

11261

8  
Zej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN INMUNOQUIMICA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA"  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

SINTESIS DE UN INMUNOGENO DIVALENTE DE PORINAS DE *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d CON TOXOIDE TETANICO

## T E S I S

que como parte de los requisitos para obtener el grado en

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
- INMUNOLOGIA -

presenta la alumna

ROSA ESTELA RODRIGUEZ ANGUIANO

MEXICO, D.F. 1999

271882

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.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de la División de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección del Dr. Armando Isibasi Araujo. Durante el desarrollo de la tesis la sustentante fue becaria de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social y de la Gerencia Corporativa de Relaciones Laborales, Subgerencia Corporativa de productividad y desarrollo de Petróleos Mexicanos.

## I N D I C E :

I. RESUMEN.....	4
II. INTRODUCCION.....	5
1. FIEBRE TIFOIDEA.	
1.1 Epidemiología	
1.2 Patogenia.	
1.3 Vacunas existentes.	
2. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>S. typhi</i> .	
3. TETANOS.	
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
IV. HIPOTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	18
VI. MATERIAL Y METODOS.....	19
1. OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTIGENOS.	
1.1 Porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9,12,Vi:d	
1.2 Toxoide tetánico	
2. CONJUGACION DE PORINAS-TOXOIDE TETANICO (Por-TT)	
2.1 Método de unión por carbodiimida.	
2.2 Método modificado de unión por carbodiimida.	
2.3 Método modificado de unión por glutaraldehído.	
2.4 Selección de conjugado Por-TT.	
3. CUANTIFICACION DE PROTEINAS	
4. CARACTERIZACION DE LOS CONJUGADOS	
4.1 Electroforesis en Poliacrilamida.	
4.2 Inmunolectrotransferencia.	
4.3 Electroforesis bidimensional.	
4.4 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.	
4.5 Inmunoprecipitación en geles de agarosa.	
5. INMUNOGENICIDAD DE LOS CONJUGADOS.	
5.1 Esquema de inmunización para ratones C3HB/FeJ.	
5.2 Esquema de inmunización para conejos.	
5.3 Esquema de inmunización para cobayos.	
6. ENSAYOS DE PROTECCION.	
6.1 Determinación de dosis letal media.	
6.2 Protección activa con porinas, toxoide tetánico y conjugado.	
6.3 Neutralización de toxina tetánica	
VII. RESULTADOS.....	27
VIII. DISCUSION.....	41
IX. REFERENCIAS.....	45

## I. RESUMEN.

Las Porinas purificadas de *Salmonella typhi* se unieron covalentemente al toxoide tetánico mediante el método modificado de la carbodiimida, utilizando como espaciador el ácido 6-amino-hexanóico. La unión entre las moléculas fue evaluada por el aumento de peso molecular y la modificación del punto isoeléctrico del producto de la reacción. La inmunogenicidad del conjugado se evaluó por su capacidad de inducir anticuerpos específicos contra las porinas y contra toxoide tetánico en conejos y ratones. La inmunización con el conjugado confirió protección a ratones C3HeB/FeJ al desafío con 1,000 DL50 de *Salmonella typhi* e indujo títulos altos de anticuerpos neutralizantes de la toxina tetánica en cobayos. Estos resultados sugieren que la inmunización con el conjugado tiene un efecto coadyuvante en la inducción de la respuesta inmune protectora contra ambas enfermedades, por lo que se propone como un buen candidato para la elaboración de una vacuna.

## II. INTRODUCCION.

### 1. FIEBRE TIFOIDEA.

#### 1.1 Epidemiología.

Aunque la taxonomía del género *Salmonella* ha variado, desde el punto de vista epidemiológico es muy útil continuar con su clasificación en tres diferentes especies: *S. enteritidis*, que comprende más de 2,000 diferentes serotipos, causantes de gastroenteritis que pueden considerarse como zoonosis. *S. choleraesuis*, la cual está altamente adaptada a los cerdos, pero que también puede causar enfermedad en el humano; y *S. typhi*, que afecta solo al ser humano causando fiebre tifoidea. Si bien la infección por *S. paratyphi* A o B produce fiebre paratifoidea, que en muchos aspectos es clínicamente indistinguible a la fiebre tifoidea, en los países endémicos el 90% de los casos de la fiebre entérica se debe a *S. typhi*.

Se estima que hay alrededor de 12.5 millones de casos de fiebre tifoidea en el mundo cada año, lo cual representa una incidencia global de 365 casos/100,000 habitantes, pero en los países subdesarrollados puede ser hasta de 540 casos/100,000 habitantes con una tasa de letalidad promedio del 1%. Cuarenta y dos por ciento de los casos ocurren en niños menores de 14 años y 5 % son en niños menores de 5 años (1). La fiebre tifoidea continúa siendo un problema de salud en los países en vías de desarrollo en algunos países industrializados y aún en los países con buena infraestructura sanitaria donde se pueden presentar brotes (2).

Se considera que *S. typhi* es una sola clona que tiene poca divergencia genética intraespecie (3,4). Sin embargo, en Sudamérica la fiebre tifoidea generalmente es una enfermedad menos grave, en tanto que en Africa y en Indonesia las complicaciones tienden a ser más frecuentes y no esta claro si esta discrepancia se debe a diferencias genéticas de la bacteria o del hospedero (5,6).

La fiebre tifoidea es endémica en América Latina, donde se presentan alrededor de 595 mil casos al año, que representan una incidencia de 150 casos/100,000 habitantes; de estos, 197,000 casos se complican y producen aproximadamente 10,000 muertes. Perú, Chile, Ecuador, Nicaragua, Bolivia y Colombia tienen las tasas de incidencia más altas y se han presentado epidemias periódicas en varios países, como Brasil, México, Perú, Ecuador, Guatemala y Guyana; algunos de estos brotes se han asociado a cepas resistentes a cloramfenicol. Además, se ha descrito la

aparición de cepas resistentes a ciprofloxacina en diversas partes del mundo. (7,8,9,10,11,12).

En México, durante 1987 se reportaron 11,078 casos, con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes. Después de un período remisión, la enfermedad ha presentado una tendencia ascendente. En el D.F., por ejemplo, hasta la semana 51 de 1995 se habían registrado 1,259 casos, comparados con 46 del mismo período de 1994 (13). Hasta la semana 34 de 1996 se habían reportado 4,351 casos, que comparados con 3,286 del año anterior, representan un incremento del 32% (14). El grupo de edad más afectado por la enfermedad es el de los 15 a 44 años, donde se presentan aproximadamente el 58.62% de los casos. Considerando que este es el grupo de edad económicamente activo, la enfermedad representa más de 500,000 días laborales perdidos al año.

Debido a que existe un subregistro muy importante de casos, se han realizado varios estudios para determinar la prevalencia real de infección por *S. typhi*. En 1976, utilizando la prueba de fijación de superficie de Ruiz-Castañeda, se analizaron 19,259 sueros y se encontró que la prevalencia de títulos significativos de anticuerpos fue de 9.6% (15). En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica se realizó un estudio seroepidemiológico para determinar la prevalencia de anticuerpos contra el antígeno "O" mediante ELISA. Comparando sueros de pacientes confirmados de fiebre tifoidea con sueros de personas normales, se determinó un punto de corte que fue capaz de diferenciar ambas poblaciones con un 95% de sensibilidad y un 90% de especificidad. Se analizaron 62,630 muestras de suero, proporcionadas por el Instituto Nacional Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la SSA, las cuales son representativas de toda la población mexicana y que fueron colectadas entre 1985 y 1986 (16). Se encontraron títulos significativos de anticuerpos contra el antígeno "O" en el 4.27% de la población. No se demostró correlación con el sexo, grado de hacinamiento o estado socioeconómico, pero los niveles de anticuerpos parecen aumentar con la edad. La prevalencia de anticuerpos contra *S. typhi* es mayor en los estados de la región central-sur del país, la cual incluye al D.F. y a los Estados circunvecinos, en tanto que la prevalencia más baja se encontró en la península de Yucatán, demostrando que en México la transmisión es mayor en las áreas urbanas que tienen las peores condiciones sanitarias.

## 1.2 Patogenia

La fiebre tifoidea se adquiere a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados. La bacteria viaja a través del intestino hasta alcanzar las placas de Peyer donde se pone en contacto con las células M, a través de las cuales es internalizada, alcanza la circulación sanguínea produciendo una bacteriemia primaria (17), invade las células del sistema fagocítico mononuclear, prolifera intracelularmente y produce bacteriemia secundaria, la cual se acompaña del síndrome febril clásico. Las complicaciones más frecuentes son la perforación intestinal, colecistitis, choque séptico, delirio y coma y la tasa de letalidad varía del 1 al 5%. (17,18). El diagnóstico se fundamenta en el cuadro clínico y en la determinación de los títulos de anticuerpos contra los antígenos "O" y "H" pero se confirma mediante hemocultivo o mielocultivo.

*S. typhi* afecta solo al ser humano y la piedra angular en la cadena de transmisión es el portador asintomático (17). Si bien es posible infectar macrófagos murinos mediante la inoculación intraperitoneal de *S. typhi* mezclada con mucina (19), esta bacteria no afecta de manera natural al ratón, pero como la infección por *S. typhimurium* en estos animales tiene una patogenia semejante a la fiebre tifoidea en el humano, se ha utilizado al ratón como modelo para estudiar las interacciones de la bacteria con el hospedero. Las diferentes cepas de ratones tienen diversos grados de susceptibilidad a la infección por *S. typhimurium* (20,21). Los ratones que expresan el alelo *Ity<sup>r</sup>* pueden sobrevivir a las primeras fases de infección, mientras que los ratones susceptibles (*Ity<sup>s</sup>*) son incapaces de controlar la multiplicación temprana de *Salmonella* dentro de los macrófagos y mueren rápidamente por la enfermedad (22,23). El locus *Ity* (*Lsh* o *Bcg*), se localiza en el cromosoma 1 y codifica para la proteína *Nrampl* (20), la cual interviene en el transporte de intermediarios del NO hacia los fagolisosomas (24). La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio, en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares, en el interior de los cuales es capaz de proliferar. En los mecanismos de protección contra la infección por *S. typhi* se requiere de la participación tanto de la inmunidad humoral como de la inmunidad celular. La presencia de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas no necesariamente correlacionan con el desarrollo de protección contra las recaídas o reinfecciones, a excepción de los anticuerpos contra el antígeno "H", que son un indicador de resistencia a la fiebre tifoidea. Aunque los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de *S. typhi* a la pared intestinal. los mecanismos de inmunidad

mediada por células, fundamentalmente la activación de macrófagos, son indispensables para el control de la infección (25). Se sabe que los linfocitos T  $\alpha\beta$  CD4+ Th1 promueven la activación de los macrófagos, estimulan la producción de anticuerpos e inducen hipersensibilidad retardada en los animales infectados con *Salmonella* (26), pero el papel de los linfocitos T CD8+ citotóxicos es controversial.

Las *Salmonellas* no-*typhi* tienen plásmidos cripticos de virulencia, que le confieren el fenotipo patógeno en ratones. Dichos plásmidos no han sido descritos en *S. typhi*; la cual, sin embargo, puede contener plásmidos de resistencia a antibióticos. *Salmonella* invade el intestino a través de las células epiteliales en un proceso que implica la activación específica de genes en la bacteria, como el locus invABCD que permite la penetración de las bacterias a la células en cultivo de tejido (27), la estimulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, la formación de prolongaciones citoplásmicas ("ruffles") en la célula epitelial y la internalización de la bacteria en vacuolas (28). La bacteria atraviesa el epitelio sin causar daño aparente, para llegar al sistema fagocítico mononuclear (SFM) donde se activan sus genes de virulencia. El más importante es una pareja de sensor-cinasa/modificador transcripcional (phoP-phoQ). Al ser fosforilado, PhoQ activa a los genes pagABCD, y reprime a los genes prg (29,30,31). Estos genes son activados en el fagolisosoma de macrófagos, pero no dentro de células epiteliales. El más estudiado de ellos es pagC, que permite la sobrevivencia dentro del macrófago. La principal característica de la expresión coordinada de los genes pag es la de inhibir el descenso de pH dentro del fagolisosoma (32).

### 1.3. Vacunas existentes.

La disminución de la fiebre tifoidea en los países industrializados se debe al mejoramiento de la infraestructura sanitaria, pero en los países de América Latina el desarrollo económico es lento y una alternativa efectiva para el control de esta enfermedad descansa en la utilización de una vacuna efectiva. No obstante que se han realizado amplias investigaciones básicas, clínicas y de campo para evaluar diferentes candidatos a vacunas, hoy en día todavía no existe una vacuna contra la fiebre tifoidea cuya aceptación sea universal. Por otro lado, no se recomienda la inmunización pasiva contra la fiebre tifoidea. La gamma globulina comercial no tiene ninguna utilidad ni en contactos ni en enfermos (33).

Las vacunas actualmente en uso pueden clasificarse en tres grupos que a continuación se describen.

#### **Vacunas elaboradas a partir de células completas inactivadas.**

Se han utilizado diversos métodos para inactivar a la bacteria, ya sea por calor, fenol, alcohol, acetona o formalina, y en general se preservan en una suspensión con fenol o se liofilizan (33). Las vacunas en suspensión deben conservarse en refrigeración, entre 4 a 8 °C y son muy estables. Dos tipos de vacuna se han evaluado extensamente en ensayos de campo, la vacuna K, que es inactivada con acetona, y la L que es inactivada por calor y preservada con fenol. La protección que confieren varía del 79 al 88% para la vacuna K y es menor para la L (33). Muchos países, entre ellos México, están en posibilidades de elaborar su propia vacuna de este tipo. Ambas vacunas han demostrado proveer entre moderada y buena protección que puede durar entre cinco a siete años. Generalmente se recomienda la aplicación subcutánea de  $5 \times 10^8$  bacterias en 0.5 ml de excipiente, se administran dos dosis con intervalo de un mes y refuerzos cada cinco años. Para disminuir las reacciones indeseables, que incluyen fiebre y dolor local, se ha utilizado la aplicación de 0.1 ml por vía intradérmica, aunque no existen ensayos clínicos controlados que aseguren que su eficacia es comparable a la administración subcutánea. La administración oral de este tipo de vacunas no genera protección efectiva, por lo que actualmente esta en desuso. Ocasionalmente se ha asociado la aplicación de este tipo de vacunas con púrpura trombocitopénica, falla renal aguda, dermatomiositis, apendicitis, eritema nodoso y esclerosis múltiple (34).

Debido a las reacciones colaterales indeseables que causan, no se aconseja su aplicación en poblaciones abiertas. Se recomienda en personas que viajan a zonas endémicas, en militares y en personas especialmente expuestas al riesgo, como trabajadores de laboratorios de microbiología. En algunos lugares se recomienda el uso en escolares. En general no se recomienda su uso masivo después de desastres naturales como terremotos o inundaciones. Tampoco esta indicada su aplicación en brotes asociados a la exposición a una fuente común de infección. Se ha sugerido que después de la aplicación de la primera dosis de vacuna inactivada hay un período de anergia donde existe mayor susceptibilidad a la infección por *S. typhi* (35). También se ha descrito que los padecimientos como la esquistosomiasis pueden interferir con la

respuesta inmune hacia la vacuna (36). Si bien no existen contraindicaciones definitivas para la aplicación de este tipo de vacunas, debe evitarse su utilización en personas que ya han mostrado reacciones indeseables en aplicaciones previas, y no deben utilizarse en pacientes con falla renal o con enfermedades del tejido conectivo, pero si pueden utilizarse en personas infectadas con HIV. La administración simultánea de este tipo de vacunas junto con toxoide tetánico o diftérico, *S. paratyphi* A y B, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Bordetella pertussis* o *Vibrio cholerae* inactivados, no ha demostrado afectar su inmunogenicidad o aumentar su antigenicidad. De hecho, en un modelo de ratón se comprobó que la administración conjunta de la vacuna de células completas de *Salmonella* inactivada con toxoide tetánico o DEAE-Dextrán induce mejor respuesta inmunológica (37) .

#### **Vacunas elaboradas a partir de *Salmonella typhi* atenuada.**

Se ha logrado atenuar varias cepas de *S. typhi* mediante métodos químicos, como es el caso de una cepa dependiente de estreptomicina que ya no se utiliza por su baja inmunogenicidad. Actualmente solo la cepa *S. typhi* Ty21a (38) se encuentra disponible en el mercado y es producida por el Instituto de Sueros y Vacunas en Berna, Suiza, con el nombre comercial de Vivotif(r). Esta cepa se obtuvo al tratar la cepa virulenta Ty2 con nitro-azoguanidina, está mutada en el gene *galE* por lo que carece de la enzima UDP-galactosa epimerasa y no puede producir de manera adecuada el antígeno "O". No se conoce con exactitud qué otras mutaciones tiene porque además no produce antígeno Vi, pero se sabe que estas mutaciones no son del todo responsables de la atenuación y la inmunogenicidad, pues algunas variantes que si producen al antígeno Vi no han demostrado ser mas inmunogénicas. La protección que confiere esta vacuna varía del 60 al 96% aproximadamente, dependiendo sobre todo de la manera como se administra (39,40,41). La vacuna se aplica por vía oral, pero requiere la neutralización del pH ácido del estómago. Por ello, se recomienda que se tome con el estómago vacío y con poca agua. Para neutralizar la acidez del estómago se han utilizado cápsulas que contienen gelatina con bicarbonato de sodio o comprimidos con capa entérica, la cual parece ser mas efectiva. Se recomiendan tres o cuatro dosis de  $2$  a  $4 \times 10^9$  UFC cada tercer día. La vacuna confiere protección por tres años y requiere ser almacenada entre  $4$  a  $8$  °C.

Se puede administrar junto con otras vacunas como la de poliovirus atenuado o la parenteral contra la fiebre amarilla y la vacuna oral contra el cólera elaborada a partir de la cepa *Vibrio*

*cholerae* CVD103HgR (42), pero se ha demostrado que la administración de algunos medicamentos antipalúdicos pueden disminuir su inmunogenicidad (43) .

Esta vacuna es bien tolerada y aunque no se ha documentado que cause problemas en embarazadas, no se aconseja su utilización en estas personas ni en pacientes con depresión de la inmunidad mediada por células. La capacidad protectora de esta vacuna no ha sido demostrada de manera concluyente y su utilidad en programas amplios de vacunación es limitada debido a lo impráctico que resulta su administración, por ello su uso es semejante al de las vacunas de células completas inactivadas.

Existen otras cepas que han sido atenuadas mediante ingeniería genética inactivando genes involucrados en la síntesis de algunos compuestos cuyos metabolitos no se encuentran en los tejidos de los mamíferos. Algunas han resultado reactogénicas y pobremente inmunogénicas, de tal manera que no ofrecen ventajas sobre la cepa Ty21a y su uso ha sido abandonado, como *S. typhi* 541Ty ( $\Delta$ aroA,  $\Delta$ purA derivada de la cepa CDC1080) (44), *S. typhi* 543Ty (44) una mutante Vi negativa derivada de 541Ty y *S. typhi* EX642 ( $\Delta$ galE, Vi negativa derivada de Ty2) y *S. typhi* CVD906 ( $\Delta$ aroC,  $\Delta$ aroD derivada de la cepa ISP1896) (45). Entre las cepas más prometedoras de este tipo se encuentran las mutantes CVD908 ( $\Delta$ aroC,  $\Delta$ aroD derivada de la cepa Ty2) (45), CVD908 ( $\Delta$ aroC,  $\Delta$ aroD,  $\Delta$ htrA derivada de CVD908) (46), la cepa X3927 ( $\Delta$ cya,  $\Delta$ crp) (47), las cepas sensibles a temperatura (48) y las mutantes phoP/phoQ (49) que ya han sido evaluadas en ensayos clínicos en voluntarios humanos (50).

Estas cepas tienen como ventaja adicional que son excelentes candidatos para ser utilizados como acarreadores vivos de antígenos. Así por ejemplo, nosotros hemos utilizado a la cepa CVD908 como acarreador de la proteína circumsporozoítica de *Plasmodium falciparum*, los factores de colonización CFA/I y CS3 de *Escherichia coli* y la proteína principal del promastigote (gp63) de *Leishmania mexicana* (51,52,53).

#### **Vacunas elaboradas a partir de subproductos bacterianos.**

Se han realizado diversos intentos para elaborar vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de subproductos de *S. typhi*, como son extractos bacterianos crudos obtenidos por ciclos de congelación-descongelación o tripsinización (33). También se ha utilizado al lipopolisacárido (LPS) purificado (33). Sin embargo, solo el antígeno Vi purificado y no desnaturalizado ha demostrado generar

protección efectiva (54). La vacuna actualmente en uso, preparada por Pasteur-Merieux, consiste en antígeno Vi de *Citrobacter freundii* purificado mediante Cetavlon(r). En ensayos de campo ha demostrado que protege entre 64 a 72% (55,56) y que los títulos de anticuerpos no decaen significativamente después del tercer año de la inmunización (57). Se administra una o dos dosis con intervalo de un mes de 25 a 50 (g por vía subcutánea).

## 2. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Salmonella typhi*.

Las proteínas de membrana externa (PME) se consideran antígenos importantes en la inducción de la respuesta inmune protectora específica contra diversas infecciones causadas por bacterias Gram negativas (58,59). Por lo anterior varios grupos de investigación han realizado estudios para evaluar la capacidad protectora de las PME de *S.typhi* o *S. typhimurium*, en modelos murinos con resultados alentadores (60,61).

Las porinas son las PME más abundantes en términos de masa de las bacterias Gram negativas. La superficie bacteriana puede llegar a tener hasta  $10^5$  copias de estas proteínas, lo que representa hasta un 2% de la proteína total (62). Las porinas identificadas en *E. coli* y *S. typhimurium* son OmpC, OmpF y PhoE. Además se ha descrito OmpD en *S. typhimurium*. Por otro lado, el gene que codifica para OmpC de *S. typhi* ha sido identificado, aislado y secuenciado (63,64). Las porinas más estudiadas son OmpF, PhoE de *E. coli* y OmpC de *S. typhi*. Se considera que debido a que existe un alto grado de homología funcional y estructural entre ellas, evolucionaron de una proteína ancestral común. Estas proteínas tienen pesos moleculares de 36 a 38 KDa, se ensamblan como trímeros y forman canales de difusión inespecífica para pequeñas moléculas hidrofóbicas. OmpC y OmpF forman poros con tamaños de exclusión similares (aproximadamente 600 Dal), con diámetros que varían entre 1.1. a 1.3 nm (62,65,66,67).

El monómero de las porinas es un polipéptido que tiene en promedio 336 residuos, que adquiere forma cilíndrica semejante a un barril y que se ensambla en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse a la membrana externa, donde forma trímeros (66). Los estudios cristalográficos realizados en OmpF y PhoE muestran que el "barril" está formado por 16 regiones de hojas  $\beta$  plegadas antiparalelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas  $\alpha$  hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras  $\beta$  de manera pseudocíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja  $\beta$ -16 y el extremo amino de la hoja  $\beta$ -1 (66,68).

En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (División de Investigación Biomédica del D.F., Centro Médico Nacional Siglo XXI), se han realizado diversos estudios que fundamentan la inclusión de porinas de *S. typhi* como antígenos protectores en una vacuna. La inmunización de ratones NIH con PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d indujo una protección al reto con la bacteria homóloga de hasta 1,000 DL50. El suero hiperinmune de conejo anti-PME transfirió protección pasiva contra el reto de la misma cepa y reconoció por inmunoelectrotransferencia principalmente a PME de 38 a 40 KDa, por lo que se infirió que el efecto protector se debe principalmente a estas proteínas (69). En otros ensayos, se encontró que PME de *S. typhi*, inyectadas vía intraperitoneal (i.p.) en ratones NIH confirieron una protección cruzada al desafío con *S. typhimurium* (69), lo que indicó la presencia de epitopos compartidos entre estas cepas. Posteriormente, las porinas se aislaron por el método de Nikaido (62), obteniéndolas con un 99.96 % de pureza (0.041 % de contaminación con LPS). En cromatografía de exclusión molecular se determinó un peso molecular de 114-128 KDa en su estado nativo (cuando se encuentran asociadas en forma de homotrimeros) y en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras las porinas monoméricas mostraron pesos moleculares de 36-41 KDa y un punto isoeléctrico comprendido entre pH 4.5 y 5 (similares al reportado para las porinas de *S. typhimurium*). Con estas porinas purificadas se inmunizaron ratones, con dosis de 10 µg a 30 µg y se logró un 90% de protección para 100 y 500 DL50, respectivamente (70). A su vez, anticuerpos monoclonales anti-porinas confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL50 de *S. typhi* (71) mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no tienen ningún efecto protector (72), estos estudios apoyaron la suposición de que las porinas participan en los mecanismos de protección contra el desafío de la bacteria homóloga. Otros estudios refuerzan esta hipótesis, pues se ha observado que pacientes con fiebre tifoidea, durante la fase de convalecencia, producen anticuerpos de clase IgG dirigidos contra las porinas de *S. typhi* (73) y los individuos vacunados con la vacuna oral presentan respuesta inmune celular dirigida contra las porinas, en contraste con las personas vacunadas con *S. typhi* inactivada (vacuna L), que no la tienen (74). Además se ha logrado inducir protección contra el reto con *S. typhi* inmunizando ratones con la porina OmpC recombinante purificada (75), se han identificado los epitopos inmunodominantes de esta proteína (76,77) y la inmunización con DNA que codifica para OmpC induce anticuerpos capaces de reconocer a la proteína nativa (78)

En experimentos *in vitro* se ha demostrado que las porinas son capaces de activar linfocitos T (79) y que esta respuesta está controlada genéticamente (80), estos experimentos probablemente indiquen el mecanismo por el cual confieren protección, pues se ha descrito con anterioridad para otros padecimientos, que este proceso es importante en el control de patógenos intracelulares (44), ya que la estimulación de linfocitos T, induce la liberación de citocinas que a su vez activan a los macrófagos. Así, mediante un ensayo de infección de macrófagos *in vitro* se ha observado que las porinas de *S. typhi* inducen la activación de macrófagos dependiente de linfocitos T, pues los macrófagos de ratones inmunizados con porinas, eliminaron aproximadamente 50% más bacteria intracelular que las células de ratones no inmunizados. También debe participar la activación de complemento mediada por anticuerpos. Esta última hipótesis se apoya en el hecho de que en nuestro laboratorio hemos demostrado que las porinas contienen epitopos de células B expuestos al medio, que pueden ser reconocidos por anticuerpos (75,76,77).

### 3. TETANOS.

El tétanos es una enfermedad aguda producida por acción de la neurotoxina secretada por *Clostridium tetani*, bacteria que prolifera en condiciones anaeróbicas y que generalmente se establece en sitios seriamente lesionados a partir de las esporas presentes en el ambiente (81). Clínicamente el tétanos se caracteriza por contracciones musculares dolorosas, primero en los maceteros, cuello y después tronco. Uno de los primeros signos que sugieren tétanos es la rigidez abdominal, aunque a veces el fenómeno se limita a la zona de la lesión, presentando espasmos generalizados, a menudo inducidos por estímulos sensoriales, cuyos signos típicos son la posición de opistótonos y la expresión facial conocida como "risa sardónica" (81,82,83).

La toxina del tétanos está constituida por una cadena polipeptídica de 150 KDa. dividida en fragmentos A y B-C que se mantienen unidos por enlaces disulfuro, esta toxina se une a gangliósidos de las terminales nerviosas periféricas, por medio del extremo carboxil-terminal de su fragmento C; internalizándose a través del transporte axonal al cordón de la médula espinal donde, por un mecanismo desconocido, interfiere con el disparo neurotransmisor, produciendo una parálisis espástica acompañada por convulsiones (84). Como es una enfermedad ocasionada por la toxina y no por la infección invasiva en si, se previene únicamente por la presencia de anticuerpos neutralizantes, los cuales pueden ser inducidos mediante inmunización activa con formas no tóxicas de la toxina (generalmente destoxificada con

formaldehído), o bien de manera adquirida por inmunización pasiva (85,86).

El tétanos es una de las enfermedades que contempla el Programa Ampliado de Inmunización (PAI) que promueve la Organización Mundial de la Salud. Los programas de vacunación contra el tétanos han resultado ser muy seguros y exitosos, por lo que esta enfermedad casi ha desaparecido en aquellos países en los que se ha llevado a cabo una inmunización apropiada (85). Sin embargo, el tétanos ocurre todavía en aquellos individuos que no han recibido esquemas completos de inmunización durante la infancia o que no reciben un refuerzo posterior apropiado. El tétanos se presenta en la mayoría de poblaciones de adultos cuyos anticuerpos neutralizantes han disminuido por debajo de niveles protectores. Esta observación confirma la absoluta necesidad de inmunizar adultos en países en vías de desarrollo, en donde la vacunación universal aún no es practicada. Esta enfermedad es responsable de un alto porcentaje de muertes (87) en los países subdesarrollados donde se estima que ocurren entre 300,000 y un millón de casos anualmente. Especialmente importante es el tétanos neonatal. La infección ocurre a través del cordón umbilical cuando el parto se atiende en condiciones de higiene deficiente. En los países subdesarrollados, donde la atención prenatal y perinatal es todavía inadecuada, se aconseja la vacunación de todas las embarazadas con el propósito de conferir inmunidad transplacentaria al feto.

Para cumplir con las recomendaciones del PAI el toxoide tetánico generalmente se administra en combinación con toxoide diftérico y vacuna contra la tosferina (difteria, pertussis, tétanos) (DTP), el esquema consiste en tres dosis con intervalo de dos meses, comenzando al mes o dos meses de edad. La formulación que ha sido usada por décadas y que contiene células completas de *B. pertussis* pronto será sustituida por una con un componente acelular y pronto se agregará un cuarto componente que consiste en glicoconjugados de *H. influenzae*. El uso de componentes purificados deberá reducir los efectos colaterales, como dolor local y fiebre en ocasiones acompañada de convulsiones, permitiendo la introducción de nuevos antígenos en la formulación y para alcanzar altos títulos de anticuerpos con una sola dosis (87).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Algunas proteínas o carbohidratos que son pobremente inmunogénicos por si solos, incrementan su inmunogenicidad al ser insertados en un vehículo adecuado o unidos correctamente a un sistema de molécula acarreadora. Los antígenos macromoleculares generalmente expresan un número limitado de determinantes antigénicos o epitopos que dictan su especificidad, en el caso de antígenos que poseen actividad biológica, solo pocos epitopos intervienen en la interacción con anticuerpos neutralizantes (88). Por tal razón, los antígenos protéicos o péptidos sintéticos, pueden unirse covalentemente a sistemas de moléculas acarreadoras a través de grupos funcionales sin afectar su antigenicidad (89). La respuesta inmune que inducen los haptenos no solo depende del número de determinantes unidos al acarreador, sino que se ve influida por factores como su tamaño, orientación y carga (90). La distancia entre el hapteno y el acarreador determina la accesibilidad al receptor del linfocito B. Un antígeno ideal es aquel cuyos grupos antigénicos no se ligan directamente a la proteína acarreadora, sino que el acoplamiento se realiza a través de grupos reactivos, o mediante una cadena policarbonada espaciadora entre el hapteno y el acarreador. Los grupos reactivos funcionales como carboxilos, aminas o alcoholes en los haptenos permite la unión directa a una proteína acarreadora, pero el uso de reactivos bifuncionales o hetero-bifuncionales, como carbodiimida o glutaraldehído, permite la unión indirecta mediante la formación de derivados, al introducir grupos adicionales, capaces de reaccionar con las proteínas acarreadoras en aquellas sustancias con grupos hidroxilo disponibles (91). Sin embargo, durante los procedimientos de conjugación cada reactivo acoplante es potencialmente capaz de modificar más de un tipo de residuo y consecuentemente, modificar la estructura espacial de los determinantes antigénicos inmunodominantes, alterando su inmunogenicidad (92). La orientación de un péptido sintético respecto a la proteína acarreadora puede manipularse de acuerdo al método de conjugación utilizando y así modificar la respuesta inmune que se genera (93).

La vacuna de polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b (Hib) conjugado a toxoide diftérico (PRP-TD), que previene meningitis y otras enfermedades sistémicas causadas por esta bacteria, representa el inicio de una nueva generación de vacunas cuyo éxito ha motivado la búsqueda de otras alternativas semejantes para prevenir diferentes enfermedades infecciosas en las que los antígenos (como polisacáridos capsulares) son pobremente inmunogénicos si se aplican purificados o no evocan una

respuesta inmune de memoria al comportarse como antígenos timoindependientes (94,95)

Se pretende desarrollar un inmunógeno de porinas de *S. typhi* conjugadas a toxoide tetánico para inducir actividad divalente específica, de tal manera que no se altere la inmunogenicidad de ambos antígenos y se logre un efecto potenciador en la producción de anticuerpos, que sean protectores contra *S. typhi* y neutralizantes de la toxina tetánica. El toxoide tetánico no solo ha sido utilizado ampliamente como vacuna, sino también ha demostrado ser un excelente potenciador de la respuesta inmune, cuando se une covalentemente a determinantes antigénicos individuales o fracciones polisacáridicas de algunos agentes infecciosos (96,97,98,99). Por ello, se decidió conjugarlo a las porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d, utilizando el método de conjugación del polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b con toxoide diftérico y del polisacárido de *Pneumococcus* 6B con toxoide tetánico, el cual consiste en la utilización de la carbodiimida y el ácido adípico (DHA) como agente espaciador (96,100). Mediante esta tecnología se han generado conjugados estables capaces de inducir respuesta inmune eficiente (99,101,102,103) .

Tener una vacuna divalente contra la fiebre tifoidea y el tétanos representaría diversas ventajas, podría reducir la cantidad de antígeno requerido para inducir una respuesta efectiva para controlar las dos enfermedades. Desde el punto de vista operativo de los programas de vacunación, se disminuiría el costo de aplicación de los productos biológicos, pues se requerirían menor cantidad de materiales y equipo como jeringas, alcohol y elementos para el almacenamiento en refrigeración (104). Además, ya que en una sola visita se recibirían dos inmunógenos, la cobertura de los programas de vacunación sería mayor, al requerirse menor número de contactos entre los destinatarios de los programas preventivos y las instituciones de salud. Por otro lado, como la utilización de ambos inmunógenos tienen un efecto potenciador de la inmunogenicidad, se despertaría una respuesta inmune más eficiente que probablemente disminuiría la necesidad de refuerzos frecuentes. Este efecto potenciador, posiblemente también haría innecesaria la utilización de otros adyuvantes, con la consecuente disminución de los efectos colaterales indeseables, como inflamación local o fiebre.

#### IV. HIPOTESIS.

Al unir covalentemente las porinas con el toxoide tetánico se obtendrá un inmunógeno divalente que inducirá una respuesta inmune específica hacia ambas proteínas, de manera más eficiente que cuando se administran de manera independiente cada uno de estos antígenos.

#### V. OBJETIVOS.

##### GENERAL:

Obtener un inmunógeno divalente que pueda ser usado como vacuna contra la fiebre tifoidea y el tétanos.

##### PARTICULARES:

- a) Conjugar porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d con toxoide tetánico.
- b) Evaluar la inmunogenicidad del conjugado.
- c) Evaluar la capacidad protectora del conjugado.

## VI. MATERIAL Y METODOS.

### 1. OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTIGENOS.

#### 1.1. Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d.

La *S. typhi* 9,12,Vi:d, fue aislada de un paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea, esta cepa bacteriana creció durante 8 hr a 37°C en cultivo agitado a 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A (fosfato dibásico de potasio 7 g/l, fosfato monobásico de potasio 3 g/l, citrato de sodio 0.5 g/l, sulfato de amonio 1 g/l, sulfato de magnesio 0.1 g/l), suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente, las bacterias en fase de crecimiento logarítmico se cosecharon por centrifugación a 1,650 Xg durante 15 min a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido (62). Las bacterias cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento se ajustaron a una densidad óptica de 1.0, en un espectrofotómetro (DU7 Beckman, Ins.) a 660 nm. A la suspensión bacteriana se le adicionó DNAsa y RNAsa (20µg/ml) y 40 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M por cada 10 ml. Posteriormente las células se rompieron sonicándolas (Lab line Ultratip Lab-sonic system sonicator) por períodos de dos min en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. Enseguida se eliminaron las bacterias enteras por centrifugación a 7,000 Xg 15 min. La envoltura celular se separó por ultracentrifugación a 100,000 Xg/30 min a 20°C, la solubilización se realizó en presencia de Tris 10 mM, pH 7.7 con SDS al 2 %, e incubación a 32°C durante 30 min. y ultracentrifugación posterior a 100,000 Xg/30 min. El sedimento fue sometido a una segunda solubilización en las condiciones descritas previamente y la peptidoglicana se obtuvo por ultracentrifugación en el precipitado. Las proteínas unidas a la peptidoglicana se extrajeron incubando la preparación 2 hr a 37°C en Tris 50 mM, SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 40 mM y β-mercaptoetanol al 0.05% pH 7.7. Después de ultracentrifugar a 100,000 Xg/30 min a 25°C, el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 de 80 cm x 2.6 cm (Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 40 ml/hr. Se separó la fracción que eluye inmediatamente después del volumen de exclusión (V<sub>0</sub>) y se midió su absorbancia a 280 nm. La fracción obtenida en el volumen de exclusión (V<sub>0</sub>) fue separada y conservada para su posterior utilización.

## 1.2. Toxoide tetánico.

El toxoide que se utilizó en este trabajo fue donado por el Instituto Nacional de Higiene (Gerencia General de Biológicos y Reactivos, de la Secretaría de Salud). Fue concentrado por ultrafiltración y posteriormente purificado por cromatografía en Sephacryl S-200 en una columna de 68 cm X 2.6 cm (Pharmacia Chemical Co.) a una velocidad de flujo de 40 ml/h, la fracción que eluyó después del volumen de exclusión se recuperó midiendo su absorbancia a 280 nm. Se dializó contra PBS 0.01M pH 7, se concentró y se caracterizó por corrimiento electroforético en SDS-PAGE.

## 2. CONJUGACION DE PORINAS-TOXOIDE TETANICO.

### 2.1. Método de unión por carbodiimida

Con el fin de obtener un conjugado entre porinas de *S. typhi* y toxoide tetánico (Por-TT), se utilizó como agente espaciador el ácido 6-amino-hexanóico (Sigma Chemical Co.) y la dihidrazida del ácido adípico (Sigma Chemical Co.). El procedimiento de conjugación consistió en preparar dos mezclas de reacción, para el toxoide tetánico una con dihirazida del ácido adípico y otra con ácido 6-amino-hexanóico, ambas en proporción 1:6 p/p y se mantuvieron en agitación constante durante una noche. Al mismo tiempo, las porinas se mezclaron con 1-etil-3(3-dimetil amino propil) carbodiimida HCl (EDC) (Sigma Chemical Co.) en proporción 1:10. Posteriormente, se incorporaron las mezclas de porinas con c/u de las mezclas de toxoide en un microambiente ácido pH 5 (logrado con HCl 0.1 N añadido al medio), la reacción se conservó en agitación constante durante 30 min, a temperatura ambiente, al término de las cuales se agregó NaOH 0.1N para lograr un pH 10 con la finalidad de disolver los coloides formados. En seguida esta mezcla se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01 M pH 7.2) durante 72 hr a 40C, al cabo de este tiempo se centrifugó durante 15 min a 3,500 rpm para separar agregados macromoleculares insolubles formados durante la reacción. El sobrenadante se conservó en congelación hasta su caracterización posterior.

### 2.2. Método modificado de unión por carbodiimida.

La reacción de conjugado Por-TT se realizó en un microambiente amortiguado con N-metil imidazol 0.2M pH 6, se mezcló el toxoide tetánico con ácido 6-amino-hexanóico en proporción 1:3 p/p, durante 15 min en agitación constante,

posteriormente se incorporó la mezcla de porinas con EDC (1:3) y se mantuvo en agitación constante por 30 min a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C, la mezcla se dializó contra PBS 0.01M pH 7.2 durante 96 hr y se centrifugó durante 15 min a 3,500 rpm, separando el sobrenadante del precipitado y cuantificando el contenido de proteínas por el método de Lowry (106), la conjugación fue monitoreada por corrimiento electroforético en SDS-PAGE y se caracterizaron sus propiedades antigénicas por ELISA, transferencia a papel de nitrocelulosa e inmunoprecipitación en geles de agarosa.

### 2.3. Método de unión por glutaraldehído.

La reacción de conjugación de porinas con toxoide tetánico se realizó según el método descrito por Zegers (105). El toxoide tetánico se dializó durante 16 hr a 4°C, contra una solución de PBS 0.01 M con 1% de glutaraldehído y posteriormente contra PBS 0.01M, se formó un derivado toxoide-glutaraldehído que se mezcló con porinas y se mantuvo en agitación constante durante 16 hr a 4°C, para formar un conjugado toxoide-glutaraldehído-porinas, los grupos activos libres de glutaraldehído que quedaron sin conjugarse se bloquearon con lisina durante 2 hr, los productos obtenidos se conservaron en congelación hasta su uso.

### 2.4. Selección del conjugado para evaluar inmunogenicidad en ratones.

Al existir varias alternativas de conjugación fue necesario seleccionar un conjugado Por-TT que conserve la mejor reactividad antigénica específica de porinas y toxoide tetánico, con la finalidad de probar inmunogenicidad en el modelo murino; esto se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos por el método de ELISA utilizando suero de conejo anti-porinas y anti-toxoide tetánico como primer anticuerpo e IgG de cabra anti conejo unido a peroxidasa (Pel-Freez Biologicals) como segundo anticuerpo. De igual forma se estimó reactividad antigénica divalente de conjugados realizados en diferente proporción molar de porinas respecto a toxoide tetánico (1:3; 1:10; 1:48) y se comparó, la influencia del uso de moléculas espaciadoras en las propiedades antigénicas específicas de los conjugados: Por-TT con ácido 6-amino-hexanóico como molécula espaciadora; Por-TT/sin molécula espaciadora.

## 3. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

La determinación del contenido de proteínas en las preparaciones de porinas se realizó de acuerdo al método de Lowry

(106) que consiste en hacer reaccionar a las proteínas con el cobre en medio alcalino, formando un complejo colorido, cuya intensidad se debe a una combinación del reactivo de Biuret y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfowolfrámico por la tirosina y el triptófano. Como proteína de referencia se empleó albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co).

#### 4. CARACTERIZACION DE LOS CONJUGADOS.

##### 4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó utilizando la unidad de electroforesis vertical del sistema Midget (LKB 2050-001) con geles de 10 x 8 cm, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), en condiciones reductoras y en un sistema de amortiguador discontinuo, según la técnica descrita por Laemmli (107). El gel introductor contenía una concentración final de 5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en Tris HCl 0.125 M, pH 6.8; el gel separador se preparó con concentraciones de 7.5 y 10% de acrilamida, 0.8% de bisacrilamida, 10 % de SDS en Tris-HCl 0.35 M , pH 8.8. Previo al análisis electroforético, las muestras de proteínas se mezclaron con amortiguador de muestra (Tris 0.125 M pH 6.8, SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%) 1:1, se calentaron a 96°C durante 5 min y se procedió al corrimiento electroforético a 15 mA por placa durante 3 hr a una temperatura de 10°C, empleando como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1% pH 8.3. Concluida la electroforesis, los geles se fijaron durante 30 min y se tiñeron durante una hora con azul de Coomassie R 250 al 0.25% en metanol-ac. acético-agua 45:10:45. El exceso de colorante se eliminó con la solución decolorante (metanol-Ac. acético-agua 5:10:85).

##### 4.2. Inmuno-electrotransferencia.

La electrotransferencia de porinas, toxoide tetánico y conjugado Por-TT de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC) se llevó a cabo durante 1.15 hr a 500 mA (Transphor, LKB Ins.). Se empleó como amortiguador para la transferencia glicina 192 mM, metanol al 20% en Tris 20 mM pH 8.3, según la técnica de Towbin (108). Transcurrido este tiempo y para comprobar la transferencia, el PNC se tiñó con rojo de Ponceau al 0.1% en agua. Después de lavar con PBS-Tween 0.1% hasta que desaparecieron las bandas, el papel se introdujo en solución de bloqueo (leche descremada 1.5% en PBS 0.01M NaCl 0.15 M pH 7.2) durante 2 hr a 37°C. Después de 4 lavados con PBS-Tween 20 al 0.1%, el PNC se incubó 3 hr a temperatura ambiente con suero de conejo anti-porinas y anti-toxoide tetánico respectivamente; se

lavó 4 veces con PBS-Tween y se incubó 1.5 hr a temperatura ambiente con la dilución óptima de antisuero de cabra conjugado a peroxidasa IgG (H+L) (Pel-Freez Biological División). Transcurrido este tiempo, se lavó dos veces con PBS-T y 2 veces con PBS para finalmente colocarlo durante 20 min. en la solución del substrato (4-cloro-2-naftol 2 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.08 % en PBS), eliminándose el exceso con agua destilada.

#### **4.3. Electroforesis bidimensional.**

La electroforesis bidimensional para análisis de la preparación de porinas, toxoide tetánico y conjugado Por-TT, se realizó de acuerdo al método descrito por O'Farrell (109). Los geles en primera dimensión se precorrieron durante 15 min. a 200 V, 30 min. a 300 V y 60 min. a 400 V (BRL Life Technologies), después de lo cual fueron colocadas las muestras (0.500 mg/gel) y se aplicó una corriente de 400 V/20 hr y gradiente de pH de 3 a 10. Una vez terminada la corrida, un gel en tubo se colocó horizontalmente sobre la región introductora de un gel para electroforesis vertical previamente preparado y se corrió a 50 V el gel concentrador y a 100 V el gel separador. Finalmente, el gel se sometió a tinción con azul de Coomassie R 250.

#### **4.4. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).**

Se realizó de acuerdo al método originalmente descrito por Engval (110). Placas de microtitulación de 96 pozos (Nunc), fueron sensibilizadas con el conjugado Por-TT, porinas, toxoide tetánico en una concentración de 0.25 µg/pozo en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.4, durante una noche a 4°C, después de lavarlos fueron saturadas con una solución de PBS-leche descremada al 2% durante 1.30 hr a 37°C, se lavaron e incubaron con diluciones de suero 1:100 en PBS-leche descremada, por 1.30 hr a 37°C, los pozos fueron lavados cinco veces con PBS 0.01M pH 7.4 conteniendo 0.1% de tween 20. Se usó como segundo anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa, que se incubó por 1 hr a 37°C, después del lavado se añadió el substrato con OPD, la coloración fue desarrollada por 15 min y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA, los títulos fueron definidos como la más alta dilución de suero dando la absorbancia de 1 ó mayor de 1, el control negativo usado fue suero de ratones no inmunizados (la especificidad de unión fue calculada en cada caso, por incubación de un exceso de antígeno soluble con el antisuero diluido).

#### 4.5. Inmunoprecipitación en geles de agarosa.

Se realizó de acuerdo a la técnica de doble difusión descrita por Ouchterlony (111), las placas de vidrio de 7.5 x 5 cm fueron cubiertas con 13 ml de solución de agarosa al 1.5 % en SSF, se hicieron horadaciones en el gel solidificado con una distancia de 7.5 mm de centro a centro. Para investigar la capacidad antigénica del conjugado obtenido, se colocó la solución de conjugado Por-TT en el pozo central y suero de conejo anti-porinas y anti-toxoide en pozos periféricos, las placas se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante dos hr y a 4°C durante 24 hr. Posteriormente, las placas fueron colocadas en SSF durante 72 hr para lavar, con cambios frecuentes de solución y finalmente con agua destilada, el exceso de humedad fue absorbido con papel filtro. Las placas fueron secadas en horno a 50°C durante 4 hr hasta su total deshidratación, posteriormente se tiñeron (3-5 min) con azul de Coomassie brillante (Sigma Chemical Co) 2 gr (0.5%), en (180:40:180) etanol, ácido acético, agua destilada y desteñidas con solución etanol-ácido acético-agua 180:40:180.

#### 5. INMUNOGENICIDAD DE LOS CONJUGADOS.

##### 5.1. Esquema de inmunización para ratones C3HeB/FeJ.

Grupos de ratones machos C3HeB/FeJ de 14 a 17 g de peso se inmunizaron con 30 µg de porinas, toxoide tetánico y conjugado Por-TT respectivamente, sin adyuvantes, los días 0, 14, y 28 por vía i.p. y fueron sangrados vía seno retroorbitario, los días 0, 7, 20, 48, 96, y 120, los sueros fueron conservados en congelación a -70°C hasta su uso.

##### 5.2. Esquema de inmunización para conejos.

Conejos machos Nueva Zelanda de 2 kg de peso fueron inmunizados con 1 µg de antígeno en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea los días 0, 7, 14 y 21, el día 28 se obtuvo sangre por punción cardíaca, los sueros fueron conservados en congelación a -70°C hasta su uso.

##### 5.3. Esquema de inmunización para cobayos.

Grupos de cobayos machos de 250-350 kg de peso se inmunizaron con los diferentes inmunógenos a una concentración de 100 µg/ml en solución salina fisiológica (SSF), administrados por vía subcutánea, de acuerdo a los siguientes esquemas:

### Esquema No. 1

No de cobayos	Inmunógeno	Dosis 100µg/ml
10	Toxoide tetánico	0.75 ml
5	Prinas	0.75 ml
5	TT-Porinas	0.75 ml
5	Testigo	---

Se aplicó una dosis única el día 0. Los cobayos se sangraron por punción cardíaca el día 15.

### Esquema No. 2

No de cobayos	Inmunógeno	Dosis 100µg/ml
10*	Toxoide tetánico	0.15 ml
5	Prinas	0.15 ml
5	TT-Porinas	0.15 ml
5	Testigo	---

Se aplicaron dos dosis una el día 0 y otra el día 15, estos cobayos fueron sangrados el día 30 por punción cardíaca, los sueros fueron separados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

\*5 cobayos recibieron una primera dosis de toxoide tetánico y una segunda dosis de conjugado Por-TT.

## 6. ENSAYOS DE PROTECCION.

### 6.1. Determinación de dosis letal media.

Los cultivos bacterianos cosechados en la fase logarítmica de crecimiento se ajustaron a una concentración de  $10^9$  bacterias/ml (D.O. 0.6 a 540 nm). A partir de esta suspensión, empleando un

factor de dilución constante, se prepararon las siguientes concentraciones:

*Salmonella typhi* 9,12,Vi:d

-----

500 000 bact/ml

100 000

20 000

4 000

0.5 ml de las bacterias suspendidas en mucina (mucina gástrica de cerdo Sigma Chemical Co.) al 5% en SSF se inocularon por vía i.p. a grupos de 10 ratones C3HeB/eFJ de 18 a 20 gr de peso. Como grupo testigo se emplearon ratones inyectados con 0.5 ml de mucina.

La sobrevivencia de 9,12,Vi:d se registró tres y diez días después de la administración del inóculo bacteriano. La DL<sub>50</sub> se determinó de acuerdo al método de Reed y Muench (112), según la siguiente fórmula:

$\log DL_{50} = \log \text{dil} < 50\% - (\text{D.P.}) \times \log \text{factor de dilución.}$

Donde:  $\log \text{dil} < 50\%$  = logaritmo de la dilución inmediata inferior a la dilución que mata el 50 % de la población.

D.P. (distancia proporcional) = 
$$\frac{50\% - <50\%}{>50\% - <50\%}$$

50% = dilución de la concentración que mata al 50% de la población

<50% = dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50 % de la población

>50% = dilución inmediata superior a la dilución que mata al 50% de la población.

6.2. Protección activa con porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d, toxoide tetánico y conjugado Por-TT.

Para evaluar la capacidad de los inmunógenos de porinas, conjugado Por-TT de inducir inmunidad activa en el modelo murino por el desafío vía i.p. (113), se emplearon grupos de 6 ratones C3HeB/eFJ, inmunizados de acuerdo a lo indicado en párrafos anteriores y retados el día 120 con 1,000 DL<sub>50</sub> de *S typhi* 9,12,Vi:d resuspendidas en mucina al 5% en SSF. Los grupos testigos fueron ratones inmunizados con mucina al 5% en SSF. El grado de protección se evaluó como la sobrevivencia a los 10 días del reto.

6.3. Neutralización de toxina tetánica.

Los sueros de los cobayos inmunizados según el esquema descrito anteriormente, fueron utilizados para titular el contenido de anticuerpos neutralizantes de toxina tetánica, según el método de Ipsen descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (114), para ello se utilizaron dos series de ratones NIH de 16 a 18 g de peso, a cada uno de 6 ratones se les administró subcutáneamente 0.5 ml de cada una de las seis mezclas preparadas de manera que la dosis inyectada contenía 0.25, 0.04, 0.0062, 0.001, 0.00156 y 0.000025 ml de suero problema combinado con 1 L+/400/50 del lote de toxina INH LTP211, es decir con la cantidad mínima de toxina que mezclada con 0.0025 UIA (1/400 de UIA) mata al 50% de los animales 4 1/2 días después de la inyección. Con el fin de corregir la variabilidad inherente a la sensibilidad de los ratones a la toxina, se preparó una serie de testigos paralela a la serie de prueba, inyectando subcutáneamente, en grupos de 3 ratones cada uno, 0.5 ml de una serie de 5 mezclas preparadas en tal forma que la dosis inyectada contenía 0.0035, 0.0025, 0.00175, 0.00125 y 0.0009 UIA mezcladas con 1L+/400/50 de toxina. Los ratones inyectados fueron observados durante 5 días y se registraron tanto los ratones muertos como los sobrevivientes con signos de tétanos y se calculó la concentración del suero problema en unidades internacionales de antitoxina (UIA/ml).

#### VIII. RESULTADOS

Para sintetizar el inmunógeno divalente de porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d, con el toxoide tetánico; las porinas se obtuvieron a partir del cultivo masivo de la bacteria, según el método descrito por Nikaido (62) y el toxoide tetánico por obsequio del INH, GGBR de la SSA. Ambos componentes se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en columnas de Sephacryl S-200 y se caracterizaron mediante SDS-PAGE 10% (Figuras No. 1 y No. 2).

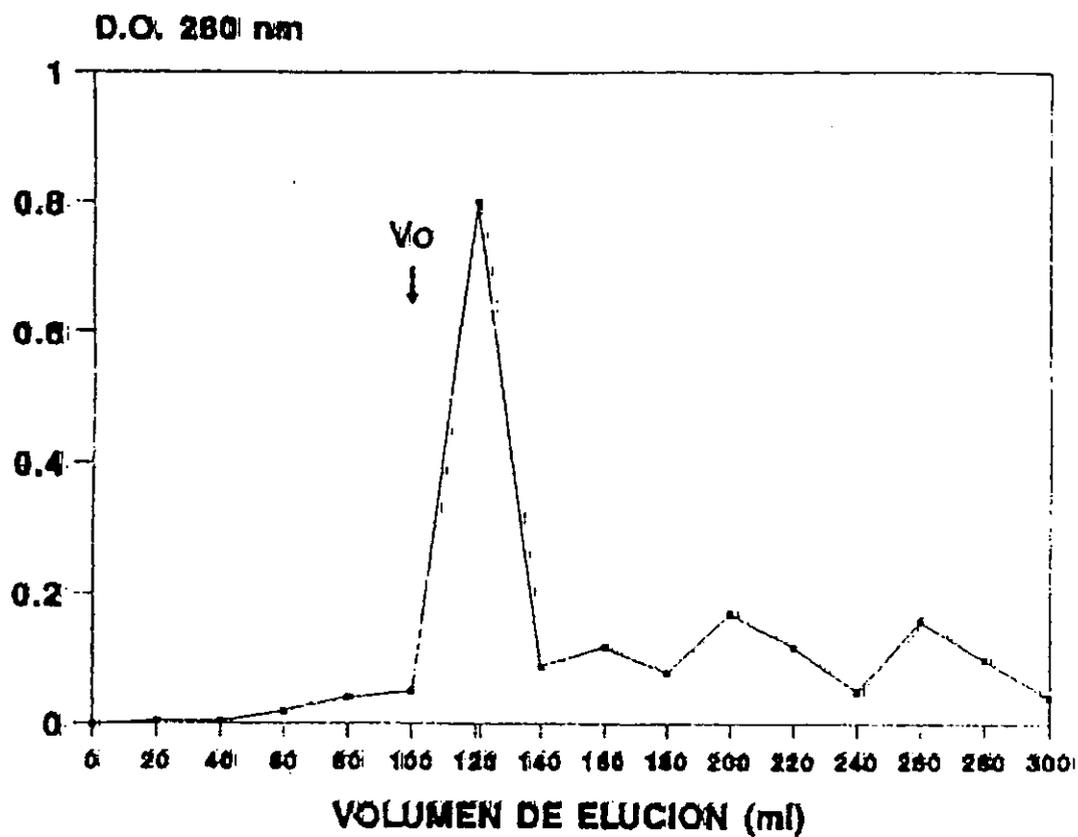


Figura No. 1. Purificación y caracterización de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d

Perfil cromatográfico de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, obtenido por elución de la columna de Sephacryl S-200. La fracción que eluye inmediatamente después del volumen vacío corresponde a las porinas en forma de trimeros (114-123 KDa).

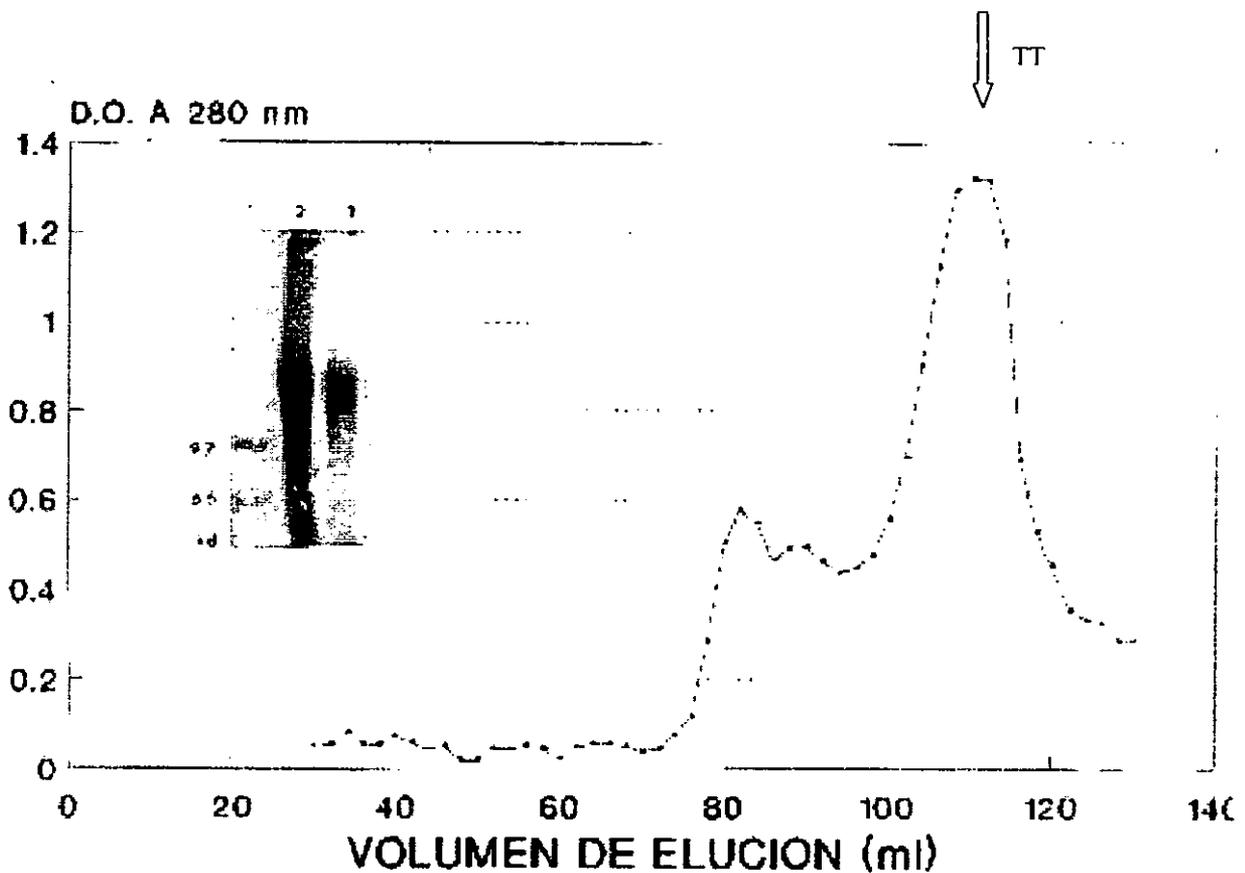


Figura No. 2. Purificación y caracterización de toxoide tetánico.

Perfil cromatográfico de purificación de toxoide tetánico, por cromatografía de exclusión molecular, en Sephacryl S-200. El pico de elución mejor definido, después del volumen vacío, corresponde al toxoide tetánico, de peso molecular aproximado a 150 Kda. El patrón de migración electroforética en el gel de poliacrilamida SDS 10 % muestra en el carril 1, marcadores de peso molecular, carril 2.- el toxoide tetánico sin purificar, en el carril 3.- muestra una banda de migración para el toxoide tetánico purificado, en el rango que involucra el peso molecular reportado para el toxoide tetánico de 150 KDa.

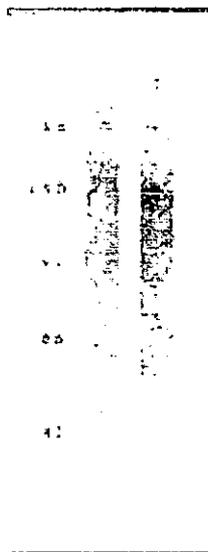


Figura No. 3. Patrón electroforético de porinas y toxoide tetánico libres.

La mezcla de porinas y toxoide tetánico, no forma agregados macromoleculares, según el patrón de migración electroforética en SDS-PAGE 10 %. Después de 72 hr de haberse conservado en refrigeración. Carril 1.- marcadores de peso molecular, carril 2.- mezcla de porinas y toxoide tetánico.

Con estas proteínas purificadas se ensayaron tres métodos de conjugación, el método de la carbodiimida (117), del glutaraldehído (105), y de la carbodiimida modificado (119). Mediante SDS-PAGE al 10% se demostró que la mezcla sencilla de porinas y toxoide tetánico no forma agregados macromoleculares (Figura No. 3).

Para comparar los cambios en la migración electroforética de los conjugados, se elaboraron conjugados de acuerdo al método de la carbodiimida, entre albúmina sérica bovina (ASB) y toxoide tetánico (ASB-TT), así como ASB y lizosima (ASB-Liz) y se caracterizaron por SDS-PAGE. El producto de la conjugación ASB-TT mostró la presencia de tres bandas de diferente peso molecular (PM) correspondientes a ASB y toxoide tetánico libres y a un componente macromolecular que no migró en el gel separador y que corresponde al conjugado ASB-TT (Figura No. 4).

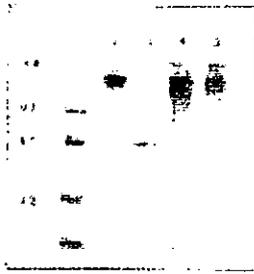


Figura No. 4. Patrón electroforético de un conjugado testigo.

El conjugado testigo ASB-TT, es identificado en el gel de poliacrilamida como un agregado macromolecular de alto peso molecular, no migratorio en las condiciones de este corrimiento, así mismo, se identifican bandas correspondientes a ASB y toxoide tetánico libres, en el mismo producto de conjugación.; carriles 1.- marcadores de peso molecular; 2.- IgG, como referencia de peso molecular de 150 KDa; 3.- albúmina libre (ASB); 4.- toxoide tetánico; 5.- conjugado ASB-TT.

El conjugado ASB-Liz dio resultados semejantes (no se muestran). De acuerdo a esta referencia se corrieron en un mismo gel los conjugados ASB-Liz y Por-TT obtenidos tanto por el método de la carbodiimida, como por el de glutaraldehído (Figura No. 5). Los patrones electroforéticos muestran para el testigo ASB-Liz, la formación de un complejos macromoleculares con características no migratorias y un componente de 80 KDa, que corresponde al producto de la unión de albúmina (66 KDa) y lizosima (14 KDa).

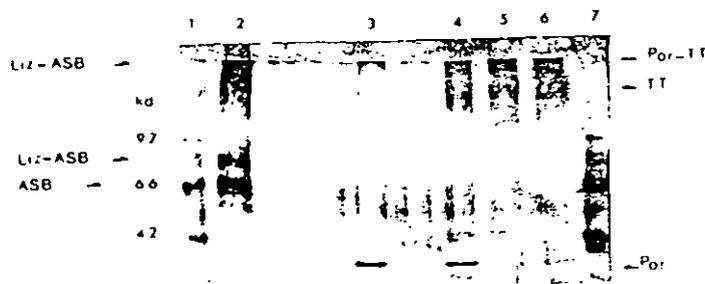


Figura No. 5. Comparación de la eficacia en la formación de conjugados Porinas-toxoide tetánico.

El método de conjugación por glutaraldehído no parece ser efectivo para acoplar las porinas al toxoide tetánico, en comparación con el método de unión por carbodiimida. La caracterización se realizó por SDS-PAGE 10 %. Carriles: 1 y 7.- marcadores de peso molecular; 2.- testigo de conjugación ASB-Liz; 3.- Por-TT (glutaraldehído), notándose la presencia de porinas libres, 4.- Mezcla de Por-TT, 5 y 6.- Por-TT (carbodiimida),

El producto de la conjugación Por-TT obtenido por el método de glutaraldehído mostró un complejo macromolecular, así como la presencia de una banda bien definida de 34 KDa, que corresponde a porinas libres. Estos resultados sugieren que por este método no se llevó a efecto una unión química eficiente entre porinas y toxoide tetánico, por lo tanto, se descartó su evaluación inmunológica. El producto de la conjugación Por-TT obtenido por el método de carbodiimida mostró la presencia de un complejo macromolecular no migratorio sin la presencia de una banda que sugiriera porinas libres. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron del todo exitosos, debido a que las condiciones de reacción para obtener el conjugado Por-TT propiciaron la insolubilización de los reactantes y productos, disminuyendo la recuperación del conjugado en forma soluble. Por lo tanto, fué necesario modificar el procedimiento de conjugación por carbodiimida, cambiando el microambiente de reacción, por una solución amortiguadora de citratos o N-metilimidazol a un pH 6, diferente del punto isoeléctrico de las porinas, para evitar su insolubilización y la formación de los compuestos intermediarios de la reacción (acilurea), por la presencia del N-metilimidazol (119). Los resultados obtenidos con esta modificación se presentan en la Figura No. 6.

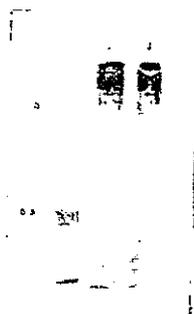


Figura No. 6. Resultados de conjugación por el método de carbodiimida modificado.

Cambiar las condiciones de reacción a un microambiente y un pH diferente permitió un alto grado de conjugación y de recuperación de Por-TT. Se muestra el patrón de migración electroforética carriles: 1.- marcadores de peso molecular; 2 y 3.- conjugado Por-TT.

Una vez eliminados los productos insolubles de la reacción de conjugación, se observa mejor resolución en el patrón electroforético y mayor concentración de proteínas en solución. La

unión covalente entre los productos de conjugación se determinó de manera indirecta por el monitoreo del cambio de migración electroforética en SDS-PAGE, debido al aumento aparente en el peso molecular del producto y por el cambio en el punto isoeléctrico del conjugado en isoelectroenfoque. Para verificar la presencia de agregados de unión sólida en el conjugado, las proteínas se separaron por electroforesis bidimensional, los resultados obtenidos mostraron que los productos de la conjugación son dos moléculas de diferente peso molecular pero igual punto isoeléctrico en relación al de las porinas y toxoide tetánico libres (Figura No. 7).



Figura No. 7. Patrón de electroforésis bidimensional.

El conjugado Por-TT, esta caracterizado por dos macromoléculas: una de difícil migración y otra de peso molecular comprendido entre 100-160 KDa, ambas con el mismo punto isoeléctrico, comprendido entre 5-6. En esta figura el conjugado se localiza en la región ácida; en el carril 2, los marcadores de peso molecular.

Para determinar si el conjugado obtenido conservó sus propiedades antigénicas específicas después de la unión química, se realizaron ensayos de doble inmunodifusión en geles de agarosa, empleando sueros de conejo anti-porinas y anti-TT. Se observaron los patrones de identidad parcial esperados que indican la presencia de determinantes antigénicos en el conjugado comunes para ambos sueros, generado por la posible unión covalente entre las porinas y el toxoide tetánico; también se observaron patrones de no identidad, sugiriendo una actividad divalente en el conjugado (Figura No. 8).

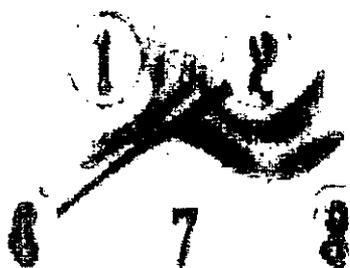


Figura No. 8. Doble inmunodifusión para determinar la identidad del conjugado Porinas-Toxoide tetánico. En el pozo del centro se aplicó el conjugado Porinas-Toxoide tetánico (7). El pozo 1.- contiene suero de conejo anti-toxoide tetánico, 2.-suero de conejo anti-porinas, 3.-porinas de *Salmonella typhi*, 4.- Suero normal de conejo. Se observa identidad parcial entre los pozos 1, 7 y 2.

A partir de una concentración molar fija de toxoide tetánico se realizaron conjugados con concentraciones variables de porinas, para obtener productos con diferente grado de sustitución (1:3, 1:10, 1:48). La reactividad antigénica divalente específica de estos conjugados se hizo con sueros de conejos anti-Por y anti-TT, y como segundo anticuerpo IgG de cabra anti conejo unido a peroxidasa (Pel-Freez Biologicals). Se encontró que la proporción de porinas unidas al toxoide tetánico parece tener influencia en la reactividad antigénica del conjugado, pues mientras una mayor cantidad de porinas unidas a la molécula acarreadora no aumenta los valores de D.O. cuando se hace reaccionar con su anticuerpo homólogo, sí modifica la reactividad del toxoide tetánico; la formulación 1:3, mostró la mejor reactividad divalente y por ello se decidió utilizarlo en los ensayos posteriores (Figura No. 9).

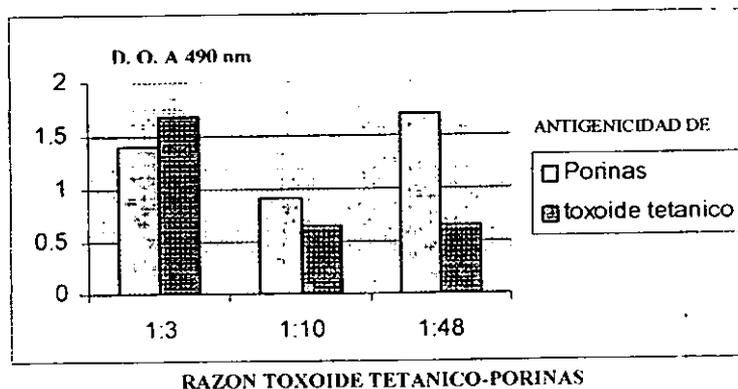
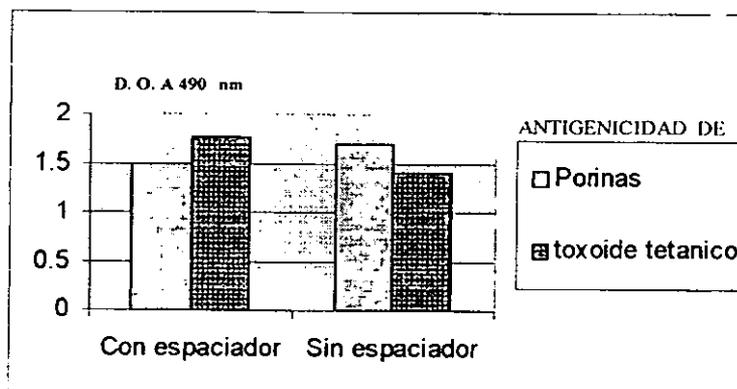


Figura No. 9. Antigenicidad de conjugados Porinas-toxoide tetánico. Se elaboraron conjugados Porinas-toxoide tetánico a diferentes relaciones molares toxoide tetánico:porinas (1:3,1:10 y 1:48). Con los conjugados obtenidos se sensibilizaron placas de microtitulación (25 g/pozo) y la antigenicidad se comparó mediante el método de ELISA, revelando con anticuerpos de conejo anti-porinas o anti-toxoide tetánico.

De manera semejante se determinó la posible influencia del uso de espaciadores en el comportamiento antigénico del conjugado. Por ELISA se determinó que al utilizar la molécula espaciadora, no existe modificación en la reactividad de los conjugados con sus anticuerpos homólogos, por lo tanto se seleccionó el conjugado formulado 1:3 con molécula espaciadora (Figura No. 10).



TIPO DE CONJUGADO TOXOIDE TETANICO-PORINAS

Figura No. 10. Efecto de la inclusión de moléculas espaciadoras en la antigenicidad de los conjugados Porinas-toxoide tetánico. Se elaboraron conjugados Porinas-toxoide tetánico, sin molécula espaciadora y utilizando ácido 6 amino-hexanóico como espaciador. Con los conjugados obtenidos se sensibilizaron plácas de microtitulación (25µg/pozo) y se determinó la antigenicidad por ELISA, revelando con anticuerpos de conejo contra porinas o toxoide tetánico.

La inmunogenicidad del conjugado se evaluó en ratones de la cepa C3HeB/FeJ. Para ello, grupos de ratones fueron inmunizados vía i.p. con dos dosis 30 µg/ml c/u de antígeno sin adyuvante, los días 0, 7. Los títulos de anticuerpos contra porinas se determinaron por ELISA los días 0, 7, 20, 48, 96 y 120. Los títulos de anticuerpos inducidos por el conjugado Por-TT fueron mayores, en comparación con aquellos obtenidos mediante inmunización con las porinas libres. Los sueros de los ratones inmunizados con el conjugado reconocieron al conjugado así como a

las porinas y el toxoide tetánico libres. El incremento de anticuerpos comenzó el día 8, alcanzando su máximo al día 20 posterior a la segunda inmunización, con una ulterior disminución el día 49, pero con anticuerpos detectables hasta el día 120 (Figura No. 11).

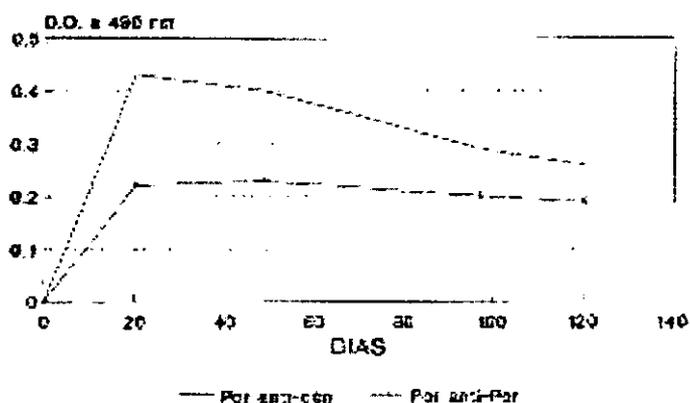


Figura No. 11. Evaluación de la respuesta inmune humoral. Las porinas conjugadas a Toxoide tetánico inducen mayor respuesta de anticuerpos que las porinas libres administradas a una dosis subóptima. Se inmunizaron ratones C3HeB/FeJ de acuerdo al esquema descrito en materiales y métodos y se determinó el título de anticuerpos antiporinas por ELISA. La figura presenta  $\Delta$ D.O. respecto al suero preinmune.

Para evaluar la capacidad protectora del conjugado se utilizó el esquema de inmunización descrito en el experimento anterior, los ratones fueron desafiados con 1,000 DL50 de *S. typhi* 9,12,Vi:d, vía i.p. el día 120. Los resultados mostraron que los ratones inmunizados con el conjugado Por-TT fueron más resistentes al desafío, en comparación con los inmunizados con las porinas libres, pues el porcentaje de sobrevivencia fue de 67%, para el grupo inmunizado con el conjugado y de 30% para el de las porinas libres (tabla No. 12).

PREPARACION UTILIZADA PARA INMUNIZAR	SOBREVIDA (%)
PORINAS SOLUBLES	30
PORINAS CONJUGADAS A TOXOIDE TETANICO	67
TOXOIDE TETANICO	20
SOLUCION SALINA	0
TESTIGO NO RETADO	100

Tabla No. 12. Evaluación de la respuesta inmune protectora. Las porinas conjugadas confieren mayor protección que una dosis subóptima de porinas. Grupos de ratones C3HeB/FeJ se inmunizaron de acuerdo al esquema descrito en materiales y métodos y se retaron con 1,000 DL<sub>50</sub> de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. El cuadro presenta la sobrevida de los ratones.

La capacidad del conjugado para inducir anticuerpos neutralizantes de la toxina tetánica se determinó de acuerdo método propuesto por Ipsen (114). A seis ratones NIH se les administró subcutáneamente 0.25, 0.04, 0.0062, 0.001, 0.00156 y 0.000025 ml de suero de cobayo (obtenido como producto de la inmunización para cobayos descrita en los esquemas anteriores) combinado con 1 L+/400/50 del lote de toxina INH LTP211, es decir con la cantidad mínima de toxina que mezclada con 0.0025 UIA (1/400 de UIA) mata al 50% de los animales 4 1/2 días después de la inyección. Los resultados obtenidos indicaron que el conjugado es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes de la toxina tetánica, estimados en UI/ml, con valor superior a lo mínimo aceptable (tabla No. 13).

PREPARACION UTILIZADA PARA INMUNIZAR	TITULO DE ANTICUERPOS ANTITOXINA TETANICA (UIA/ml)	
	ESQUEMA DE UNA DOSIS	ESQUEMA DE DOS DOSIS
TT Y CONJUGADO PORINAS TOXOIDE TETANICO	N. D.	11.22
CONJUGADO PORINAS TOXOIDE TETANICO	1.011	5.17
TOXOIDE TETANICO	0.217	9.88
PORINAS SOLUBLES	0	0

Tabla No. 13. Inducción de anticuerpos neutralizantes de la toxina tetánica. Se inmunizaron cobayos con toxoide tetánico o con el conjugado Porinas-Toxoide tetánico de acuerdo a los esquemas que se describen en materiales y métodos. Se obtuvo suero y se mezcló con toxina tetánica. La mezcla se transfirió a ratones NIH y se determinó la sobrevivencia de los ratones. Los resultados están expresados en Unidades Neutralizantes Internacionales por ml (UIA/ml)

Con las evidencias anteriores, se comprobó que el conjugado Por-TT es potencialmente más inmunogénico que las porinas libres y confiere protección específica y es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes de toxina tetánica, por lo que, se considera como un inmunógeno divalente, que podría ser usado como vacuna contra la fiebre tifoidea y como un refuerzo, para inducir anticuerpos neutralizantes de toxina tetánica.

## VIII. DISCUSSION

## VIII. DISCUSION.

En la actualidad existen evidencias de que la respuesta humoral a *S.typhi* ha sido importante para conferir inmunidad protectora contra la fiebre tifoidea de acuerdo a los reportes de protección obtenidos con el empleo de vacunas de células muertas o atenuadas y de componentes purificados del parásito tales como el antígeno Vi.

En la mayoría de las situaciones que se utilizan subunidades inmunogénicas se recurre al uso de adyuvantes, con el fin de generar una respuesta apropiada de inmunidad protectora, debido a que estas substancias o componentes adyuvantes están ligadas a la capacidad de estimular subpoblaciones de células T, las cuales controlan las principales características de la respuesta inmune específica, por lo tanto no es difícil suponer que si el efecto del adyuvante deriva de su modo de acción y si las principales fuentes de inmunoadyuvantes son estructuras bacterianas miméticas, éstas pueden ser de utilidad como base de vehículos para antígenos purificados. El unir antígenos purificados a una molécula acarreadora que corresponde a un componente microbiano con propiedades adyuvantes, se da el incremento de inmunogenicidad para el antígeno purificado unido a ella y se genera una respuesta inmune hacia mecanismos mediados por células, como es el caso de las vacunas de polisacáridos que al ser conjugadas a una proteína acarreadora como el TT le confiere un incremento inmunogénico y le adiciona propiedades tímicas dependientes al polisacárido (122,123).

El unir más de un determinante antigénico protector en una proteína acarreadora sin modificar en ambas moléculas los epitopos reactivos por el efecto de conjugación, aumenta la posibilidad de interacción con las células del sistema inmune de manera apropiada y dirigida.

En el presente trabajo se describe la obtención de conjugados de porinas de *S. typhi* con toxoide tetánico mediante tres métodos, glutaraldehído, carbodiimida y carbodiimida modificado. Los conjugados fueron caracterizados electroforéticamente y se encontró que el método más eficiente fue el de carbodiimida modificado, sobre todo por la mejor solubilidad del producto. Los determinantes antigénicos inmunodominantes de las porinas y del toxoide tetánico no parecen ser afectados por el proceso de conjugación, pues los anticuerpos dirigidos contra las proteínas libres reconocen al conjugado, dando como resultado bandas de identidad parcial en doble inmunodifusión. Utilizando el método modificado de la carbodiimida se obtuvieron conjugados con diferentes proporciones de toxoide tetánico-porinas. La proporción de porinas en el conjugado no parece afectar la inmunogenicidad de estas proteínas, sin embargo se encontró que a mayor proporción de

porinas la respuesta hacia el toxoide tetánico es menor. Los conjugados demostraron ser inmunogénicos y generaron una respuesta inmune más eficiente que las proteínas libres. En el experimento que se presenta en la Figura No.11 las porinas solubles no generaron una respuesta inmune eficiente; sin embargo, es importante hacer notar que los esquemas de inmunización y dosis utilizados en este experimento son distintos a aquellos utilizados en experimentos anteriores donde se ha demostrado que las porinas son buenos inmunogénos.

Se decidió utilizar al toxoide tetánico como antígeno para realizar los conjugados con porinas porque el toxoide es inmunogénico y seguro, y la respuesta inmunitaria se puede evaluar. Se ha utilizado con éxito en combinación con otros antígenos y al formar parte de los conjugados, puede potenciar la respuesta de antígenos que son pobremente inmunogénicos. La toxina tetánica es una potente neurotoxina, constituida por una cadena polipeptídica de 150.5 KDa que es sintetizada intracelularmente por *Clostridium tetani* y después de la lisis celular, la toxina es liberada al medio de cultivo, el filtrado de este cultivo contiene la toxina, que es destoxificada por la adición del formaldehído (86).

Durante el proceso de destoxificación, el formaldehído reacciona, no solo con la molécula de toxina, sino también con peptonas y otras proteínas presentes en el medio de cultivo (115,116). El resultado final del tratamiento de la toxina tetánica con formaldehído involucra uniones cruzadas entre grupos (-amino de lisina, histidina, tirosina o triptófano, a través de un puente metileno (-CH<sub>2</sub>-) estable, pudiendo ocurrir reacciones entre los grupos de amino ácidos de la misma molécula de toxina, resultando una reacción de unión cruzada interna de proteínas. Así mismo, las reacciones pueden ocurrir entre dos moléculas de toxina, dando como resultado una dimerización, o bien puede reaccionar un pequeño péptido presente en el medio y una molécula de toxina disminuyendo en el toxoide la cantidad de algunos aminoácidos a consecuencia de la reacción con el formaldehído. Por lo tanto, el proceso de destoxificación crea una población de moléculas extremadamente heterogéneas. Por ello, para conjugarse al toxoide tetánico con las porinas fue necesario primeramente purificarlo mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200. Por cada molécula de toxoide tetánico (150Kd) se determina el equivalente a 48 grupos amino, disponibles para acoplarse. Este valor a sido determinado por el 2,4-dinitrophenyl, según el método de Sanger revisado por Needleman, 1970 (128)

En el presente trabajo la carbodiimida demostró ser el mejor agente acoplante. Este es un reactivo heterobifuncional dependiente principalmente de grupos amino y carboxilo (117). En comparación con otros procedimientos de conjugación, la reacción con carbodiimida presenta las siguientes ventajas: ocurre bajo condiciones muy suaves, puede unir un amplio rango de componentes y permite conjugar directamente proteínas sin intercalar grupos adicionales. La unión postulada entre un hapteno una proteína se realiza a través de un enlace amida. El acoplamiento probablemente se realiza en dos pasos, el primero implica un ataque inicial al residuo carboxílico para la formación de un material básico inestable O-acilurea, que en ausencia de un nucleófilo fuerte y un ambiente ácido, puede producir dos reacciones principales, un rearrreglo para formar N-acilurea o una hidrólisis que regenera el ácido carboxílico. La hidrólisis aparentemente procede a una velocidad menor que el rearrreglo. Por lo tanto, en cada ciclo puede formarse una pequeña cantidad de N-acilurea, pero en presencia de exceso de carbodiimida puede regenerarse el ácido carboxílico y reaccionar con nueva molécula de carbodiimida. Este mecanismo cíclico acumula N-acilurea que también puede formarse en modificaciones previas de proteínas por carbodiimida en ausencia de un nucleófilo agregado. Si se añade al sistema un nucleótido capaz de reaccionar rápidamente con el O-acil-isourea, compite efectivamente con el rearrreglo y dirige la reacción a la formación del conjugado hapteno-proteína (118). Sin embargo, el empleo de carbodiimida en la preparación de conjugados no siempre ha sido exitoso (119), debido probablemente a la presencia de acilurea. En el presente trabajo fue necesario utilizar un método modificado. Se cambiaron las condiciones del acoplamiento con un amortiguador de N-metil imidazol el cual inhibe aparentemente la formación de derivados ó agregados de acilurea, creando así condiciones favorables de acoplamiento (119) entre las porinas (hapteno) y el toxoide (proteína) con propiedades nucleofílicas y dirigiendo la reacción hacia la formación del conjugado deseado Por-TT .

En este trabajo se demuestra que es posible la obtención de un conjugado de toxoide tetánico-porinas de *S. typhi* y en consecuencia la preparación de una vacuna contra tétanos y fiebre tifoidea. Sin embargo, el trabajo tiene también como propósito la evaluación de la factibilidad de conjugar porinas a otras moléculas, pues estas proteínas tienen una estructura terciaria que semeja un barril cuyos aminoácidos, posiblemente reactivos, pueden no estar suficientemente expuestos.

Una posibilidad atractiva es conjugar porinas de *S. typhi* al antígeno Vi. Pues si bien la vacuna elaborada a partir de antígeno Vi tiene ventajas sobre otras vacunas, ya que es bien tolerada, muy estable y no requiere de refrigeración e induce la producción de IgG contra el antígeno Vi en adultos, la vacuna se comporta como un antígeno timo-independiente, débil como inmunógeno en los niños menores de cuatro años y la respuesta de anticuerpos no se refuerza cuando se administran dosis subsecuentes, por lo que se presume que la inmunidad protectora no sea mayor a cinco años (33).

Para aumentar la inmunogenicidad del antígeno Vi es necesario convertirlo a timodependiente. Para ello, se ha intentado su conjugación química con proteínas acarreadoras como son los toxoides tetánico o diftérico (120) y la toxina termolabil (LTB) de *E. coli* o la exoproteína A de *P. aeruginosa* (121) con resultados prometedores, pues además se ha demostrado que otros antígenos, como el polisacárido O incrementan su inmunogenicidad al conjugarse químicamente a proteínas como toxoide tetánico (122) y que las vacunas de conjugados proteína-polisacárido contra microorganismos como *H. influenzae* del grupo b o *S. pneumoniae* (123,124) son muy efectivas e inducen una respuesta inmunitaria en niños (125,126,127). Consecuentemente, el antígeno Vi conjugado a las porinas podría generar una protección mucho más eficiente contra la fiebre tifoidea.

## IX. REFERENCIAS.

1. Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., and Altwegg, M. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends. Microbiol.* 3:253-255, 1995.
2. Cote, T.R., Convery, H., Robinson, D., Ries, A., Barret, T., Frank, L., Furlong, W., Horan, J., and Dwyer, D.J. Typhoid fever in the park: epidemiology of an outbreak at a cultural interphase. *Community Health.* 20:451-458, 1995.
3. Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A., and Musser, J.M. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars causing human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* 58:2262-2275, 1990.
4. Franco, A., González, C., Levine, O., Lagos, R., Hall, R., Hoffman, S., Moechtar, M., Gotuzzo, E., Levine, M., Hone, D., and Morris, G. Further consideration of the clonal nature of *Salmonella typhi*: Evaluation of molecular and clinical characteristics of strains from Indonesia and Peru. *J. Clin. Microbiol.* 30:2187-2190, 1992.
5. Thong, K.L., Passey, M., Clegg, A., Combs, B.G., Yassin, R.M., and Pang, T. Molecular analysis of isolates of *Salmonella typhi* obtained from patients with fatal and non fatal typhoid. *J. Clin. Microbiol.* 34:1029-1033, 1996.
6. Fica, A.E., Prat-Miranda, S., Fernandez-Ricci, A., D'Ottone, K., and Cabello, F.C. Epidemic typhoid in Chile: Analysis by molecular and conventional methods of *Salmonella typhi* strain diversity in epidemic (1977 and 1981) and nonepidemic (1990) years, *J. Clin. Microbiol.* 34:1701-1707, 1996.
7. Uwaydah A.K., Matar, I., Chako, K.C., and Davidson, J.C. The emergence of antimicrobial resistant *Salmonella typhi* in Qatar: epidemiology and therapeutic implications. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:790-792, 1991.
8. Sarkar, A.K., Ganguly, S., and Ganguly, S. Recent outbreak of chloramphenicol resistant typhoid fever in West Bengal. *J. Indian. Med. Assoc.* 89: 257-259, 1991.
9. Daoud, A.S., Zaki, M., Pugh, R.N., al-Mutairi, G., Beseiso, R., and Nassrallah, A.Y. Clinical presentation of enteric fever: its changing pattern in Kuwait. *J. Trop. Med. Hyg.* 94:341-347, 1991.
10. Madan, A., Dhar, A., Kulsherestha, P.P., Laghate, V.D., and Dhar, P. Preliminary observation on drug resistant cases of typhoid fever. *J. Assoc. Physicians India.* 39:449-451, 1991.
11. Agarwal, S., Madhu, S.V., Guleria, J.S., and Talwar, V. The problem of emerging chloramphenicol resistance in typhoid fever. A preliminary report. *J. Assoc. Physicians India.* 39:443-444, 1991.
12. Rowe, B., Ward, L.R., and Threlfall, E.J. Multidrug-resistant *Salmonella typhi*: a worldwide epidemic. *Clin. Infect. Dis.* 24(Suppl1):S106-S109, 1997.
13. Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Unico de Información. 13 (1): Semana 1, 1996.

14. Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Unico de Información. 13(36): Semana 36,1996.
15. Gutierrez, G., Coll, R., Cerda, M.S., y Muñoz, O. IV. Seroepidemiología de la fiebre tifoidea en la República Mexicana. Gac. Med. Mex. 111:97-102, 1976.
16. Magos-López, C., Sánchez-Villareal, F., Gutierrez, G., y Tapia-Conyer, R. Banco Nacional de Sueros. Sal. Pub. de Mex. 34:136-147, 1992.
17. Salyers, A.A., and Whitt, D.D. Salmonella Infections. In: Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. ASM Press. Washington, D.C. pp. 229-243, 1994.
18. González-Ojeda, A., Pérez-Ríos, A., and de la Garza-Villaseñor, L. The surgical complications of typhoid fever: a report of 10 cases. Rev. Gastroenterol. Mex. 56:77-81, 1991.
19. Sein, J., Cachicas, V., Becker, M.I., and De Ioannes, A.E. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. Biol. Res. 26:371-380, 1993.
20. Vidal, S., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gross, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of candidate for bcg. Cell. 73:469-485, 1993.
21. Mastroeni, P., Villareal, R., and Hormaeche, C. Transfer of immunity to oral challenge with virulent *Salmonella* in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. Infect. Immun. 61:3981-3984, 1993.
22. Swanson, R., and O'Brien, A. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: ity gene is expressed in vivo by 24 hours after infection. J. Immunol. 131:3014-3020, 1983.
23. Benjamin, J., Hall, P., Roberts, S., and Briles, D. The primary effect of the ity locus is on the rate of growth of *Salmonella typhimurium* that are relatively protected from killing. J. Immunol. 3443-3451,1990.
24. Vidal, S., Tremblay, M.L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiane, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., and Gros, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. J. Exp. Med. 182:655-666, 1995.
25. Makela, H. Immunization with outer major membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Infect. Immun. 25:857-862, 1979.
26. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V. Characteristics of live vaccines in relations to delayed-type hypersensitivity and protective in murine salmonellosis. Immunology Letters 6:299-302, 1983.
27. Galan, J.E., and Curtiss, R.III. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 86: 6383-6387, 1989.
28. Pegues, D.A., and Miller, S.I. Salmonellosis, including typhoid fever. Curr. Op. Infect. Dis. 7:616-623,1994.
29. Falkow, S. Bacterial entry into eukaryotic cells. Cell. '65:1099-1102, 1991.

30. Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5054-5058, 1989.
31. Wick, M.J., Madara, J.L., Fields, B.N., and Normack, S.J. Molecular cross talk between epithelial cells and pathogenic microorganisms. Cell. 67: 651-659, 1991.
32. Alpuche-Aranda, C.M., Swanson, J.A., Loomis, W.P., and Miller, S.I. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10079-10083, 1992.
33. Levine, M.M. Typhoid fever vaccines. In: Vaccines. Plotkin, S.A., Mortimer, E.A., eds. 2nd ed. W.B. Saunders Co. USA. pp 597-633, 1994.
34. Hoyt, R.E., and Herip, D.S. Severe systemic reactions attributed to the acetone-inactivated parenteral typhoid vaccine. Mil. Med. 161(6):339-341, 1996.
35. Hejfec, L.B. On the negative phase of postvaccination immunity to typhoid with reference to the results of epidemiological studies. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 15:393-401, 1971.
36. Muñiz-Junqueira, M.I., Tavares-Neto, J., Prata, A., and Tosta, C.E. Antibody response to *Salmonella typhi* in human schistosomiasis mansoni. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 29(5):441-445, 1996.
37. Kaistha, J., Sokhey, J., Singh, S., Kumar, S., John, P.C., and Sharma, N.C. Adjuvant effect of DEAE-dextran and tetanus toxoid on whole cell heat inactivated phenol preserved typhoid vaccine. Indian. J. Pathol. Microbiol. 39(4):287-292, 1996.
38. Germanier, R., and Furer E. Isolation and characterization of *S. typhi* galE mutant Ty21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine, J. Infect. Dis. 131: 553-558, 1975.
39. Levine, M.M., Ferreccio, C., Black R.E., the Chilean Typhoid Committee, and Germanier, R. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. Lancet. 1:1049-1052, 1987.
40. Ferreccio, C., Levine, M.M., Rodríguez, H., Contreras, R., and the Chilean Typhoid Committee. Comparative efficacy of two, three, or four doses of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation: A field trial in an endemic area. J. Infect. Dis. 159:766-769, 1989.
41. Levine, M.M., Ferreccio, C., Cryz, S., Ortiz, E. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in a randomized controlled field trial. Lancet. 336:891-894, 1990.
42. Kollaritsch, H., Furer, E., Herzog, C., Widemann, G., Que, W.J.U., and Cryz, S.J. Randomized, double-blind placebo-controlled trial to evaluate the safety and immunogenicity of combined *Salmonella typhi* Ty21a and *Vibrio cholerae* CVD103HgR live oral vaccines. Infect. Immun. 64:1454-1457, 1996.
43. Kollaritsch, H., Que, J.U., Kunz, C., Wiedemann, G., Herzog, C., Cryz, S.J. Jr. Safety and immunogenicity of live oral cholera and typhoid vaccines

administered alone or in combination with antimalarial drugs, oral polio vaccine, or yellow fever vaccine. J. Infect. Dis. 175:871-875,1997.

44. Levine, M.M., Herrington, D., Murphy, J.R., Morris, G., Losonsky, G., Tall, B., Lindenberg, A.A., Svenson, S., Baqar, S., Edwards, M.F., and Stocker, B. Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. J. Clin. Invest. 79:888-902,1987.

45. Hone, D., Harris, A., Chatfield, S., Dougan G., and Levine, M.M. Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. Vaccine 9:810-816, 1991.

46. Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Wasserman, S.S., Nataro, J.P., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S.N., and Levine, M.M. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strain with deletions in htrA and aroC, aroD and immune response in humans. Infect. Immun. 65:452-456,1997.

47. Tacket, C.O., Hone D.M., Curtis, R. III., Kelly, S.M., Losonsky, G., Harris, A.M., Edelman, R., Levine, M.M. Comparison of the safety and immunogenicity of aroC, aroD, and cya, crp *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. Infect. Immun. 60:536-541,1992.

48. Bellanti, J.A., Zeligs, B.J., Vetro, S., Pung, Y.H., Luccioli, S., Malavasic, M.J., Hooke, A.M., Ubertini, T.R., and Nencioni, L. Studies of safety, infectivity and immunogenicity of a new temperature-sensitive (ts) 51-1 strain of *Salmonella typhi* as a new live oral typhoid fever vaccine candidate. Vaccine. 11:587-590,1993.

49. Miller, S.I., Loomis, W.O., Alpuche-Aranda, C., Behlau, I., Hohmann, E. The PhoP virulence regulon and live oral vaccines. Vaccine. 11:122-125, 1993.

50. Hohmann, E.L., Oletta, C.A., and Miller, S.I. Evaluation of a phoP/phoQ-deleted, aroA/ deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers. Vaccine. 14(1)19-24, 1996.

51. González, C., Hone, D., Noriega, F., Tacket, C., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Sztein, M., Heppner, G., Fouts, T.R., Isibasi, A., and Levine, M.M. *Salmonella typhi* strain CVD908 expressing the circumsporozoitic protein of Plasmodium falciparum: Strain construction, safety and immunogenicity in humans. J. Infect. Dis. 169:927-931, 1994.

52. Girón, J.A., Xu, J.G., González, C.R., Hone, D., Kaper, J.B., and Levine, M.M. Simultaneous expression of CFA/I and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* by (aroC, (aroD *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908. Vaccine. 13:939-946, 1995.

53. Gonzalez, C.R., Noriega, F., Huerta, S., Santiago, A., Vega, M., Paniagua, J., Ortiz-Navarrete, V., Isibasi, A., and Levine, M.M. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana*. Vaccine. (En prensa).

54. Robbins, J.D., and Robbins, J.B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide Vi antigen of *Salmonella typhi*. J. Infect. Dis. 150:436-449,1984.

55. Acharya, I.L., Lowe, C.U., Thapa, R., Gurubacharya, V.L., Shrestha, M.B., Cadoz, M., Schultz, D., Armand, J., Bryla, D.A., Trollfors, B., Cramton, T., Scheerson, R., and Robbins, J.B. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*: A preliminary report. N. Eng. J. Med. 317:1101-1104, 1987.
56. Klugman, K.P., Gilbertson, I.T., Koornhof, H.J., Robbins, J.B., Scheerson, R., Schulz, D., Cadoz, M., Armand, J., and The Vaccination Advisory Committee. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. Lancet. 2:1165-1169, 1987.
57. Klugman, K.P., Koornhof, H.J., Robbins, J.B., and Le Cam, N.N. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. Vaccine. 14:435-438, 1996.
58. Buchanan, T.M., Pearce, W.A., Schoolnick, G.K., and Arko, R.J. Protection against infections with *Neisseria* protein complex and purified pilli. J. Infect. Dis. 136(suppl):132-137, 1977.
59. Buchanan, T.M., and Arko, R.J. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs. J. Infect. Dis. 135:879-887, 1977.
60. Kussi, N., Nurmien, M., Saxen, H., and Makela, P.H. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. Infect. Immun. 34:328-332, 1982.
61. Kussi, N., Nurmien, M., Saxen, H., Valtonen, and Makela, P.H. Immunization with outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Infect. Immun. 25:857-862, 1979.
62. Nikaido, H., and Vaara, M. Outer Membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society of Microbiology. Washington, D.C. USA. pp 7-22, 1987.
63. Agüero, J., Mora, G., Mroczenski-Willey, M.J., Fernández-Beros, M.E., Aron, L., and Cabello, F.C. Cloning, expression and characterization of the 36 KDal *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. Microbial. Pathogen. 3:339-407, 1987.
64. Venegas, A., Gómez, I., Zaror, I., and Yudelevivh, A. The nucleotide sequence of *Salmonella typhi* ompC porin gene. Nucleic Acids Res. 16:7721, 1988.
65. Benz, R., and Bauer, K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Eur. J. Biochem. 176:1-19, 1988.
66. Cowan, S.W., Schirmer, G., Rummel, G., et al. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. Nature. 358:727-733, 1992.
67. Bosch, D., Scholten, M., Verhagen, C., and Tommassen, J. The role of the carboxyl terminal membrane-spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K12 outer membrane protein PhoE. Mol. Gen. Genet. 216:144-148, 1989.
68. Struyvé, M., Moons, M., and Tommassen, J. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. J. Mol. Biol. 218:141-148, 1991.

69. Isibasi, A., Ortiz, V., M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J., and Kumate J. 1988., Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9.12,d,Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959, 1988.
70. Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C., García, J.A., and Kumate, J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine* 10:811-813, 1992.
71. Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M., González, C., García, A., Islas, S. y Kumate, J. Anticuerpos monoclonales murinos de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med.* 20:315-320, 1989.
72. Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargaz, M., González, C., and Kumate, J. The role of outer membrane proteins from Gram negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against *S. typhi* porins. In: *Cell function and disease*, Cañedo, Todd and Jaz Eds. Plenum Press, New York.
73. Ortiz, V., Isibasi, A., García-Ortigoza, E., and Kumate, J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 27:1640, 1989.
74. Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C., and Kumate, J. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scan. J. Infectol.* 25:73-80, 1983.
75. Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M, P., Martín, N., Ramírez, G., González, C.R., López-Macias, C., Sánchez, J., Kumate, J., Ortiz-Navarrete, V. Role of Porins from *Salmonella typhi* in the Induction of Protective Immunity. In: *Microbial Pathogenesis and Immune Response*. Ann NY Acad Sci 730:350-353, 1994.
76. Paniagua-Solís J., Sánchez J., Ortiz-Navarrete V., González C.R., Isibasi, A. Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* OmpC peptide loops. *FEMS Microbiol Letters* 141:31-36, 1996.
77. Paniagua, J., Martín, N., Ortiz, V., Ramírez, G., González, C.R., and Isibasi, A. Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. *Immunol. Infect. Dis.* 5:244-249, 1995.
78. López-Macias, C. López-Hernández, M.A., González, C.R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V. Induction of antibodies against *Salmonella typhi* OmpC by naked DNA immunization. *Ann NY Acad Sci.* 772:285-288, 1995.
79. González, C.R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., García, J., Blanco, F., and Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol Immunol* 37:793-799, 1993.
80. González, C.R., Mejía, M.V., Paniagua, J., Ortiz, V., Ramírez, G., and Isibasi, A. Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. *Arch. Med. Res. (Mex).* 26: S99-S103, 1995.

81. Cate, T.R., *Clostridium tetani* (tetanus): In Principles and practice of infectious diseases. Third edition, Mandell GL., Douglas R G, Bennett JE (ed). New York Churchill Livingstone, 1990. pp 1842-1846.
82. Eidel S.L., Proja, R.L., and Hart, D.A. Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.* 47:596-620, 1983.
83. Middlebrook, J.L., Dorland, R.B. Bacterial toxins. Cellular mechanisms of action. *Microbiol. Rev.* 48:199-221, 1984.
84. Bizzini B. Tetanus toxin. *Microbiol. Rev.* 43:224-240, 1979.
85. Bizzini B. Tetanus. In: Bacterial vaccines. Germanier R., ed. New York; Academic Press. pp. 37, 1984.
86. Bizzini, B., et Raynaud, M. La detoxification des toxines proteiques par le formol: mecanismes supposes et nouveaux developpements. *Biochimie* 56:297, 1974.
87. Rappuoli, R. New and Improved Vaccines against Diphtheria and Tetanus. In: New Generation Vaccines. Levine, M. ed. pp. 251-267, 1990.
88. Lanzavechia, A. Ag presentation by B lymphocytes: A critical step in T-B collaboration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 130:65, 1986.
89. Sela, M. Antigenicity: Some Molecular Aspect. *Science.* 166:1365, 1969.
90. Landsteiner, K. The specificity of serologic reactions. Cambridge, MASS: Harvard University Press, 1945.
91. Erlanger, B.F. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies. *Pharmacol. Rev.* 25,2:271, 1973.
92. Briand, J.P., Muller, S., and Van Regenmortel, M.H.V., Synthetic peptides as antigens: Pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods.* 78:59, 1985.
93. Schaaper, W.M.M., Lankhof, H., Puijk, W.C., and Meloen, R.H. Manipulation of antipeptide immune response by varying the coupling of the peptide with the carrier protein. *Molecular Immunol.* 26:81, 1989.
94. Robbins, J.B., and Schneerson R. IDSA Meeting presentations polysaccharide-protein conjugates: A new generation of vaccines; *J. Infect. Dis.* 161:821-832, 1990.
95. Weinberg, G.A., and Granoff, D.M. Medical progress, polysaccharide-protein conjugate vaccines for the prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease; *J. Pediatr.* 113:621-631, 1988.
96. Chu, C.Y., Schneerson, R., Robbins, J.B., and Rastogi, S. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and *Pneumococcal* type A polisaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 40:245-256, 1983.
97. Sharada, S.K., Kaplan, J., Schiffman, G., Bryla, D., Robbins, J.B., and Schneerson, R. Studies on *sPneumococcus* vaccine alone or mixed with DTP and on *Pneumococcus* type 6B and *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates in two to five-years-old children with sickle cell anemia. *Pediatr. Infect. Dis.* 9:181, 1990.

98. Lagergard, T., Shiloach, J., Robbins, J., Schneerson, R. Synthesis and Immunological properties of conjugates composed of Group B Streptococcus type III capsular polysaccharide covalently bound to tetanus toxoid. *Infect. Immun.* 58:687, 1990.
99. Beuvery, E.C., van Rossum, F., and Nagel, J. Comparison of the induction of immunoglobulin M and G antibodies in mice with purified pneumococcal type 3 and meningococcal group C polysaccharides and their protein conjugates. *Infect. Immun.* 37:15-22, 1982.
100. Schneerson, R., Barrera, O., Sutton, A., and Robbins, J.B. Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J. Exp. Med.* 152:361, 1980.
101. Schneerson, R., Chu, C.Y., Ahlstedt, S., Soderstrom, T., Sutton, A., Zon, G., and Robbins, J.B. Protein-polysaccharide conjugate vaccines. In S:H: Sell and P.F.Wright (ed.), *Haemophilus influenzae: epidemiology, immunology, and prevention of disease.* Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1982.
102. Schneerson, R., Robbins, J.B., Barrera, O., Sutton, A., Habig, W.B., Hardegree, M.C., and Chaimovich. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates: model for a new generation of capsular polysaccharide vaccines. In: Next development with human and veterinary vaccines. Alan R. Liss, Inc., New York. 1980.
103. Anderson, P., Insel, R.A., Farsad, P., Smith, D.H., and Petrusick, T. Immunogenicity of "aggregated PRP" "PRP complex" and covalent conjugates of PRP with a diphtheria toxin. S.H. Sell and P.Wright (ed.), *Haemophilus influenzae: Immunology and prevention of disease.* Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York., 1982.
104. Paniagua, J., García, J.A., López, C.R., González, C.R., Isibasi, A., Kumate, J. Vacunas conjugadas contra infecciones bacterianas: Fiebre Tifoidea. *Salud Pública. Méx.* 34:268-273, 1992.
105. Zegers, N., Gerritse, K., Deen, C., Boersma, W., and Claassen, E. An improved conjugation method for controlled covalent coupling of synthetic peptides to proteins using glutaraldehyde in a dialysis method. *J. Immun. Methods.* 130:195, 1990.
106. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R. J. Protein measurement with the folin-phenol-reagent; *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
107. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 27:680, 1970.
108. Towbin, H.T., Staebelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350, 1979.
109. O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins; *J. Biol. Chem.* 250:4007, 1975.
110. Engvall, E., and Perlmann P. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA); *Immunochem.* 8:874, 1971.

111. Ouchterlony O., Handbook of experimental immunology, Weir D.M. (ed), Blackwell Sci. Publ., Oxford & Edinburgh 655-706,1967.
112. Reed, L.J., and Muench, H.A. A simple method of estimating fifty percent end points. Am.J. Hyg. 27:493,1938.
113. Spaun, J. Studies on the influence of the immunization in active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay to typhoid vaccines. Bull WHO. 31:793,1964.
114. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos ed. 1991 p. 1529-1558.
115. Blass, J. Etat actuel de nos connaissances sur le mécanisme de la détoxification par le formol; Biol. Med.; 53:202, 1964.
116. Blass, J., Bizzini, B., et Raynaud M; Etudes sur le mécanisme de la détoxification des toxines protéiques par le formol. Bull Soc. Chim. Fr.10:3957,1967.
117. Goodfriend, T.L., Levine, L., and Fasman, G.D. Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. Science; 144:1344, 1964.
118. Hoare, D.G., and Koshland, D.F.Jr. A method for the quantitative modified and estimation of carboxylic acid group in proteins.; J. Biol. Chemistry; 242:2447,1967.
119. Deen,C., Claassen, E., Gerritse, K., Zegers, N.D., and Boerma, W.J.A. A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides. Enhanced anti-peptide antibody responses. J. Immunol. Methods. 129:119,1990.
120. Szu, S.C., Stone, A.L., Robbins, J.D., Schneerson, R., and Robbins, J.B. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. Preparation, characterization and immunogenicity in laboratory animals. J. Exp. Med. 166:1510-1524,1987.
121. Szu, S.C., Taylor, D.N., Trofa, A.C., Clements, J.D., Shiloach, J., Sadoff, J.C., Bryla, D.A., and Robbins, J.B. Laboratory and preliminary clinical characterization of Vi capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. Infect. Immun. 62:4440-4444,1994.
122. Saxena, M., and Di Fabio, J.L. *Salmonella typhi* O-polysaccharide-tetanus toxoid conjugated vaccine. Vaccine. 12:879-884,1994.
123. Kniskern, P.J., Mamburg, S., and Ellis, R.W. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Pharm. Biotechnol. 6:673-694,1995.
124. Eby, R. Pneumococcal conjugate vaccines. Pharm. Biotechnol. 6:695-718,1995.
125. O'Brien, K.L., Steinhoff, M.C., Edwards, K., Keyserling, H., Thoms, M.L., and Madore, D. Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. Pediatr. Infect. Dis. 15:425-430,1996.
126. Anderson, E.L., Kennedy, D.J., Geldmacher, K.M., Donnelly, J., and Mendelman, P.M. Immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants. J. Pediatr. 128:649-653,1996.

127. Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K., Patridge, S., Chang, S.J., Chiu, C.Y., Ghesling, L.L., Carlone, G.M., and Ward, J.I. Safety and Immunogenicity of a serogroups A/C *Neisseria meningitidis* oligosaccharide-protein conjugate vaccine in young children. A randomized controlled trial. JAMA 275:1499-1503,1996.

128. J.M. Peeters, T.G. Hazendonk, E.C. Beuvery and G.I. Tesser. Comparison of four bifunctional reagents for coupling peptides to proteins and the effect of the three moieties on the immunogenicity of the conjugates. J. Immun. Methods. 120 (1989) 133-143