



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la capacidad inmunogénica y protectora del Factor de Elongación Tu (EF-Tu) contra Salmonella Typhi en un modelo de ratón.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Sofía Bravo Sosa

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Constantino III Roberto López Macías
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Dr. Eduardo Alberto García Zepeda
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México, Diciembre 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 proyecto contó con el apoyo de CONACYT, que otorgó una beca de manutención para la realización de estudios de maestría a Sofia Bravo Sosa, con número de registro (CVU/Becario) 508722.

Agradezco el apoyo otorgado por el Programa de Formación de Investigadores del IMSS, con Folio:2013-003, matrícula 99375580.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi, al Dr. Constantino López Macías, al Dr. Pastelin Palacios y a la Dra. Lourdes Arriaga por su ayuda para el desarrollo del proyecto.

A los estudiantes Marisol Pérez Toledo, Núriban Valero Pacheco, Daniel Isui Aguilar Salvador, Nancy Dionisio Martínez y Miriam Leonardo Reza por su ayuda en la planeación, desarrollo del proyecto y experimentos.

A la Dra. Ingeborg Becker y al personal del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina-UNAM por su ayuda en el cuidado y manejo de los animales de laboratorio utilizados para este proyecto.

Al Dr. Edmundo Calva Mercado y al M. en C. Marcos Fernández Mora, por su colaboración en la obtención de las proteínas utilizadas en este experimento.

A Araceli Hurtado por su ayuda en los aspectos administrativos y de organización en el laboratorio.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres Gabriel y Sofia. Su apoyo incondicional hizo esto posible. Los amo.

A mis hermanos Gabriel y Ana Karen, mis eternos compañeros y sostén. Los amo.

A mis amigos.

Índice

RESUMEN	6
1. MARCO TEÓRICO	8
1.1 SALMONELLA.....	8
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	9
1.3. FIEBRE TIFOIDEA.....	10
1.4. INFECCIÓN POR TYPHI.....	10
1.5. VACUNAS CONTRA <i>SALMONELLA</i>	11
1.6. FACTOR DE ELONGACION TU (EF-TU)	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 OBJETIVO GENERAL	21
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	21
6. MATERIALES	22
6.1 CEPAS BACTERIANAS	22
6.2 ANIMALES DE LABORATORIO	23
6.3 SUEROS DE RATÓN.....	26
7. MÉTODOS	22
7.1 PURIFICACIÓN DE EF-TU DE <i>SALMONELLA</i> TYPHI	22
7.2 ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DOSIS OPTIMA EF-TU.....	23
7.3 ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN	24
7.4 DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA EF-TU POR ELISA..	25
7.5 SUSPENSIÓN BACTERIANA PARA BACTERIEMIA EN RATÓN	26
7.6 DETERMINACIÓN DE DOSIS DE <i>SALMONELLA</i> TYPHI PARA BACTERIEMIA EN RATÓN	26
7.7 DETERMINACIÓN DE CARGA BACTERIANA EN SANGRE, BAZO E HIGADO	27

7.8 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA.....	28
7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 CARACTERÍSTICAS DE LOTE DE EF-TU.....	29
8.2 LA INMUNIZACIÓN CON EF-TU INDUCE ANTICUERPOS IGM E IGG DE MANERA DOSIS-DEPENDIENTE.....	29
8.3 LA INMUNIZACIÓN DE EF-TU CON ADYUVANTE INCREMENTA LOS TÍTULOS DE IGG	31
8.4. LA EF-TU EN COMBINACIÓN CON ALÚMINA Y PORINAS DE S. TYPHI ES CAPAZ DE INDUCIR PROTECCIÓN CONTRA LA BACTEREMIA DE S.TYPHI.....	32
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIONES	36
11. BIBLIOGRAFÍA	37

“Caracterización de la capacidad inmunogénica y protectora
del Factor de Elongación Tu (EF-Tu) contra *Salmonella*
Typhi en un modelo de ratón.”

Resumen

Salmonella enterica es una bacteria intracelular que puede causar infecciones graves en humanos. Se ha estimado que anualmente ocurren alrededor de un millón de muertes alrededor del mundo por infecciones asociadas a *Salmonella*, lo cual convierte a este patógeno en un problema de salud mundial. La serovar Typhi, causa fiebre tifoidea y es causa considerable de morbilidad y mortalidad, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos y en contextos donde la falta de agua limpia y saneamiento inadecuado facilitan que la enfermedad se propague a través de la transmisión fecal-oral. La distribución de estas enfermedades ocurre principalmente en países en vías de desarrollo (Centro y sudamérica, África, Asia), aunque los países en desarrollo tampoco están exentos, ya que con el incremento de viajeros hacia zonas endémicas, el riesgo de que contraigan la enfermedad es mayor. Además, *Salmonella* presenta un aumento progresivo de la resistencia a los antibióticos, lo cual complica el manejo y tratamiento de los pacientes. La fiebre tifoidea es responsable de aproximadamente 21.65 millones de casos anualmente de los cuales ocurren 433,000 muertes al año. En México se han reportado alrededor de 15 mil casos al año de fiebre tifoidea.

Existen diferentes estrategias vacúnales para prevenir la infección por *Salmonella*, sin embargo las disponibles en el mercado ofrecen una protección del 50 a 75% por un periodo de 2 a 5 años, además de que las pruebas diagnóstico disponibles carecen de sensibilidad y especificidad.

Por lo que se hace evidente la necesidad de encontrar antígenos que sean excelentes inmunógenos que induzcan una potente respuesta de anticuerpos de larga duración y que provean mayor protección contra la infección y ayuden a contribuir en el diseño de vacunas contra S.Typhi.

Este es el caso de las proteínas de membrana externa como las porinas, las cuales inducen protección contra S.Typhi.

La superficie de las bacterias tiene un gran número de moléculas con capacidad de modular la respuesta inmune. Las porinas son unas de las proteínas más abundantes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica se identificó que las porinas de *S. Typhi* (OmpC y OmpF) son blanco de la respuesta inmune contra *S. Typhi* en pacientes con fiebre tifoidea durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, y con porinas purificadas se demostró que inducen el 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. Typhi* en ratones.

En Bangladesh ubicado al sur de Asia, se lograron identificar en sueros de pacientes con fiebre tifoidea durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, un gran número de proteínas, entre ellas las porinas, sin embargo, las que llamaron la atención de nuestro grupo de trabajo fue la proteína Factor de elongación-Tu (EF-Tu), ya que en el proceso de obtención de las porinas de *S. Typhi*, se presenta de manera abundante la EF-Tu, la cual también se encuentra en la membrana externa de la bacteria. Y dado que el rendimiento que presenta EF-Tu es mayor en comparación con las porinas y resiste a situaciones de estrés, se propone que podría ser un antígeno candidato para una vacuna, la cual además de ser efectiva, también podría ser más barata y fácil de obtener.

Se espera entonces que con la inmunización de EF-Tu se induzca la producción de anticuerpos y proteja contra la infección bacteriana producida al retar con *S. Typhi* en un modelo murino.

Los resultados indican que la inmunización de EF-Tu si disminuye bacteriemia causada por *S. Typhi* y en combinación con las porinas hay protección contra la infección y se genera una mejor respuesta de anticuerpos IgG_T e IgM.

1. Marco teórico

1.1 *Salmonella*

El género *Salmonella* se clasifica en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, la especie *S. enterica* se clasifica en seis subespecies: *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae*, *S. indica*, *S. salame* y *S. enterica*. (JCICSP 2005). De estas subespecies, sólo *enterica* causa enfermedades en animales de sangre caliente; mientras que el resto se han aislado de animales de sangre fría y raramente de humanos (Agbaje, Begum et al. 2011). De las más de 2500 serovariedades reconocidas dentro de la subespecie *enterica*, sólo 50 de ellas se han identificado como patógenas en humanos o en animales (Uzzau, Brown et al. 2000).

Las bacterias del género *Salmonella* causan un alto índice de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La sintomatología de las enfermedades que estas bacterias generan en humanos permite dividir a las bacterias de este género en dos grupos:

- a) aquellas que causan una infección sistémica, que incluye a los serovares *S. enterica* Typhi (Typhi) y *S. enterica* Paratyphi A, B y C (Paratyphi A, B y C, respectivamente), que generan fiebre tifoidea (FT) y paratifoidea (FPT), respectivamente.
- b) por otro lado se encuentran las que comúnmente generan enfermedades gastrointestinales denominadas salmonelosis no tifoídicas (SNT) que agrupan un gran número de serovariedades, entre las que destacan *S. enterica* Typhimurium (Typhimurium) y *S. enterica* Enteritidis (Enteritidis) como las principales serovariedades aisladas de pacientes diagnosticados con SNT (Galanis, Wong et al. 2006).

1.2. Epidemiología

Las infecciones por *Salmonella* continúan siendo un problema de salud, tanto en países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo. La fiebre tifoidea es responsable de aproximadamente 21.65 millones de casos de los cuales ocurren 433,000 muertes al año en el mundo. Se ha observado que la mayoría de estos casos se presentan con mayor frecuencia en individuos inmunocomprometidos y niños (Ochiai, Acosta et al. 2008).

En 2012 se reportaron en México 54,041 casos de fiebre tifoidea y 32 decesos por fiebre tifoidea (Sistema Único de Información Epidemiológica en México 2013). Sin embargo, estos datos representan un sub registro de la enfermedad, debido a que un gran número de personas tanto en las ciudades como en el campo no consultan al médico y optan por la automedicación y el uso de métodos terapéuticos alternativos. Aunado a esto, los métodos estándar para el diagnóstico de enfermedades causadas por *S. enterica*, son poco sensibles (Parry, Wijedoru et al. 2011).

El tratamiento con antibióticos es común y los pacientes mejoran rápidamente por lo que en la mayoría de los casos no regresan al servicio médico para que se les someta a las pruebas que permitan el correcto diagnóstico de su enfermedad. Esta situación favorece el establecimiento de portadores asintomáticos que mantienen focos infecciosos en la comunidad.

Además se han presentado cepas multiresistentes a antibióticos en los pollos, cerdos y bovinos, que son los reservorios más frecuentes de diferentes serovares de *Salmonella*, siendo estos reservorios un riesgo de salud potencial para la población en general (Zaidi, Macias et al. 2006)

En Asia se encontró que el 25% de las cepas aisladas eran multiresistentes a cloranfenicol, ampicilina y cotrimoxazol (Ochiai, Acosta et al. 2008). De igual manera, en Europa el 26% de las cepas aisladas de Typhi presentó multiresistencia a este grupo de antibióticos (Threlfall, Fisher et al. 2003).

1.3. Fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril, infectocontagiosa potencialmente letal, causada por la infección generalizada del sistema fagocítico mononuclear (SFM), del tejido linfoide intestinal y de la vesícula biliar por *Salmonella Typhi*. (Levine, Sztein et al. 2011) La enfermedad se adquiere por la ingestión de agua y/o alimentos contaminados con la bacteria y se caracteriza generalmente por la presencia de fiebre persistente, dolor abdominal, malestar generalizado y cefalea durante aproximadamente 3 semanas (Crump, Luby et al. 2004) (Fauci 2008). El periodo de incubación es de un promedio de 14 días y la recuperación completa puede requerir hasta 3-4 meses. Los pacientes tratados con antibióticos apropiados responden con una reducción gradual de la fiebre en un periodo de 3-5 días. Durante este periodo los pacientes pueden arrojar bacteria en sus heces. En un 5-12% de casos la enfermedad es recurrente, en un 1-4% de los casos el paciente se convierte en portador crónico a pesar del tratamiento con antibióticos (Gal-Mor, Boyle et al. 2014). Este estado de portador crónico tiene otras consecuencias en la salud. Se ha reportado que el 16% de los pacientes con cáncer de vías biliares son portadores asintomáticos de Typhi (Singh and Choudhuri 2003) y se han observado también correlaciones con cáncer colorrectal, de páncreas y de pulmón (Caygill, Hill et al. 1994, Caygill, Braddick et al. 1995). Además, la mayoría de los pacientes que se recuperan de una infección con Typhi no se encuentran protegidos contra una reinfección (Marmion, Naylor et al. 1953).

1.4. Infección por Typhi

La ruta común de entrada al organismo de *S. enterica* es a través de la ingestión de agua y/o alimentos contaminados, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, y penetra la membrana basal sin causar daño importante en los tejidos hasta llegar a las placas de Peyer. Este proceso se lleva a cabo a través de las células M, que son una población de células especializadas asociadas con la captación de antígenos del lumen intestinal. La bacteria posteriormente es fagocitada por los macrófagos y células dendríticas y es transportada a los

ganglios linfáticos regionales donde se multiplica activamente (Levine et al., 2001; Romero Cabello 1999).

Los sujetos infectados presentan una fase de bacteriemia en la cual la bacteria se distribuye en el sistema fagocítico mononuclear, en donde se reproducen y son liberadas nuevamente al sistema circulatorio, aunque existen reportes de diseminación sistémica independiente de transporte celular (Knodler, Vallance et al. 2010). La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con muy escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares, en el interior de los cuales es capaz de proliferar (Mittrucker and Kaufmann 2000, Levine, Tacket et al. 2001, Cabello 2007).

La capacidad de Typhi para provocar enfermedad en los seres humanos está relacionada con la adquisición horizontal de genes de virulencia denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI). En Typhi, SPI-1 y SPI-2 contienen genes para dos sistemas de secreción tipo III (SST3), a través de los cuales la bacteria es capaz de exportar proteínas al citoplasma de la célula blanco. Estas proteínas tienen diferentes funciones entre las cuales se encuentran la promoción de entrada de la bacteria, el control de la respuesta inflamatoria, y la regulación de la supervivencia bacteriana dentro de la célula huésped (Agbor and McCormick 2011). La expresión de los genes codificados en la SPI-1 y secretados a través del SST3 se relacionan principalmente con la invasión, mientras que los genes expresados por SPI-2 y secretados a través del SST3 parecen promover principalmente la supervivencia intracelular de Typhi. Se cree que es necesaria una corregulación entre SPI-1 y SPI-2 para generar la infección (Agbor and McCormick 2011, Figueira and Holden 2012).

1.5. Vacunas contra *Salmonella*

La primera vacuna desarrollada contra *Salmonella* consistía en la administración de bacteria inactivada, y confería una protección del 73% (Wright and Leishman 1900). Sin embargo, su alto nivel de efectos secundarios llevó a su desuso (Engels, Falagas et al. 1998).

Actualmente existen dos vacunas licenciadas a nivel mundial contra Typhi. Por un lado, la vacuna oral atenuada Ty21a confiere entre 35-58% de protección después de 3 dosis por hasta 3 años (Anwar, Goldberg et al. 2014), administrándose a partir de 5 años de edad (Engels, Falagas et al. 1998, Fraser, Paul et al. 2007). Por otro lado, la vacuna de polisacárido Vi induce una protección del 55-69% (Anwar, Goldberg et al. 2014) por hasta 3 años (Engels, Falagas et al. 1998, Fraser, Paul et al. 2007); sin embargo Vi es poco inmunogénico en niños menores de 2 años de edad (Sinha, Sazawal et al. 1999) y también se ha reportado el aumento de casos de fiebre tifoidea por cepas de *S. Typhi* Vi-negativas (Crump, Luby et al. 2004).

En India y en China se encuentran licenciadas vacunas contra Typhi que consisten en conjugados del antígeno Vi (Szu 2013). También se encuentran en desarrollo vacunas a base de conjugados del antígeno Vi (Lin, Ho et al. 2001, Lu, Zhang et al. 2012), con bacterias atenuadas (Hohmann, Oletta et al. 1996, Wang, Noriega et al. 2000, Kirkpatrick, Tenney et al. 2005) y a base de proteínas de membrana externa (Salazar-Gonzalez, Maldonado-Bernal et al. 2004, Moreno-Eutimio, Tenorio-Calvo et al. 2013).

Como se puede notar en los párrafos anteriores, la mayoría de los esfuerzos se enfocan en polisacáridos conjugados o en cepas atenuadas. Esto conlleva problemas en la potencial aplicación. Por un lado, los polisacáridos conjugados limitan el espectro de protección a las serovariedades que expresan el serotipo particular de la vacuna; además de que se ha mostrado que la expresión de antígenos polisacáridicos es altamente variable entre cepas e incluso a lo largo del proceso infeccioso (Murray, Attridge et al. 2003, Bravo, Silva et al. 2008, Santander, Roland et al. 2008, Crawford, Keestra et al. 2012). Por otro lado, el uso de polisacáridos o de cepas atenuadas limita su uso en personas inmunocomprometidas y en población infantil, que son los principales afectados por la *salmonella*, como se mencionó anteriormente.

Pruebas de diagnóstico disponibles y prácticas para la fiebre tifoidea carecen de sensibilidad y/o especificidad (Olsen et al, 2004), por lo que identificar antígenos inmunogénicos de *S. Typhi* expresados durante la infección humana, podría dar lugar a ensayos de diagnóstico y a vacunas mejoradas.

La superficie de bacterias tienen un gran número de moléculas con capacidad de modular la respuesta inmune (Akira et al, 2001). Uno de los principales componentes que además son altamente inmunogénicos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas lo constituyen las proteínas denominadas porinas. Las porinas son unas de las proteínas más abundantes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. (Secundino et al, 2006).

En la Unidad de Investigación Médica en Inmunología se identificó que las **porinas de *S. Typhi* (OmpC y OmpF)** son blanco de la respuesta inmune contra *S. Typhi* en pacientes con fiebre tifoidea durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad (Ortiz et al, 1989), y con porinas purificadas se demostró que inducen el 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. Typhi* en ratones (Isibasi et al, 1992).

Lo anterior permitió el diseño de una vacuna a base de porinas de *S. Typhi* a la que se le denominó Isipor, que además de inducir la protección, es capaz de inducir una respuesta inmune de memoria y no requiere de cadena fría para su transporte y almacenamiento, por ser estable a temperatura ambiente (Carreno et al, 2016). En un estudio clínico fase I se demostró que esta vacuna es segura e inmunogénica en humanos, induciendo respuesta inmunitaria de anticuerpos y respuesta de linfocitos T específicos productores de IFN- γ (Salazar-Gonzalez et al, 2004).

Estudios donde evaluaron la capacidad adyuvante de las porinas de *S. Typhi* al administrarlos con lisozima de huevo de gallina empleado como antígeno modelo, muestran que las porinas de *S. Typhi* tienen efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos específicos contra HEL que se mantiene hasta 400 días post inmunización, mientras que, cuando se administra el antígeno sin las porinas, la

respuesta contra HEL cae a títulos basales a partir del día 30 (Moreno-Eutimio et al, 2013). Por otra parte, se ha visto que las vesículas de membrana externa de *Escherichia coli*, ricas en porinas, al ser administrados en animales, inducen un perfil de citocinas del perfil Th1 y Th17, el cual resulta benéfico para el animal, ya que cuando éstos son sometidos a un reto con la bacteria viva, sobreviven a la infección (Kim OY et al, 2013). En conjunto, estos datos sugieren que las porinas pueden potenciar y diversificar la respuesta contra antígenos co-administrados no relacionados, y que dicha respuesta podría traducirse como inmunidad.

En Bangladesh ubicado al sur de Asia, se lograron identificar en sueros de pacientes con fiebre tifoidea durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, 57 proteínas inmunogénicas que pertenecen a la membrana externa de *S. Typhi* (Charles et al, 2010), entre ellas las porinas, sin embargo, las que llamaron la atención de nuestro grupo de trabajo fue la proteína Factor de elongación-Tu (EF-Tu), ya que en el proceso de obtención de las porinas de *S. Typhi*, se presenta de manera abundante la EF-Tu, la cual también se encuentra en la membrana externa de la bacteria. Y dado que el rendimiento que presenta EF-Tu es mayor en comparación con las porinas y resiste a situaciones de estrés, se propone que podría ser un antígeno candidato para una vacuna, la cual además de ser efectiva, también podría ser más fácil de obtener.

A continuación se presenta el gel de electroforesis (Figura 1) realizado en el instituto de biotecnología (IBT) por grupo del Dr. Calva y el M. en C. Fernández Mora, los cuales son los encargados de proporcionar a nuestra unidad las cepas bacterianas, así como la EF-Tu para el presente estudio.

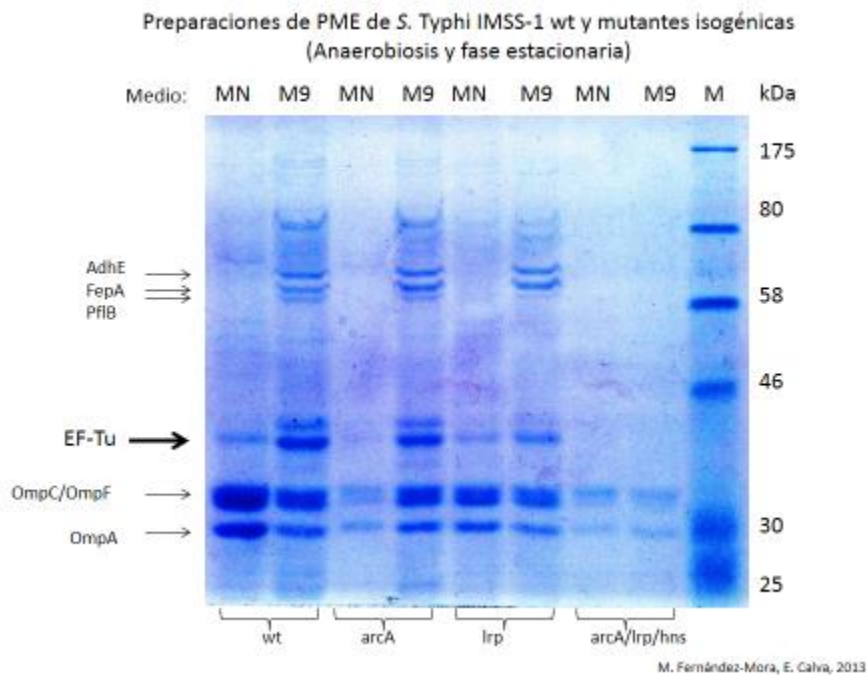


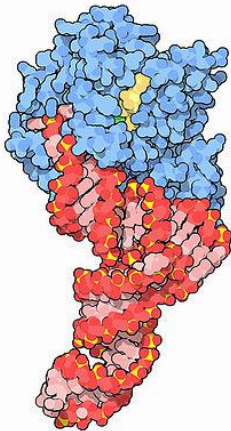
Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con tinción de azul brillante de Coomassie. Se observan las proteínas presentes en las diferentes cepas de *S. Typhi*: wt (wild type) y mutantes isogénicas (*arcA*, *lrp* y *arcA/lrp/hns*), crecidas en con medio enriquecido (MN) y con medio mínimo (M9). Observamos las bandas con diferente peso molecular de AdhE que es acetaldehído-CoA/alcohol deshidrogenasa, FepA que es un receptor de hierro de la membrana externa, PflB que es la piruvato formato liasa, EF-Tu que es la proteína que estudiaremos, Omp C/OmpF que son porinas al igual que OmpA.

En este gel se aprecia la presencia de las porinas OmpC y OmpF, estas porinas tienen un peso molecular de aproximadamente 36 y 38kDa respectivamente, así como EF-Tu la cual tiene un peso molecular de 43.29 kDa, las condiciones de crecimiento fueron dos: en medio enriquecido normal (MN) y de estrés (Anaerobiosis y fase estacionaria) con medio mínimo (MN). En este gel se corrieron las preparaciones de proteínas de membrana externa (PME) pertenecientes a las cuatro cepas que manejan de *S. Typhi* en dicho laboratorio (IMSS-1 wt y mutantes isogénicas).

Podemos ver entonces que hay una cantidad mayor de EF-Tu si se crece a la *S. Typhi* en condiciones de estrés y que es significativa la cantidad en comparación de las otras PME.

Se propone entonces se lleve a cabo la purificación de la EF-Tu y se demuestre si la inmunización de EF-Tu induce protección contra el reto de *S. Typhi* en un modelo murino.

1.6. FACTOR DE ELONGACION Tu (EF-Tu)



EF-Tu (factor de elongación termo inestable)

Molecule AP
Mespdb81_1 septiembre de 2006.

Azul: EF-Tu,
rojo: tRNA,
amarillo: GTP.

EF-Tu (factor de elongación termo inestable) es una proteína requerida para asistir la síntesis de otras proteínas, es uno de los tres factores de elongación de los procariotas: EF-Tu, EF-Ts y EF-G.

Son parte del mecanismo que sintetiza nuevas proteínas por traducción en el ribosoma. El ribosoma es una máquina molecular responsable de traducir la información transportada por el ARN mensajero (ARNm) en una secuencia de aminoácidos, que se unen para formar una cadena de polipéptido y, finalmente, una proteína. La traducción es un proceso dinámico durante el cual el ribosoma y todos sus ligandos funcionales sufren cambios conformacionales tras diversos mecanismos de ajuste inducido. El ciclo de elongación, es un proceso de varios pasos repetitivos que abarca la sección aminoacil-ARNt (AA-ARNt), la formación del enlace péptido, y la translocación ARNm-ARNt. . El ribosoma alcanza este equilibrio, trabajando en coordinación con EF-Tu y EF-G durante la entrega aa-tRNA y los pasos de translocación de tRNA, respectivamente. (Johansson et al. 2008; Zaher & Green, 2009)

Características:

- Proteína más abundante en las enterobacterias. (hasta un 10% en peso de la proteína total)
- La síntesis de proteínas depende casi absolutamente de este factor.
- Es indispensable para el crecimiento de la bacteria.
- Factor regulador positivo de la transcripción de los genes rRNA.

Características fisicoquímicas:

- Monómeros
- Moderadamente ácidos
- Peso molecular de 43 kDa
- pI de 5.0 (Hughes D. et al, 1990)

Cuando cumple su función se desprende del ribosoma al citoplasma y por medio de vesículas llega a la membrana externa de la bacteria, aún se desconoce el mecanismo, pero existen estudios previos donde indican que EF-Tu está dentro de vesículas y se expone en membrana externa de la bacteria (Nieves et al, 2010).

Estudios previos sugieren que la EF-Tu está presente en la superficie de las bacterias y es reconocida en sueros de pacientes convalecientes durante la infección, lo cual no ocurre en el suero de pacientes sanos. Esto indica que el hospedero genera anticuerpos contra la EF-Tu durante la infección bacteriana.

En el modelo de ratón EF-Tu es expresada durante la infección y es reconocida por los anticuerpos generados en el hospedero durante la infección bacteriana (Figura 2). (Nieves et al, 2010)

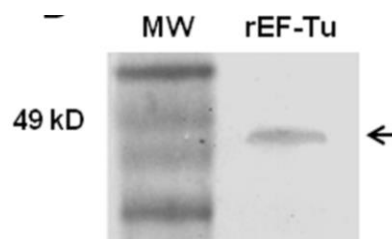


Figura 2. Western blot que contiene 10 µg de EF-Tu probada con el pool de sueros de ratones infectados con 10^7 UFC de bacteria, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular. EF-Tu es reconocida durante la infección bacteriana en el modelo murino. (Nieves et al, 2010)

La inmunización con EF-Tu induce generación de anticuerpos contra EF-Tu de la bacteria (Figura 3), para esto se inmunizo un grupo de 6 ratones con 25 ug de EF-Tu, al día 21 se reimunizo y el día 35 se obtuvo el suero de estos ratones, este pool de suero se enfrentó a 0.5 ug EF-TU purificada (rEF-Tu), 15 µg de lisado de la bacteria (WCL) y 15 µg de proteínas totales de membrana de la bacteria (TMP).

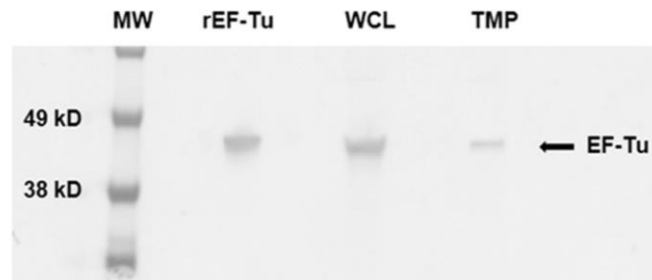


Figura 3. Western blot que contiene 0.5 ug EF-TU purificada (rEF-Tu), 15 µg de lisado de bacteria (WCL) y 15 µg de proteínas totales de membrana de la bacteria (TMP), el primer carril corresponde al marcador de peso molecular. El suero de ratones inmunizados presenta anticuerpos que reconocen a EF-Tu. (Nieves et al, 2010)

2. Justificación

Las enfermedades causadas por *Salmonella enterica* representan un problema de salud a nivel mundial. La serovar Typhi, causa fiebre tifoidea y es causa considerable de morbilidad y mortalidad. El aumento progresivo de la resistencia a los antibióticos, complica el manejo y tratamiento de los pacientes.

En el caso de los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, la necesidad de una vacuna efectiva es mayor, ya que las disponibles en el mercado ofrecen una protección del 50 a 75% por un periodo de 2 a 5 años y estas no pueden administrarse en las poblaciones de mayor riesgo, además de que las pruebas diagnósticas disponibles carecen de sensibilidad y especificidad.

Esto hace evidente la necesidad de encontrar antígenos que sean excelentes inmunógenos que induzcan una potente respuesta de anticuerpos de larga duración y que provean mayor protección contra la infección y ayuden a contribuir en el diseño de vacunas contra *S. Typhi*.

La superficie de las bacterias tiene un gran número de moléculas con capacidad de modular la respuesta inmune. En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica se identificó que las porinas de *S. Typhi* (OmpC y OmpF) son blanco de la respuesta inmune contra *S. Typhi* en pacientes con fiebre tifoidea durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, y con porinas purificadas se demostró que inducen el 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. Typhi* en ratones.

En el proceso de obtención de las porinas de *S. Typhi*, se presenta de manera abundante la EF-Tu, la cual también se encuentra en la membrana externa de la bacteria. Además de que en estudios previos se encuentra esta proteína en los sueros de pacientes con fiebre tifoidea y dado que el rendimiento que presenta EF-Tu es mayor en comparación con las porinas y resiste a situaciones de estrés, se propone que podría ser un antígeno candidato para vacuna, la cual además de ser efectiva, también podría ser más barata y fácil de obtener.

Se espera entonces que con la inmunización de EF-Tu se induzca la producción de anticuerpos y proteja contra la infección bacteriana producida por *S. Typhi* en un modelo murino.

3. Planteamiento del problema

Las infecciones por *Salmonella enterica* continúan siendo un problema de salud, tanto en países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo. La fiebre tifoidea es responsable de aproximadamente 21.65 millones de casos anualmente de los cuales ocurren 433,000 muertes al año. En la zona sub-sahariana de África, la tasa de mortalidad alcanza hasta el 25%. En conjunto, las diferentes manifestaciones clínicas asociadas a la infección por *Salmonella enterica*, son responsables de aproximadamente un millón de casos anuales, lo cual hace a éste patógeno una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. La alta incidencia de enfermedades causadas por infecciones con *Salmonella enterica*, aunada a la alta mortalidad que presentan, hace evidente la necesidad de estudiar los mediadores inmunológicos que provean protección contra la infección y ayuden a contribuir conocimiento para que pueda ser empleado en el diseño racional de vacunas contra *Salmonella Typhi*.

4. Hipótesis

La proteína Factor de Elongación Tu (EF-Tu) de *Salmonella* Typhi es inmunogénica y capaz de inducir protección contra la bacteremia inducida por *S. Typhi* en ratones.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar la capacidad inmunogénica y protectora de EF-Tu contra *Salmonella* Typhi en ratones BALB/c.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar los anticuerpos inducidos por la inmunización con la proteína EF-Tu en ratones BALB/c.
2. Determinar la capacidad protectora de la EF-Tu contra el reto con *Salmonella* Typhi en ratones inmunizados con esta proteína.

6. Materiales

6.1 Cepas Bacterianas

Se utilizó la cepa ATCC 9993 de *Salmonella entérica* serovar Typhi, que lleva el plasmido tufB-His.

6.2 Animales de laboratorio:

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c hembras, de 6-8 semanas de edad, adquiridos en Harlan® de México, mantenidos en condiciones libre de patógenos específicos (SPF) en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

6.3. Sueros de ratón:

Los ratones fueron sangrados por punción de vena facial colectando la sangre en tubos microtainer con el gel separador (Becton Dickinson®). La sangre se centrifugo a 5000 rpm durante 10 minutos para separar el suero del paquete celular. El suero fue almacenado a -70°C hasta el momento de su utilización.

7. Métodos

7.1 Purificación de EF-Tu de Salmonella Typhi

Cultivo y obtención de las células bacterianas.

Se inocularon 100 µL de la cepa de *Salmonella* Typhi ATCC 9993 que lleva el plasmido tufB-His en 2 mL de medio mínimo A [K_2HPO_4 0.4M, KH_2PO_4 2.2M, $(NH_4)_2SO_4$ 0.07M, citrato de sodio 0.016M, extracto de levadura al 0.1%, glucosa 0.27M, $MgSO_4$ al 0.1%] suplementado con Trp y Cys. En placas Constar de 24 pozos. Se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% durante 20 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 1 500g durante 20 min y se almacenaron a -70°C.

Obtención de la EF-Tu de S. Typhi.

Las células se descongelaron y se les adicionó medio LB (Luria Bertani) hasta obtener 1000 mL de suspensión bacteriana. De ahí se alicuotaron e 10 tubos de 50 mls (cada tubo se concentró lo de 100 ml). Posteriormente las células cosechadas se rompieron utilizando una prensa francesa (método de Schnaitman, 1970) y por sonicación (método de Filip, 1973). Las bacterias intactas y fragmentos se removieron por centrifugación 1 500g durante 10 minutos a 23 °C. El precipitado se incubó con el detergente iónico TritonX-100 a 2% más MgCl₂, y el detergente Sarkosyl a 2%, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las PME se obtuvieron por centrifugación a 1 500g durante 10 minutos, se resuspendieron en Buffer HEPES 10mM, pH 7.4, que contiene EDTA 5mM ajustado con NaOH a pH7.4. Se lleva a cabo otra extracción por centrifugación a 302,000 g durante 60 minutos para obtener el pellet llamado “membrana insoluble Triton-EDTA”. Se resuspende en Buffer HEPES 10mM, pH 7.4, que contiene EDTA 5mM ajustado con NaOH a pH7.4. Las proteínas fueron eluidas en una columna de níquel (Ni²⁺ -ácido nitriloacetico) donde el primer filtrado se hace con 50 mM NH₂PO₄ y 300 mM de NaCl y el segundo y tercer filtrado con la elución de imidazol a 10 mM, 20mM y 250mM en buffer, las fracciones contienen la EF-Tu purificada. Se cuantificó la proteína por el método de ácido bicinconínico, se comprobó la pureza de EF-Tu por una electroforesis en SDS-PAGE con tinción de plata y se evaluó el contenido de endotoxina por el método de Limulus.

7.2 Esquema de inmunización para establecer dosis optima de EF-Tu

Se inmunizaron grupos de 5 ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad, los grupos, las dosis de EF-Tu y el esquema de inmunización se muestran en la tabla 1. Todas las inmunizaciones se realizaron en un volumen de 300 µl por vía intraperitoneal, utilizando Solución Salina Inyectable (SSI) como vehículo. Se tomaron muestras de sangre por punción en la vena facial en los días 4, 8, 12, 20, 30, 90 y 120 después de la primera inmunización.

Tabla 1. Esquema de inmunización para establecer dosis optima de EF-Tu

Grupo	Inmunógeno	Dosis	Esquema de inmunización
1	SSI	-	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
2	EF-Tu	10µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
3	EF-Tu	25µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
4	EF-Tu	50µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)

7.3 Esquema de inmunización

Se inmunizaron grupos de 4 ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad, los grupos, las dosis de EF-Tu y el esquema de inmunización se muestran en la tabla 2. Todas las inmunizaciones se realizaron en un volumen de 300 µl por vía intraperitoneal, utilizando Solución Salina Inyectable (SSI) como vehículo. Se tomaron muestras de sangre por punción en la vena facial en los días 4, 8, 12, 20, 30, 90 y 120 después de la primera inmunización.

Tabla 1. Esquema de inmunización

1	SSI	-	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
2	EF-Tu	50µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
3	EF-Tu+ Alúmina	50µg + Alúmina (1:1 v/v)	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
4	EF-Tu + Porinas Typhi	50µg + 10 µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
5	Porinas Typhi	10µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)

7.4 Determinación de los títulos de anticuerpos contra EF-Tu por ELISA

El título de anticuerpos específicos se evaluó mediante la técnica de ELISA. Para ello se sensibilizaron (adsorción) placas de poliestireno de 96 pozos (Corning®) con 100µl por pozo de solución amortiguadora de carbonatos pH 8.6 conteniendo: 1µg de EF-Tu, manteniéndolo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se bloquearon con 150 µl por pozo de una solución de PBS-leche 5% (Svelty, Nestle) y se lavan cuatro veces con una solución de Tween 20 al 0.1%. Una vez bloqueadas, se añade a cada uno de los pozos las muestras de suero (diluidas en PBS-leche 20%-Tween20 0.05%) empleando diluciones doble seriadas (inicial 1:40) en un volumen de 100 µl, y se incuban durante 1 hora a 37° C. Después de esto se lavan 4 veces, y se procede una segunda incubación con un anticuerpo monoclonal dirigido contra anticuerpos IgM (dilución 1:1000) e IgG (dilución 1:4000), el cual está acoplado a peroxidasa. Posteriormente, se lavan y se revelan empleando orto-fenilendiamina como sustrato (0.5 mg/ml en una solución de citratos pH 5.6 y 1 µl/ml de peróxido de hidrógeno). La reacción de revelado se detiene agregando 10 µl de una solución 2.5N de ácido sulfúrico a cada pozo. Las placas fueron leídas en un lector de microplacas (Dynex Technologies, MRX II) a 492 nm. Las absorbancias se determinan ajustando un lector para placas de ELISA a 492 nm como longitud de onda de lectura. Cada placa incluye un control negativo y un control positivo. Los títulos de anticuerpos específicos se determinaron como aquella dilución en donde la absorbancia fuera equivalente a 3 veces el fondo (generalmente fue igual a 0.3) y se graficaron en forma logarítmica los títulos contra el día a que corresponda el suero. Se utilizaron como controles positivos sueros de ratón previamente titulados para el antígeno respectivo.

7.5 Preparación de la suspensión bacteriana para la bacteriemia en ratón

A partir de 100 µl de un banco de trabajo se realiza un cultivo de bacteria de *S.Typhi* en 5 ml de medio LB durante 14-16 horas a 37°C y 180 rpm. A partir de este cultivo se toman 100 µl y se siembran en 10 ml de medio LB. Este cultivo se incuba en agitación constante a 37°C y 180 rpm durante aproximadamente 4 horas hasta que alcanza una $DO_{562} = 1$. Una vez alcanzada esta densidad óptica se centrifuga el cultivo 1500 g a 4°C durante 20 minutos. Se resuspende el botón en 10 ml de PBS estéril, se vuelve a centrifugar y se vuelve a repetir este paso una vez más. Para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFCs) se toman 10 µl de la suspensión y se realizan 8 diluciones seriadas 1:10 en un volumen de 100 µl. Se toman por triplicado 10 µl de cada dilución y se siembran en una caja petri con Agar-TSA. La caja se incuba a 37°C durante 24 horas y se determinan las UFCs contando las colonias en la dilución que tenga entre 3 y 30 colonias. Finalmente este valor se multiplica por el factor de dilución.

7.6 Determinación de dosis de Salmonella Typhi para bacteriemia en ratón

Para determinar el número de UFCs de *Typhi* que es necesario para detectar bacterias en bazo, hígado y sangre se infectaron grupos de tres ratones con las dosis que se describen en la tabla 2. Para esto se prepararon suspensiones bacterianas como se describió anteriormente y se realizaron las diluciones necesarias en PBS para obtener el número aproximado de UFCs suspendidas en 300 µl. Las suspensiones se administraron por vía intraperitoneal, se sacrificaron los ratones a las 20 horas y se determinó la carga bacteriana en bazo, hígado y sangre.

Tabla 2. Detalle de dosis probadas para la determinación de carga bacteriana en ratones

Cepa	Dosis probadas	Tiempo post-infección de determinación de carga
Salmonella Typhi IMSS	1.5 x 10 ⁶ , 1.5 x 10 ⁷ , 1.5 x 10 ⁸	20 horas

Descartando las dosis en las que murió algún ratón y las dosis en las que no se detectó bacteria en los órganos se establecieron las siguientes dosis infectivas: 10⁷ UFCs.

7.7 Determinación de carga bacteriana en sangre, bazo e hígado

Se punza con una aguja la vena facial del ratón, se toma una muestra de sangre y se plaquean 50 uL de sangre en una caja Petri con Agar- TSA. Posteriormente se sacrifica al ratón por dislocación cervical y se realiza una incisión a partir del esternón, dándole vuelta transversalmente. Se retira la piel de la parte superior e inferior jalándola hacia los extremos, de manera que el peritoneo quede expuesto. Se realiza una incisión al peritoneo para extraer el bazo y para extraer el hígado se realiza una incisión debajo del diafragma para dejar el hígado expuesto. Se extrae al hígado y al bazo y se coloca en 1 ml de PBS-Gentamicina a 80 µg/ml. Una vez extraídos los órganos, estos se cortan a la mitad y se determina el peso del fragmento y del órgano completo. El fragmento a ser homogeneizado se coloca en PBS estéril. Utilizando un homogeneizador de tejidos se homogeneizan los fragmentos de órganos en PBS estéril. Posteriormente se realizan dos diluciones seriadas 1:10 en PBS estéril de cada órgano homogeneizado y se plaquean 50 µl de cada dilución en una caja petri con Agar-TSA. Finalmente se incuban las cajas durante 14 horas a 37°C y se determina el número de UFCs multiplicando el número de colonias resultante por el factor de dilución. Para obtener el número de UFCs por gramo de órgano, se multiplica el número de colonias de la placa por el factor de dilución, y se divide entre el peso del fragmento de órgano homogeneizado. Para obtener el número de UFCs por

órgano, se multiplica el número de UFCs por gramo de órgano por el peso del órgano completo.

7.8 Evaluación de la capacidad protectora

Grupos de 4 ratones BALB/c se inmunizaron con EF-Tu en un esquema de dosis en un intervalo de 15 días:

Tabla 3. Esquema inmunización para evaluar la capacidad protectora de EF-Tu

Grupo	Inmunógeno	Dosis	Esquema de inmunización
1	SSI	-	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
2	EF-Tu	50µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
3	EF-Tu + Alúmina	50µg + 1:1 v/v	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
4	EF-Tu + Porinas de S. Typhi	50 ug + 10ug	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)
5	Porinas de S. Typhi	10µg	Inmunización (Día 0) Reinmunización (Día 15)

En el día 30 post-inmunización se les inyectó de manera intraperitoneal una suspensión de Typhi (10^7 UFCs). Se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonia en bazo, hígado y sangre a las 20 horas de ser infectados.

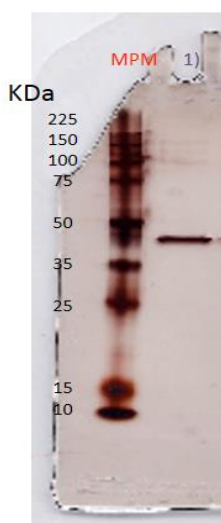
7.9 Análisis estadístico

Se realizó una prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Diferencia Mínima Significativa de Fisher comparando todos los grupos entre sí. En las gráficas se muestran los valores de significancia: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

8. Resultados

8.1 Características del lote de EF-Tu

La EF-Tu empleada para este experimento se obtuvo de una cepa ATCC 9993 de *Salmonella* entérica serovar Typhi., para el cual se reportaron 307.6 µg/mL de proteína y <0.01 ng de endotoxina por 10 µg de proteína. El gel de SDS-PAGE revelado con tinción de plata muestra la presencia de una banda de mayor intensidad en 43 kDa correspondiente a EF-Tu.



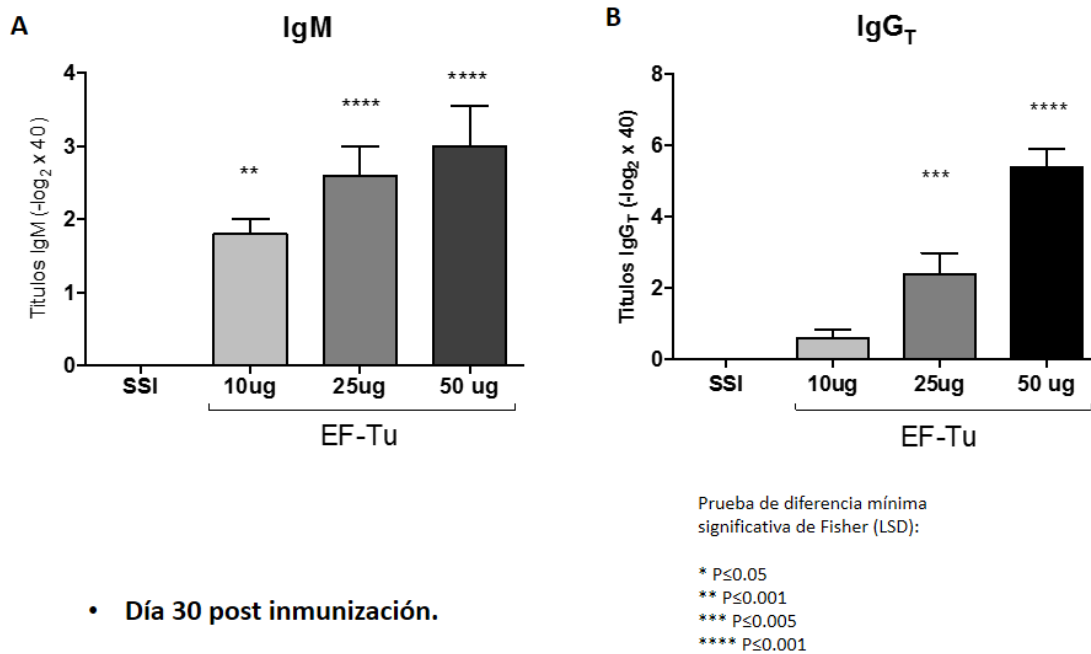
1) Condiciones reducidas 1µg de EF-Tu

Figura 4. El lote L-1993 de EF-Tu no muestra contaminación por otras proteínas bacterianas. SDS-PAGE al 12% del lote L-1993 de EF-Tu de *S. Typhi* revelado con tinción de plata. . MPM: Marcador de peso molecular.

8.2 La inmunización con EF-Tu induce anticuerpos IgM e IgG de manera dosis-dependiente.

Para responder si EF-Tu de *S. Typhi* induce anticuerpos de clase IgG e IgM después de la inmunización, se inyectaron ratones BALB/c con EF-Tu por vía intraperitoneal (I.P), se reinmunizaron al día 15 y después de 30 días, se

sangraron a los ratones para obtener su suero. La concentración de IgM e IgG se cuantificó mediante ELISA. Como controles se utilizaron una dosis de 10 mg/mL de OVA (ovoalbúmina) y suero de ratones OVA positivos y no inmunizados. Para conocer la cantidad óptima necesaria de EF-Tu para inducir respuesta de anticuerpos, se decidió evaluar diferentes dosis, 10 μ g, 25 μ g y 50 μ g. La inmunización de ratones con estas dosis generó una respuesta de anticuerpos IgM anti EF-Tu (Figura 1A) y anticuerpos IgG anti EF-Tu (Figura 1B). Se decide utilizar 50 μ g de EF-Tu para los experimentos ya que es la óptima para producir mayor cantidad de anticuerpos, aunque se observa un incremento de manera dosis-dependiente, no se probaron dosis más altas ya que la producción de la EF-Tu era limitada y no contábamos con una gran cantidad para probar dosis más altas.



- Día 30 post inmunización.

Figura 5. La EF-Tu de *Salmonella Typhi* induce anticuerpos de clase IgM e IgG. 5 ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad por grupo fueron inmunizados con 10 μ g de EF-Tu, 25 μ g de EF-Tu y 50 μ g de EF-Tu por vía intraperitoneal (I.P), se reinmunizaron con las mismas dosis a los 15 días y se sangraron de vena facial a los 30 días post inmunización. Se realizaron ELISAs contra EF-Tu para medir los títulos de anticuerpos IgG e IgM. Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante la prueba U de Fisher. ****P<0.001, significativo.

Para asegurar que los anticuerpos tienen afinidad contra EF-Tu y no a otras proteínas se realizó un Western Blot de los sueros de los ratones, utilizando como control positivo porinas de *S. Typhi*, las cuales ya sabemos tienen anticuerpos anti porinas.

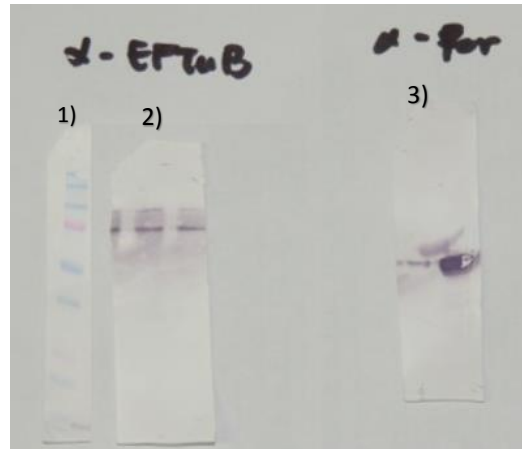


Figura 6. Western blot que contiene en el carril 2, 1 μ g de EF-Tu probada con el pool de sueros de ratones inmunizados con EF-Tu, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular. En el carril 3, pusimos 1 μ g de porinas probado con el suero de ratones inmunizados con porinas como nuestro control positivo. El suero de ratones inmunizados presenta anticuerpos que reconocen a EF-Tu.

8.3 La inmunización de EF-Tu con adyuvante incrementa los títulos de IgG

Conociendo las características de las porinas como adyuvantes, se decidió realizar inmunizaciones con 50 μ g de EF-Tu y 10 μ g de porinas de *S. Typhi*, además de 50 μ g de EF-Tu y alumina(1:1 v/v), para responder si EF-Tu de *S. Typhi* en combinación de adyuvante potencian la inducción de anticuerpos de clase IgG e IgM después de la inmunización, se inyectaron ratones BALB/c por vía intraperitoneal (I.P), se reinmunizaron al día 15 y después de 30 días, se sangraron a los ratones para obtener su suero. La concentración de IgM e IgG se cuantificó mediante ELISA. Como controles se utilizaron una dosis de 10 mg/mL de OVA (ovoalbúmina) y suero de ratones OVA positivos y no inmunizados. En placa se fijó EF-Tu y Porinas de *S. Typhi* para su medición correspondiente. La

inmunización de ratones con adyuvante genero una respuesta significativamente mayor de anticuerpos IgG (Figura 7B), no fue estadísticamente significativa para IgM. Se decide utilizar estas mezclas para los experimentos de reto.

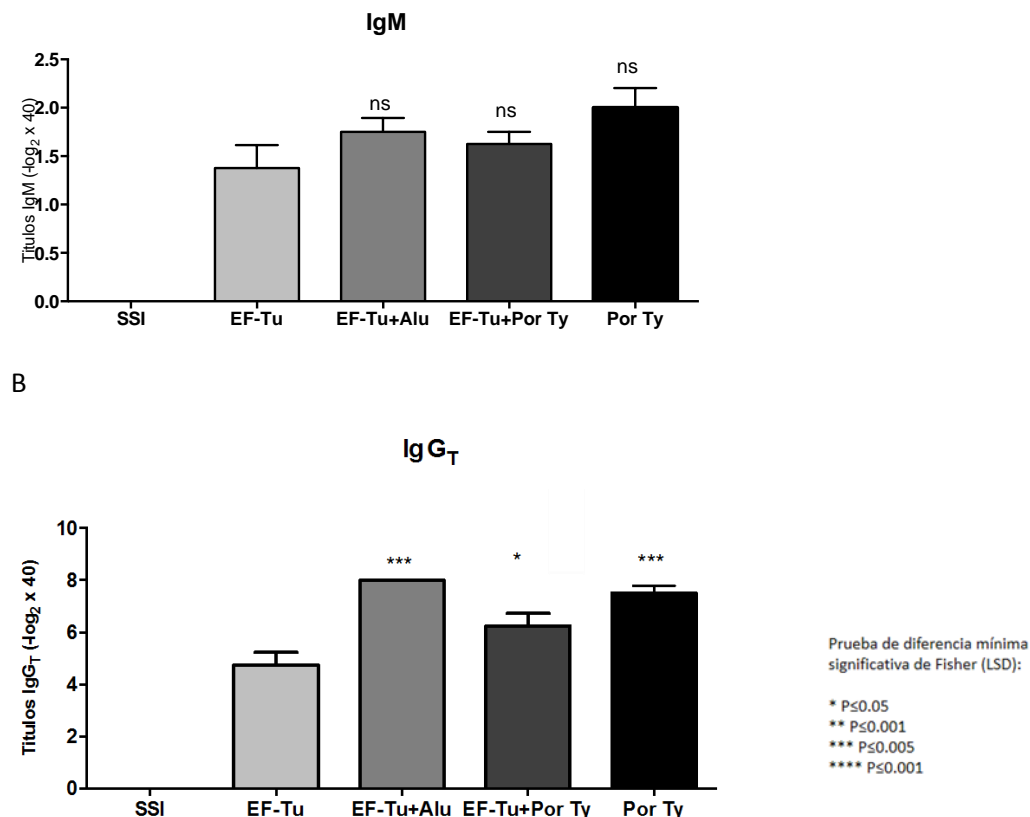


Figura 7. La EF-Tu de *Salmonella Typhi* con porinas inducen una mayor respuesta de anticuerpos de clase IgG. 5 ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad por grupo fueron inmunizados con 50 ug de EF-Tu, 50 ug de EF-Tu y 10 ug de porinas de *S.Typhi*, 50 ug de EF-Tu y alumina (1:1 v/v) y 10 ug de porinas de *S.Typhi* (Por Ty) por via intraperitoneal (I.P), se reinmunizaron con las mismas dosis a los 15 días y se sangraron de vena facial a los 30 días post inmunización. Se realizaron ELISAs contra EF-Tu y Por Ty respectivamente para medir los títulos de anticuerpos IgG e IgM. Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante la prueba U de Fisher. ****P<0.001, significativo.

8.4. La EF-Tu en combinación con alúmina y porinas de *S. Typhi* es capaz de inducir protección contra la bacteremia de *S.Typhi*

Para evaluar si los anticuerpos generados por la inmunización de EF-Tu de *S. Typhi* y de su mezcla con adyuvante presentan capacidad de protección, retomamos a los ratones en el día 30 post-inmunización de manera intraperitoneal una

suspensión de *S. Typhi* (10^7 UFCs). Se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonia en bazo, hígado y sangre, a las 20 horas de ser infectados. Este tiempo se estableció con estudios previos que se han realizado en la UIMIQ para medir el proceso de infección bacteriana de los diferentes serovariedades de *S. Typhi*.

Como se muestra en la Figura 8, la inmunización de EF-Tu combinada con alúmina y porinas de *S. Typhi* induce una disminución significativa de la carga bacteriana en bazo, hígado y sangre.

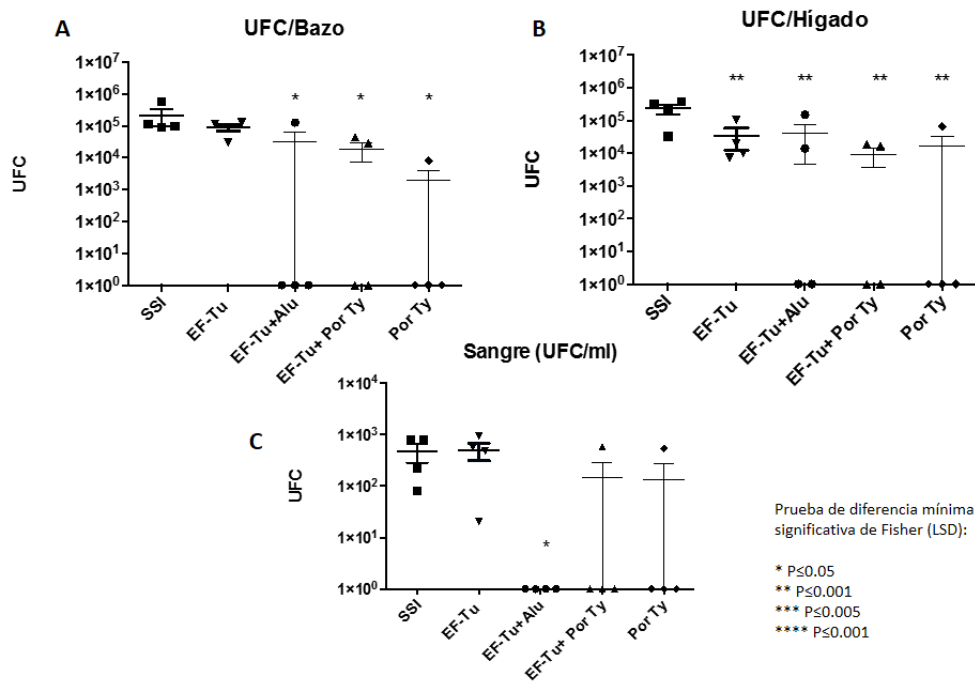


Figura 8. La EF-Tu en combinación con alúmina y porinas de *S. Typhi* es capaz de inducir protección contra la bacteremia de *S. Typhi*, ya que disminuye la Carga bacteriana en Bazo (A), Hígado (B) y sangre(C), expresada como Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en ratones inmunizados con Solución Salina Isotónica (SSI), EF-Tu, EF-Tu con Alúmina (EF-Tu+Alu), EF-Tu con porinas de *S. Typhi* (EF-Tu+PorTy) y porinas de *S. Typhi* (PorTy). Prueba de Diferencia Mínima Significativa de Fisher comparando los diferentes tratamientos contra el grupo inmunizado con SSI (* $p < 0.05$)

9. Discusión

Pocos son los antígenos que pueden inducir títulos de anticuerpos y no necesariamente se relacionan con protección, por lo que evaluar la capacidad inmunogénica y protectora del Factor de Elongación Tu (EF-Tu) contra *Salmonella* Typhi en un modelo de ratón, es importante pensando en la generación de una vacuna efectiva contra la Fiebre tifoidea. El objetivo de un antígeno vacunal es generar protección efectiva y de larga duración, en la actualidad se conoce que las vacunas exitosas clínicamente son capaces de generar protección a través de mantener títulos de anticuerpos neutralizantes principalmente. Se ha mostrado que la inmunización con porinas de Typhi es una manera segura y efectiva de generar protección contra esta bacteria (Blanco et al., 1993; Isibasi et al., 1992; Salazar-Gonzalez et al., 2004). Se sabe además que la inmunización con porinas de Typhi induce una respuesta de anticuerpos IgG e IgM de larga duración con capacidad bactericida contra Typhi por la vía clásica de activación del sistema de complemento (Secundino et al., 2006). Sin embargo se tiene la necesidad de explorar otras proteínas, las cuales además de ser inmunogénicas, también induzcan protección contra la infección de *Salmonella* Typhi, sean más fáciles de obtener, tengan mayor rendimiento y se tenga un menor costo al obtenerlas.

Por ello la EF-Tu representa un buen candidato, tomando en cuenta la abundancia de estas proteínas en la superficie de la bacteria, ya que aunque esta abundancia puede variar por las condiciones ambientales como pH, osmolaridad y metabolitos, como es el caso de la porina OmpD (I. L. Calderón et al., 2011; Santiviago, Toro, Hidalgo, Youderian, & Mora, 2003) y de las porinas OmpC y OmpF (Puente, Verdugo-Rodríguez, & Calva, 1991; Villarreal et al., 2014); el punto a favor de la EF-Tu es que resiste condiciones de estrés, es decir, atmosferas reducidas, pocos nutrientes y variación de pH.

La inmunización de EF-Tu induce anticuerpos de clase IgM e IgG de manera dosis dependiente, lo cual sugiere que si hubiéramos tenido mayor cantidad de la proteína hubiéramos podido visualizar títulos más altos de anticuerpos, sin

embargo las dosis establecida de 50 ug fue satisfactoria para este estudio. El uso de porinas de *S. Typhi* y de alumina, sirvió para visualizar el efecto que en si tienen como adyuvantes y como funcionaron en el experimento de protección, lo cual sugiere que la inmunización de EF-Tu con porinas y EF-Tu con alúmina si confiere protección contra la infección por *S.Typhi*, ya que notamos una disminución de la carga bacteriana significativa en bazo, hígado y sangre. Podemos apreciar que la infección que se presenta es sistémica por lo que la EF-Tu con Porinas tienen total protección en sangre y bazo, sin embargo en hígado solo hay disminución significativa de bacterias, ya que es donde pueden estar alojadas una mayor cantidad de bacterias por el tiempo de infección. Si bien las porinas de *S. Typhi* por si solas confieren protección contra *S.Typhi*, en este estudio se sugiere que hay más efectividad si se mezclan con EF-Tu.

Este estudio abre el panorama para estudiar a esta proteína, la cual se pensaba no tenía ninguna valor inmunológico, solo se consideraba su función en la producción de nuevas proteínas, aún se desconocen muchos mecanismos, como el cómo llega a membrana externa, si se encuentra expuesta o no. Con este estudio ahora ya sabemos que la EF-Tu es inmunogenica y que con adyuvantes confiere protección contra la *S. Typhi*. Finalmente corresponde hacer nuevos protocolos donde se aumente la N de ratones, la dosis de inmunización, las repeticiones y la cantidad de proteína purificada para poder hacer todo esto.

10. Conclusiones

La proteína Factor de Elongación Tu (EF-Tu) de *Salmonella* Typhi es inmunogénica y en combinación con alúmina y porinas de *Salmonella* Typhi induce protección contra la bacteremia inducida por *S. Typhi* en ratones BALB/c. Lo cual la posiciona como un buen candidato vacunal contra *Salmonella* Typhi, ya que es la más abundante de las proteínas presentes en las bacterias y tiene la cualidad de resistir condiciones de estrés, por lo que extraerla es más sencillo y barato.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E., & Adenubi, O. T. (2011). Evolution of Salmonella nomenclature: a critical note. *Folia Microbiologica*, 56(6), 497-503. doi: 10.1007/s12223-011-0075-4
2. Agbor, T. A., & McCormick, B. A. (2011). Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1858-1869. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01701.x
3. Anwar, H., Roome, C. J., Nedelescu, H., Chen, W., Kuhn, B., & De Schutter, E. (2014). Dendritic diameters affect the spatial variability of intracellular calcium dynamics in computer models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 168.
4. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* (2001) 2:8, 675-80. doi: 10.1038/90609 90609 [pii].
5. Balasubramaniam, D., Arockiasamy, A., Kumar, P. D., Sharma, A., & Krishnaswamy, S. (2012). Asymmetric pore occupancy in crystal structure of OmpF porin from Salmonella typhi. *J Struct Biol*, 178(3), 233-244. doi: 10.1016/j.jsb.2012.04.005
6. Berlanda Scorza, F., Colucci, A. M., Maggiore, L., Sanzone, S., Rossi, O., Ferlenghi, I., . . . Gerke, C. (2012). High Yield Production Process for <italic>Shigella</italic> Outer Membrane Particles. *PLoS One*, 7(6), e35616. doi: 10.1371/journal.pone.0035616
7. Blanco, F., Isibasi, A., Raul Gonzalez, C., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguin, C., & Kumate, J. (1993). Human cell mediated immunity to porins from Salmonella typhi. *Scand J Infect Dis*, 25(1), 73-80.
8. Bobat, S., Flores-Langarica, A., Hitchcock, J., Marshall, J. L., Kingsley, R. A., Goodall, M., . . . Cunningham, A. F. (2011). Soluble flagellin, FliC, induces an Ag-specific Th2 response, yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of Salmonella typhimurium infection. *Eur J Immunol*, 41(6), 1606-1618. doi: 10.1002/eji.201041089
9. Bravo, D., Silva, C., Carter, J. A., Hoare, A., Alvarez, S. A., Blondel, C. J., . . . Contreras, I. (2008). Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of Salmonella. *J Med Microbiol*, 57(Pt 8), 938-946. doi: 10.1099/jmm.0.47848-0
10. Buckle, G. C., Walker, C. L., & Black, R. E. (2012). Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. *J Glob Health*, 2(1), 010401. doi: 10.7189/jogh.02.010401
11. Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*: Editorial Medica Panamericana Sa de.
12. Calderon, I., Lobos, S. R., Rojas, H. A., Palomino, C., Rodriguez, L. H., & Mora, G. C. (1986). Antibodies to porin antigens of Salmonella typhi induced during typhoid infection in humans. *Infect Immun*, 52(1), 209-212.
13. Calderon, I. L., Morales, E., Caro, N. J., Chahuan, C. A., Collao, B., Gil, F., . . . Saavedra, C. P. (2011). Response regulator ArcA of Salmonella enterica serovar Typhimurium downregulates expression of OmpD, a porin facilitating uptake of hydrogen peroxide. *Res Microbiol*, 162(2), 214-222. doi: 10.1016/j.resmic.2010.11.001
14. Caygill, C. P., Braddick, M., Hill, M. J., Knowles, R. L., & Sharp, J. C. (1995). The association between typhoid carriage, typhoid infection and subsequent cancer at a number of sites. *Eur J Cancer Prev*, 4(2), 187-193.
15. Caygill, C. P., Hill, M. J., Braddick, M., & Sharp, J. C. (1994). Cancer mortality in chronic typhoid and paratyphoid carriers. *Lancet*, 343(8889), 83-84.
16. Charles Richelle C. 2010. Characterization of Anti-Salmonella enterica Serotype Typhi Antibody Responses in Bacteremic Bangladeshi Patients by and Immunoaffinity Proteomics-Based Technology. CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Aug. 2010, p. 1188–1195
17. Choo KE, Razif AR, Oppenheimer SJ, Ariiffin WA, Lau J, Abraham T. 1993. Usefulness of the Widal test in diagnosing childhood typhoid fever in endemic areas. *J Paediatr Child Health* . 29:36-9.

18. Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., . . . Rosenbusch, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature*, *358*(6389), 727-733. doi: 10.1038/358727a0
19. Crawford, R. W., Keestra, A. M., Winter, S. E., Xavier, M. N., Tsois, R. M., Tolstikov, V., & Bäuml, A. J. (2012). Very Long O-antigen Chains Enhance Fitness during Salmonella induced Colitis by Increasing Bile Resistance. *PLoS Pathog*, *8*(9), e1002918. doi: 10.1371/journal.ppat.1002918
20. Crump, J. A., Luby, S. P., & Mintz, E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ*, *82*(5), 346-353.
21. Crump, J. A., & Mintz, E. D. (2010). Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis*, *50*(2), 241-246. doi: 10.1086/649541
22. Chimalizeni, Y., Kawaza, K., & Molyneux, E. (2010). The epidemiology and management of non typhoidal salmonella infections. *Adv Exp Med Biol*, *659*, 33-46
23. Diaz-Quinonez, A., Martin-Orozco, N., Isibasi, A., & Ortiz-Navarrete, V. (2004). Two Salmonella OmpC K(b)-restricted epitopes for CD8+-T-cell recognition. *Infect Immun*, *72*(5), 3059-3062.
24. Engels, E. A., Falagas, M. E., Lau, J., & Bennish, M. L. (1998). Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. *Bmj*, *316*(7125), 110-116.
25. Fauci, A. S. (2008). *Harrison's principles of internal medicine* (Vol. 2): McGraw-Hill Medical New York.
26. Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*, *379*(9835), 2489-2499. doi: 10.1016/s0140-6736(11)61752-2
27. Figueira, R., & Holden, D. W. (2012). Functions of the Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology*, *158*(Pt 5), 1147-1161. doi: 10.1099/mic.0.058115-0
28. First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. (2011). *New England Journal of Medicine*, *365*(20), 1863-1875. doi: 10.1056/NEJMoa1102287
29. Fraser, A., Paul, M., Goldberg, E., Acosta, C. J., & Leibovici, L. (2007). Typhoid fever vaccines: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Vaccine*, *25*(45), 7848-7857. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.08.027
30. Garmory, H. S., Brown, K. A., & Titball, R. W. (2002). Salmonella vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev*, *26*(4), 339-353.
31. Galanis, E., Wong, D. M. A. L. F., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., for World Health Organization Global Salm-Surv. (2006). Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(3), 381–388.
32. Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, *5*,
33. Gil-Cruz, C., Bobat, S., Marshall, J. L., Kingsley, R. A., Ross, E. A., Henderson, I. R., . . . Cunningham, A. F. (2009). The porin OmpD from nontyphoidal Salmonella is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(24), 9803-9808. doi: 10.1073/pnas.0812431106
34. Gordon, M. A. (2011). Invasive nontyphoidal Salmonella disease: epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*, *24*(5), 484-489. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834a9980
35. Hohmann, E. L. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis*, *32*(2), 263-269. doi: 10.1086/318457
36. Hohmann, E. L., Oletta, C. A., Killeen, K. P., & Miller, S. I. (1996). phoP/phoQ-deleted Salmonella typhi (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis*, *173*(6), 1408-1414.
37. Hughes Diarmaid, [john F. Atkins](#), The role of EF-Tu and other translation components in determining translocation step size, Howard Hughes Medical Institute and Dept. of Human Genetics, 16 May 1990, 391.

38. Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., Gonzalez, C. R., Garcia, J. A., & Kumate, J. (1992). Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine*, *10*(12), 811-813.
39. Johansson MJ, et al. (2008) Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Mol Cell Biol* *28*(10):3301
40. Kingsley, R. A., Msefula, C. L., Thomson, N. R., Kariuki, S., Holt, K. E., Gordon, M. A., . . . Dougan, G. (2009). Epidemic multiple drug resistant *Salmonella Typhimurium* causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res*, *19*(12), 2279-2287. doi: 10.1101/gr.091017.109
41. Kirkpatrick, B. D., Tenney, K. M., Larsson, C. J., O'Neill, J. P., Ventrone, C., Bentley, M., . . . Chatfield, S. N. (2005). The novel oral typhoid vaccine M01ZH09 is well tolerated and highly immunogenic in 2 vaccine presentations. *J Infect Dis*, *192*(3), 360-366. doi: 10.1086/431605
42. Knodler, L. A., Vallance, B. A., Celli, J., Winfree, S., Hansen, B., Montero, M., & Steele-Mortimer, O. (2010). Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(41), 17733-17738. doi: 10.1073/pnas.1006098107
43. Konadu, E., Shiloach, J., Bryla, D. A., Robbins, J. B., & Szu, S. C. (1996). Synthesis, characterization, and immunological properties in mice of conjugates composed of detoxified lipopolysaccharide of *Salmonella paratyphi A* bound to tetanus toxoid with emphasis on the role of O acetyls. *Infect Immun*, *64*(7), 2709-2715.
44. Kumar, V. S., Gautam, V., Balakrishna, K., & Kumar, S. (2009). Overexpression, purification, and immunogenicity of recombinant porin proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi). *J Microbiol Biotechnol*, *19*(9), 1034-1040.
45. Levine, M. M., Tacket, C. O., & Sztein, M. B. (2001). Host-*Salmonella* interaction: human trials. *Microbes Infect*, *3*(14-15), 1271-1279.
46. Lim, J. A., Lee, D. H., & Heu, S. (2014). The interaction of human enteric pathogens with plants. *Plant Pathol J*, *30*(2), 109-116. doi: 10.5423/ppj.rw.04.2014.0036
47. Lin, F. Y. C., Ho, V. A., Khiem, H. B., Trach, D. D., Bay, P. V., Thanh, T. C., . . . Kaufman, J. B. (2001). The Efficacy of a *Salmonella typhi* Vi Conjugate Vaccine in Two-to-Five-Year-Old Children. *New England Journal of Medicine*, *344*(17), 1263-1269. doi: 10.1056/NEJM200104263441701
48. Lu, Y. J., Zhang, F., Sayeed, S., Thompson, C. M., Szu, S., Anderson, P. W., & Malley, R. (2012). A bivalent vaccine to protect against *Streptococcus pneumoniae* and *Salmonella typhi*. *Vaccine*, *30*(23), 3405-3412. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.039
49. MacLennan, C. A., Gilchrist, J. J., Gordon, M. A., Cunningham, A. F., Cobbold, M., Goodall, M., . . . Molyneux, M. E. (2010). Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal *Salmonella* in HIV-infected African adults. *Science*, *328*(5977), 508-512. doi: 10.1126/science.1180346
50. MacLennan, C. A., Martin, L. B., & Micoli, F. (2014). Vaccines against invasive *Salmonella* disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *10*(6), 1478-1493. doi: 10.4161/hv.29054
51. Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., . . . Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, *50*(6), 882-889. doi: 10.1086/650733
52. **Marmion, D. E., Naylor, G. R. E. & Stewart, I. O. (1953), Studies of Immunity in Typhoid Fever - NCBI**
53. Micoli, F., Rondini, S., Gavini, M., Pisoni, I., Lanzilao, L., Colucci, A. M., . . . Saul, A. (2013). A scalable method for O-antigen purification applied to various *Salmonella* serovars. *Anal Biochem*, *434*(1), 136-145. doi: 10.1016/j.ab.2012.10.038
54. Mittrucker, H. W., & Kaufmann, S. H. (2000). Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol*, *67*(4), 457-463.
55. Moreno-Eutimio, M. A., Tenorio-Calvo, A., Pastelin-Palacios, R., Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., Lopez-Santiago, R., . . . Lopez-Macias, C. (2013). *Salmonella Typhi* OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology*, *139*(4), 459-471. doi: 10.1111/imm.12093

56. Murray, G. L., Attridge, S. R., & Morona, R. (2003). Regulation of Salmonella typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol*, 47(5), 1395-1406.
57. Nieves, W., Heang, J., Asakrah, S., Höner zu Bentrup, K., Roy, C. J., & Morici, L. A. (2010). Immunospecific Responses to Bacterial Elongation Factor Tu during Burkholderia Infection and Immunization. *PLoS ONE*, 5(12), e14361.
58. Nikaido, H. (1983). Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol*, 97, 85-100.
59. Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem*, 269(6), 3905-3908.
60. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(4), 593-656.
61. Ochiai, R. L., Acosta, C. J., Danovaro-Holliday, M. C., Baiqing, D., Bhattacharya, S. K., Agtini, M. D., . . . Clemens, J. D. (2008). A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. *Bull World Health Organ*, 86(4), 260-268.
62. Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Connor, T. R., Harris, S. R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., . . . Dougan, G. (2012). Intracontinental spread of human invasive Salmonella Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat Genet*, 44(11), 1215-1221. doi: 10.1038/ng.2423
63. Ortiz, V., Isibasi, A., Garcia-Ortigoza, E., & Kumate, J. (1989). Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from Salmonella typhi in humans with typhoid fever. *J Clin Microbiol*, 27(7), 1640-1645.
64. Parry, C. M., Wijedoru, L., Arjyal, A., & Baker, S. (2011). The utility of diagnostic tests for enteric fever in endemic locations. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(6), 711-725. doi: 10.1586/eri.11.47
65. Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., Pastelin-Palacios, R., Cervantes-Barragan, L., Hisaki, E., Chai, Q., . . . Ludewig, B. (2014). IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote generation of protective germinal center-derived IgM+ B cell memory against Salmonella Typhi. *J Immunol*, 192(11), 5192-5200. doi: 10.4049/jimmunol.1302526
66. Puente, J. L., Verdugo-Rodríguez, A., & Calva, E. (1991). Expression of Salmonella typhi and Escherichia coli OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on Escherichia coli OmpR. *Mol Microbiol*, 5(5), 1205-1210. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01894.x
67. Reddy, E. A., Shaw, A. V., & Crump, J. A. (2010). Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 10(6), 417-432. doi: 10.1016/s1473-3099(10)70072-4
68. Romero-Cabello, R. 1999. Microbiología y Parasitología humana. Ed. Médica Panamericana, México. Stevens, R. 1986. Diagnostic Devices Manual
69. Sahastrabudde, S., Carbis, R., Wierzb, T. F., & Ochiai, R. L. (2013). Increasing rates of Salmonella Paratyphi A and the current status of its vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 12(9), 1021-1031. doi: 10.1586/14760584.2013.825450
70. Salazar-Gonzalez, R. M., Maldonado-Bernal, C., Ramirez-Cruz, N. E., Rios-Sarabia, N., Beltran-Nava, J., Castanon-Gonzalez, J., . . . Isibasi, A. (2004). Induction of cellular immune response and anti-Salmonella enterica serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett*, 93(2-3), 115-122. doi: 10.1016/j.imlet.2004.01.010
71. Salazar-Gonzalez, R. M., Niess, J. H., Zammit, D. J., Ravindran, R., Srinivasan, A., Maxwell, J. R., . . . McSorley, S. J. (2006). CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity*, 24(5), 623-632. doi: 10.1016/j.immuni.2006.02.015
72. Santander, J., Roland, K. L., & Curtiss, R., 3rd. (2008). Regulation of Vi capsular polysaccharide synthesis in Salmonella enterica serotype Typhi. *J Infect Dev Ctries*, 2(6), 412-420.
73. Santiviago, C. A., Toro, C. S., Bucarey, S. A., & Mora, G. C. (2001). A chromosomal region surrounding the ompD porin gene marks a genetic difference between Salmonella typhi and the majority of Salmonella serovars. *Microbiology*, 147(Pt 7), 1897-1907.

74. Santiviago, C. A., Toro, C. S., Hidalgo, A. A., Youderian, P., & Mora, G. C. (2003). Global regulation of the Salmonella enterica serovar typhimurium major porin, OmpD. *J Bacteriol*, 185(19), 5901-5905.
75. Secundino, I., Lopez-Macias, C., Cervantes-Barragan, L., Gil-Cruz, C., Rios-Sarabia, N., Pastelin-Palacios, R., . . . Isibasi, A. (2006). Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology*, 117(1), 59-70.
76. Schnaitman CA.1970.Comparison of the Envelope Protein Compositions of Several Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol* . 104:1404-5
77. Simon, R., Tennant, S. M., Wang, J. Y., Schmidlein, P. J., Lees, A., Ernst, R. K., . . Levine, M. M. (2011). Salmonella enterica serovar enteritidis core O polysaccharide conjugated to H:g,m flagellin as a candidate vaccine for protection against invasive infection with S. enteritidis. *Infect Immun*, 79(10), 4240-4249. doi: 10.1128/iai.05484-11
78. Singh, M. K., & Choudhuri, G. (2003). Re: Dutta et al.-gallbladder cancer. *Am J Gastroenterol*, 98(4), 936; author reply 936-937. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07372.x
79. Sinha, A., Sazawal, S., Kumar, R., Sood, S., Reddaiah, V. P., Singh, B., . . . Bhan, M. K. (1999). Typhoid fever in children aged less than 5 years. *Lancet*, 354(9180), 734-737. doi: 10.1016/s0140-6736(98)09001-1
80. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. (2013). from <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>
81. Svenson, S. B., Nurminen, M., & Lindberg, A. A. (1979). Artificial Salmonella vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with Salmonella typhimurium. *Infect Immun*, 25(3), 863-872.
82. Szu, S. C. (2013). Development of Vi conjugate - a new generation of typhoid vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 12(11), 1273-1286. doi: 10.1586/14760584.2013.845529
83. Threlfall, E. J., Fisher, I. S., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tschape, H., Cormican, M., . . . Edwards, G. (2003). Trends in antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica serotypes Typhi and Paratyphi A isolated in Europe, 1999-2001. *Int J Antimicrob Agents*, 22(5), 487-491.
84. Tpw, J. G., Phipps, R. P., & Mandel, T. E. (1980). The Maintenance and Regulation of the Humoral Immune Response: Persisting Antigen and the Role of Follicular Antigen-Binding Dendritic Cells as Accessory Cells. *Immunological Reviews*, 53(1), 175-201. doi: 10.1111/j.1600-065X.1980.tb01044.x
85. The type species of the genus Salmonella Lignieres 1900 is Salmonella enterica (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet enterica in Salmonella enterica over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. (2005). *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(Pt 1), 519-520. doi: 10.1099/ijs.0.63579-0
86. Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of Salmonella enterica. *Epidemiol Infect*, 125(2), 229-255.
87. Villarreal, J. M., Becerra-Lobato, N., Rebollar-Flores, J. E., Medina-Aparicio, L., Carbajal-Gómez, E., Zavala-García, M. L., . . . Hernández-Lucas, I. (2014). The Salmonella enterica serovar Typhi ltrR-ompR-ompC-ompF genes are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. *Mol Microbiol*, 92(5), 1005-1024. doi: 10.1111/mmi.12610
88. Waddington, C. S., Darton, T. C., Jones, C., Haworth, K., Peters, A., John, T., . . . Pollard, A. J. (2014). An outpatient, ambulant-design, controlled human infection model using escalating doses of Salmonella Typhi challenge delivered in sodium bicarbonate solution. *Clin Infect Dis*, 58(9), 1230-1240. doi: 10.1093/cid/ciu078
89. Wang, J. Y., Noriega, F. R., Galen, J. E., Barry, E., & Levine, M. M. (2000). Constitutive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated Salmonella enterica serovar typhi oral vaccine strain CVD 909. *Infect Immun*, 68(8), 4647-4652.
90. Watson, D. C., Robbins, J. B., & Szu, S. C. (1992). Protection of mice against Salmonella typhimurium with an O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccine. *Infect Immun*, 60(11), 4679-4686.

91. Wright, A. E., & Leishman, W. B. (1900). Remarks on the Results which have been Obtained by the Antityphoid Inoculations and on the Methods which have been Employed in the Preparation of the Vaccine. *Br Med J*, 1(2038), 122-129.
92. Yang, Y., Wan, C., Xu, H., & Wei, H. (2013). Identification and characterization of OmpL as a potential vaccine candidate for immune-protection against salmonellosis in mice. *Vaccine*, 31(28), 2930-2936. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.04.044
93. Zaidi, M. B., Macias, C. L., & Calva, E. (2006). [Mexican studies on Salmonella: epidemiology, vaccines and molecular biology]. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 121-125.
94. Zaher, HS & Green, R. (2009). Fidelidad a nivel molecular:. Lecciones de la síntesis de proteínas Cell 136 ., 746-762