

56
270



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES
ANTI-POLISACARIDO VI DE SALMONELLA TYPHI**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ROSA MARIA SALAZAR GONZALEZ

**U N A M
F E B
Z A R A G O Z A**



**LA UNIDAD DE
DE INVESTIGACION**

ASESOR DE TESIS: DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

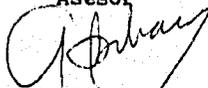
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Q.F.B. MARTHA A. SANCHEZ RODRIGUEZ
Vocal:	DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO
Secretario:	Q.F.B. LUZ MARGARITA CHAVEZ MARTINEZ
Suplente:	DR. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Suplente:	Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO

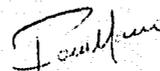
Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; bajo la tutoría del Dr. Armando Isibasi Araujo y cotutoría del Dr. Jorge Fernando Paniagua Solís.

Asesor



Dr. Armando Isibasi Araujo

Sustentante



Rosa María Salazar González

**AGRADEZCO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO EL HABERME
BRINDADO LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR UNA CARRERA PROFESIONAL DE
MANERA GRATUITA**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por darme la oportunidad de existir, ser y sentir.

A MI MADRE: Por su invaluable apoyo y ejemplo. Gracias.

A MI PADRE: Por su incondicional ayuda.

A MI BUEN AMIGO: Dr. Ramirez, por su paciencia, su compañía, sus consejos, pero sobre todo por su amistad. Gracias.

A MI AMIGA: Carmen Montaña, por su compañía, su paciencia, su agradable caracter y por su valiosa amistad. Gracias.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que careciendo de los medios y condiciones necesarios para un adecuado desarrollo profesional, poseen la capacidad y voluntad de llegar a ser individuos productivos y seres humanos valiosos.

RosaMaria

Deseo agradecer de manera especial al Dr. Armando Isibasi Araujo por haberme permitido trabajar en uno de los proyectos que se realizan en la unidad. Gracias.

Agradezco los consejos, ayuda, y paciencia del Dr. Jorge F. Paniagua Solís para la realización del presente trabajo. Gracias.

Agradezco la compañía, ayuda y consejos de mis compañeros del Laboratorio:

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Dr. Cesar González Bonilla

M. en C. Constantino López Macías

M. en C. Rebeca Alvarez Cordoba

Dr. Manuel Carrera

M. en C. Natalia Martin Orozco

M. en C. Sara Huerta Yopez

M. en C. Mario Vega Paredes

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO.

I N D I C E

RESUMEN	1
FUNDAMENTACION TEORICA	3
ANTIGENO Vi	3
A) Composición y Propiedades químicas	4
B) Propiedades inmunológicas y Virulencia	6
FIEBRE TIFOIDEA Y <i>Salmonella typhi</i>	8
DIAGNOSTICO PARA FIEBRE TIFOIDEA	10
ANTICUERPOS MONOCLONALES	13
PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	15
a) Líneas Celulares utilizadas para la fusión	16
b) Fusión y Selección	19
c) Identificación	20
PROPIEDADES DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
OBJETIVOS	26
HIPOTESIS	27
LISTA DE MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS	28
PREPARACION DE SOLUCIONES UTILIZADAS	31
MATERIALES Y METODOS	33
Immunización	33
a) Immunización con <i>C. freundii</i>	33
b) Immunización con <i>C. freundii</i> más Adyuvante Incompleto de Freund	33

c) Inmunización con Antígeno Vi más Adyuvante completo de Freund	34
ESQUEMA DE INMUNIZACION	35
Cistaminación de Antígeno Vi	36
Cultivo celular	36
Tratamiento con 8-azoguanidina	36
Clonación celular	37
Obtención de Macrófagos o células Alimentadoras	37
Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)	37
Fusión celular	38
Clonación de Hibridomas	40
Identificación de Hibridomas y Clonas Productoras	40
Producción en grandes cantidades	40
Determinación del Isotipo de los Anticuerpos Monoclonales . .	41
RESULTADOS	43
Análisis de los sueros inmunes	43
Generación de Hibridomas	45
Identificación de Hibridomas productores	46
Identificación de clonas productoras	47
Determinación del isotipo de los Anticuerpos Monoclonales . .	49
DISCUSION DE RESULTADOS	51
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	57
BIBLIOGRAFIA	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.

Estructura de la unidad de repetición del polisacárido capsular Vi
de *Salmonella typhi* 5

Figura 2.

Vías de Síntesis de Purinas 18

Figura 3.

Clonas productoras de Acn anti-Vi obtenidas por técnica de dilución
limitante 50

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1.	
Reconocimiento del Ag Vi por sueros de ratones inmunizados .	43
Gráfica 2.	
Reconocimiento del Ag Vi por el suero de un ratón inmunizado	44
Gráfica 3.	
Hibridomas productores de Anticuerpos anti-Vi	46
Gráfica 4.	
Clonas productoras de Antiuceros monoclonales anti-Vi . . .	47
Gráfica 5.	
Clonas productoras de Anticuerpos monoclonales anti-Vi . . .	48
Gráfica 6.	
Determinación del Isotipo de Anticuerpos monoclonales anti-Vi	49

ABREVIATURAS

ACF:	Adyuvante completo de Freund
Acm:	Anticuerpo monoclonal
AIF:	Adyuvante incompleto de Freund
BHI:	Infusión-cerebro-corazón
CPA:	Célula presentadora de antígeno
D'MEM:	Dulbecco's Minimum Essential Medium
EDAC:	Carbodimida
ERMN:	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
Fc:	Fracción cristalizable
HAT:	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
HBSS:	Hank's Balanced Salt Solution
HGPRT:	Hipoxantina-guanidina-fosforribosil-transferasa
HT:	Hipoxantina-timidina
INDRE:	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiologica
ip:	Intraperitonealmente
LPS:	Lipopolisacárido
OPD:	Ortofenilendiamina
PBS:	Solución buffer Phosphates
PSC:	Polisacárido capsular
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SSI:	Solución salina isotónica
TTH:	Tetrahidrofolato
TK:	Timidina-cinasa

R E S U M E N

La determinación confirmativa de la presencia de *Salmonella typhi*, bacteria causante de la fiebre tifoidea, representa la manera más confiable para el diagnóstico de esta enfermedad. El ensayo serológico comúnmente utilizado (reacción de Widal), es útil para determinar la presencia de infección por el genero *Salmonella* en los individuos, aunque tiene la limitante de carecer de especificidad en la identificación de *Salmonella typhi*. El método de determinación más concluyente es el hemocultivo, pero es positivo hasta la primera semana de la infección, lo que dificulta el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Debido a que el polisacárido Vi componente capsular de *S. typhi* se ha encontrado en la mayoría de cepas de *Salmonella typhi* aisladas de la sangre de pacientes con fiebre tifoidea, y que además se encontraron títulos elevados de anticuerpos anti-Vi en dichos pacientes, se propone que la detección del antígeno Vi en el suero de sujetos probablemente infectados permitiría un diagnóstico temprano de la infección, así como la oportuna detección de posibles acarreadores asintomáticos que constituyen el mecanismo de transmisión mas frecuente de la enfermedad.

Se han desarrollado diversas técnicas para este propósito, con el uso de anticuerpos policlonales en algunas de ellas; estos ensayos demostraron tener especificidad pero no sensibilidad, se

sugiere que mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se aumentará en gran medida la sensibilidad y confiabilidad de las mismas.

Por tal motivo se desarrollaron anticuerpos monoclonales anti-polisacárido Vi que permitirán diseñar una metodología apropiada para la determinación del antígeno en muestras problema.

Para la producción de hibridomas estables productores de los anticuerpos deseados se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c con antígeno Vi y *Citrobacter freundii*. El título de anticuerpos anti-Vi se determinó por la técnica de ELISA, usando como anticuerpo revelador un conjugado polivalente anti-Igs de ratón y peroxidasa, el título más alto se observó en los ratones inmunizados con *C. freundii*. Posteriormente se fusionaron las células de bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma Ag8. Los hibridomas producidos se seleccionaron en medio HAT. Los hibridomas productores se identificaron por la técnica de ELISA. Se realizaron dos clonaciones para aislar clonas productoras, las cuales se identificaron por la técnica de ELISA. Se lograron obtener 7 clonas productoras. Se identificaron los isotipos de los anticuerpos producidos por las cinco clonas más estables mediante un ensayo de ELISA de doble anticuerpo, resultando 4 clonas productoras de clase IgM y una clona productora de los isotipos IgM e IgG1. Las clonas se expandieron por cultivo y líquido de ascitis en ratones para obtener los anticuerpos monoclonales en grandes

cantidades.

La homogeneidad de especificidad, clase y afinidad definidas de los anticuerpos monoclonales ofrecen la posibilidad de desarrollar una metodología con la suficiente precisión y confiabilidad para la detección del antígeno.

FUNDAMENTACION TEORICA

ANTIGENO VI

Félix y Pitt notificaron que la *Salmonella typhi* aislada de la sangre de pacientes con fiebre tifoidea no era aglutinada por un antisuero preparado por inmunización a conejos con organismos muertos por calor (suero tipo O), mientras que un antisuero preparado con *S. typhi* fresca contenía un anticuerpo que aglutinaba esa bacteria. Ellos mismos descubrieron que la virulencia y la protección inducida por las cepas O-no aglutinables (Vi+) contra *S. typhi* fue considerablemente más grande que las cepas O-aglutinables (Vi-). Con base en estos resultados ellos propusieron la presencia de un antígeno de superficie y lo llamaron Vi por la virulencia que demostró en los ensayos realizados (1).

A) Composición y Propiedades químicas

La envoltura capsular bacteriana juega un papel importante en la patogenia de la bacteria, porque la protege de la fagocitosis y algunos de sus componentes pueden funcionar como adhesinas. En algunas bacterias Gram negativas la cápsula consiste de polisacáridos relativamente simples con unidades repetitivas de dos o tres azúcares (2). El polisacárido capsular Vi (PSC) es un componente de la envoltura celular de varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi C* y *Citrobacter freundii* (2,3).

El antígeno Vi purificado de *S. typhi* o *C. freundii* se muestra como un homopolímero lineal de ácido alfa-1,4-deoxi-2-N-acetilgalactourónico, variablemente O-acetilado en el carbono 3 (1,3,4,). Las difracciones por rayos X indican que este polisacárido asume las formas características de hélices con dos o tres pliegues simétricos, siendo la distancia lineal entre los grupos carboxilo de aproximadamente 0.43 nm (5). El modelo espacial de Courtauld Koltun de un pentamero de Vi demuestra que los voluminosos O-acetilos no polares sobresalen en las hileras de ambos lados componiendo la mayoría de la superficie, los carboxilos están menos expuestos y parcialmente protegidos por los O-acetilos (Fig. No.1). (5).

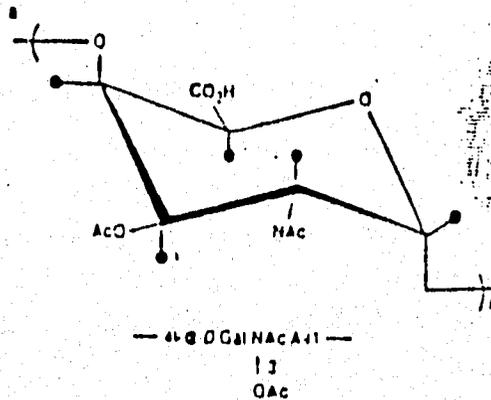


Figura No.1

ESTRUCTURA DE LA UNIDAD DE REPETICION DEL POLISACARIDO CAPSULAR VI DE

Salmonella typhi Aco(GRUPO O-ACETILO), NAc(GRUPO N-ACETILO) (B).

FUENTE: SZU S C. 1987.

Debido a su estructura no es susceptible a la despolimerización, su integridad se mantiene si se almacena liofilizado a 25°C. No puede ser analizado en su estructura química por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (ERMN) debido a su alto peso molecular y viscosidad (4,6,7). Los ensayos colorimétricos comúnmente usados para determinación de

polisacáridos no son aplicables al Vi debido a su inusual resistencia a la hidrólisis ácida pero se determina el grupo O-acetilado cuando reacciona con hidroxilamina en presencia de álcali (reacción de Hestrin) (6).

B) Propiedades inmunológicas y Virulencia

Craigie y Brandon estudiaron la *Salmonella typhi* de la sangre, heces, orina, y billis de pacientes con fiebre tifoidea y en acarreadores crónicos, con ayuda de sueros de conejo anti-Vi, encontrando formas Vi+ en todos los aislamientos de la sangre, y formas Vi- (que revirtieron a Vi+) en la orina y heces (8). La invariable presencia de Vi+ en aislamientos de sangre de *S. typhi* y la variantes formas Vi- en aislamientos de heces sugieren que el Vi es esencial para la sobrevivencia de la bacteria en sangre (1).

En 1950s y 1960s se desarrollaron dos vacunas para fiebre tifoidea a partir de la cepa de *S. typhi* Ty2, la vacuna K donde la bacteria fue inactivada con acetona (reteniendo Ag Vi) y la vacuna L en la cual la bacteria se inactivó con calor y se preservó con fenol o formol (reduciéndose el contenido de Vi), en ensayos posteriores se demostró que la vacuna K confería mayor protección que la vacuna L, debida a la inducción de anticuerpos anti-Vi (6,9,10,11). Sin embargo las vacunas de la bacteria inactivada inducían inmunidad limitada y producían reacciones colaterales adversas frecuentes y muy severas (12,13,14).

En 1970 se elaboró una vacuna a base de antígeno *Vi* para evaluación clínica, pero el método de purificación no fue suficiente para remover el Lipopolisacárido (LPS), contaminante que produce reacciones colaterales por lo que se sometió a reflujo con ácido acético 1 N a 100°C por 24 h para reducir el contenido de endotoxina, la preparación de polisacárido *Vi* fue activa en la protección de ratones pero no produjo anticuerpos anti-*Vi* ni protección contra la infección por *S. typhi* (6), casi dos décadas después el Dr. Robbins demostró que el tratamiento del reflujo despolimerizaba el PSC *Vi* y removía todos los grupos O-acetilos y N-acetilos reduciéndose por esto el peso molecular del polisacárido y en consecuencia sus acciones inmunogénicas y protectoras (1).

En 1985 se desarrolló una vacuna de *Vi* preparada de modo similar a la vacuna del polisacárido del meningococo, induciendo protección y reacciones locales ligeras (6). La vacuna de PSC *Vi* preparada en condiciones que no alteran su estructura produce altos niveles de anticuerpos y una elevada actividad protectora contra dosis letales de *S. typhi* en ratones (4,6).

Ahora se sabe que la inmunogenicidad del PSC *Vi* esta estrechamente relacionada al grado de O-acetilación; la parcial O-deacetilación aumenta ligeramente su inmunogenicidad mientras que la completa O-deacetilación elimina la inmunogenicidad del antígeno *Vi*. En contraste, la reducción del carboxilo tiene un efecto comparativamente ligero en la inmunogenicidad y antigenicidad del

Polisacárido Vi (5).

FIEBRE TIFOIDEA Y *Salmonella typhi*

En 1829, Dr. P. Ch. A. Louis en París describió la fiebre tifoidea, separándola claramente de otras fiebres y asociando la expresión clínica de la infección con las lesiones patológicas en los intestinos, nódulos linfáticos mesentéricos, y bazo (1). En 1884, Gaffkey y German, cultivaron y aislaron por primera vez *Salmonella typhi* en un cultivo puro de los bazos de pacientes infectados. Posteriormente German y otros investigadores cultivaron el microorganismo de heces fecales, orina, y bilis (15,16).

Pfeiffer y Kölle en 1896 hicieron la primera vacuna para humanos contra la fiebre tifoidea con microorganismos muertos por calor y demostraron el desarrollo de anticuerpos que protegieron pasivamente a cobayos contra la infección experimental (1,16).

En ese mismo año Gruber, Durham y Widal, reportaron cada uno independientemente, que el suero de la fase convaleciente mezclado con *S.typhi* causó que los microorganismos se unieran en grandes grumos y perdieran su movilidad, naciendo entonces el término de aglutininas y el clásico ensayo serológico para la infección por *S.typhi* (16).

En 1948 Theodore Woodward y colegas introdujeron el tratamiento para fiebre tifoidea en la era moderna de antibióticos (16).

La fiebre tifoidea es una enfermedad septicémica severa, que cuando no es tratada, un 20% de los pacientes muere y un 10% sufre una recaída con fiebre, hemorragia intestinal o peritonitis. La fase crítica de la patogénesis es la invasión del intestino y la diseminación de la bacteria por la sangre al hígado, bazo y médula ósea (2).

Salmonella typhi es una bacteria miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, genero *Salmonella*, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil, con aproximadamente 2000 diferentes serotipos. La clasificación serológica de *Salmonellae* según Kauffman-White se basa en los principales determinantes antigénicos presentes en el antígeno somático "O" y flagelar "H"; el antígeno "O" está presente en el lipopolisacárido (LPS), que consiste de un lípido A, un núcleo interno de oligosacárido y largas cadenas laterales de polisacárido. El lípido A o endotoxina que puede activar macrófagos constituye la principal porción en la lámina exterior de la membrana externa de organismos Gram negativos, consiste de un disacárido de glucosamina unido por un puente de pirofosfato en el cual los grupos amino e hidroxilo son substituidos por una larga cadena de ácidos grasos que son el principal determinante de toxicidad. El núcleo interno de

oligosacárido es similar en todos los serotipos, mientras que las cadenas laterales "O" consisten de unidades repetitivas de cuatro o cinco residuos, algunos son determinados por conversión lisogénica, los cuales varían en los diferentes grupos y determinan la principal especificidad O. El antígeno "O" es importante en la virulencia de *Salmonella* debido a que disminuye la susceptibilidad a la fagocitosis y la habilidad para activar la vía alterna del complemento. El antígeno "H" muestra también diversidad en sus determinantes, variaciones en la composición antigénica del flagelo de organismos con antígenos "O" comunes determinan los diferentes serotipos. Algunas salmonellas (*S.typhi*, *S.dublin*, *S.paratyphi*) expresan el antígeno de superficie capsular Vi, que puede enmascarar al antígeno "O" y que es importante en la virulencia e inducción de inmunidad (17).

DIAGNOSTICO PARA FIEBRE TIFOIDEA

Debido a que el polisacárido Vi se ha encontrado en la mayoría de cepas de *Salmonella typhi* aisladas de la sangre de pacientes con fiebre tifoidea y que además se encontraron títulos de anticuerpos anti-Vi elevados en el suero de esos pacientes se propuso que la presencia de anticuerpos anti-Vi tendría relación con la infección. Landy y Lamb (1953) estudiaron los anticuerpos contra antígeno Vi en suero por medio de hemaglutinación pasiva con antígeno purificado y encontraron un elevado título de anticuerpos en

pacientes con fiebre tifoidea reciente o activa, no encontrando títulos detectables en personas sanas (1). En 1981, Nolan y col. emplearon una ELISA para demostrar la relación entre anticuerpos anti-Vi y la infección activa entre casos aislados de Arkansas y en 1982, Chau y col. confirmaron dicha relación con anticuerpos anti-Vi probados por contrainmunolectroforesis de contracorriente con el antígeno purificado y su diagnóstico de fiebre tifoidea aguda y acarreadores asintomáticos (18,19,20,21). En 1983, el Dr Lanata y col. confirmaron que la hemaglutinación pasiva utilizada para medir anticuerpos contra Vi es sensible y específica para el diagnóstico de acarreadores asintomáticos (16).

La detección de acarreadores crónicos de *S. typhi* no es fácil, el método tradicional que ha sido la colección de una serie de cultivos diarios de heces, es costoso y sólo intermitentemente positivo debido a que *S. typhi* es inhibida por la colonización de la flora normal. El ensayo serológico más practicado es el ensayo de aglutinación de Widal que no es específico debido a que detecta anticuerpos circulantes contra la bacteria en individuos sanos especialmente en áreas endémicas (22).

Otros autores han descrito la presencia de antígenos de *S. typhi* en suero y orina de pacientes que sufrieron la enfermedad (15,23,24). Taylor y col. (1983) estudiaron la utilidad de antígeno Vi urinario como marcador de diagnóstico para fiebre tifoidea. Los ensayos de aglutinación y ELISA basados en

anticuerpos policlonales carecieron de sensibilidad y especificidad (25). Chaicumpa y col. (1988) describieron ensayos de ELISA de doble anticuerpo para la detección del antígeno O9 de *S. typhi* en orina empleando anticuerpos policlonales como captura del antígeno y el monoclonal anti-O9 como anticuerpo revelador, los ensayos mostraron elevada especificidad pero no tuvieron sensibilidad (16). Los autores sugieren que el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra otros antígenos específicos de *Salmonella typhi* como polisacárido Vi pueden incrementar la sensibilidad del ensayo para la detección del antígeno en pacientes con Fiebre Tifoidea (26,27,28).

Qadri y col. (1988-1990) desarrollaron anticuerpos monoclonales altamente específicos generados contra los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi) de *S. typhi*. Los anticuerpos anti-O reconocen diferentes epitopos en los antígenos O9 y O12 del LPS de la bacteria. Los anticuerpos anti-Vi reaccionaron a dos determinantes discretos, uno constituido por el grupo O-acetilo y el otro por los grupos N-acetilo y carboxilo. Los anticuerpos fueron usados en un ensayo de ELISA de doble anticuerpo para detección de la bacteria. El O-ELISA, H-ELISA y Vi-ELISA detectaron 10^{-9} g de LPS/ml y 2×10^3 *S. typhi*/ml, 10^{-9} g de antígeno H/ml y 6×10^3 *S. typhi*/ml y 10^{-10} g de Vi/ml y 6×10^2 *S. typhi*/ml respectivamente (15,29).

Una limitación del sistema de detección O-ELISA es que las

infecciones causadas por *S. typhi* no pueden ser distinguidas de otras causadas por diferentes miembros de *Salmonellae* como *S. enteritidis*, la manera de diferenciar a *S. typhi* de tales es determinar la presencia de Vi y el antígeno flagelar (d-H), la demostración de esos dos antígenos lleva a una identificación definitiva de *S. typhi*. La muestra de sangre se cultiva en 7-8 h en agar sangre, para enriquecer la bacteria y se asegura el diagnóstico rápido y confiable el mismo día de la toma de muestra (25).

Los anticuerpos monoclonales son muy útiles para una rápida identificación de *S. typhi* en cultivos primarios bacterianos y pueden reemplazar a los anticuerpos anti-Vi policlonales que son usados rutinariamente en laboratorios bacteriológicos (26,30).

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Cuando se reta con un patógeno o antígeno, el sistema inmune del huésped responde montando una respuesta inmune que está dirigida a la eliminación específica del antígeno o patógeno del organismo. La respuesta inmune en un animal es de naturaleza

policlonal y se produce una mezcla de muchos anticuerpos con diferentes especificidades y afinidades para el antígeno. Esta respuesta policlonal es el resultado de la activación de un gran número de diferentes clones de células B, cada clona codifica un tipo único de inmunoglobulina con una especificidad única para el antígeno, interactuando y cooperando junto con otras células del sistema inmune, incluyendo linfocitos T y células presentadoras de antígeno (CPA) (31).

En general aunque los anticuerpos son generados por las células B, por rearreglo azaroso y mutación somática de sus genes para inmunoglobulina, la respuesta inmune en un animal esta dirigida hacia aquellas partes del antígeno que son diferentes de antígenos propios. Los isotipos de un anticuerpo generado por cualquier antígeno también están sujetos a procesos de regulación que no están claramente entendidos. Por esto la forma del antígeno, ruta de inmunización, acarreador, adyuvante, tiempo, cepa y especies juegan un papel importante en la predisposición del sistema inmune para producir un patrón restringido de isotipos de inmunoglobulinas. La respuesta de células B a antígenos puede ocurrir en diferentes órganos linfoides siendo esto influenciado por la naturaleza del antígeno y ruta de administración (31,32).

Los anticuerpos producidos se distribuyen en diferentes localidades anatómicas, en la superficie de determinadas células inmunes efectoras como fagocitos mononucleares, células asesinas

naturales que poseen receptores específicos para su enlace, en fluidos intersticiales como el moco y la leche. En el plasma o porción fluida de la sangre donde son un componente minoritario dentro de una compleja mezcla de proteínas, los anticuerpos presentes son una colección heterogénea de moléculas con un amplio rango de afinidades y especificidades (33,34).

La necesidad de anticuerpos homogéneos en especificidad y afinidad para un determinado epitopo se volvió un reto. Si las células de un tejido linfóide que responden a un antígeno particular pudieran ser propagadas continuamente *in vitro*, el sobrenadante de cultivo podría contener moléculas de anticuerpos homogéneos. Desafortunadamente la progenie de linfocitos no pueden ser crecidos por largo tiempo en cultivo. Este problema fue resuelto en 1974 por Köhler y Milstein, quienes desarrollaron una técnica para producir una población homogénea de anticuerpos de especificidad antigénica conocida (32,35).

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Por largo tiempo se ha visto que las células de diferente tipo y diferentes especies pueden ser fusionadas para formar células híbridas, sin embargo, características altamente diferenciadas no son retenidas a menos que las dos células madres sean de líneas similares, aproximadamente del mismo estadio de diferenciación

(35). La técnica de Köhler y Milstein esta basada en el hecho de que cada linfocito B produce anticuerpos de especificidad única, por tanto cada tumor monoclonal derivado de un linfocito B llamado mieloma produce solo un anticuerpo. Tales tumores ocurren espontáneamente en el hombre y pueden ser inducidos experimentalmente por varios tratamientos. Sin embargo, la mayoría de los mielomas secretan anticuerpos de especificidades antigénicas desconocidas porque el proceso de transformación que produce el aumento para esos tumores afecta a los linfocitos B azarosamente y no es posible predecir la especificidad de ninguna clona de células B transformadas (32,33,34).

El método involucra la fusión celular o la hibridización celular somática entre una célula B normal productora de anticuerpos y una línea de mieloma que proporciona la inmortalidad, con la posterior selección de células fusionadas llamados hibridomas que secretan anticuerpos de la especificidad deseada denominados anticuerpos monoclonales (36,37).

a) Líneas Celulares utilizadas para la Fusión

Las células de mieloma pueden crecer en un medio normal pero no pueden crecer en un medio de selección porque carecen de un gen funcional requerido para su desarrollo. Esto es necesario para evitar que continuen proliferando y solamente sobrevivan los hibridomas resultantes. Un medio de selección comúnmente usado es

el que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) (31,37,38).

Las células normales sintetizan nucleótidos de purinas y timidato a partir de fosforribosil pirofosfato y urilidato respectivamente por varias vías, una de ellas involucra la transferencia de un grupo metil o formil del tetrahidrofolato (THF) activado, la aminopterina bloquea la reactividad del THF inhibiendo la síntesis de purinas y timidato, puesto que estos son componentes necesarios de DNA, la aminopterina bloquea la síntesis de DNA por la vía de novo. Las células tratadas con aminopterina pueden usar un camino de salvamento en el que la purina es sintetizada por hipoxantina suministrada exogenamente usando la enzima Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferasa (HGPRT) y el timidato por timidina empleando la Timidina cinasa (TK), las células crecen normalmente en la presencia de aminopterina si el medio de cultivo es también suplementado con hipoxantina y timidina (Fig No.2).

Via de Novo.

Vias de Salvamento.

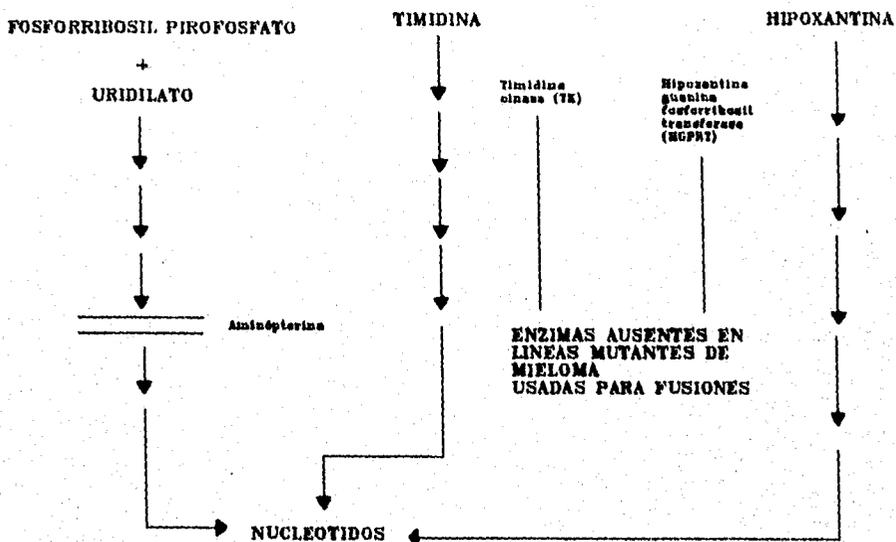


FIGURA NO.2
VIAS DE SINTESIS DE
PURINAS
FUENTE: Abbas A.K. 1994.
(33).

Las líneas celulares sin embargo, pueden hacerse defectuosas en HGPRT si son mutagenizadas y seleccionadas en tioguanina o 8-azoguanidina que son análogos de los metabolitos normales que funcionan como sustratos para HGPRT pero dan purinas no funcionales. De manera similar las células se pueden hacer defectuosas en TK por mutagénesis y seleccionan en

bromohidroxiuridina la cual es metabolizada por TK para formar un producto letal ligeramente sensitivo. Tales células negativas en HGPRT y TK no pueden usar la vía de salvamento y podrían sin embargo morir en medio HAT. Si las células normales son fusionadas con células HGPRT⁻ y TK⁻, las células normales proveen estas enzimas necesarias para que los hibridomas puedan sintetizar DNA y crecer en medio HAT (33,35).

Las líneas de mieloma son los mejores progenitores para la fusión con células B puesto que las células similares tienden a fusionarse y originar hibridomas estables mas eficientemente que las células no semejantes (32,34).

b) Fusión y Selección

Köhler y Milstein fusionaron una línea de mieloma de ratón deficiente en HGPRT con células B normales de ratones inmunizados con un antígeno conocido usando el virus Sendai, que expresa una envoltura protéica (proteína de fusión) que fusiona conjuntamente las células. Se han hecho algunas modificaciones a la técnica básica que incluyen el uso de líneas de mielomas que no producen inmunoglobulinas propias y el uso de polietilenglicol como agente fusionante (36,37,38,39).

Los hibridomas fueron seleccionados por crecimiento en medio HAT , bajo estas condiciones las células de mieloma sin fusionar

mueren porque no pueden usar la vía de salvamento y las células B viven solamente dos semanas porque termina su ciclo de vida normal y sobreviven únicamente los hibridomas deseados (36,37,38,39).

En la fusión se pueden generar hibridomas según las siguientes posibilidades: 1) fusión de células de bazo-bazo; donde se forman células productoras pero no inmortales, 2) fusión de células de mieloma-mieloma; que dan origen a células inmortales pero no productoras, y 3) fusión de células de bazo-mieloma; dando origen a hibridomas productoras e inmortales, en el medio de selección sobreviven únicamente los hibridomas inmortales productoras y no productoras de anticuerpos (36).

c) Identificación

Para diferenciar los hibridomas productoras de los no productoras se analiza el sobrenadante de cultivo de los hibridomas para detectar el anticuerpo producido por diferentes técnicas como ELISA y RIA. Una vez identificados los hibridomas productoras del anticuerpo deseado son clonados en varios ciclos en células alimentadoras (macrófagos) a una densidad de una célula por pozo en placas de cultivo de 96 pozos para asegurar que el anticuerpo final sea monoclonal y que la célula secretora es estable, las clonas productoras se identifican por el mismo método que para los hibridomas. Las clonas de los pozos positivos son aisladas y cultivadas en grandes volúmenes o en líquido de ascitis en ratones

para la producción en grandes cantidades (36,37,38).

De esta manera se obtiene un reactivo que permanece constante por grandes períodos, aunque su especificidad y calidad deben ser chequeadas periódicamente, por lo que tiene las propiedades de un reactivo químico puro altamente definido (37).

PROPIEDADES DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL

Un anticuerpo monoclonal reconoce un solo determinante antigénico, por lo que posee una especificidad única y una selectividad extremadamente alta para el epítipo. Son de clase, especificidad y afinidad definidas, de calidad consistente con una producción en grandes cantidades y utilidad a gran escala. Ofrecen un suministro ilimitado de anticuerpos con características constantes. Pueden ser fácilmente purificados por cromatografía bajo condiciones suaves. Son de alta pureza y con muy bajos fondos de unión. Entre otras propiedades están: pueden generarse anticuerpos contra epítipos discretos en el mismo antígeno, la producción de fragmentos es más fácil y más controlada, tienen rápida equilibración en su unión al antígeno, se pueden obtener anticuerpos monoespecíficos incluso de inmunógenos impuros, sin embargo, presentan algunas desventajas: la especificidad da susceptibilidad a variación polimórfica de antígenos y epítipos lábiles, usualmente no forman buenos complejos de precipitación con

la mayoría de antígenos. Se necesitan para obtener pequeñas cantidades de antígeno purificado (31,32,37).

En contraste el anticuerpo policlonal presenta otras características: son de especificidad, clase y afinidad variables, existe variación de grupo a grupo, se encuentran limitados por la disponibilidad de animales apropiados y se necesitan para obtener grandes cantidades de antígeno (34).

Una vez caracterizados, los anticuerpos monoclonales pueden ser útiles para la búsqueda y ensayo de rutina de la presencia del antígeno. Se pueden usar en ensayos de muestras cualitativas, semicuantitativas o totalmente cuantitativos. La avidéz por el antígeno puede ser explotada para purificar antígenos de mezclas complejas por afinidad o para remover contaminantes de otras moléculas (31,37).

La significancia de los Acm es explotar sus propiedades positivas, como reemplazar para propósitos de diagnóstico el suero inmune que es menos definido y que por su amplio espectro de especificidades no es capaz de distinguir epitopos individuales y con precisión suficiente (31,32).

Los Acm han tenido una entrada triunfal en los diagnósticos inmunológicos e inmunohistoquímicos, no solamente se han usado para determinar la progresión del SIDA para determinar las proporciones

de células T supresoras y cooperadoras, también reemplazan al antisuero convencional en grupos sanguíneos y serología de trasplantes. Han establecido un lugar en el diagnóstico de enfermedades linfoproliferativas y de tumores (39,40). Los tumores pueden ser ahora más fácilmente distinguidos formalmente de otros lo cual tiene consecuencias para la terapia. Los sistemas de ELISA comercialmente disponibles para enzimas, marcadores de tumores, hormonas y antígenos de superficie celular se incrementan diariamente (31,32).

Existe un gran número de diferentes usos terapéuticos de los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un uso *in vitro* es el tratamiento de médula ósea antes de la infusión, para remover células T antes del injerto que previene la reacción de injerto contra huésped. En usos *in vivo* pueden ser la inmunización pasiva para neutralizar toxinas, venenos, sobredosis de drogas, o para proteger contra virus y otros patógenos. En la terapia de cáncer tiene un uso limitado, en contraste, el uso en inmunosupresión y otras manipulaciones más ingeniosas del sistema inmune para el tratamiento de desórdenes autoinmunes o en el tratamiento de complicaciones de trasplantes de órganos y médula ósea se ha observado un considerable progreso (31,37).

Los AcM no están libres de tener reacciones cruzadas particularmente de clase IgM, esto sucede por el tamaño limitado del epitopo que es reconocido en el antígeno y el cual involucra

solo de 5 a 6 aminoácidos en una proteína, es posible que un anticuerpo dado reconozca también secuencias similares en otros antígenos. La más grande desventaja es que exponen más variabilidad fisicoquímica que en suero y esto afecta su comportamiento. Nunca se puede predecir como un buen anticuerpo permanece en solución, puede ser bien almacenado si tiende a agregarse. Su actividad biológica también es impredecible: los Acm dirigidos contra un mismo epitopo pueden unirse con diferentes afinidades, fijar complemento más o menos, ser más o menos tóxico, y ser más o menos útil para un marcaje o una técnica de ELISA (31,32).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la metodología de diagnóstico para fiebre tifoidea más utilizada presenta algunas limitaciones; no es completamente concluyente, no permite un diagnóstico rápido en fases tempranas de la enfermedad. Teniendo como antecedente la presencia del antígeno capsular Vi en la mayoría de cepas de *Salmonella typhi* aisladas de la sangre de pacientes con fiebre tifoidea, se propone la posibilidad de encontrar este antígeno de manera soluble en el suero o en la orina de los enfermos, teniendo además la opción de detectar la bacteria en los mismos fluidos por medio de este antígeno de superficie. Por tal motivo en este trabajo se pretenden obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-polisacárido Vi de *Salmonella typhi* para su posible aplicación en diversas técnicas que permitan un diagnóstico rápido y definitivo de la infección.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

1. Desarrollar anticuerpos monoclonales contra polisacárido Vi de *Salmonella typhi*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.1 Obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-polisacárido Vi de *Salmonella typhi*.

1.2 Desarrollar clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra polisacárido Vi de *Salmonella typhi* y determinar su reactividad con el antígeno.

1.3 Isotipificar los anticuerpos monoclonales que se logren obtener.

1.4 Producir los anticuerpos monoclonales en grandes cantidades.

HIPOTESIS

Utilizando polisacárido Vi de *Salmonella typhi* como antígeno se pretenden obtener por la técnica de fusión celular somática hibridomas murinos productores de anticuerpos monoclonales que se podrán usar en diferentes métodos para detectar al antígeno.

LISTA DE MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

EQUIPO UTILIZADO:

- 1) Baño Maria: marca Buchi, modelo B-465
- 2) Congelador Revco: marca Diana
- 3) Espectrofotometro: marca Beckman, modelo D-640
- 4) Potenciometro: marca corning, modelo 10
- 5) Liofilizadora: marca Heto, modelo FD4
- 6) Parrilla de agitación: marca Lindberg, modelo 52166
- 7) Campanas de flujo laminar: marca VECO
- 8) Microscópio invertido: Marca Bausch and Lamb
- 9) Centrifuga; marca Sorval RT, modelo 6000D
- 10) Incubadora de CO₂: marca Lab-Line

MATERIAL:

- 1) Jeringas de 1, 3 y 5 ml.
- 2) Botellas de cultivo celular de 50, 200, 500 y 2 cm²: marca corning.
- 3) Placas de cultivo celular de 6, 12, 24, 48, y 96 pozos: marca Nunc.
- 4) Pipetas Pasteur
- 5) Pipetas volumetricas de 5 y 10 ml
- 6) Equipo de disección
- 7) Placas de ELISA de 96 pozos: marca Nunc

REACTIVOS:

- 1) Agar Infusión Cerebro-Corazón: marca Bioxon
- 2) Caldo Infusión Cerebro-Corazón: marca Bioxon
- 3) Adyuvante Incompleto de Freund: marca GIBCO
- 4) Adyuvante Completo de Freund: marca GIBCO
- 5) Antígeno Vi: purificado de *C. freundii*
- 6) Medio de cultivo RPMI: marca SIGMA
- 7) Medio de cultivo D'MEM: marca SIGMA
- 8) Glutamina 200mM: marca HyQ
- 9) Piruvato de Sodio 100mM: marca SIGMA
- 10) Beta- Mercaptoetanol 5×10^{-2} M: marca HyQ
- 11) Suero fetal bovino: marca GIBCO BRL
- 12) Penicilina
- 13) Estreptomicina
- 14) 8-azoguanidina
- 15) Solución de HANK'S: marca SIGMA
- 16) Conjugado suero anti-Igs de ratón- Peroxidasa: marca SIGMA
- 17) Ortofenilendiamina: marca SIGMA
- 18) H_2SO_4 , 2.5 N
- 19) Tween 20: marca SIGMA
- 20) Polietilenglicol 4000: marca GIBCO
- 21) Hipoxantina: marca SIGMA
- 22) Timidina: marca SIGMA
- 23) Aminopterina: marca SIGMA
- 24) Anticuerpos anti-cadena pesada de Igs de ratón IgA, IgD, IgM,

IgE, e IgG: marca SIGMA

24) Gelatina Tipo A de piel de cerdo: marca SIGMA

MATERIAL BIOLÓGICO:

1) *Citrobacter freundii*

2) Ratones hembras de la cepa BALB/c de 1 mes de edad, con un peso de 14-16 Kg.

3) Línea celular murina de mieloma Ag8

PREPARACION DE SOLUCIONES UTILIZADAS

SOLUCION SALINA ISOTONICA: Disolver 8.5 g de NaCl en 1 l de agua destilada.

AMORTIGUADOR DE BICARBONATO-CARBONATO: Disolver 2.93g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 1.59g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) en 800 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1000 ml.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO (PBS): Disolver en 800 ml de agua desionizada los siguientes componentes:

Cloruro de sodio (NaCl).....	8.0 g
Cloruro de Potasio (KCl).....	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4).....	1.44 g
Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4).....	0.24 g

Ajustar a pH 7.2 y aforar a 1000 ml.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO-TWEEN (PBS-TWEEN):

Disolver 1 ml de Polyoxyethylene (20) sorbitol monolaurate (Tween-20) en 1000 ml de PBS.

AMORTIGUADOR DE CITRATOS:

Disolver 29 g de Citrato de sodio y 4.1 g de Acido cítrico en 800 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 5.6 y aforar a 1000 ml.

AMORTIGUADOR DE LISIS:

Disolver en 800 ml de agua desionizada los siguientes componenetes:

Cloruro de amonio (NH_4Cl).....	8.29 g
Bicarbonato de Potasio (KHCO_3).....	1.00 g
Na_2EDTA	37.20 mg

Ajustar el pH a 7.2-7.4 con HCl 1N y aforar con agua a 1000 ml.

Filtrar en membrana de 0.2mM.

SOLUCION DE BLOQUEO:

Disolver 3 g de gelatina en 100 ml de amortiguador de fosfatos salino pH 7.2.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo y Aislamiento Bacteriano: Se trabajó con una cepa caracterizada de *Citrobacter freundii* en el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiologica), que se cultivó en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) marca Bioxon, tanto en placas como en tubos. La cepa se congeló de la siguiente manera: de una colonia aislada de la bacteria se sembró en forma masiva una placa de agar y se incubó a 37°C por 24 hrs. Con un hisopo estéril se resuspendió el crecimiento bacteriano en caldo BHI con glicerol al 30% en esterilidad y se almacenó a -70°C.

Inmunización: Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 1 mes de edad y con un peso de 14-16g. Se realizaron los siguientes esquemas de inmunización:

a) Inmunización con *C. freundii*: De un cultivo reciente de la bacteria se hizo una suspensión en solución salina isotónica (SSI) estéril y se sometió a calor por 60 min. a 60°C en baño María para matar la bacteria, después se ajustó la suspensión a una densidad óptica (D.O.) de 0.6 a 540 nm que representa 10^9 bacterias por ml. De esta suspensión se inocularon intraperitonealmente (ip) 0.2ml a cada ratón que corresponden a 2×10^7 bacterias.

b) Inmunización con *C. freundii* más Adyuvante Incompleto de Freund (AIF): se mezcló 1 ml de la misma suspensión bacteriana con

1 ml de AIF y se inocularon 0.4 ml ip a cada ratón.

c) Inmunización con antígeno Vi más Adyuvante completo de Freund (ACF): se utilizó el antígeno Vi a una concentración de $10\mu\text{g/ml}$ en SSI y se mezcló 1 ml con 1 ml de ACF, de esta mezcla se inocularon 0.2ml a cada ratón.

Los esquemas de inmunización se aplicaron cada 2 semanas a 5 ratones por tres veces.

ESQUEMA DE INMUNIZACION

ANTIGENO	DOSIS Y VIA DE	DIA	No. DE RATONES
ESQUEMA A			
<i>C. freundii</i>	2x10 ⁷ bacterias en 0.2ml de PBS, i.p.	0	5
<i>C. freundii</i>	2x10 ⁷ bacterias en 0.2ml de PBS, i.p.	15	5
<i>C. freundii</i>	2x10 ⁷ bacterias en 0.2ml de PBS, i.p.	30	5
SANGRIA			
ESQUEMA B			
<i>C. freundii</i>	2x10 ⁷ bacterias en AIF, i.p.	0	5
<i>C. freundii</i>	2x10 ⁷ bacterias en AIF, i.p.	15	5
<i>C. freundii</i>	2x10 ⁷ bacterias en AIF, i.p.	30	5
SANGRIA			
ESQUEMA C			
Antígeno Vi	10µg/ml en ACF, i.p.	0	5
Antígeno Vi	10µg/ml en ACF, i.p.	15	5
Antígeno Vi	10µg/ml en ACF, i.p.	30	5
SANGRIA			

Cistaminación de Antígeno Vi: Se pesaron 97mg de polisacárido Vi y se disolvieron en solución de NaCl 0.2M con agitación en cuarto frío por 24h. A esta solución se le agregaron 200mg de Cistamina y se ajustó el pH a 4.9 con HCl 0.1N agitándose a temperatura ambiente. Se agregaron 100mg de carbodimida (EDAC) con agitación, ajustándose nuevamente el pH a 4.9 y manteniéndose así por 3h. Se dializó contra agua destilada y se liofilizó.

Cultivo celular: Se utilizaron campanas de flujo laminar que proporcionan una atmósfera de esterilidad. Se trabajó con una línea celular de mieloma de ratón Ag8 que se cultivó en botellas de 50 y 200 ml, utilizando medios de cultivo RPMI y D'MEM complementados con glutamina 200mM, piruvato de sodio 100mM, 28-mercaptoetanol 5×10^{-2} M, suero fetal bovino al 10% (marca GIBCO BRL) y como antibióticos penicilina (100 μ l/ml) y estreptomina (100 μ g/ml). Las células se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Para observar el desarrollo y estado de las células se utilizó un microscopio invertido.

Tratamiento con 8-azoguanidina: La línea celular Ag8 se cultivó con 8-azoguanidina en concentraciones de 20 a 100 μ g/ml, durante un mes.

Clonación celular: Se clonaron las células de mieloma Ag8 por el método de dilución limitante. Las células se diluyeron con solución de HANKS hasta tener 0.3 células por pozo y se cultivaron en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano, se observó el crecimiento celular a los 7 días y aquellos pozos donde hubo solamente una clona se pasaron a placas de 24 pozos y posteriormente a botellas para expandir cada clona obtenida.

Obtención de Macrófagos ó Células Alimentadoras: Se sacrificó un ratón de 3 meses de edad por dislocación cervical y se bañó en alcohol al 70%. Con un equipo de disección se retiró la piel y se descubrió el peritoneo, se sujetó el ratón con agujas sobre un tabla de disección y se le inyectaron con cuidado 5 ml de HANKS frío, se agitó con fuerza durante 5 minutos y después se retiró el líquido del peritoneo con la misma aguja cuidando de no picar órganos o tejidos para no llevarse eritrocitos. Posteriormente se colocó el líquido en un tubo estéril de 10ml y se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio fresco.

Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA):

a) Titulación de suero: Se utilizaron placas de ELISA marca Nunc, la placa se sensibilizó con 100 μ l de antígeno Vi-C (Vi-

cistaminado) en una concentración de 10µg/ml en amortiguador de carbonatos pH 9.5 incubándose 1 hr. a 37°C y toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó 2 veces y se bloqueó con PBS-Gelatina al 3% durante 2 hrs. a 37°C. Enseguida se lavó 2 veces y se adicionó por duplicado el suero de ratón en PBS-Gelatina al 2% en varias diluciones, se colocaron 100 µl por pozo y se incubó por 2 hrs. a 37°C. Después se hicieron 4 lavados y se agregó el conjugado anti-Ig polivalente de ratón-peroxidasa diluido en PBS-Gel al 2% depositando 100µl por pozo y se incubó 1 1/2 hr. a 37°C. Posteriormente se lavó 4 veces y se adicionó el substrato de la enzima (H₂O₂) y el cromógeno indicador de la reacción orto-fenilendiamina (OPD) en amortiguador de citratos pH 5.6. La reacción se protegió de la luz y se detuvo a los 10 min. con H₂SO₄ 2.5 N. La intensidad de color producido se leyó a 492 nm. Los lavados se hicieron con PBS-Tween al 0.1%. Se utilizó como control negativo un suero de ratón preinmune.

Fusión Celular: Se trabajó con los ratones inmunizados según los esquemas descritos y reforzados tres días antes de la fusión. Se sangraron a blanco y se sacrificaron por dislocación cervical. Con ayuda de un equipo de disección se retiró la piel y se extrajo el bazo, se colocó en una caja petri sobre un pedazo de organza estéril y 10 ml de medio RPMI sin suero fetal, el bazo se maceró con una aguja y émbolo en medio de la organza, con una pipeta pasteur se colectó el medio y las células de bazo presentes ahí, se

colocó en un tubo y se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 min., se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió suavemente en 5 ml de cloruro de amonio y se incubó 1 min. después se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 min., se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió suavemente en medio fresco, se realizaron dos lavados con medio para eliminar residuos de cloruro de amonio y células muertas, se resuspendió el botón en un volumen final de 10 ml de medio sin suero y se contaron las células vivas o células de bazo, por otro lado las células de mieloma Ag8 se concentraron en un solo paquete celular que se lavó dos veces con medio sin suero y se resuspendió en un volumen final de 10 ml para contarse después. Las células Ag8 (14.2×10^6) se mezclaron con las células de bazo (35.5×10^6) en relación 2:5, la mezcla se centrifugó a 800 r.p.m. por 5 min. y se decantó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió con golpes suaves en el fondo del tubo y lentamente se adicionaron 0.8 ml de poletilenglicol manteniendo el tubo durante 1 minuto entre las manos. Posteriormente se adicionó 1 ml de medio sin suero gota a gota, y después 20 ml de medio sin suero durante 5 min. y se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 min., el sobrenadante se retiró con una pipeta estéril y el botón de células se resuspendió suavemente en 50 ml de medio con suero fetal al 20%. En placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano se colocaron 100ul de la suspensión anterior por pozo (100 000 células) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente de la fusión se adicionaron 100ul de medio selectivo HAT a cada pozo de las placas de microcultivo y se realizaron cambios de medio fresco

por día, se evaluó el desarrollo de las células diariamente. A los 12 días de la fusión se adicionó medio selectivo HT reemplazando al medio HAT, manteniéndose el cultivo durante 8 días más, y realizando cambios de medio fresco diariamente. Después de la selección en los medios HAT y HT se evaluó el estado y desarrollo de los hibridomas sobrevivientes y se cultivaron en medio RPMI al 20% de suero fetal bovino.

Clonación de Hibridomas: Los hibridomas obtenidos se clonaron usando la misma metodología que para la línea Ag8.

Identificación de Hibridomas y Clonas Productoras: De los hibridomas que lograron sobrevivir en los medios selectivos HAT y HT, se analizó el sobrenadante de cultivo de cada uno de ellos utilizando la misma metodología que para suero, sin embargo; el primer anticuerpo del sobrenadante de cultivo se agregó sin diluciones y se incubó 1hr. a 37°C y toda la noche a 4°C. Como control negativo se utilizó sobrenadante de cultivo de la línea de mieloma Ag8. De la misma manera se identificaron las clonas productoras obtenidas de las clonaciones realizadas.

Producción en grandes cantidades: Después de haberse expandido las clonas caracterizadas en botellas de cultivo de 500 ml se cultivaron en recipientes de 2 L para obtener los anticuerpos

monoclonales en grandes cantidades, además se obtuvo líquido de ascitis de la siguiente manera: se inyectaron ratones hembras de 1 mes de edad de la cepa BALB/c con 0.5 ml de adyuvante incompleto de freund y a los 15 días se inocularon i.p. de 5-7 millones de células productoras de anticuerpos en 0.5 ml de PBS estéril. Después de aproximadamente 10 a 15 días se obtuvo el líquido de ascitis por punción en el peritoneo del ratón. Se centrifugó a 2000 r.p.m. por 5 minutos para separar las células presentes, después se centrifugó a 5000 r.p.m. durante media hora y 4°C para eliminar la grasa que lleva el ascitis, el sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C.

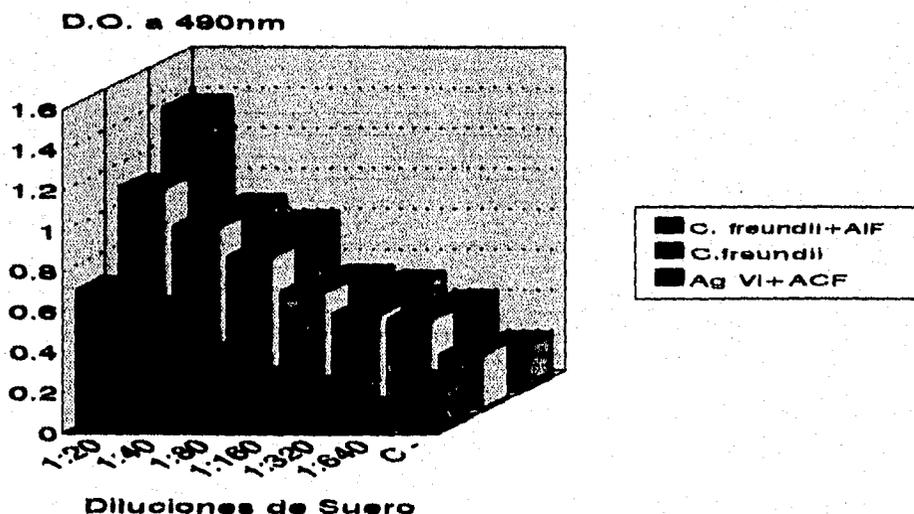
Determinación del isotipo de los Anticuerpos Monoclonales: Se determinó el isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos, mediante la técnica de ELISA de doble anticuerpo, realizándose de la siguiente manera: se sensibilizó una placa de ELISA marca Nunc con anticuerpos monoclonales de cabra anti-isotipos de ratón IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM diluidos 1:1000 en PBS incubándose 1h/37°C. Se lavó 2 veces y se bloqueó con PBS-Gelatina al 2% por 2h a 37°C. Posteriormente se lavó 2 veces y se adicionó el sobrenadante de cultivo de cada clona a probar, incubándose durante 2h a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces y se agregó conjugado anti-Ig polivalente de ratón-peroxidasa diluido en PBS incubándose 1h a 37°C. Se lavó después 4 veces y se reveló con H₂O₂ y OPD. La reacción se detuvo a los 10 minutos por adición de H₂SO₄ 2.5N. La

intensidad del color producido se leyó a 492 nm. Como control negativo se utilizó sobrenadante de cultivo de la línea celular Ag8. Los lavados se hicieron con PBS-Tween al 0.1%.

RESULTADOS

- Análisis de los sueros inmunes: se analizó el título de anticuerpos anti-Polisacárido Vi mediante un ensayo de ELISA donde la densidad óptica leída a 490 nm corresponde a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero. De los tres esquemas de inmunización utilizados se obtuvo un título de anticuerpos en todos ellos; a una dilución del suero 1:20 la lectura mayor fue de 1.3 correspondiente a la inmunización con *C. freundii* mas adyuvante incompleto de Freund como se observa en la gráfica número 1.

Título de sueros de ratón anti-Vi Técnica de ELISA



Gráfica No.1

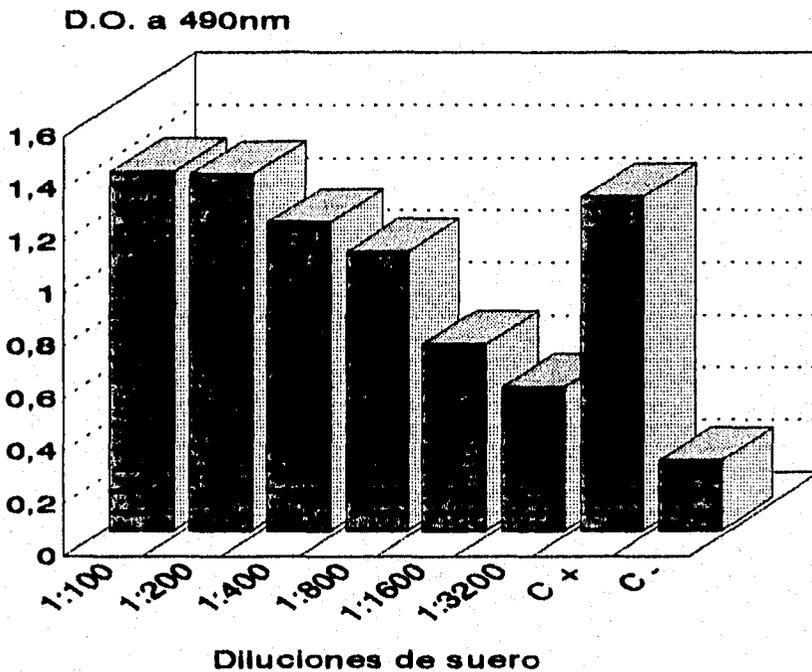
Reconocimiento del Ag Vi por sueros de ratones inmunizados

Se utilizó Ag Vi-C a 10 ug/ml

Ac revelador: Conjugado suero anti-Igs de ratón-Peroxidasa

El ratón del que se obtuvieron las células de bazo utilizadas en la fusión exitosa mostró un elevado título de anticuerpos que reconocen al antígeno Vi, a una dilución de 1:100 se obtuvo una lectura de 1.3 mayor que el control positivo, esto se observa en la gráfica número 2.

TITULACION DE SUERO DE RATON ANTI-VI Técnica de ELISA



Gráfica No.2

Reconocimiento del antígeno Vi por el suero de un ratón inmunizado

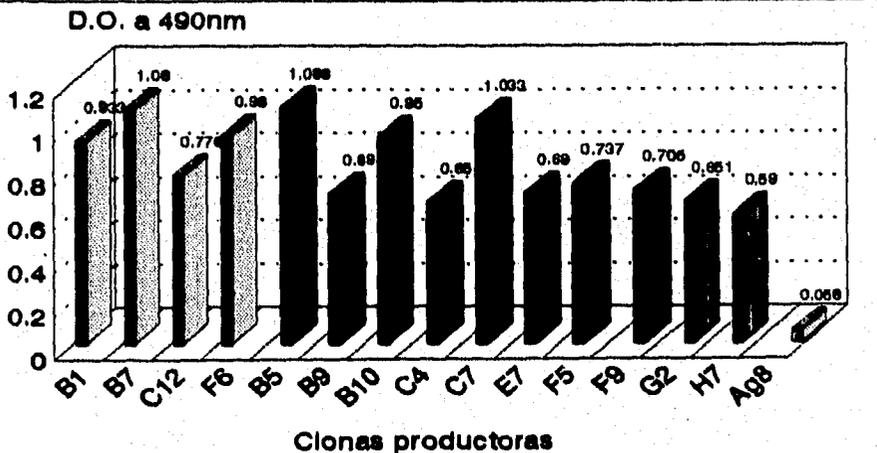
Se utilizó Ag Vi-C a 10 ug/ml

Ac revelador: Conjugado suero anti-Igs de ratón-Peroxidasa

-Generación de Hibridomas: Se realizaron varias fusiones bajo todos los esquemas de inmunización utilizados teniendo éxito la fusión de células de bazo de un ratón inmunizado con *C. freundii* en relación 2:5 con células de mieloma Ag8. La posibilidad de que una fusión sea exitosa es muy azarosa y no se pueden fijar condiciones estándar para lograrlo. Los hibridomas generados se seleccionaron en medio HAT y HT, observándose desarrollo de pequeñas clonas en algunos de los pozos y células muertas en el resto de ellos. De cinco placas de cultivo utilizadas en la fusión se encontró un mayor desarrollo de hibridomas productores en las placas cubiertas con macrófagos, la eficiencia fue mayor en presencia de macrófagos; los hibridomas en estas condiciones de cultivo se observaron más estables en su crecimiento y producción de anticuerpos, esto refleja la importancia de contar con la presencia de células alimentadoras que liberan diversos factores de crecimiento como interleucinas que favorecen el desarrollo de las células.

-Identificación de hibridomas productores: El rastreo de los hibridomas productores de anticuerpos anti-Vi se realizó analizando su sobrenadante de cultivo mediante un ensayo indirecto de ELISA donde el anticuerpo revelador fue un antisuero polivalente para Igs de ratón conjugado a peroxidasa, el título de los anticuerpos producidos en cada uno de los pozos de las placas de fusión identificados se muestra en la gráfica número 3. Los títulos más altos se obtuvieron en las placas con macrófagos; los hibridomas con mayor producción fueron B7 y F6 para la placa Mac 1 y B5 y C7 para la placa Mac 2. Como control negativo se utilizó sobrenadante de cultivo de la línea de mieloma Ag8.

Hibridomas productores de Anticuerpos anti-Vi Técnica de ELISA



Gráfica No.3

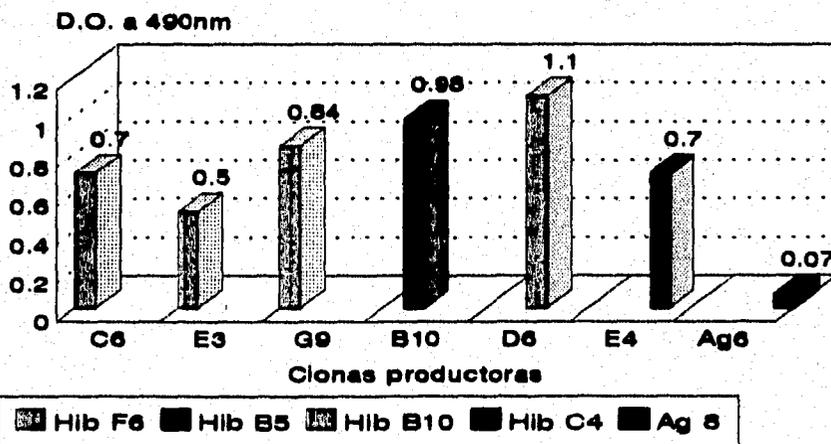
Hibridomas productores de Acs anti-vi

Se utilizó Ag Vi-C a 10 ug/ml

Ac revelador: Conjugado suero anti-Igs de ratón-Peroxidasa

-Identificación de clonas productoras: Para obtener anticuerpos monoclonales anti-Vi se clonaron los hibridomas mas estables en crecimiento y producción de anticuerpos por la técnica de dilución limitante, los hibridomas clonados fueron de la placa Mac 1 el F6, de la placa Mac 2 el B5, B10 y C4. Las clonas productoras se buscaron por análisis de su sobrenadante utilizando el sistema de ELISA descrito. De una primera clonación se obtuvieron 6 clonas C6/F6, G9/F6, E3/F6, B5/B10, D6/B10 y C4/F4 productoras, los títulos de anticuerpos producidos se muestran en la gráfica número 4. La clona mas productora fue la D6/B10 con una densidad óptica de 1.1, el control negativo fue sobrenadante de

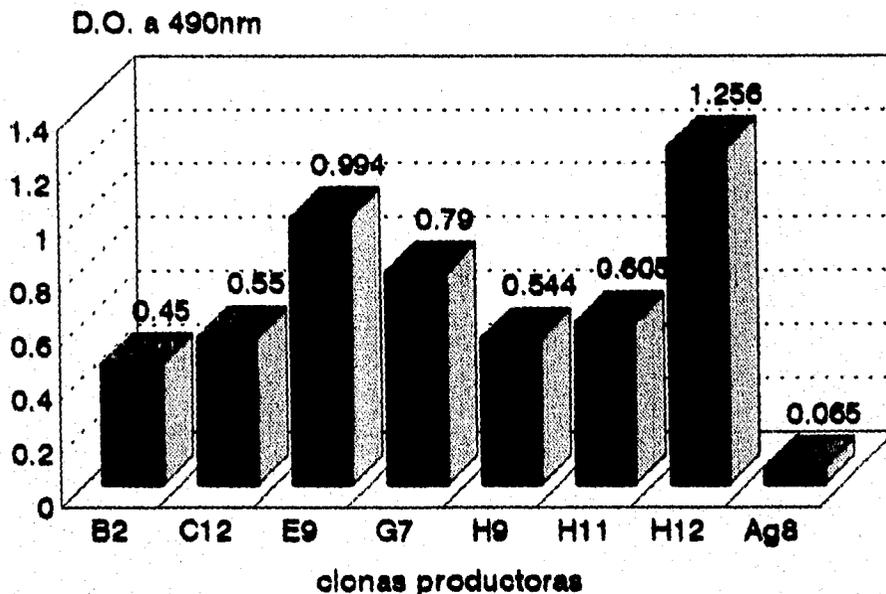
CLONAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS ANTI-VI
Primera Clonación
Técnica de ELISA



Gráfica No.4
Clonas productoras de Acs monoclonales anti-Vi
Se utilizó Ag Vi-C a 10 ug/ml
Ac revelador: Conjugado suero anti-Igs de ratón-Peroxidasa

Se realizó una segunda clonación a partir de la clona D6/B10 obteniéndose 7 clonas productoras de anticuerpos anti-Vi, los títulos de anticuerpos producidos se observan en la gráfica número 5, las clonas con mayor producción fueron H12, y E9 con densidades ópticas de 1.2 y 0.9 respectivamente.

CLONAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPO ANTI-VI **Segunda Clonación** **Técnica de ELISA**

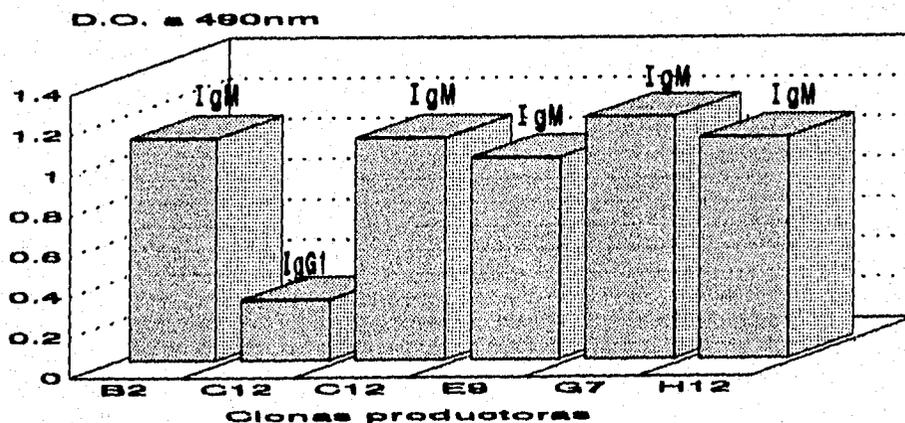


Gráfica No.5
Clonas productoras de Acs monoclonales anti-Vi
Se utilizó Ag Vi-C a 10 ug/ml
Ac revelador: Conjugado suero anti-Igs de
ratón-Peroxidasa

-Determinación del isotipo de los Anticuerpos Monoclonales:

Para identificar el isotipo de cada uno de los anticuerpos monoclonales obtenidos se utilizó un sistema ELISA de doble anticuerpo donde el anticuerpo de captura es anti-cadenas pesadas de Igs de ratón (anti-IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) que reconoce la fracción Fc del anticuerpo producido por las células y el anticuerpo revelador es un suero anti-Igs de ratón conjugado a peroxidasa. De cinco clonas analizadas se identificaron 4 clonas productoras de anticuerpos monoclonales de clase IgM, la clona B2, C12, E9, G7 y H12, y una clona que muestra producción de anticuerpos IgM e IgG1, este resultado muestra que aun existe mezcla de clonas en ella, los títulos de los anticuerpos producidos por las clonas se muestran en la gráfica número 6.

Determinación del isotipo de Acs Monoclonales anti-VI Técnica de ELISA (Doble anticuerpo)



Gráfica no.6

Determinación del isotipo de los Acs monoclonales anti-VI
El Ac de captura reconoce la cadena pesada de Ig de ratón
Ac revelador: Conjugado suero anti-Igs de ratón_Peroxidasa

Dado que en la clona C12 existe mezcla de dos clonas se debe clonar una vez mas para separarlas y tener cultivos de una sola clona. Por otro lado se logro obtener liquido de ascitis de las clonas C12 y E9 en ratones.

CLONACION DE HIBRIDOMAS ANTI-VI

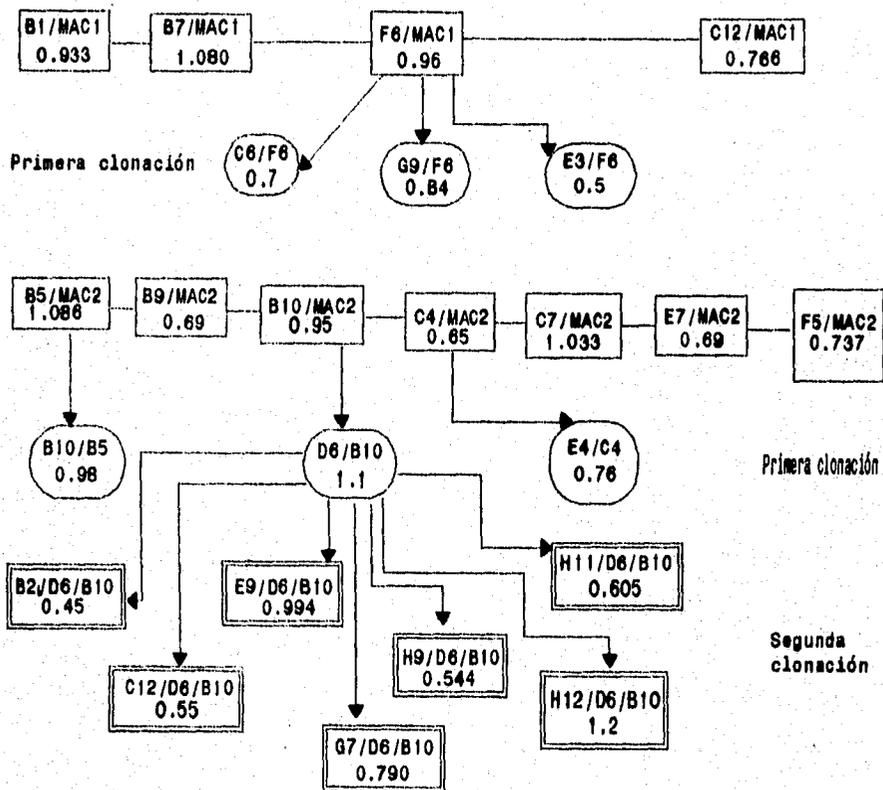


Figura No.3
Clonas productoras de Acm anti-Vi
obtenidas por técnica de dilución
limitante

DISCUSION DE RESULTADOS

En el diagnóstico actual para fiebre tifoidea, el ensayo serológico más practicado es la prueba de Widal que determina infección causada por miembros del genero *Salmonella*, especialmente en zonas no endémicas y representa una herramienta muy útil en países subdesarrollados donde la metodología de diagnóstico no puede ser costosa; sin embargo, tiene la limitante de no ser específica para *Salmonella typhi* debido a que detecta anticuerpos circulantes contra la bacteria en individuos sanos especialmente en áreas endémicas, los anticuerpos anti-O no son exclusivamente para *Salmonella typhi*, otras salmonellas del serogrupo D comparten el antígeno usado en la prueba, los anti-H muestran reacciones cruzadas y los anti-Vi se detectan hasta 3 ó 4 semanas después (22).

Se desarrollaron algunas metodologías para la detección de los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi) de *Salmonella typhi*, la determinación del antígeno O tiene la limitación de que la infección causada por *S. typhi* no puede ser distinguida de otras infecciones causadas por diferentes miembros de la familia *Salmonellae*. La manera confirmativa de identificar *Salmonella typhi* es demostrar la presencia de antígeno Vi y del antígeno flagelar (d-H) (22).

El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos

específicos de *Salmonella typhi* como Vi pueden incrementar la sensibilidad en los ensayos para detectar al antígeno en fases tempranas de la enfermedad (29).

Por tal motivo, en el presente trabajo se desarrollaron hibridomas productores de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. Para generar estos hibridomas se fusionaron células B productoras de anticuerpos con células de mieloma Ag8.

El rendimiento de la fusión fue más grande cuando se contó con la presencia de macrófagos de peritoneo como células alimentadoras, que en aquellas placas de la fusión en las que no se colocaron macrófagos, debido a que crean un microambiente de cultivo rico en factores de crecimiento como interleucinas, además de que eliminan desechos y restos celulares generados durante la selección, ayudando al crecimiento y estabilización de los hibridomas producidos.

Los hibridomas obtenidos mostraron diferencias en cuanto a producción de anticuerpos y cinética de crecimiento, algunos producían elevada cantidad de anticuerpos pero un crecimiento lento, otros presentaron baja producción de anticuerpos y un desarrollo rápido, y el resto de hibridomas mostraron alta producción de anticuerpos y un crecimiento rápido. Estas dos características no permanecieron constantes en muchos de los

hibridomas generados, con el tiempo en cultivo algunos empezaron a producir menor cantidad de anticuerpo que al inicio llegando incluso a no producir en absoluto, por otro lado aquellos hibridomas que mostraron un desarrollo lento con el tiempo dejaron de crecer y algunos se perdieron por completo. Para obtener clonas productoras se trabajó con los hibridomas más estables, aquellos que mostraron: 1) una cinética de crecimiento rápida y 2) una elevada producción de anticuerpos, ambas características de manera constante.

Pensando en que un posible sistema de detección del antígeno Vi sea un ensayo de ELISA, este método se utilizó para el rastreo de los hibridomas y de las clonas productoras de anticuerpos capaces de reconocer al polisacárido Vi. Dado que el antígeno Vi es químicamente un carbohidrato que se sabe induce una respuesta inmune de tipo primaria principalmente con la activación de células B productoras de IgM; aunque en algunos reportes se han generado anticuerpos anti-Vi de tipo IgG, se esperaba que la mayoría de hibridomas fueran productores de IgM, por esto, en el sondeo de los hibridomas y clonas productoras se utilizó en el ensayo de ELISA como anticuerpo revelador un conjugado de suero anti-Igs de ratón y peroxidasa, posteriormente al identificar por una técnica de ELISA de doble anticuerpo o sandwich el isotipo de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales generados, resultó que como se esperaba la mayoría de ellos fueron de clase IgM, aunque se encontró una clona productora de IgG1.

De manera similar Luk J M y col. desarrollaron hibridomas productores de anticuerpos anti-Vi, obteniendo cuatro clonas productoras de anticuerpos monoclonales de clase IgM y una clona que produce anticuerpos de isotipo IgG3 (41). Mohan N en 1989 obtuvo hibridomas que producen anticuerpos anti-Vi de clase IgM (42). El grupo de Qadri desarrollo anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno Vi, siendo la mayoría de ellos de clase IgG (29). Aunque la mayoría de los anticuerpos producidos se utilizaron en ensayos de aglutinación, para detectar la bacteria completa de muestras de sangre de los pacientes o de aislamientos en cultivo.

Para obtener los anticuerpos monoclonales anti-Vi en grandes cantidades se inocularon ratones intraperitonealmente con las células productoras de los anticuerpos para inducirles un tumor del hibridoma que se esta inoculando, y puesto que el animal representa un excelente medio de cultivo para el crecimiento de los hibridomas productores la proliferación de estas células es muy rápida y alta permitiendo a la vez tener una elevada producción de los anticuerpos en un pequeño volumen de líquido de ascitis. No todos los ratones respondieron favorablemente a la formación de tumores productores de anticuerpos, algunos no desarrollaron nunca los tumores inducidos, la capacidad de respuesta es particular de cada animal, así algunos ratones formaron tumores productores rápidamente mientras que otros tardaron más tiempo o la cantidad de anticuerpos producidos fue menor. La respuesta de los animales a

desarrollar tumores también fue distinta para cada hibridoma, la clona C12 tardo mas tiempo en generar líquido de ascitis que la clona E9, además de que el líquido de ascitis obtenido de la clona E9 se observó más claro y libre de células que el líquido de ascitis producido por la clona C12, que se observó más turbio y con mas cantidad de células de arrastre.

Puesto que los anticuerpos monoclonales constituyen un reactivo de características definidas y constantes como son la especificidad, homogeneidad y afinidad además de poderse obtener de manera ilimitada se han utilizado como herramientas muy valiosas para distintos propósitos, en este caso para desarrollar un sistema de detección que permita establecer un diagnóstico temprano de fiebre tifoidea o para identificar acarreadores asintomáticos de *Salmonella typhi*.

Con la disponibilidad actual de sistemas que aumentan en gran medida la sensibilidad y rapidez de los ensayos como el sistema avidina-biotina, antisueros conjugados a enzimas (peroxidasa), fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína) o a isótopos radioactivos como I^{125} , se puede pensar en un ensayo que, aunado al uso del o de los anticuerpos monoclonales obtenidos, permitirá posiblemente detectar el antígeno Vi en forma soluble en fluidos biológicos como orina y suero, o en forma constitutiva en la bacteria como en las heces, de manera confiable y rápida.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron siete clonas productoras de anticuerpos que reconocen el Polisacárido Vi de *Salmonella typhi*.

- Se identificaron cuatro clonas productoras de anticuerpos monoclonales de tipo IgM.

- Finalmente, se puede diseñar un sistema para probablemente detectar el antígeno Vi, utilizando los anticuerpos monoclonales obtenidos en este trabajo y que permita un diagnóstico de fiebre tifoidea.

PERSPECTIVAS

Una vez desarrollado el sistema de detección mas conveniente se deberá probar con un número adecuado de muestras de enfermos de Fiebre Tifoidea para evaluar su eficacia, reproducibilidad, sensibilidad y rapidez, así como probarse con muestras de posibles enfermos y de personas sanas para detectar acarreadores asintomaticos, de esta manera se podrá estandarizar el sistema para su posterior aplicación, además de su comparación con sistemas ya reportados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Robbins J D, Robbins J B. Reexamination of the protective role of the capsular Polysaccharide (Vi Antigen) of *Salmonella typhi*. J Infect Dis. 1984, 150:436-49.
- 2.- Falkow S, Mekalanos J. The Enteric Bacilli and Vibrios. En: Davis B B, Dulbecco R. (Eds). Microbiology. Filadelfia: J B Lippincot Company. 1990: 576-79.
- 3.- Daniels E M, Schneerson R, Egan W M, Szu S C, Robbins J B. Characterization of the *Salmonella paratyphi C* Vi Polysaccharide. Infec Immun. 1989, 10:3159-64.
- 4.- Martin D G, Jarvis F G, Milner K C. Physicochemical and biological properties of sonically treated Vi antigen. J Bacteriol. 1967, 94:1411-16.
- 5.- Szu S C, Li X R, Stone A L, Robbins J B. Relation between structure and immunologic properties of the Vi capsular polysaccharide. Infect Immun. 1991, 59 (12):4555-61.
- 6.- Hornick R B. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world XX Typhoid Fever. Rev Infect Dis. 1985, 7:536-38.

7.- Kirkwood T B. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards III, Principles of Design. J Biol Stand. 1978, 12:215-24.

8.- Szu S C, Stone L A. Vi capsular polysaccharide Protein conjugates for prevention of Typhoid Fever. J Exp Med. 1987, 166:1510-24.

9.- Merseleis J G, Kaye D, Connoly C S, Hook E W. Quantitative bacteriology of the typhoid carrier state. Am J Trop Med Hyg. 1984, 13:425-29.

10.- García J A, Paniagua J, Pelayo R, Isibasi A, Kumate J. Factores de Virulencia de *Salmonella typhi* en relación al desarrollo de nuevas vacunas. Salud Pública Mexicana. 1992, 34:262-67.

11.- Paniagua J, García J A, López C R, Isibasi A, Kumate J. Vacunas conjugadas contra infecciones bacterianas: Fiebre Tifoidea. Salud Pública Mex. 1992. 34:268-78.

12.- Levine M M, Hone D, Tacket C, Ferrecio C, Cryz S. Clinical and field trials with attenuated *Salmonella typhi* as live oral vaccines and carrier vaccines. Rev Microbiol. 1990, 141 (7-8):807-16.

13.- Wong K H, Feeley J C, Piltman M, Forlines M E. Adhesion of Vi

Antigen and Toxicity in Typhoid Vaccines Inactivated by Acetone or by Heat and Phenol. *J Infect Dis.* 1974, 129 (5):501-6.

14.- Tacket C O, Ferreccio C, Robbins J B, Tsai C M. Safety and Immunogenicity of two *Salmonella typhi* Vi Capsular Polysaccharide Vaccine. 1986, 154 (2):342-45.

15- Qadri A, Talwar G P, Banerjee K, Reddi P P, Sharuna M. Diagnostics for the tropical countries. *J Immunol Methods.* 1992, 150:121-132.

16.- Edelman R, Levine M M. Summary of an International workshops on Typhoid Fever. *Rev Infect Dis* 1986, 8 (3):329-39.

17.- Hormaeche C E. *Salmonella, Infection and Immunity.* En: Roitt M I. (Eds). *Encyclopedia of Immunology.* New York: Academic Press. 1992:1350-52.

18.- Nolan C M, Feeley J C, White P C, Hambie E A, Brown S L, Wong K H. Evaluation of a new assay for Vi antibody in chronic carriers of *Salmonella typhi.* *J Clin Microbiol.* 1980, 12:22-6.

19.- Nolan C M, White P C, Feeley J C, Brown S L, Wong K H. Vi serology en the detection of typhoid carriers. *Lancet.* 1981, 1:583-85.

20.- Chau P Y, Tsang R S W. New Method for serological screening of typhoid carriers. Lancet. 1980, 2:695-96.

21.- Chau P Y, Tsang R S W. Vi serology in screening of typhoid carriers: improved specificity by detection of Vi antibodies by counter-immunoelectrophoresis. J Hyg. 1982, 89:261-67.

22.- Keusch G T, Salmonellosis. En: Harrison. (Eds). Principos de Medicina Interna. Madrid: Interamericana-Mc Graw Hill. 1994: 783-87.

23.- Vitale G, Librizzi R, Mocciaro C, Friscia I, Blandino E, Usticario V, Mansueto S, Di-Flore M, Reina G, Gambino G. An ELISA method in the diagnosis of typhoid fever. J Clin Lab Immunol. 1990, 32 (4):195-99.

24.- Wang D M, Gu X H. Duration of appearance of Vi antigen and *Salmonella typhi* in blood and urine of infected models. Chin Med J Engl. 1991, 104 (1): 46-8.

25.- Taylor D N, Harris J R, Barret T J, Hargrett N T. Detection of urinary Vi antigens a diagnostic test for typhoid fever. J Clin Microbiol. 1983, 18: 872-76.

26.- Xi W, Ni X, Lu T, Zhang J, Xu J, Huang M W C. Early diagnosis of typhoid fever using monoclonal antibody. Chin Med Sci J. 1993,

8 (2):123-24.

27.- Pongsunk S, Sarasombath S, Ekpo P, Tangtherawattana P, Levine M M. Production of monoclonal antibodies to Vi polysaccharide antigen of *Salmonella typhi*. Asian Pac J Allergy Immunol. 1993, 11 (1):53-6.

28.- Tsang R S W, Chau P Y. Production of Vi Monoclonal Antibodies and Their Application as Diagnostic Reagents. J Clin Microbiol. 1987, 25 (3):531-35.

29.- Qadri A, Ghosh S, Prakash K, Kumar R, Moudgil K d. Sandwich enzyme immunoassays for detection of *Salmonella typhi*. J Immunoassays. 1990, 11 (2):251-59.

30.- Luk J M, Zhao C R, Karlsson K M, Lindberg A A. Specificity of monoclonal antibodies binding to the polysaccharide antigens (Vi,09) of *Salmonella typhi*. FEMS Microbiol Lett. 1992, 76 (1-2):173-78.

31.- Clark M. Introduction General. En: Birch J R, Lennox E S. (Eds). Antibodies monoclonales, Principles and Applications. USA: W Ley-Liss. 1995: 15-78.

32.- Berzofsky J A, Berkower I J, Epstein S L. Antigen-Antibody Interactions and Monoclonal Antibodies. En: Paul W E.(Eds).

Fundamental Immunology. New York: Raven Press. 1993: 455-462.

33.- Abbas A K. (Eds). Cellular and Molecular Immunology. USA: W.B. Sanders Company. 1994: 33-7.

34.- B and T Hybridomas and Cell Lines. En: Hudson L, Hay F C. (Eds). Practical Immunology. London: Blackwell Scientific Publications. 1989: 367-422.

35.- Brown G, Ling N R. Murine Monoclonal Antibodies. En: Catty A. (Eds). Antibodies a Practical Approach. Oxford: IRLPRESS. 1989: 81-106.

36.- Capmbell A M. Monoclonal Antibodies. En: Roitt M I. (Eds). Encyclopedia of Immunology. New York: Academic Press. 1992: 1087-89.

37.- Peters J H, Baumgarten H. (Eds). Monoclonal Antibodies. Germany: Springer Verlag. 1992: 1-7.

38.- Nilsson B. Enzyme-linked immunosorbent assays. Current Opinion in Immunology. 1990, 2:898-904.

39.- Harlow E, Lane D. (Eds). Antibodies A Laboratory Manual. USA: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988: 207-50.

40.- Porstmann T, Kiessig S T. Enzyme immunoassay techniques An overview. J Immunol Methods. 1992, 150:5-21.

41.- Luk J M, Zhao C R, Karlsson K M. Specificity of monoclonal antibodies binding to the polysaccharide antigens (Vi,09) of *Salmonella typhi*. FEMS Microbiol Lett. 1992, 76 (1-2): 173-78.

42.- Mohan N, Kumar R. A mouse monoclonal antibody to Vi antigen its usefulness in the serotyping of *Salmonella*. Indian J Med Res. 1989, 89: 229-32.