenta con evidencias de que complejo de las porinas de *S. typhi* inducen protección en el modelo murino (14) y como consecuencia de esos resultados se decidió estudiar el papel que juegan cada una de ellas. La estrategia experimental se diseñó

para utilizar metodología de DNA recombinante, pensando en eliminar contaminantes (como el LPS) y evaluar la actividad protectora independiente de cada porina en modelos murinos. Cabello y colaboradores en 1990, obtuvieron el DNA de cepas de *Salmonella typhi* procedentes de Perú, México, Chile, India e Inglaterra, y compararon el genoma para la expresión de proteínas de membrana externa (9). En 1987, clonaron el gen que codifica para la porina de 36 KDa, OmpC de *Salmonella typhi*, en el plásmido pst13, el cual fué introducido por transducción en la cepa *Escherichia coli* UH302 (*E. coli* UH302/pst13). La clona recombinante fué identificada por: a) su capacidad de dotar a *Escherichia coli* de la susceptibilidad a bacteriófagos porina específicos, b) mostrar resistencia a la ampicilina y c) por la aparición en la membrana de una nueva proteína de 36 KDa a la cual se le denominó porina OmpC recombinante (rOmp C) (1).

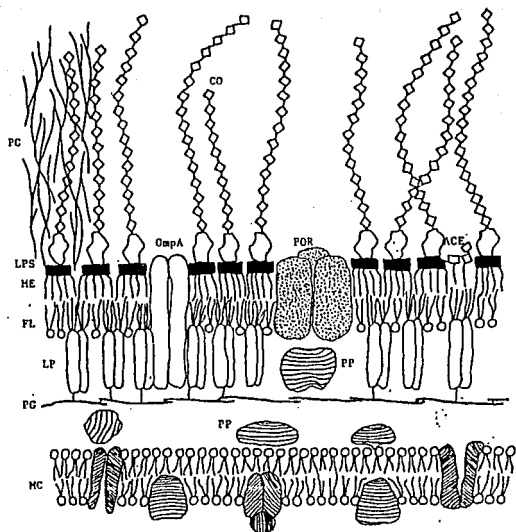


Fig 1. Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas (11). ME: membrana externa; LPS: lipopolisacárido; FL: fosfolípidos; ACE: antígeno común enterobacteriano; POR: porina; OmpA: proteína modificable por el calor; PG: peptidoglicano; LP: lipoproteína; PP: proteínas periplásmicas; MC: membrana citoplasmática; PC: polisacárido capsular; CO: cadenas O.

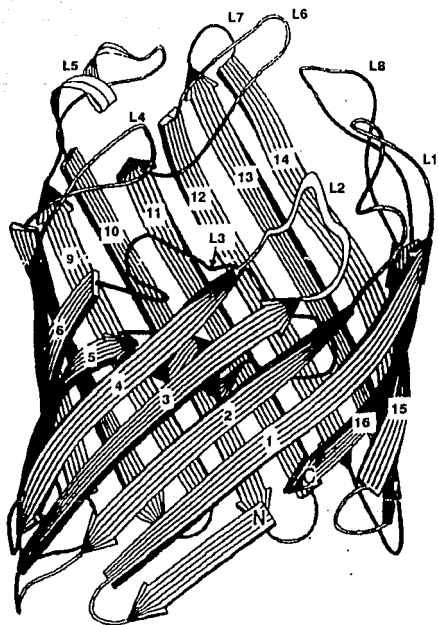


Fig 2. Estructura tridimensional del monómero de la porina Omp F de *E. coli* (5).

3. FUNDAMENTACION DEL TEMA

La fiebre tifoidea es un problema de salud en los países en vías de desarrollo. En la región de las Américas (América Latina y el Caribe) en 1990, se presentaron 89,600 casos aproximadamente (33), los cuales representan una incidencia de 20.8 casos/100 000 habitantes, esta incidencia llegó a ser en Chile de hasta 150 casos/100 000 habitantes. En México la fiebre tifoidea es todavía un problema de salud pública; en diciembre de 1992 se reportaron 11623 casos (32).

Las vacunas parenterales y orales actualmente disponibles no son adecuadas para su aplicación en gran escala, pues frecuentemente dan lugar a reacciones secundarias indeseables y no generan inmunidad de larga duración. De ahí la necesidad de trabajar en el desarrollo de una vacuna efectiva y exenta de estos inconvenientes. Como respuesta a este problema se han desarrollado varios modelos experimentales. Uno de ellos, se basa en la capacidad que presentan cada una de las porinas de *S.typhi* de inducir protección, en el modelo murino, ante el reto con la bacteria homóloga. Por técnicas recombinantes se ha obtenido la porina OmpC de *Salmonella typhi* en la cepa *Escherichia coli* UH302/pst13, con este modelo se tiene la ventaja de trabajar con la proteína pura y libre de contaminación, como el LPS, al cual se le atribuye efecto de endotoxina.

En el presente trabajo, se pretende purificar y caracterizar inmunológicamente a la porina OmpC de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d expresada en *E. coli* UH302/pst13 (rOmp

C) y evaluar la protección que induce en el modelo experimental murino a diferentes dosis de reto con la cepa homóloga.

Con los resultados que se obtengan, en caso de protección de la porina OmpC en un futuro este modelo podría ser un candidato a vacuna. Para llevar a cabo el desarrollo de una vacuna se requiere de mucho trabajo y tiempo, para lo cual una vez conocido el agente inmunizante, hay que preparar lotes pilotos para ensayar en pequeña escala el procedimiento de producción industrial que posteriormente se llevará a cabo en escala mayor. El material obtenido se utiliza para demostrar que es inocuo y biológicamente activo mediante su inoculación en varias especies de animales de laboratorio susceptibles a la infección, que son utilizadas como modelos experimentales. La eficacia deberá demostrarse en animales, tanto observando la formación de anticuerpos como analizando su resistencia a la infección y a la enfermedad después de haberlos retado experimentalmente con el agente patógeno específico. A este nivel se establecen los niveles preliminares de dosis que servirán para orientar posteriores estudios en humanos.

Cuando se tiene información satisfactoria sobre su inocuidad e inmunogenicidad en animales y se dispone de cantidades adecuadas del material en condiciones de planta piloto, se pueden llevar a cabo estudios en humanos pertenecientes a grupos pequeños y cuidadosamente controlados, seleccionados de manera que permita obtener la mayor información posible con un mínimo de riesgo (8).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El complejo de porinas de *S.typhi* obtenidas por el método de Nikaido (24) induce protección en el modelo murino. Para evaluar la actividad protectora de cada porina, una de ellas, la OmpC se obtuvo en forma recombinante de la cepa de *Escherichia coli* UH302/pST13 que tiene el gen que codifica para la expresión de tal proteína.

La porina rOmp C es una proteína de 36 Kda y se arregla en forma regular en la membrana externa formando trímeros.

En estudios anteriores (29) se encontró que la porina rOmp C no protegía ante el reto de 500 DL₅₀ de *S.typhi* en la cepa murina C3H/Fej y BALB/c, por lo tanto se decidió buscar la razón de esta falta de protección.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar inmunológicamente la porina rOmp C y analizar su efecto protector en un modelo murino a diferentes dosis de reto con *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d.

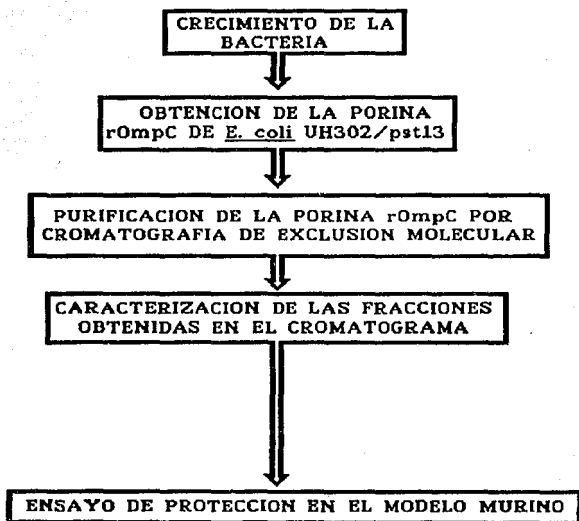
OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Purificar la porina rOmp C por el método de Nikaido.
- 2.- Caracterizar inmunológicamente cada una de las fracciones obtenidas en el cromatograma de la porina rOmp C.
- 3.- Evaluar el efecto de protección activa de la porina rOmp C en su forma nativa a diferentes dosis de reto de *S. typhi* 9,12,Vi:d.

6. HIPOTESIS

El efecto protector conferido por la porina rOmp C puede depender de su estructura cuaternaria.

7. ESQUEMA DE TRABAJO



8. MATERIAL Y METODOS

8.1. ANIMALES

Se emplearon ratones de las cepas C3H/Fej y BALB/c de ocho semanas de edad, de 14 a 18 g de peso, los cuales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene de la Secretaria de Salud.

8.2. CEPAS BACTERIANAS

La cepa *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, fué aislada de un paciente y mantenida bajo las condiciones del laboratorio.

La cepa *Escherichia coli* UH302/pst13 que tiene el gen que codifica para la expresión de la porina Omp C de *S. typhi* 9,12, Vi:d, fué donada por el Dr. Felipe Cabello.

8.3. CARACTERIZACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Para la identificación de las cepas bacterianas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para enterobacterias Gram-negativas: fermentación de glucosa y sacarosa, producción de ácido sulfhídrico, movilidad y descarboxilación de la ornitina y lisina, empleando los siguientes medios:

Agar hierro y triple azúcar (TSI)

Agar de hierro y lisina (LIA)

Agar MIO

Agar Citrato de Simmons

8.4. CULTIVO Y COSECHA DE LA BACTERIA.

Se sembró *E. coli* UH302/pst13 por aislamiento en placas de agar BHI con ampicilina y se dejó crecer toda la noche a 37°C.

Se tomó una colonia, la cuál se depositó en 80 ml de medio mínimo A (MMA, complementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa) y se dejó crecer por 18 horas a 37°C. De esta misma colonia se realizaron las pruebas bioquímicas necesarias para su caracterización.

Una vez crecida, la semilla se pasó a garrafones de 4 litros de MMA en presencia de ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C de 18-24 hrs.

8.5. PURIFICACION DE LA PORINA rOmp C DE *E. coli* UH302/pst13.

La obtención de la porina rOmp C de *E. coli* UH302/pst13 se efectuó empleando el método descrito originalmente por Nikaído (24) y modificado por Isibasi (14).

La bacteria *E. coli* UH302/pst13 cosechada en la fase de crecimiento logarítmico se ajustó a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompió por sonicación (Lab line Ultratip Labsonic system sonicator) en períodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3, ésto fué seguido de la eliminación de las bacterias enteras por centrifugación a 7000 xg/15 min. El sobrenadante que contenía el lisado, se trató con DNasa y RNasa incubándose durante 30 min en un baño

para disminuir la viscosidad y eliminar los ácidos nucleicos; la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 100 000 xg/ 30 min a 20°C. Esta se solubilizó en Tris 10 mM, pH 7.7, SDS al 2% y se incubó 30 min a 32°C, posteriormente se ultracentrifugó y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contenía peptidoglicana, de donde se extrajeron las proteínas unidas a ella solubilizándola en amortiguador de Nikaído que contenía Tris 50 mM pH 7.7, SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y B-mercaptoetanol al 0.05%; después de un período de incubación de 2hrs a 37°C, se ultracentrifugó a 100 000 xg/30 min a 25°C y el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4ml/hr. Se recuperó la fracción que eluye inmediatamente después del volúmen vacío, detectada por absorbancia a 280 nm. Para reutilizar la columna esta se lavó con amortiguador de Nikaído, un volúmen equivalente a dos veces el volúmen total del gel.

De las fracciones obtenidas en el cromatograma, cada fracción se concentró, y se dializó con Tris-HCl 50 mM durante 24 hrs.

8.6. DETERMINACION DE PROTEINAS

La cuantificación del contenido proteico de cada una de las fracciones se realizó por medio del método de Lowry (21) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

8.7. DETERMINACION DE LPS

La cantidad de lipopolisacárido (LPS) contaminante de cada una de las fracciones de la porina rOmp C se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto-3-manooctulónico (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis (16), empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.).

8.8. ELECTROFORÉISIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de proteínas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments) y sistemas de amortiguadores discontinuos. Se analizaron muestras de las fracciones obtenidas en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes (muestras hervidas y no hervidas respectivamente). El gel separador contenía 11.2 % de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente los geles se tñieron durante 1 h. en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se decoloraron empleando una solución de metanol-ácido

acético agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fué transparente.

8.9. ELECTROFORESIS DE LPS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis de LPS con tinción en plata se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments), sin SDS y sistema de amortiguadores discontinuos.

El gel separador contenía 14% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida en amortiguador de Tris-HCl 0.125M pH 6.8. El amortiguador de muestra contenía Tris-HCl 0.125M, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de Bromofenol al 0.005%.

La electroforesis se llevó a cabo empleando 30 mA por placa en amortiguador de Tris 0.025M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1% pH 8.3. Al concluir la electroforesis los geles se fijaron durante 18 h. en una solución de etanol-ácido acético-agua (40:10:50) y posteriormente se trataron durante 15 min con una solución de ácido peryódico al 0.7% en agua. El gel se lavó cuatro veces en intervalos de 15min con agua desionizada, seguido de un tratamiento por 15 min con la solución de tinción (5 ml de nitrato de plata al 20%, agregados gota a gota a una solución de hidróxido de amonio al 0.69% e hidróxido de sodio 0.1 N al 19.4%). Posteriormente el gel se sometió a 3 lavados de 20 min con agua desionizada; después de lo cuál se sumergieron en solución de revelado (25 mg de ácido cítrico y 0.1 ml de formaldehido al 37% en 500 ml) hasta que las bandas fueron visibles y el fondo del gel permaneció transparente.

8.10. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional para comprobar la purificación de la porina rOmp C de *S.typhi* 9,12,d,Vi se realizó de acuerdo al método descrito por O'Farrell (25).

8.11. SISTEMA DE QUIMIOLUMINISCENCIA -TIPO PHOTOBLOT- PARA LA DETECCION DE PROTEINAS

Esta se llevó a cabo de acuerdo al manual " The PHOTOBLOT Chemiluminescent Systems for Protein Detection (Cat. Nos. 9599SA, 9600SA and 9601SA)". En esta técnica se realizó una electrotransferencia (34) de porina rOmp C a una membrana de difluorido de polivinilideno (PVDF), la cual fué revelada con suero de ratón anti-rOmp C y anti-IgG de ratón biotinilado en combinación con un conjugado de estreptavidin-fosfatasa alcalina y Lumi-Phos 530 para producir una señal luminiscente y alcanzar una alta sensibilidad con bajo fondo. La amplificación de la señal es llevada a cabo por la interacción de anticuerpos secundarios policlonales biotinilados con el anticuerpo primario seguido por la unión de múltiples conjugados de streptavidin-fosfatasa alcalina con los muchos sitios del anticuerpo secundario (30).

8.12. INMUNIZACION Y RETO

Grupos de 10 ratones de las cepas C3H/Fej y BALB/c, de 8 semanas de edad y 14-18 g en peso fueron inmunizados intraperitonealmente en el día 0 y día 15 con 10 μg de porina rOmp C disuelta en solución salina. En el día 25 fueron retados estos ratones con 20, 100 y 500 DL_{50} de bacteria *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d resuspendida en mucina gástrica al 5% en solución salina. La protección fué definida como el porcentaje de sobrevivencia durante los 10 días siguientes al reto. La dosis letal al 50% (DL_{50}) para cada cepa de ratones fué calculada como se describe por Reed y Muench (28).

El esquema de inmunización y reto fué el siguiente:

Día de Inmunización	Inmunización con porina Omp C (μg)					
	Cepa C3H/Fej			Cepa BALB/c		
	1	2	3	1	2	3
0	10	10	10	10	10	10
15	10	10	10	10	10	10
25 Día de reto	20 DL_{50}	100 DL_{50}	500 DL_{50}	20 DL_{50}	100 DL_{50}	500 DL_{50}

9. RESULTADOS

9.1. CARACTERIZACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

La cepa de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d cuando se hizo crecer en medio de Agar hierro y triple azúcar (TSI) dió:

- Fermentación de la lactosa (-)
- Fermentación de la sacarosa (-)
- Fermentación de la glucosa (+)
- H₂S (+)

En medio MIO dió:

- Movilidad (+)
- Producción de indol (-)
- Descarboxilación de la ornitina (+)

Y en Citrato de Simmons fué (-)

Los resultados de las pruebas bioquímicas para la cepa *Escherichia coli* UH302/pst13 cuando se hizo crecer en Agar hierro y triple azúcar (TSI), fueron:

- Fermentación de la lactosa (-)
- Fermentación de la sacarosa (-)

- Fermentación de la glucosa (+)

- H₂S (-)

En medio MIO fueron:

- Movilidad (+)

- Producción de indol (+)

- Descarboxilación de la ornitina (-)

Y en citrato de Simmons fué (-)

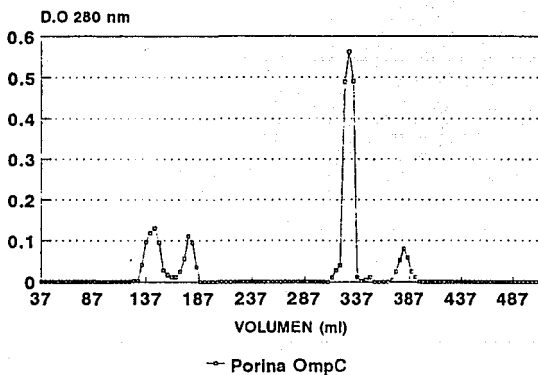
9.2. PURIFICACION DE LA PORINA Omp C RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR

La porina rOmp C que se obtuvo de *Escherichia coli* UH302/pst13 cuando se paso por cromatografía de exclusión molecular se obtuvo en cuatro fracciones después del volúmen vacío, y cada una de ellas se concentró y se dializó contra Tris-HCl 10 mM pH 7.7.

La fig 3 muestra el perfil cromatográfico obtenido.

CROMATOGRAMA DE EXCLUSION MOLECULAR

EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-200 DE PORINA
OmpC RECOMBINANTE DE *S.typhi* 9,12,d,VI



Vo 126 ml

Figura 3. Perfil cromatográfico de exclusión molecular de la porina rOmp C.

TABLA 1

CONTENIDO DE PROTEINAS Y LPS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA PURIFICACION DE LA PORINA OmpCr

	PROTEINAS (mg/ml)	KDO (μ g/ml)	ANTRONA (mg/ml)
FRACCION 1	0.2270	negativo	0.141
FRACCION 2	1.4580	negativo	0.016
FRACCION 3	0.0650	negativo	0.008
FRACCION 4	0.1070	negativo	0.003

9.3. CUANTIFICACION DE PROTEINAS Y LPS

La cuantificación de proteínas por el método de Lowry de cada una de las fracciones muestra que en la segunda se obtiene la mayor concentración.

Cuantificando el contenido de LPS en las fracciones a través del método del KDO y ANTRONA se encuentra que están libres de LPS, como se demuestra en la Tabla 1.

9.4. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

En los corrimientos de geles de poliacrilamida, las cuatro fracciones mostraron que cuando se usaron condiciones no desnaturalizantes migraron en una banda con pesos moleculares entre 114 y 123 Kda. Las muestras hervidas corrieron también en una banda pero en un peso molecular aproximado de 36 Kda. La segunda fracción fué la más abundante. Los resultados anteriores sugieren que las porinas en el primer caso están como trímeros mientras que en el segundo caso como monómeros, Fig 4.

9.5. ELECTROFORESIS DE LPS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis para LPS con tinción en plata de las cuatro fracciones, mostró que no hay presencia de LPS al comparar cada fracción con un control de LPS, Fig 5.

9.6. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis en doble dimensión en la Fig 6 muestra que solo hay una proteína, lo cual confirma su purificación.

9.7. REACTIVIDAD DE UN SUERO DE RATON ANTI-PORINA Omp C

Por quimioluminiscencia se encontró que suero de ratón anti-Omp C reconoce, en muestras hervidas y sin hervir, a la porina Omp C como monómero y como trímero. Además es capaz de reconocer a dos bandas en muestras de porinas de *Salmonella typhi* (hervidas y sin hervir), que corresponden a los monómeros, como podemos observar en la fig 7.

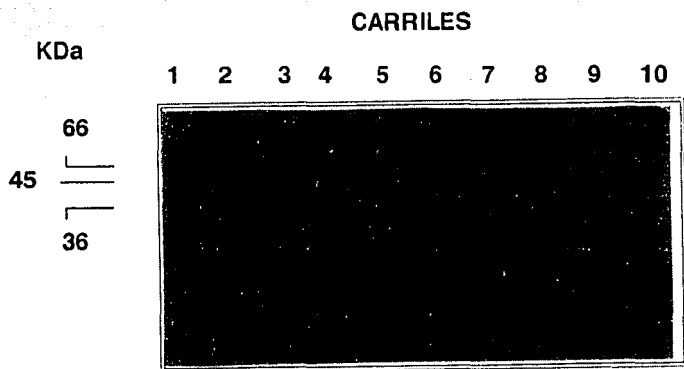


Figura 4. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para las fracciones obtenidas en el cromatograma de elución (Tinción para proteínas).
 1) PM; 2) Por. OmpC, 1a. fracc. sin her.; 3) Por OmpC, 1a. fracc. her.; 4) Por OmpC, 2a. fracc. sin her.; 5) Por. OmpC, 2a. fracc. her.; 6) Por. OmpC, 3a. fracc. sin her.; 7) Por. OmpC, 3a. fracc. her.; 8) Por. OmpC, 4a. fracc. sin her.; 9) Por. OmpC, 4a. fracc. her.

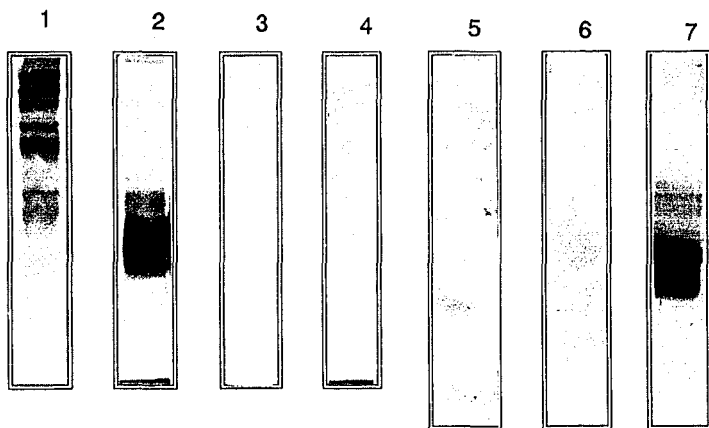


Figura 5. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas en el cromatograma. Tinción de LPS con nitrato de plata. 1)PM; 2) Por OmpC antes de pasar por columna; 3) Fracc 1; 4) Fracc 2; 5) Fracc 3; 6) Fracc 4; 7) Control de LPS.

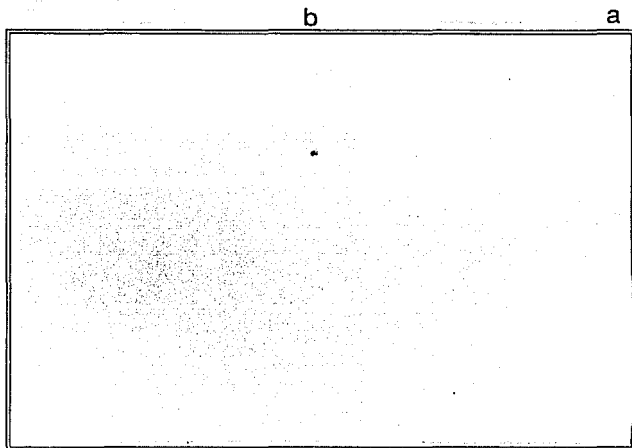


Figura 6. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida-SDS. Tinción de proteínas con azul de Coomassie. a: electroforesis en 1-D de marcadores de peso molecular, b: electroforesis 2-D de porina OmpCr de *S. typhi*.

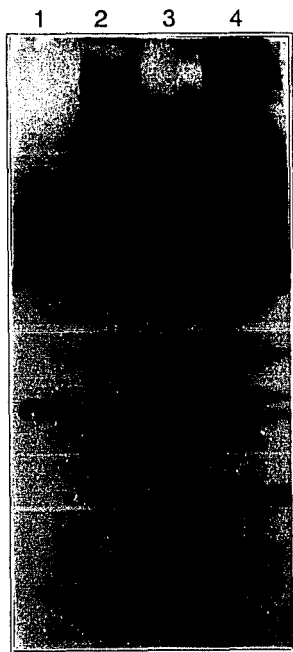


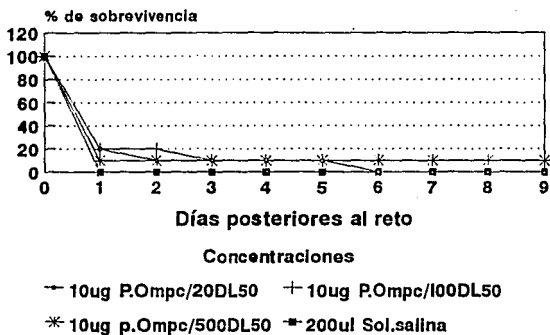
Figura 7. Análisis de la reactividad de un suero de ratón anti-rOmpC hacia la porina rOmpC de *S. typhi* 9,12,Vi:d por la técnica de quimioluminiscencia "Tipo Photoblot". Electrotransferencia a membrana PVDF (difluorido de polivinilideno) de porina rOmpC, revelada con suero de ratón anti-rOmpC y anti-IgG de ratón biotinilado en combinación con un conjugado de estreptavidin-fosfatasa alcalina y Lumi-Phos 530. 1) Por. OmpC her.; 2) Por. OmpC sin her.; 3) Por. *S. typhi* her.; 4) Por. *S. typhi* sin her.

9.8. CINÉTICA DE SOBREVIVENCIA

Se determinó la DL_{50} de las cepas BALB/c y C₃H/Fej por el método de Reed y Muench (28), siendo para BALB/c de 20×10^3 bact/ml y para C₃H/Fej de 3×10^5 bact/ml. Los ratones se inmunizaron el día 0, y el día 15 con 10 μ g de porina Omp C recombinante de S. typhi 9,12,Vi:d, posteriormente se retaron el día 25 con 20, 100 y 500 DL_{50} de S.typhi 9,12,Vi:d. Se registró la sobrevivencia por 10 días para ambas cepas de ratones, los resultados se muestran en las gráficas 1 y 2.

Se encontró que en la cepa C3H/Fej no hubo protección, mientras que en la cepa BALB/c para las dosis 20, 100 y 500 DL_{50} hubo una protección del 50, 37 y 0% respectivamente.

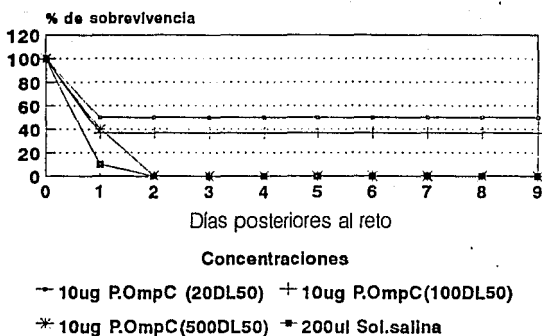
Cinética de sobrevivencia Cepa C3H/Fej



Ratones Inmunizados con Porina OmpC y
retados con 10^9 bact/ml de *S.typhi*
9,12,d,VI.

Gráfica 1. Evaluación de la actividad protectora de la porina rOmpC en ratones C₃H/Fej.

Cinética de sobrevivencia Cepa Balb/c



Ratones Inmunizados con porina OmpC y
retados con 10^9 bact/ml de *S.typhi*
9,12,d,Vi.

Gráfica 2. Evaluación de la actividad protectora de la porina rOmpC en ratones BALB/c.

10. DISCUSION DE RESULTADOS

Se tiene como antecedente que la porina rOmpC (10 µg) tiene una baja protección en los ratones C3H/Fej y BALB/c (20% y 10.5% respectivamente), ante el reto de 500 DL₅₀ de la bacteria viva de *S.typhi*, (29), con estos datos se llegó a pensar que en la actividad protectora de las porinas de *Salmonella typhi* estaban involucrados, además de la porina Omp C, las otras porinas y el LPS.

De la porina OmpC utilizada en dicho trabajo se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de muestras en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes (muestras hervidas y no hervidas respectivamente), encontrándose que las muestras en condiciones no desnaturalizantes no mostraban la banda nativa esperada de 108 KDa, si no que se encontraban bandas con PM de 72 a 36 KDa que correspondían a los dímeros y monómeros de tal porina. Con estos resultados se llegó a pensar que la no protección era debida a que la proteína no estaba en su forma nativa, que es la forma más estable para que se induzcan anticuerpos de mayor afinidad y se favorezca una respuesta inmunológica celular. Con lo anterior se propuso purificar y caracterizar la porina OmpC en su forma nativa y ver su efecto protector a 20, 100 y 500 DL₅₀ con la bacteria homóloga.

Una vez obtenida la proteína OmpC recombinante, se caracterizó inmunoquímicamente mediante métodos analíticos e inmunológicos, los resultados obtenidos mostraron que esta proteína estaba en mayor concentración en la segunda

fracción del cromatograma de elución y se obtuvo en su forma nativa libre de contaminación por LPS.

Esta proteína es reconocida además por un suero de ratón anti-OmpC (en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes), que reconoce también a dos bandas de una muestra de porinas de *Salmonella typhi* (en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes) (fig 7), lo que nos hace pensar que una de las bandas reconocidas por este suero es la porina OmpC y que la otra banda es una porina diferente que comparte regiones antigénicas homólogas con la porina OmpC.

Los resultados en la cinética de sobrevivencia muestran que la porina OmpC protege parcialmente a bajas dosis de reto (el 50 y el 37% de protección a 20 y 100 DL₅₀ respectivamente) en la cepa BALB/c cuando se reta con la bacteria homóloga, pero que no induce protección en los ratones C3H/Fej, esto nos lleva pensar a que probablemente la porina OmpC por si sola no induzca protección del 100% si no que es necesario todo el complejo de porinas de *Salmonella typhi* con el LPS.

Las DL₅₀ para ambas cepas de ratones fueron para BALB/c de 20×10^3 bact/ml y para C3H/Fej de 3×10^5 bact/ml, es decir los ratones BALB/c son más susceptibles a la bacteria y los ratones C3H/Fej son más resistentes, esta sensibilidad de la cepa BALB/c a la bacteria es debida a un gen llamado Ity* en estos ratones, sin embargo en la cinética de sobrevivencia se observa protección en los BALB/c y no en los C3H/Fej, la explicación a esto podría ser que durante la inmunización con la porina OmpC la respuesta inmunológica que se despierta (dada por linfocitos CD4*, INF γ y macrófagos) es más eficiente en los ratones BALB/c que en los C3H/Fej (36,37).

11. CONCLUSIONES

La porina OmpC obtenida mediante el método de Nikaido y purificada por cromatografía de exclusión molecular se observa en una banda con un PM aproximado de 108 y 72 KDa (en condiciones no desnaturalizantes) en una electroforesis de geles de poliacrilamida SDS-PAGE, lo cual nos indica que está en su forma nativa. No hay contaminación por LPS y la proteína es reconocida por un suero de ratón anti-OmpC (en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes). Del análisis con porinas de *Salmonella typhi* podemos decir que una porina reconocida por este suero es la porina OmpC y la otra porina reconocida comparte regiones antigénicas homólogas con la OmpC.

Diez μg de porina OmpC protegen en un 50% y un 37% al reto con 20 y 100 DL_{50} respectivamente de la bacteria homóloga, mientras que no hay protección al reto con 500 DL_{50} en la cepa BALB/c. Lo cual indica que hay una protección parcial en esta cepa con la porina OmpC a bajas dosis de reto.

Diez μg de porina OmpC no protegen al reto con 20, 100 y 500 DL_{50} de la bacteria homóloga en la cepa C3H/Fej.

La obtención de la porina OmpC en su forma nativa no influye en un aumento en la protección a 500 DL_{50} de reto.

En un futuro se pretende obtener por ingeniería genética las porinas OmpA, OmpF y PhoE y evaluar su actividad protectora en modelos murinos, lo cual nos permitirá

saber si es la mezcla de las porinas o solo alguna de ellas la que confiera actividad protectora en el modelo murino ante la infección por *Salmonella typhi*.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Aguero J, Mora G, Mroczero-Wildey, ME Fernandez, Bero, LFC, Cabello.** 1987. Cloning expression and Characterization of the 36 KDal *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microbiol. Patogenesis.* **3**:399-407.

- 2.- **Acharya IL, Lowe CL, Thapa R Thapa R, Gurubacharya VL, Shresta MB, Bact D, Cadoz M, Schulz D, Armand J, Bryla DA, Trollfors B, Cramton T, Schneerson R and Robbins RB.** 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.

- 3.- **Braun V.** 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* **415**:335-337.

- 4.- **Chal T and Fould J.** 1974. Demonstration of missing outer membrane protein in tolG mutante in *Escheria coli*. *J. Mol. Biol.* **85**:465-474.

- 5.- **Cowan SW, Schirmer G, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauplit RA, Jansonius JN and Rosenbusch JP.** 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature.* **358**:727-733.

6.- **Datta DB, Arden B and Henning U.** 1977. Mayor protein of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J. Bacteriol. **128**:821-829.

7.- **Di Rienzo JM, Nakamura K and Inouye M.** 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions. Annu. Rev. Biochem. **47**:481-532.

8.- **Escobar A, Valdespino JL, Sepulveda J.** Vacunas, Ciencia y Salud. Secretaria de Salud. México. 1992. pag 61.

9.- **Faundez G, Aron L and Cabello F.** 1990. Chromosomal DNA, Iron-Transport Systems, Outer membrane proteins and Enterotoxin (Heat labile) Production in *Salmonella typhi* strains. J. Clin. Microb. **28**:894-897.

10.- **Germanier R, Furer E.** 1975. Isolation and characterization of *S. typhi* gal E. mutant Ty21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infect. Dis. **131**:553-558.

11.- **Hernández RM.** Caracterización de las PME de *Salmonella typhi*. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, 1985.

12.- **Hornick RB, Dupont HL, Dawkins AT, Snyder MJ, Wood-Ard TE.** 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Symp. Series Immunobiol. Stand. **15**:143-150.

- 13.- **Islbasi A, Ortiz V, Vargas M, González C, Paniagua J, Moreno J, Kumate J.** 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection after immunization with outer-membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
- 14.- **Islbasi A, Ortiz V, Paniagua J, Pelayo R, González C, García JA and Kumate J.** 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine.* 10:811-813.
- 15.- **Joo I.** 1970. Present status and perspectives of vaccination against typhoid fever. *PAHO Sci. Publ.* 226:339-341.
- 16.- **Karkhanis YD, Zelther JY, Jackson JJ and Carlo DJ.** 1978. A new and improved microassay to determine 2-Keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85:595-601.
- 17.- **Klugman KP, Koomhof HJ, Gilbertson IT and col.** 1987. Protective activity of Vi Capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet.* II:1165-1169.
- 18.- **Kumate J.** Inmunidad, inmunización y vacunas. 2a. ed. México, D.F.: Ediciones del Hospital Infantil de México, 1979; 227-247.

19.- **Kumate J.** Fiebre Tifoidea. En: Kumate J y Gutierrez G. Manual de Infectología. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México. 7a. edic., 1980.

20.- **Kussi N, Nurminen M, Saxen H, Valtonen M and Makela PH.** 1979. Immunization with mayor outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice. *Infect. Immun.* **25:857-862.**

21.- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* **193:265-275.**

22.- **Mosler DE, Subbarao B.** 1982. Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunol. Today.* **3:217-222.**

23.- **Nikaido H and Vaara M.** 1985. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbial. Rev.* **49:1-32.**

24.- **Nikaido H.** 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol.* **97:85-100.**

25.- **O'Farrell PH.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250:4007-4021.**

26.- **Osborn MJ and Wu HC.** 1980. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**:369-422.

27.- **Pelayo R, Isibasi A, Panlagua J, Ortiz V, Muy M, González C, Islas S, Kumate J.** 1989. Elaboración de un inmunoabsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* **20**:279-286.

28.- **Reed LJ and Muench HA.** 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497.

29.- **Santiago AE.** 1992. Evaluación de la actividad protectora de la porina Omp C recombinante de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. México D.F.

30.- **Schaap AP.** (1988). *Photochem. Photobiol.* **47**,505.

31.- **Schweizer M and Henning U.** 1977. Action of mayor outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **129**:1651-1652.

32.- **Sistema Nacional de Salud.** Boletín Mensual EPIDEMIOLOGIA. México, Vol 8, No.4, Abril 1993.

33.- **Sistema Regional de Vacunas para América Latina y el Caribe. SIREVA. Estudio de Factibilidad.** Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C., Abril de 1990.

34.- **Towbln HT, Staehlin T and Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76:**4350-4354.

35.- **Udhayakumar V, Muthukkaruppan Vr.** 1987. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immun. **55:**816-821.

36.- **Vidal SN, Malo D, Vogan K, Skamene E and Gros P.** 1993. Natural Resistance to Infection with Intracellular Parasites: Isolation of a Candidate for Bcg. Cell. **73:**469-485.

37.- **William H, Benjamin Jr, Janet Y, Patti H and David EB.** 1991. The *Salmonella typhimurium* Locus *mviA* Regulates Virulence in Ity* but Not Ity' Mice: Functional *mviA* Results in Avirulence; Mutant (nonfunctional) *mviA* Results in virulence. J. Exp. Med. **174:**1073-1083.