



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EMPLEO DE ANTIGENO
CRUDO Y PURIFICADO PARA LA INVESTIGACION
DE ANTICUERPOS Vi



T E S I S

EXAMEN DE TITULACION
FAC. DE QUIMICA

PATRICIA DEL CARMEN MEMIJE NERI
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

1 9 8 3



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.

CONTENIDO

OBJETIVO

CAPITULO I GENERALIDADES

- 1) Patogenia de Salmonella
- 2) Portadores
- 3) Estructura antigénica
- 4) Respuesta inmunológica
- 5) Diagnóstico de la fiebre tifoidea

CAPITULO II ANTIGENO Vi

- 1) Anticuerpos anti-Vi en los portadores sanos
- 2) Localización y características del antígeno Vi
- 3) Estructura del antígeno Vi
- 4) Métodos de obtención del antígeno Vi purificado
- 5) Respuesta inmunológica
- 6) Métodos para titular anticuerpos anti-Vi
- 7) Localización de portadores por titulación de anticuerpos anti-Vi

CAPITULO III MATERIALES Y METODOS

CAPITULO IV RESULTADOS

CAPITULO V CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

OBJETIVO.

El presente estudio tuvo como finalidad determinar en una muestra constituida por 500 personas clínicamente sanas mayores de 15 años, los títulos de aglutininas anti-Vi, anti-H y anti-O para establecer su frecuencia en población abierta y realizar así la primera parte de una serie de estudios tendientes a determinar si la investigación y titulación de anticuerpos anti-Vi de Salmonella es una prueba efectiva para detectar portadores sanos de este microorganismo.

Además de determinar la incidencia de anticuerpos anti-Salmonella en población abierta se evaluó un método para la obtención del antígeno Vi parcialmente purificado, para ser utilizado en la reacción de hemaglutinación indirecta para la investigación de sus anticuerpos homólogos.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1) Patogenia de Salmonella.

En todas las formas de infección por Salmonella, los microorganismos penetran por vía oral y pueden producir tanto una infección clínica como subclínica. Son patógenos para el hombre y los animales. Estos microorganismos pueden producir tres tipos de enfermedad y con frecuencia se presentan formas combinadas:

- a) En primer lugar están las fiebres intestinales, como la fiebre tifoidea (S.typhi) y paratifoidea (S.paratyphi A, S.schottmülleri), se presentan cuando los microorganismos son ingeridos con alimentos y bebidas contaminadas y alcanzan el intestino delgado, a partir del cual penetran en los linfáticos intestinales (posiblemente fagocitados por los monocitos). Los microorganismos pasan por el conducto torácico hasta la corriente sanguínea de donde se diseminan a muchos órganos, incluyendo riñón, bazo, vesícula e intestino, en este último caso se reproducen en el tejido linfoide y son eliminados por las heces.

Las lesiones más importantes que se producen son hiperplasia y necrosis del tejido linfoide, necrosis

focal del hígado, inflamación de la vesícula biliar y ocasionalmente en otros sitios, como pulmón.

- b) También se puede presentar septicemia (S.choleraesuis) donde la invasión de la sangre sigue a la entrada del microorganismo por vía oral, aunque sin presentarse la infección intestinal. Estos microorganismos están ampliamente diseminados y tienden a causar supuraciones focales, abscesos, meningitis, osteomielitis, neumonías y endocarditis.
- c) Por último se encuentran las gastroenteritis (S.typhimurium, S.enteritidis, S.derby), muchas veces se les llama intoxicación alimentaria, ya que los síntomas comienzan después de 8 a 24 h de incubación, lo cual sugiere que la ingestión de grandes cantidades de microorganismos irrita las mucosas (45).

Las especies del género Salmonella presentan marcadas diferencias tanto en sus características fisiológicas in vitro, como en su interacción con el hospedador (especificidad, invasividad, etc.). Entre las cepas de Salmonella patógenas para el hombre se encuentran Styphi y tres serotipos de S.entritidis: S.paratyphi-A, S.paratyphi C y S.paratyphi sendai. Las fiebres entéricas son causadas por las mismas bacterias (excepto S.enteritidis serotipo S.paratyphi C) y por S.entritidis.

dis serotipo S.paratyphi B. (60)

Fiebre tifoidea.

Esta enfermedad generalmente se adquiere por vía oral. Hornick y colaboradores (41), trabajando con voluntarios humanos llegaron a la conclusión de que una cantidad de 10^9 bacterias ingeridas, provocan enfermedades en el 95% de los casos, 10^7 bacterias en el 50% de los casos y con 10^5 bacterias se enferman el 25% de los individuos. En tanto que no hubo enfermedad cuando la dosis ingerida fué de 10^3 bacterias o menos. Puede hacerse una diferenciación entre las personas que excretan S.typhi (85), en los convalecientes, la excreción por vía digestiva suele durar de 2 a 16 semanas(aunque las bacterias pueden aislarse aún después de 7 u 8 meses) y por orina de 6 a 8 semanas o durar toda una vida en ambos casos.

2) Estado de portador.

Un ejemplo importante de la resistencia a la infección por Salmonella es el estado de portador. Después de una infección clínica o subclínica, cierto número de individuos continúan portando microorganismos en sus tejidos

durante períodos variables (portadores convalecientes y portadores sanos permanentes) (46). Estos portadores son aquellos individuos que excretan S.typhi por períodos mayores de un año; si el período de eliminación es menor son "excretadores temporales" de dos tipos: los convalecientes, que son aquellos que presentaron un cuadro clínico reconocible y los asintomáticos, en los que no se presentó el cuadro. Hay que hacer notar que puede haber portadores en los que nunca se presentaron los síntomas de la enfermedad (85).

Se sabe que un 3% de los enfermos de fiebre tifoidea se convierten en portadores permanentes estando presente el microorganismo en diferentes órganos, entre los cuales los más importantes son vesícula biliar, intestinos y en algunos casos vías urinarias. Estas personas generalmente continúan excretando el bacilo por el resto de su vida (46, 58).

Siendo S.typhi un parásito primariamente adaptado al hombre, la epidemiología de la fiebre tifoidea se construye alrededor del portador, ya que cualquiera de los vehículos y medios de contaminación debe haber estado en contacto con un ser humano infectado. Por esto las medidas profilácticas son: (66)

- a) Mejoramiento de las condiciones sanitarias, particularmente en las que se refieren a la vigilancia del abastecimiento de agua potable y manejo de los alimentos.
- b) Control de los portadores.
- c) Empleo de vacunas para la inmunización activa de la población de zonas endémicas y en los casos de epidemias.

Es obvio que para evitar la fiebre tifoidea hay que impedir que las bacterias excretadas por una persona puedan ser ingeridas por otra. En aquellos países o zonas en que la fiebre tifoidea es endémica, las condiciones sanitarias generalmente dejan mucho que desear y existen fallas evidentes en la vigilancia de los abastecimientos de agua, la disposición de excretas y el control de los alimentos (67).

Los portadores crónicos de tifoidea constituyen un importante reservorio de S.typhi y son responsables de muchos brotes de fiebre tifoidea (58). Si en estas circunstancias el portador tiene acceso a medios que permitan una amplia diseminación de la contaminación, el riesgo de que se presenten brotes es alto. Un ejemplo clásico de la importancia que puede tener un portador es el de Mar

Mallon ("María Tifoidea") quien entre muchos brotes que ocasionó se cuenta uno en Nueva York con 1,300 casos (40).

Esta mujer padeció fiebre tifoidea en 1901. Poco después un amigo de la casa donde ella era cocinera contrajo la enfermedad y un mes más tarde la lavandera de la familia también enfermó de fiebre tifoidea. En 1902, María se empleó en otra casa. Pocas semanas después enfermaron la lavandera de la familia y 7 miembros de la casa. En 1904 se mudó de ocupación. Tres semanas después de su llegada a la nueva casa, aparecieron 4 enfermos de tifoidea. Como se sospechara de la cocinera, abandonó la casa y fué a servir a otra familia donde 15 días después enfermó la lavandera. En 1907 llegó a servir a otra familia en la ciudad de Nueva York, y dos meses después de su llegada se presentaron dos casos de tifoidea en la familia, siendo uno fatal. En el curso de estos cinco años se estableció que María había sido la causa de por lo menos 25 casos de fiebre tifoidea. Prácticamente fué hecha prisionera por el Departamento de Salud y durante 3 años los coprocultivos practicados fueron constantemente positivos, con cantidades variables del bacilo. María se perdió de la observación de esta dependencia en 1914, año en que entró a trabajar como cocinera a un hospital de mujeres de Nueva York. En este hospital en enero y febrero de 1915, se presentó un brote epidémico de tifoidea con un

total de 25 casos. La cocinera huyó. Nuevos estudios se realizaron a esta portadora como la causante de una epidemia hídrica de fiebre tifoidea ocurrida en 1903, en Ithaca, estado de Nueva York, con un total de 1,300 casos.

Existen innumerables ejemplos de portadores que han sido seguidos a través de varios años. Sawyer, en 1914, describió otro brote de 93 casos de fiebre tifoidea entre los asistentes a una comida.

El ambiente inmediato del portador (contacto familiar) o sea, su "esfera de acción" va adquiriendo gradualmente resistencia contra la enfermedad, no así los parientes lejanos, visitas o amigos.

En una primera parte el portador produce más estragos en su esfera de influencia que fuera de ella, pero con el transcurso del tiempo este proceso de invierte, observándose una mayor agresividad contra las personas que no han tenido contacto permanente con él, debido a lo cual, son más susceptibles. El fenómeno explica la reducción del número de casos nuevos de fiebre tifoidea por el portador en el transcurso del tiempo y el que la incidencia de la fiebre tifoidea sea función del número de portadores producidos hasta 5 a 10 años antes. La agresividad del portador decrece gradualmente con la inmunización de

sus esferas de acción. La presencia de enfermos después de 10 años exige la concurrencia de varios factores: manipulación de alimentos, llegada de individuos susceptibles a la esfera de acción, dosis infectante, etc., condiciones que tienden a reducir el número de enfermos producidos sin mediar ninguna medida sanitaria (3).

La probabilidad de que una persona se convierta en portador, aumenta con la edad; el número de mujeres que se convierten en portadores es mayor al de hombres (1). En estas personas la eliminación de S.typhi es intermitente y en ocasiones poco numerosa. El número de microorganismos eliminados puede ser desde menos de 500 hasta 10^{10} por gramo de heces (58,77).

Las mujeres exceden a los hombres como portadores en una relación o proporción de 3:1. Los microorganismos residen en los focos endurecidos del árbol biliar, migran a través de los conductos biliares y sobre la superficie del epitelio intestinal y no causan fiebre tifoidea en el portador. Las alteraciones anatómicas en el tracto biliar son importantes en la producción del estado del portador. La deficiencia de IgM, conjuntamente con el endurecimiento o daño del árbol biliar, son también importantes (41).

Aunque la importancia epidemiológica del estado del por-

tador ha sido reconocida desde hace tiempo, existe poca información sobre la cantidad de microorganismos presentes. Merselis y colaboradores (58) reportan que 42 de 46 muestras fecales obtenidas en 13 portadores, contenían de 10^6 a 10^{10} bacilos por gramo de heces. Thomson (77) reporta que en 8 muestras fecales de 12 portadores se encontraron de 5×10^7 bacilos por gramos de heces. Hornick (41) reporta hasta 10^{11} microorganismos por gramo.

Para localizar a los portadores en un grupo es necesario un estudio bacteriológico que comprenda varias muestras (68). Si se considera el pequeño porcentaje que representan los portadores en la población total, el estudio es laborioso y resulta caro, sin contar con la dificultad que puede representar la obtención adecuada de las muestras.

Como solución para superar todos estos factores se ha pensado en los métodos serológicos, pues el análisis bacteriológico de heces no es accesible todavía como una prueba que se puede aplicar en forma simplificada y sistemática.

3) Estructura antigénica de Salmonella.

Aún cuando las principales variedades de bacilos entéri-

ricos pueden ser identificados tentativamente por fermentación y otras reacciones metabólicas en medios diferenciales, la identificación final de especies individuales está basada en su estructura antigénica (22).

La estructura antigénica de Salmonella ha sido estudiada incluso a nivel molecular. Las investigaciones hechas por Kauffmann (1937) y White (1926) sobre los componentes antigénicos del soma y de los flagelos sirven como base para la clasificación que lleva su nombre.

Los antígenos "H" (flagelares) y los "O" (somáticos) fueron originalmente descritos como los componentes antigénicos lábiles y estables al calor. Los tipos de Salmone
lla se han reunido en grupos con base en la presencia de los antígenos "O" (somáticos) y los tipos dentro de un grupo se establecen con base en la presencia de los antígenos flagelares o "H".

Antígenos "H" y variación de fase.

Los antígenos H son de naturaleza protéica y se inactivan a temperaturas mayores de 60°C, así como por el tratamiento con ácidos diluidos y alcoholes. Para preparar los antígenos que se emplean en las pruebas serológicas, se añade formalina a los cultivos jóvenes de cepas móviles obtenidas en medios líquidos. Este procedimiento probablemente fija los flagelos a la pared celular de tal

manera que los antígenos somáticos ya no se encuentran expuestos, pues se cubren con los antígenos H y los que reaccionan son estos últimos.

El suero que contiene anticuerpos anti-H aglutina a los antígenos H en forma característica en aproximadamente 2 h a 55°C, formando grandes masas esponjosas que se dispersan fácilmente (59).

Los miembros de cada grupo O pueden diferenciarse en serotipos con base en sus antígenos flagelares (H). La mayoría de las cepas de Salmonella pueden producir dos tipos diferentes de antígenos flagelares. El primero, antígeno flagelar en fase 1, es compartido por unos pocos tipos de Salmonella; el segundo, antígeno flagelar en fase 2, es menos específico. Los microorganismos de un cultivo dado pueden ser de una sola fase (cultivo monofásico), frecuentemente pueden dar mutantes en otra fase (variación de fase) especialmente si el cultivo se incubaba por más de 24 h. Tal variación de fase puede inducirse cultivando los microorganismos en un medio que contenga los anticuerpos homólogos a sus antígenos flagelares, esto favorece el crecimiento de mutantes con el antígeno alternante (alelico) el cual no reacciona con el suero hiperinmune (22).

Antígenos O.

Los antígenos "O" no presentan variación de fase y por ésto constituyen una base más firme para la clasificación en grupos que los componentes flagelares (esquema Kauffmann-White). Los componentes somáticos se encuentran presentes en la superficie del cuerpo celular (soma) en aquellos microorganismos tanto móviles como inmóviles. Son de naturaleza lipopolisacárida y resistentes al calentamiento prolongado a 100°C, no se destruyen por alcohol o por ácido diluído. La aglutinación del antígeno se produce después de 6 a 12 h a 55°C y se forman agregados bacterianos en forma de masas granulares que no pueden dispersarse por agitación (22).

Antígeno Vi.

Ciertas especies dentro de la familia Enterobacteriaceae tienen una capa exterior de polisacárido llamado antígeno Vi. Algunas cepas de S.typhi no aglutinan cuando se les mezcla con el suero homólogo, Felix y Pitt (1934) demostraron que esa falta de aglutinación se debía a la posesión de ese componente somático especial llamado "Vi" o antígeno de virulencia, ya que las cepas que lo contienen son más virulentas para el ratón que los microorganismos que sólo poseen el antígeno O. El antígeno Vi se encuentra en la periferia extrema del cuerpo de la célula y así previene el acceso de las aglutininas anti-O a sus antígenos somáticos homólogos. Defiere de los anti-O.

nos O en que es lábil al calentamiento por 1 h a 60°C, a ácidos diluídos y al fenol. Los bacilos pierden su antígeno Vi después de repetidos subcultivos y se vuelven aglutinables frente al suero anti-O.

En 1938, Craigie y Yen descubrieron bacteriófagos activos frente a cultivos de Salmonella que contienen antígeno Vi. Estos fagos presentan una adaptabilidad poco usual a las cepas de bacterias en las cuales se propagan, dando como resultado el desarrollo de una especificidad extraordinaria para la cepa de S. typhi. Los fagos Vi específicos son un medio valioso para la identificación de S. typhi y también se han utilizado para la identificación de cepas de S. schottmülleri (60).

Disociación

Además de la variación de fase flagelar, Salmonella puede presentar algunas alteraciones relacionadas con sus diferentes componentes antigénicos. Las cepas móviles pueden convertirse en no móviles por pérdida de sus antígenos flagelares (H). Se presenta frecuentemente la variación lisa a rugosa (S/R) y se da por la pérdida del antígeno O y la aparición en la superficie de la célula de diferentes polisacáridos extraídos de sus paredes celulares (antígeno R) que están también presentes en células lisas (S) y que causan que el microorganismo aglutine espontáneamente en solución salina. El cambio de S a R pue

de tener lugar sin la pérdida de los antígenos flagelares o el Vi (22, 63).

El contenido de antígeno Vi en cualquier cepa de S. typhi puede variar sin afectar sus antígenos O u H. Kauffmann (1935) describió tres formas en las que este microorganismo se puede encontrar: (1) la forma V, que posee una gran cantidad de antígeno Vi y que no aglutina con el suero anti-O; (2) la forma VW, en la cual se detecta algo de antígeno Vi pero que sí aglutina con el suero anti-O; y (3) la forma W que no contiene antígeno Vi. Ya que el antígeno Vi, H y O pueden variar independientemente, pueden presentarse en varias formas de disociación (60).

Antígeno común enterobacteriano. Además de los antígenos que diferencian algunos géneros de la familia Enterobacteriaceae, muchos de estos microorganismos comparten un antígeno común, el cual puede extraerse de la célula. Los anticuerpos no precipitan al antígeno común, y no aglutinan células, pero pueden ser detectados por reacciones de hemaglutinación indirecta o de fijación de complemento.

Preparación de suero específico. Cuando los animales se inmunizan con cepas móviles inactivadas con formalina, el suero contiene ambos anticuerpos anti-H y anti-O. Los

anticuerpos anti-H presentan generalmente un título más alto que aquel del O. Esta diferencia puede deberse, en parte, a la inmunogenicidad mayor del antígeno H que es una proteína, comparada con el polisacárido del antígeno O, y en parte a la mayor sensibilidad de la prueba de aglutinación H. Si la cepa inmunizante también contiene un antígeno Vi, el suero contendrá, además, anti-Vi.

El suero reacciona con los antígenos superficiales individuales en pruebas de aglutinación y por esto se somete a reacciones de absorción selectiva. Por ejemplo, el anticuerpo anti-H puede ser eliminado por absorción con suspensiones de flagelos homólogos o con suspensiones de mutantes que contienen los flagelos de las células inmunogénicas pero no sus antígenos Vi u O. De manera similar, los anticuerpos anti-O o anti-Vi pueden eliminarse por absorción con las suspensiones adecuadas de bacilos (22).

Clasificación de Kauffmann-White.

Los tipos de Salmonella de acuerdo a la presencia de antígeno O, se han constituido en grupos que se designan por letras mayúsculas y números, como A, B, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3, etc., hasta la Z y después por números del 51 al 65. Se toman en cuenta uno o más componentes antígenicos como esenciales para la inclusión en un grupo. Cada componente del antígeno O se designa por un número arábi-

go. Los antígenos flagelares en fase 1 se denominan con letras minúsculas con subíndices numéricos; los de fase 2 se denotan por la combinación de números arábigos y letras minúsculas solas o con subíndice numérico. El sistema Kauffmann-White incluye ahora más de 2,000 tipos de Salmonella (38).

Debe puntualizarse que pueden existir diferencias en la propiedad de fermentar uno o más carbohidratos entre cepas que son idénticas antigénicamente. Se designan como variedades fermentativas. El esquema de clasificación basado en el análisis antigénico es complejo, pero permite el estudio epidemiológico de Salmonella.

4) Respuesta inmunológica a Salmonella typhi.

Hornick y colaboradores (41) en experimentos con voluntarios humanos observaron que, al parecer, los anticuerpos formados durante el curso de la enfermedad no presentan características protectoras, ya que no se encontraba correlación entre el nivel de anticuerpos y la resistencia a la fiebre tifoidea.

En una investigación en humanos sobre el tipo de anticuerpos que forman, se observó que en individuos sanos, los anticuerpos anti-O son del tipo de IgM principalmente (16, 21, 50).

En pacientes con tifoidea se produjeron, además de los anteriores, anticuerpos IgG en cantidades considerables a partir de la primera semana del inicio de los síntomas y también pequeñas cantidades de IgA (50).

El estímulo antigénico en la vacunación es insuficiente para inducir la formación de anticuerpos anti-O de otro tipo diferente al IgM, pero la septicemia prolongada que se presenta en la fiebre tifoidea estimula la síntesis de diferentes tipos de anticuerpos. En la etapa de recuperación disminuye el nivel de anticuerpos anti-O y anti-Vi de la clase IgM y los anticuerpos IgG desaparecen completamente (16).

Crznar reportó que los niveles de anticuerpos IgM fueron 2.2 y 2.8 veces más altos en sueros de pacientes y de personas con antecedentes de fiebre tifoidea, respectivamente, comparados con sueros de portadores (21).

También es de interés anotar que entre las inmunoglobulinas que se presentan en pacientes y portadores se encuentran anticuerpos incompletos. En portadores los anticuerpos incompletos anti-O en su mayoría son IgA frecuentemente y en cantidades significativas (16).

En pacientes con tifoidea, la respuesta inmune celular

es más importante que la inmunidad humoral en el período de recuperación de la enfermedad (57).

En los portadores parece existir un grado de inmunidad parcial suficiente para evitar el desarrollo de la enfermedad pero no para la total eliminación de S.typhi y que de aislarse el bacilo de la sangre del hospedador sin que aparezcan síntomas de fiebre tifoidea en ningún momento (80).

5) Diagnóstico de fiebre tifoidea.

La reacción Widal modificada para la prueba en placa, es un método ampliamente usado en nuestro medio para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. Con el desarrollo de procedimientos adecuados para el aislamiento de Salmonella, los métodos de diagnóstico basados en la detección de aglutininas han perdido la importancia que se les dió hace tiempo (69). La reacción de aglutinación debe considerarse como una prueba de valor presuntivo en virtud de las variables que pueden influir en el resultado: el estado de la enfermedad, la presencia de aglutininas en la población normal, el efecto de la vacunación previa y la administración de antibióticos (84).

La preparación de los antígenos H y O para esta reacción

debe hacerse a partir de colonias lisas para obtener buenos resultados, ya que en ocasiones se dificulta por la variación S/R que experimenta Salmonella. No se han establecido métodos aceptados mundialmente para la estandarización de la prueba, por lo que los títulos de sueros probados por diferentes laboratorios pueden tener discrepancias hasta del 70% al usar antígenos H u O preparados por cada uno de ellos (32).

Considerando todo lo anterior, no puede establecerse un título por encima del cual la reacción puede considerarse positiva en todos los casos, pero siempre es posible efectuar pruebas serológicas y obtener resultados concluyentes si se hace una prueba al inicio de la enfermedad y otra a la semana; si se observa un aumento significativo, por ejemplo, de 1:40 hasta 1:120 en el título de anticuerpos, se tiene la certeza de que la infección es actual. Sin embargo, (69) se ha reportado que el diagnóstico definitivo debe hacerse sobre la base del aislamiento del agente causal.

Neter y colaboradores encontraron que para la titulación de aglutininas pueden emplearse eritrocitos sensibilizados con polisacáridos bacterianos, la sensibilización puede efectuarse simplemente mezclando los antígenos con los eritrocitos (62). El antígeno soluble crudo o el lipopolisacárido purificado previamente tratado con NaOH,

se adsorben mejor a los glóbulos rojos (65).

La hemaglutinación bacteriana indirecta con productos de rivados de bacterias es un método más sensible que la aglutinación directa. Con ella se ha estudiado la respuesta humoral de personas con infecciones entéricas por Salmonella, Shigella y Escherichia coli, así como en infecciones crónicas o agudas del tracto urinario (34, 61, 62, 63, 64).

La utilidad de la hemaglutinación indirecta ha sido demostrada por Cáceres y Mata quienes estandarizaron una técnica para Shigella dysenteriae tipo I que posee alta especificidad y buena reproducibilidad (14). Por ello se planteó en este trabajo la posibilidad de investigar con el mismo procedimiento, el sensibilizar eritrocitos con antígenos Vi de Salmonella typhi y en los casos positivos, averiguar si existe correlación con la reacción de Widal.

Para el diagnóstico de la fiebre tifoidea se considera apropiado efectuar las reacciones de hemaglutinación con antígeno Vi y O. La reacción de hemaglutinación Vi en conexión con la reacción de Widal puede ser apropiada como prueba orientativa para la detección de portadores crónicos de tifoidea.

La reacción de hemaglutinación con el antígeno Vi puede ser aplicada para detectar particularmente portadores en los cuales las bacterias no se están excretando por heces y orina. Esta reacción puede ser también de ayuda en la diferenciación entre portadores crónicos y transitorios.

CAPITULO II

ANTIGENO Vi

- 1) Relación de anticuerpos anti-Vi y el estado de portador. La demostración de anticuerpos anti-Vi de S.typhi pueden ser un método útil para establecer el estado de portador crónico, ya que se han encontrado niveles séricos significativos de anticuerpos anti-Vi en aproximadamente el 90% de los portadores crónicos de fiebre tifoidea (58, 71).

Félix observó en 1935 (26, 27, 53) la aparición de anticuerpos anti-Vi en el suero de portadores de S.typhi por primera vez y este mismo investigador y colaboradores, durante el mismo año (27, 71) propusieron utilizar la prueba de hemaglutinación con el antígeno Vi en la detección de los mencionados portadores.

Desde entonces, esta prueba ha sido estudiada por muchos investigadores dando como resultado un cúmulo de literatura, que fué revisada por Klein (1943) (71), Sokolov (1945), Middlebrook y Dubos (1948) (6), Felix (1951) (71), Spaun (1951 y 1952) (71), Landy y Lamb (1953) (6), Landy (1954) (6), Spaun (1957) (71), y Kraskina y Cols (1965) (6).

No obstante que en general se aceptó el valor de la prue-

ba de hemaglutinación para la detección de anticuerpos, frecuentemente ha sido modificada por diferentes investigadores y la técnica no ha sido completamente estandarizada (16).

Los resultados obtenidos por diferentes investigadores en las pruebas de hemaglutinación indirecta, difieren mucho los porcentajes de portadores detectados y el número de reacciones positivas obtenidas en sueros de personas aparentemente normales (71).

2) Localización y características del antígeno Vi.

Este antígeno está presente en Salmonella typhi, Salmonella enteritidis (serotipo paratyphi C y dublin) y en algunas cepas de Citrobacter (entre ellas Salmonella balleur y un bacilo designado sucesivamente Salmonella coli, Escherichia coli 5396/38, Escherichia freundii 5396/38 y Citrobacter freundii 5396/38). Es importante hacer notar que no se han encontrado diferencias inmunológicas entre los antígenos Vi presentes en diferentes especies (24, 44, 45, 85).

Felix y Pitt (29) lo reportaron como un antígeno somático especial perteneciente al grupo K (49). Generalmente el antígeno Vi se inactiva parcial o totalmente por ebu-

llición durante 2 h y aún a veces por exposición a 60°C durante 1 h, por tratamiento con HCl 1 mol/litro durante 20 h a 37°C, o con NaOH 0.05 mol/litro durante 4 h a temperatura ambiente. Resiste la formalina hasta una concentración del 0.2% y el alcohol etílico, a concentración final de 0.5%, lo desnaturaliza siendo este efecto reversible (85).

Ashida en 1949 (4) aisló de Salmonella typhi Ty2 antígeno Vi libre del antígeno O. Grabar y Corvazier obtuvieron antígeno Vi de Salmonella typhi Vi1 (33). Anteriormente Henderson y Morgan utilizando cepas rugosas de S. typhi que contenían poco o nada de antígeno O, aislaron antígeno Vi libre de antígeno O pero llegaron a la conclusión de que el antígeno Vi había sufrido modificaciones durante su purificación (34).

5) Estructura del Antígeno Vi.

Los estudios químicos del antígeno Vi aislado, demostraron que es un polisacárido ácido totalmente polimerizado (5, 17, 23, 45, 55, 81, 83) constituido por unidades repetitivas de ácido N-acetil-D-galactosaminurónico (17, 37, 55, 81). En 1958, Clark, McLaughlin y Webster (17) hidrolizaron el antígeno utilizando HCl y H₂SO₄ concentrados y el producto de hidrólisis fué caracterizado por aná

lisis en cromatografía en papel y espectrografía infrarroja y por comparación con un ácido D-glucosaminurónico sintético como un ácido aminohexaurónico. También se ha reportado que la molécula del antígeno Vi crudo contiene O-acetilo (5,23,43). Hay concordancia en la comparación entre los niveles analíticos teóricos que lo presentan como un polímero y los datos reportados por Webster (83). Se ha descrito que las unidades de ácido galactosaminurónico se encuentran ligadas por uniones $\alpha(1\rightarrow4)$ (37), que su peso molecular promedio es bajo y que el contenido de O-acetilo se reduce o elimina cuando se utiliza álcali diluido (82) durante su purificación.

Se ha demostrado que el tratamiento con el fago II Vi disminuye los grupos O-acetilo del polisacárido Vi sin despolimerizar (75, 76). No se han reportado otros residuos químicos además de los grupos O-acetilo y N-acetilo (5, 81). El estudio del efecto del peso molecular y el contenido de O-acetilo en la actividad-biológica del antígeno Vi se ha dificultado debido a que no pueden alterarse ambas propiedades independientemente (23, 52, 54).

Kiessling ha demostrado que las cadenas paralelas del polisacárido están unidas por enlaces éster (23, 42) aunque no se ha establecido la estructura secundaria del antígeno Vi. El tratamiento con ácido diluido o álcali puede causar despolimerización por hidrólisis a lo largo de tales uniones (23).

Como sucede con el DNA, probablemente en el antígeno Vi se obtiene un decremento en el peso molecular por rompimiento transversal. El tratamiento sónico del antígeno produce una clase diferente del producto despolimerizado por hidrólisis química (23); sin embargo, Jarvis y cols. (42) reportaron que el antígeno obtenido por ellos era químicamente similar al original.

Landy y cols. (17, 36) sugieren que la viscosidad de los preparados del antígeno Vi es un indicador sensible de su actividad biológica. Parece que es necesario que exista un alto grado de polimerización de la molécula del antígeno, para una buena inmunogenicidad y para dar protección al ratón frente a Salmonella typhi. Milner y Jarvis, (59) purificaron el antígeno Vi electroforéticamente y lo probaron mediante el método de titulación de hemaglutinación indirecta descrito por Jarvis (44), demostrando que no hubo cambios en los títulos del antígeno, aún cuando no llegó a producir un decremento de 40 veces el peso molecular promedio. Jarvis reportó que el peso molecular del antígeno intacto es de 1.7×10^6 (42).

El calentamiento no destruye al antígeno, sino que facilita su disolución (49), este calentamiento hace que se pierda inmunogenicidad, así como la capacidad de formar aglutinados; sin embargo, todavía se forman complejos antígeno-anticuerpo (85). Los determinantes antigénicos son

estables al calor (85), pero para que se tenga buena antigenicidad se requiere que la molécula esté muy polimerizada (23). El mismo Jarvis, analizando los resultados obtenidos por medio de la hidrólisis alcalina y el tratamiento sónico para degradar el antígeno, postula que es una macromolécula cuyas cadenas están unidas por enlaces éster (42, 49).

Varios investigadores (9, 18, 20, 49, 78) han reportado que los concentrados crudos de antígeno Vi contienen del 2 al 5% de nitrógeno, 2% de fósforo y del 2-10% de cenizas. No se han encontrado azúcares reductores antes de someterlo a la hidrólisis ácida, pero sí después de ella.

Existen ciertas contradicciones sobre las pruebas cualitativas de proteínas y aminoácidos. Se han reportado residuos lipídicos asociados con el antígeno (18, 20, 78).

El análisis electroforético (19) reveló un movimiento rápido del antígeno con componentes cargados negativamente. Existen también reportes acerca de la ausencia de ácidos urónicos (20, 49), a pesar de la presencia de un ácido fuerte (82).

4) Purificación del antígeno Vi.

Los primeros intentos de extracción de este polisacárido fueron totalmente empíricos. Algunos investigadores han reportado sus intentos para purificar el antígeno Vi y han descrito las propiedades químicas y biológicas de los productos. Entre ellos Topley y cols. en 1937; Combiesco y cols., 1937; Henderson y Morgan, 1938; Boivin y Mesrobeanu, 1938; Ogonuki, 1940; Grabar y Corvazier, 1951; Webster, Landy y Freeman, 1952; Kosinski y cols., 1954; De Barbieri y cols., 1956; Baker y cols., 1959; etc. (45). Los reportes varían en los datos proporcionados acerca de la cantidad y calidad del antígeno obtenido, particularmente respecto a la química del antígeno. En general, estas discrepancias pueden ser atribuidas a diferencias en el grado de pureza del producto, pero también a alteraciones químicas del antígeno durante su purificación.

Ashida ideó un método de hidrólisis (4) con hidróxido de sodio que dió inicialmente buenos resultados (82) y más tarde reportó alteraciones en las propiedades del antígeno. Webster, Landy y Freeman (82) describieron un método (que es el utilizado para la purificación del antígeno Vi en este trabajo de tesis) que les permitió obtener un antígeno altamente purificado de S.typhi, E.coli y P.ballerup. En este método se emplean los extractos acuosos de bacilos desarrollados en medio de tripticasa soya agar en presencia de concentraciones elevadas de NaCl. Estos ex-

tractos se someten al fraccionamiento con etanol y después a la hidrólisis con ácido acético 1 mol/litro calentando a 100°C durante 24 h (así se eliminan los restos de antígeno O y se obtiene un antígeno Vi muy puro). A pesar de este tratamiento en condiciones severas, el antígeno conserva buena actividad antigénica e inmunogénica (51, 55, 56).

Barbieri y cols., en 1965, reportaron que también utilizaron la hidrólisis ácida descrita por Webster, Landy y Freeman (82). Baker y colaboradores (5) tuvieron éxito al purificar el antígeno por precipitación con acetona e indicaron que el tratamiento con ácido acético y calor probablemente degradaba la molécula y que la hidrólisis alcalina eliminaba el O-acetilo pero no el N-acetilo. Sin embargo, Landy y cols. reportaron que el tratamiento alcalino eliminaba una gran cantidad de N-acetilo (52). No hay reportes de que la clase de degradación causada por la hidrólisis ácida o alcalina del antígeno Vi pueda realizarse sin desacetilación. Por otra parte, si se reduce el peso molecular por vibración sónica y se elimina O-acetilo sin que se degrade a la molécula, se facilita la relación de estructura química con actividad biológica (75, 76).

Se sabe que la composición del antígeno Vi es a base de unidades de ácido galactosaminurónico N-acetilado y O-acetilado y que su estructura no parece un polielectrolito -

lineal. Todo modelo estructural del antígeno debe explicar la clase de degradación que ocurre tanto en el medio ácido como en el alcalino (42). La hidrólisis produce pérdida de O-acetilo, además de una considerable reducción del peso molecular. Cuando se centrifugan preparados del antígeno Vi parcialmente hidrolizado (por tratamiento con ácido acético 1 mol/litro y calentamiento por 24 h, o bien tratado con NaOH 0.1 mol/litro por 15 min a temperatura ambiente) se identifican dos compuestos de peso molecular diferente; uno es el que perdió O-acetilo y tiene alto peso molecular y otro de peso molecular menor.

La falta de una cantidad apreciable de compuestos intermedios durante la hidrólisis, parece indicar que el antígeno original tiene una estructura estable de subunidades organizadas o por lo menos que la alteración ocurre de una forma ordenada y no en una forma casual. El tratamiento sónico del antígeno original (56), produce una clase de rompimiento transversal casual de una molécula asimétrica.

Cualquier tratamiento que elimine O-acetilo también causa reducción del peso molecular. La hidrólisis es lenta cuando se emplea ácido acético 1 mol/litro y calentamiento; en tanto que es rápida con NaOH 0.1 mol/litro a temperatura ambiente (54).

Las observaciones reportadas por Heyns y Kiessling (36) están de acuerdo con el tipo de estructura sugerida anteriormente.

Se han empleado también otros métodos para la purificación del antígeno. Jarvis y cols. (45) utilizaron un método electroforético. Wong y cols. (86) aislaron el antígeno por precipitación con acetona y reportaron una mayor inmunogenicidad además de una menor toxicidad.

En resumen, las alteraciones químicas causadas al antígeno Vi durante su aislamiento y la pureza obtenida, son dos características que influyen decisivamente en sus propiedades químicas y biológicas ya que la hidrólisis, alcalina o ácida, provoca pérdida de los grupos acetilo y la disminución del peso molecular (42, 45) y, por lo tanto, la reducción de la inmunogenicidad y la pérdida de la actividad de receptor para el fago VIII (42, 75).

Entre las propiedades del antígeno Vi purificado, se observó que cuando se adsorbe en eritrocitos humanos tipo O, es aglutinado específicamente por los anticuerpos anti-Vi.

El antígeno Vi aislado, cuando tiene alta potencia y estabilidad, ofrece ventajas para detectar y cuantificar los anticuerpos anti-Vi de una manera práctica (4).

5) Respuesta inmunológica frente al antígeno Vi.

La respuesta humoral a la inmunización con el antígeno Vi purificado en personas normales y la que aparece durante el curso de la enfermedad es similar en cuanto a la clase de anticuerpos producidos; en el 90. día después de la inmunización aparecen anticuerpos clase IgM, IgA e IgG. Los niveles y el porcentaje relativo no se alteran después de repetir la inmunización (16).

Bhatnagar (8) pudo demostrar por medio de pruebas de aglutinación, anticuerpos anti-Vi en pacientes sólo hasta 3 ó 4 semanas después del inicio del cuadro clínico.

Besednova y cols. (6) hicieron estudios en personas que habían sufrido una infección severa y determinaron por medio de pruebas de hemaglutinación, que los títulos más altos de anticuerpos anti-Vi estaban presentes entre el 50. y 70. mes después del inicio de la misma. El porcentaje de resultados positivos en esta prueba entre personas que han padecido la enfermedad, va desde 46% entre aquellos que habían padecido la enfermedad de 6 a 12 meses antes, hasta un 2% cuando habían enfermado 4 años antes (6) y si se mantenían los títulos de anticuerpos anti-Vi altos, generalmente se trataba de portadores (51,68).

Existe cierta analogía entre el antígeno Vi y los polisacáridos capsulares del neumococo. Ambos son polímeros vis

cosos altamente polimerizados que cuando se purifican muestran buena inmunogenicidad para el hombre y para el ratón protegiéndolos contra las cepas virulentas correspondientes. La inmunización con una sola dosis en el humano estimula la producción de anticuerpos cuyos títulos se mantienen por largos períodos, más de 2 años, y no se observa respuesta secundaria con una dosis de refuerzo (51, 57).

En el caso de portadores no disminuye el título de anticuerpos anti-Vi, sino que continúan sintetizándose por muchos años. Estos anticuerpos pertenecen a la clase IgG en su mayoría y una menor proporción a la clase IgA, no encontrándose IgM. La ausencia de estos últimos en portadores, constituyó una diferencia notable con respecto a los pacientes e individuos vacunados que incluyeron en su estudio Chernokhvostova y cols. (16) quienes demostraron en ellos las tres clases de anticuerpos: IgM, IgA e IgG.

Frecuentemente los niveles de anticuerpos no se encuentran elevados y algunos portadores analizados aparentemente son sensibles a las endotoxinas. Así, los microorganismos virulentos son eliminados del huésped probablemente por mecanismos inmunológicos humorales o celulares locales. Un estudio más profundo de este ejemplo notable de persistencia microbiana y de los anticuerpos y linfo-

citos sensibilizados, puede llevar a tomar mejores medidas de control contra las infecciones entéricas.

Chernokhvostova y cols. han reportado que los portadores de Salmonella presentan deficiencia de IgM y que con la administración del antígeno Vi no forman estos anticuerpos. Ellos sugieren que los portadores podrían seleccionarse por esta deficiencia en IgM (16).

Existen muchos reportes de la depresión selectiva de la síntesis de IgM en portadores (Ivanyi & Cerny, 1965; Ivanyi Valentova & Cerny, 1966; Cerny & Ivanyi, 1966, 1967; Sterzl, 1966; Jilek & Sterzl, 1967). Ellos suponen que esta deficiencia es debida al agotamiento de las células productoras de IgM por una hiperinmunización durante la formación del estado portador; sin embargo, también señalan en la discusión de su reporte que el deterioro de la síntesis de IgM posiblemente sea una manifestación de un defecto congénito del sistema IgM y, por esto, sí se puede considerar este defecto como una causa del estado del portador pero no como un resultado (16).

Los polisacáridos bacterianos generalmente inducen una síntesis activa y prolongada de anticuerpos IgM, el antígeno O es uno de los que inducen sólo producción de IgM (30), pero en los portadores estudiados por Chernokhvostova, además de que no se encontraron IgM anti-O y anti-Vi,

la inmunización con antígeno Vi incrementó sólo el nivel de IgG. Como los anticuerpos IgM son más efectivos que los IgG para provocar reacciones citolíticas por su mayor facilidad para activar complemento, su presencia en pequeñas cantidades podría influir en la baja actividad bactericida específica observada en sueros de portadores (16). En estas personas los anticuerpos anti-Vi de la clase IgG tienen mayor afinidad, características que también se presentan durante el período agudo de la enfermedad.

Por otra parte, cuando el suero de portadores se absorbe con antígeno Vi hay disminución de anticuerpos en IgA (48). La disminución de IgA por absorción con el antígeno Vi es 2.5 veces más alta en portadores que en no portadores con antecedentes de tifoidea (21).

Por lo que toca a la influencia de la vacuna antitifoidea en el título de anticuerpos anti-Vi, algunos autores reportan que la vacunación no modifica los niveles de estos anticuerpos (11, 68, 70).

Eliot, utilizando la técnica de hemaglutinación indirecta, no obtuvo resultados positivos en las personas inmunizadas (25); Saint Martin y Desranleau (70) encontraron 1.8%; Landy y Lamb (53) un 7.1% y Staack y Spaun (73) encontraron un 3.3% de positivos en este tipo de po

blación. Joe y cols. (47) reportaron un 41.7% de títulos positivos en adultos vacunados semestralmente.

Con la técnica de hemaglutinación, Landy (51) y Levin y cols. (57) demostraron que en respuesta a la vacunación hay producción de anticuerpos. Gaines y cols. encontraron títulos más altos de anticuerpos anti-Vi incompletos, que anticuerpos anti-Vi completos en la mayoría de las personas vacunadas y que la misma situación se presenta en los portadores (31).

Los anticuerpos anti-O producidos en respuesta a la vacunación son IgM aún después de inmunizaciones repetidas, en cambio, los anticuerpos anti-Vi son IgA, IgG e IgM. (16).

6) Métodos para cuantificar los anticuerpos anti-Vi.

Para conocer los anticuerpos anti-Vi hay que tomar en consideración la interferencia causada por el antígeno O (68). Bhatnagar (8) recomendó para esto utilizar en las pruebas de aglutinación, las cepas aisladas por Kauffmann deficientes en antígeno O y H, pero ricas en antígeno Vi.

Desde 1938 se usó la cepa Vi I o Bhatnagar, pero tenía la desventaja de ser rugosa por lo que era difícil lograr

una buena reproducibilidad en los resultados (53,71); sin embargo, una década después aún se usaba. Para titular los sueros problema debía probarse paralelamente un suero preparado por Felix (27) como standard. El título del suero era la dilución que daba una aglutinación igual a la observada en el standard (68). Un título de 1:5 o mayor era considerado significativo.

Desranleau (1943) y Saint Martin y Desranleau (72), prepararon un antígeno glicerolado de la cepa Vi I y lo emplearon para la técnica en placa.

Los inconvenientes de trabajar con una cepa rugosa hicieron que se probaran otras técnicas tratando de sensibilizar eritrocitos con preparaciones del antígeno Vi.

Spaun (72) y Staack y Spaun (73) desarrollaron una técnica de hemaglutinación indirecta empleando un extracto acuoso de la cepa Bhatnagar para sensibilizar eritrocitos humanos tipo O. Landy y Lamb (53) sensibilizaron eritrocitos humanos tipo O con antígeno Vi de Escherichia coli 5396/38 purificado por el método de Webster y cols. (82).

Schubert y cols (71) modificaron el método de Landy y Lamb en tres aspectos: utilizaron glóbulos rojos de carnero en lugar de glóbulos rojos humanos tipo O y un ex-

tracto crudo de Salmonella ballerup para su sensibilización, debido a que los glóbulos rojos de cárnoro son más accesibles a la mayoría de los laboratorios de salud pública; se utilizó un control de células no sensibilizadas en cada prueba y los sueros se absorbieron con glóbulos rojos no sensibilizados.

Anderson (2) opinó que la técnica no era adecuada, ya que encontró un 20% de títulos positivos entre individuos no portadores y los atribuyó a la presencia de anticuerpos frente a un componente del extracto que era diferente del antígeno Vi.

Besednova y cols. (6) utilizaron antígenos Vi obtenidos de dos diferentes maneras: calentando un crecimiento bacteriano suspendido en solución salina durante 1 h a 120°C o bien, tratando la suspensión con NaOH. Hicieron una comparación entre la prueba de hemaglutinación indirecta y la de fijación de complemento y concluyeron que ambos métodos son auxiliares valiosos en el diagnóstico de fiebre tifoidea y en la detección de portadores. Indicaron además, que las ventajas de estas pruebas son una alta sensibilidad, gran especificidad, sencillez en el procedimiento y rapidez en la obtención de resultados.

Chau y Chang (15), considerando que los glóbulos rojos sensibilizados por las técnicas anteriores son muy ines

tables, propusieron adsorber a eritrocitos estabilizados con glutaraldehído el antígeno Vi purificado por precipitación (87). Estos mismos autores desarrollaron una técnica en la cual emplearon como antígeno bacterias fijadas con acetona y los anticuerpos anti-Vi eran titulados por la técnica de inmunofluorescencia.

7) Localización de portadores por titulación de anticuerpos anti-Vi.

La técnica más ampliamente usada ha sido la de aglutinación reportada por Felix y Pitt (29) en 1938. Desde entonces se han hecho una gran cantidad de publicaciones, sin embargo, los resultados reportados por dos diferentes investigadores difieren grandemente en el porcentaje de reacciones positivas encontradas entre portadores y población aparentemente normal. Se han hecho muchas modificaciones a la técnica original pero no se ha logrado estandarizar el procedimiento.

En 1960, Bokkenheuser (11) seleccionó los casos en que la prueba se ha llevado al cabo en grupos bien definidos; los portadores habían sido confirmados por exámen bacteriológico y en los controles se había demostrado la ausencia de Salmonella typhi. Los resultados pueden verse en la tabla 1. En la tabla 2 se anotan las condiciones

de los experimentos. Se reportó que el 12.4% de los portadores dieron resultados negativos en la dilución 1:5; aceptando la dilución 1:10 como el título significativo más bajo (adoptado por algunos autores) no se registró al 23.6% de portadores.

En la tabla 4 se pueden observar los resultados obtenidos en población normal. Bokkenheuser reportó que de los 1,589 sueros analizados, 11.4% dieron resultados positivos y que la cantidad de reacciones falsas positivas disminuyó al aumentar el título considerado significativo.

Opinó el mismo autor que la prueba no puede usarse para detectar portadores en población general, pero que puede aplicarse cuando se quiere localizar un portador en un grupo determinado, haciendo la confirmación por exámen bacteriológico.

* TABLA I. Anticuerpos anti-Vi en portadores.

Autor	Aglutinación en tubo						Aglut. en placa	Hemaglut.	
	I	II	III	IV	V	VI		VII	VIII
Año	1938	43	45	50	51	52	51	53	53
Total de sueros	56	41	4	71	63	24	26	58	20
Sueros neg. en la dil. mas baja	0	4	2	11	7	8	0	7	2
Títulos de sueros positivos:									
1:2	-	-	-	-	-	-	4	-	-
1:5	18	2	0	9	0	0	} 5	4	2
1:10	18	12	0	12	4	2		12	2
1:20	11	13	0	19	18	5	} 17	16	4
1:40	4	6	0	11	23	5		9	5
1:80	3	3	1	9	9	3		3	4
1:160	1	1	1	1	1	0	} 17	5	1
1:320	1				1	1		2	

I. Felix II. Klein III. Lewin, Bershon y Hogg IV. Ruhnke.
 V. Rische y Rohne VI. Ortel VII. Saint Martin y Desranleau
 VIII. Staack y Spaun IX. Landy y Lamb.

- No se hizo.

* Bokkenheuser, V. 1960. South African M.J. 34:601.

TABLA 2. Características de los experimentos registrados en la Tabla 1.

Autor	Cepa usada	Período de incubación a 37°C (h)	Período de incubación a temp. amb.	Suero Control estandar
Felix	Watson	2	24 h.	+
Klein	Bhatnagar	24	-	-
Lewin	Bhatnagar	2	-	+
Rühnke	Cepa 965 Rauss	3 - 4	18 h.	-
Rische	Cepa 58907 (Inst Robert Koch)	5	-	-
Ortel	Cepa 965 Rauss	2	-	-
Saint Martin	Bhatnagar	-	30 min.	-
Staack	Bhatnagar	1	-	-
Landy	<u>Escherichia coli</u> 5396/38	2	-	+

El mismo autor combina los resultados en la siguiente forma: (11)

TABLA 3. Títulos anti-Vi entre 259 portadores

Dilución del suero	Número	%
1:5	29	11.2
1:10	48	18.5
1:20	66	25.5
1:40	49	18.9
1:80	28	10.8
1:160	4	1.5
1:320	3	1.2
Negativos	32	12.4

TABLA 4. *Anticuerpos anti-Vi en no portadores

Autor Año	Aglutinación del tubo				Aglutinac. en placa	Hemaglutinac.
	I	II	III	IV	V	VI
1940	45	51	52		51	53
Total de Sueros	200	103	204	1082	9192	243
Sueros neg. en la dil. más baja	107	87	167	1047	9082	225
Títulos de sueros positivos:						
1:2	-	-	-	-	59	-
1:5	55	8	15	14	} 22	} 18
1:10	37	2	5	4		
1:20	1	6	2	5	} 29	
1:40			5	2		

I. Morgan II. Lewin III. Rische IV. Ortel V. Saint Martin
VI. Staack.

* Bokkenheuser, V. 1960. South African M.J. 34:601.

Combinando los resultados se obtiene la tabla 5 (11):

TABLA 5. Títulos anti-Vi de 1589 individuos aparentemente sanos.

Dilución del suero.	Número	%
1:5	92	5.8
1:10	68	4.3
1:20	14	0.9
1:40	7	0.4
Negativo	1408	88.6

} 181 } 11.4

El Public Health Laboratory Service (PHLS) reportó en 1961 (68) que un 71.5% de portadores y un 1.17% de no portadores, dieron resultados positivos empleando la técnica de hemaglutinación indirecta.

Bokkenheuser determinó 14,6% de casos positivos entre población supuestamente normal de Sudáfrica pero no logró aislar S.typhi en la mayoría de ellos (10).

Títulos de anticuerpos anti-Vi.

Por medio de la reacción de hemaglutinación indirecta, los títulos máximos de anticuerpos anti-Vi se encuentran entre el 5o. y 7o. mes del inicio de la enfermedad. Besednova (6) reportó que en el suero de 294 sujetos que habían padecido la enfermedad, se habían presentado anticuerpos anti-Vi en un título de 1:40 o más en los siguientes casos: en sujetos que habían padecido la enfermedad por lo menos 6 meses antes, en un 46% de los casos; en aquellos que habían estado enfermos de 6 meses a un año antes, en el 20% de los casos; en sujetos que habían estado enfermos de 1 a 2 años antes, en el 6% de los casos y en aquellos que habían estado enfermos más de 2 años antes, en el 2% de los casos. En el 89% de los portadores, los anticuerpos anti-Vi estaban presentes en títulos significativos de 1:80 a 1:160 en el 6% de los casos. La reacción de hemaglutinación indirecta fué negativa en 3 portadores de fiebre tifoidea.

Schubert y cols. (71) reportaron que, comparando sus resultados con los de otros autores, la reacción de hemaglutinación indirecta no detectó a todos los portadores de S.typhi. Reportaron un 91% de títulos positivos y concuerda con el 90% reportado por Landy y Lamb (53), y el 87.9% reportado por Staack y Spaun (73), en exámenes de series menores de portadores. La menor dilución considerada positiva fué 1:10 pero opinaron que puede tomarse una dilución más baja, 1:5. Reportaron que no debe confiarse sólo en las pruebas de hemaglutinación para la detección de portadores, sino que debe acompañarse de pruebas de aglutinación de antígenos O y H y exámen bacteriológico. Merselis (58) reportó un título de anticuerpos anti-Vi de 1:160 o más en todos los sueros de los portadores estudiados, menos en uno.

Se han reportado variadas opiniones sobre el valor que debe dársele a estas encuestas serológicas. Lewin, Ruhrike y Felix (64) consideraron que puede servir como un auxiliar en la localización de portadores ya que se consideran anticuerpos anti-Vi en individuos sanos pero no en un cierto porcentaje de portadores. Schubert y cols. (71) opinaron que para la localización de portadores no puede emplearse únicamente la prueba de hamaglutinación indirecta y que su utilidad sería el indicar en qué casos debe hacerse un exámen bacteriológico más minucioso.

Saint Martin y Desranleau (70) reportaron la prueba como eficiente; Pijper, Rische y Lewin (11) opinaron que debe ser una prueba de rutina y que se debe impedir que los individuos con resultados positivos manipulen alimentos.

El PHLS reportó que tomando en cuenta su sensibilidad y especificidad, la prueba es útil, opinión que es compartida por Besednova y cols. (6, 68).

Un tercer grupo de autores duda de su utilidad; Joe y cols. (47) reportaron que no es útil en áreas donde la tifoidea es endémica. Los títulos bajos obtenidos por Davis y Radowsky (11) les hicieron pensar que una gran parte de los casos positivos no son portadores. Bokkenheuser (10) reportó que del 25 al 30% de los portadores no dan resultados positivos y en cambio se presentan muchas reacciones falsas positivas.

Chau y Chang (15) tratando de establecer un método fácil de estandarizar utilizando reactivos estables y tomando en cuenta la deficiencia de anticuerpos IgM que presentan los portadores, estudiaron una técnica en la cual los sueros son tratados con 2 mercaptoetanol para inactivar los anticuerpos IgM. Los anticuerpos residuales fueron titulados utilizando eritrocitos tratados con glutaraldehído y sensibilizados con antígeno Vi purificado. La prueba fue

más específica con sueros tratados donde se obtuvo el 3% de resultados positivos entre población supuestamente normal y el 8% de positivos en población supuestamente normal con sueros no tratados, respectivamente, aún cuando la sensibilidad fué la misma: de 82% de resultados positivos entre portadores. Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados con la prueba de inmunofluorescencia ya que dieron títulos positivos el 97% de los portadores y sólo el 1.7% en población supuestamente normal.

Resumiendo, en la mayoría de los portadores se encuentran niveles elevados de anticuerpos anti-Vi y para localizar estos anticuerpos se utiliza la hemaglutinación indirecta. Sin embargo, para localizar estos portadores en población abierta se necesita un método fácil de estandarizar, accesible en su aplicación a gran escala, sensible y específico, como lo es la prueba de hemaglutinación, pero debe hacerse una evaluación para determinar hasta qué punto influyen en el método la persistencia de anticuerpos en convalecientes y la aparición de anticuerpos anti-Vi tanto por vacunación como por el contacto de la población con S.typhi. Se deben establecer los títulos significativos para cada región de acuerdo con estos factores.

La medida más efectiva para la prevención de la fiebre tifoidea es, indudablemente, el mejoramiento de las condi-

ciones sanitarias y el contar con una prueba presuntiva para la localización de portadores, que después se confirmarían por exámen bacteriológico de heces y se someterían a tratamiento médico; tendrá mayor importancia en aquellas comunidades donde el mejoramiento progresivo de las condiciones sanitarias evite la supervivencia y diseminación de S.typhi.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Muestras biológicas.

Los sueros utilizados fueron recolectados por el Departamento de Epidemiología del mismo Instituto.

Se titularon 500 sueros procedentes de personas mayores de 15 años, de ambos sexos, de población abierta.

Todas las cepas de microorganismos utilizados fueron proporcionadas por el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto.

METODO PARA LA PREPARACION DEL ANTIGENO VI CRUDO (81)

Equipo:

Autoclave	Centrífuga
Incubadora	Baño de agua
Microscopio estereoscópico	Refrigerador

Material:

Cajas Petri	Asa y portasa
Matraz Erlenmeyer 500 ml	Tela de asbesto y tripié
Pipetas graduadas estériles 10 ml	Filtros Millipore de poro 0.8 y 0.2 μ .
Varilla de vidrio con un ex- tremo doblado en triángulo.	Soporte metálico para filtros Millipore
Tubos de ensayo de 17X150 mm	Frascos de centrifuga de plás- tico de 500 ml.
Gradilla para estos tubos.	

Medios de cultivo, soluciones y reactivos:

Solución salina isotónica estéril
Suero normal de conejo
Suero específico anti-Vi
Solución de NaCl sobresaturada (salmuera)
Trypticase soya agar (TSA) en cajas Petri y tubos inclinados.

Cepa:

Citrobacter ballerup

Fundamento:

Se utiliza una cepa que contenga una cantidad elevada de antígeno Vi, seleccionando colonias lisas para que solo contengan cantidad baja de antígenos flagelares, los microorganismos se inactivan calentando hasta la ebullición el cultivo en salmuera, se centrifuga para eliminar los somas celulares y obtener el antígeno Vi en solución.

Para la preparación del antígeno se utilizó una cepa de Citrobacter ballerup que se sembró en medio de tripticasa soya agar (TSA) en placas, se incubó de 18 a 24 h a 37°C para seleccionar las colonias más lisas y para esto se observaron en microscopio estereoscópico y se obtuvieron 5 colonias circulares, brillantes y de bordes lisos.- Cada una de estas colonias se sembró en tubos de TSA inclinados, se incubaron de 18 a 24 h a 37°C. Después se tomó una muestra de cada colonia que se sometió a la reacción de aglutinación en placa frente al suero anti-Vi, obtenido en conejos, y se escogió la colonia que presentó aglutinación más franca y que no autoglutinó con solución salina isotónica ni frente a suero normal de conejo.

Una vez seleccionada la colonia lisa, se sembró en 100 ml de caldo tripticasa y se incubó en baño de agua a 37°C durante 6 h. Posteriormente este cultivo se sembró en forma masiva en cada una de 150 placas de TSA que se incubaron de 18 a 24h a 37°C. Se cosechó el desarrollo añadiendo 3 ml de solución salina estéril a cada placa y con una varilla de vidrio con la punta doblada en forma de triángulo se desprendió el desarrollo, las suspensiones bacterianas se reunieron en un matraz y se inactivó por ebullición en baño maría en la salmuera durante 1 h. Después de enfriar la suspensión, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. y el sobrenadante se clarificó a través de un filtro Millipore de poro 0.3 μ y después en condiciones de esterilidad, en un filtro Millipore de poro 0.2 μ .

Esta solución se utilizó como fuente de antígeno Vi crudo obteniéndose 900 ml; el reactivo es estable hasta por 10 meses en refrigeración a 4°C.

METODO DE PURIFICACION DEL ANTIGENO Vi (81)

Equipo:

Centrífuga

Material:

Embudo de filtración	Papel filtro Whatman # 40
Matraces Erlenmeyer 300 ml	Tubo para diálisis
Pipetas graduadas 10 ml	Mechero Bunsen
Vasos de precipitados 100 y 300 ml	Refrigerante de serpentín con conexiones
Frascos de centrífuga de plástico 500 ml	Pinzas para refrigerante

Telas de asbesto y tripié

Soluciones y reactivos:

Antígeno Vi crudo	Acido acético
Cloruro de sodio	Agua destilada
Etanol 96%	

Fundamento:

El método consiste en el fraccionamiento por modificación de la solubilidad de los componentes de los extractos acuosos del bacilo mediante la adición de etanol y NaCl. Después se somete a la hidrólisis con ácido acético 1 mol/ litro a 100°C durante 24 h para eliminar los restos de antígenos y obtener un antígeno muy puro.

Se tomaron 450 ml de antígeno Vi crudo, se agregó NaCl hasta tener una concentración del 35%. A la mezcla se le añadió etanol hasta tener una concentración final de 0.3 mol/litro. El precipitado obtenido se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, se resuspendió en agua y se dializó en agua destilada para eliminar el exceso de NaCl. Se cambió el agua del recipiente todos los días hasta que no hubo reacción de cloruros con una solución de nitrato de plata al 20%.

El producto obtenido se utilizó como antígeno parcialmente purificado.

Para llevar al cabo la purificación completa de este extracto se tomaron 175 ml, se les añadió ácido acético hasta una concentración de 0.3 mol/litro. El precipitado se redisolvió en 25 ml de agua. Se le agregó suficiente ácido acético hasta tener una concentración del ácido 1 mol/litro. Esta mezcla se reflujo por 24 h, la solución se dejó enfriar y se dializó de la manera referida anteriormente, se filtró a través del papel filtro Whatman y se precipitó nuevamente con etanol a una concentración de 0.2 mol/litro.

SENSIBILIZACION DE GLOBULOS ROJOS

Equipo:

Baño de agua con control de temperatura

Centrífuga clínica

Incubadora

Material:

Tubos de ensayo de 13X100 Pipetas graduadas de 5 ml.

Tubos de centrífuga graduados 5 ml Pipetas Pasteur con bulbo

Gradillas para tubos de ensayo

Reactivos y soluciones:

Solución salina 0.85% Antígeno Vi crudo y purificado

Glóbulos rojos de carnero Heparina

lavados.

Fundamento:

La sensibilización de glóbulos rojos con el antígeno Vi se logra mediante la adsorción inespecífica por unión covalente del antígeno que puede fijarse a la superficie de los eritrocitos para realizar la interacción con sus anticuerpos específicos.

Para la sensibilización se usan normalmente eritrocitos de carnero o humanos del grupo O. El tratamiento de los eritrocitos con solución de ácido tánico antes de la sensibilización aumenta el poder de adsorción para el antígeno (37).

Se obtuvieron 25 ml de sangre de carnero, extraída de la yugular usando como anticoagulante 0.5 ml de heparina (40 U). Se lavaron 5 ml de paquete celular con solución salina 0.85% tres

veces, centrifugando después de cada lavado a 2000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se preparó una suspensión de glóbulos rojos ajustando su concentración al 10%.

Se prepararon diluciones seriadas del antígeno Vi desde 1: 10 hasta 1:4000 en incrementos de 2 y se pasó 1 ml de cada una de estas diluciones a tubos de centrifuga graduados.

Se añadió 1 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 10% a cada tubo de centrifuga, se colocaron en incubación de baño de agua a 37°C durante 2 h, agitando suavemente cada 30 min.

Se procedió a lavar los glóbulos rojos sensibilizados tres veces con solución salina al 0.85% centrifugando a 2000 rpm durante 5 min. después de cada lavado. Finalmente con cada muestra se hizo una suspensión al 1% de glóbulos rojos sensibilizados.

METODO DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-Vi

Equipo:

Baño de agua con temperatura controlada a 50°C

Equipo de microtitulación "Microtiter"

Incubadora a 37°C

Material:

Pipetas graduadas de 1 ml

Gradillas para tubos de ensayo

Tubos de ensayo de 13x100 mm.

Soluciones y reactivos:

Glóbulos rojos de carnero sensibilizados con distintas concentraciones de antígeno Vi.

Solución salina 0.85%

Suero hiperinmune anti-Vi de conejo.

Determinación de la dilución óptima del antígeno Vi por titulación en bloque.

Se llevó al cabo utilizando el equipo de microtitulación.

Se probó un suero hiperinmune anti-Vi, inactivado a 50°C durante 30 min en diluciones desde 1:100 hasta 1:204, 800 en incrementos de 2 frente a las suspensiones de glóbulos rojos sensibilizados, de la siguiente manera:

Se midió en cada excavación de la placa 0.025 ml de solución salina con las micropipetas del equipo Microtiter menos a la primera excavación de cada fila. Se añadió a la primera y segunda excavaciones de cada fila 0.025 ml con la micropipeta del suero hiperinmune diluido 1:100 y con los microdilutores se procedió a diluir el suero a partir de la segunda excavación hasta la doceava. Se desecharon 0.025 ml de la última excavación.

En cada fila se agregó a cada una de las excavaciones 0.025 ml de glóbulos rojos sensibilizados con cada una de las diluciones del antígeno, preparados como se describió anteriormente.

En otras excavaciones de la placa se colocaron los siguientes testigos:

- T₁ = Glóbulos rojos sensibilizados y solución salina
- T₂ = Glóbulos rojos sin sensibilizar y solución salina
- T₃ = Glóbulos rojos sin sensibilizar y suero hiperinmune

Se agitaron suavemente las placas y se dejaron en incubación a 37°C durante 1 h y después a temperatura ambiente de 18 a 24 h.

El título se determinó como la más alta dilución del antígeno adsorbido a los glóbulos rojos sensibilizados que aglutinó con la más alta dilución del suero homólogo. Ejemplo:

Ag ↓	Suero hiperinmune →											
	1:100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	X
1:10	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1000	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:2000	3+	3+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:4000	3+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T ₁	T ₂	T ₃									
	T ₁	T ₂	T ₃									

X = 1:204800

Interpretación de la prueba:

La prueba se consideró positiva cuando los glóbulos rojos se sedimentaron uniformemente en el fondo de la excavación y negativa cuando se formó un botón compacto en el fondo de la excavación.

Titulación de los sueros problema:

Los sueros se inactivaron durante 30 min. a 50°C en baño de agua; y se probaron las diluciones desde 1:20 hasta 1:1280 en incrementos de 2, con solución salina y utilizando los glóbulos rojos sensibilizados con la dilución óptima del antígeno Vi que se había determinado con anterioridad.

Los testigos que se incluyeron fueron:

T₁ = Glóbulos rojos sensibilizados y solución salina

T₂ = Glóbulos rojos sin sensibilizar y solución salina

T₃ = Glóbulos rojos sin sensibilizar y suero problema

A todos los sueros problema se les sometió a la reacción de Widal para determinación de anticuerpos anti-O y anti H.

METODO DE PREPARACION DEL ANTIGENO H.

Equipo:

Baño de agua a 37°C

Microscopio entereoscópico

Incubadora

Material:

Cajas Petri

Gradilla para tubos de ensayo

Frascos de Roux de 1000 ml

Asa y portasa

Pipetas graduadas estériles

Mechero Bunsen

5 ml

Tubos de ensayo de 16X150

Reactivos y medios de cultivo:

Medio de movilidad (SIM)

Tripticasa soya agar (TSA) en placa y caldo

Formalina al 37%

Cepa:

Salmonella typhi H901

Fundamento:

Los antígenos H se encuentran en los flagelos, para realizar pruebas serológicas el reactivo se prepara añadiendo formalina a cultivos jóvenes obtenidos en medios líquidos de cepas móviles. Este procedimiento probablemente fija los flagelos a la superficie de la célula de tal manera que los antígenos somáticos ya no se encuentran expuestos (59).

Para la preparación del antígeno H se utilizó la cepa S.typhi H901 que se sembró en una placa de TSA y se incubó a 37°C de 18 a 24 h. Se seleccionaron las 5 colonias que se observaron más lisas en el microscopio estereoscópico y se sometieron a las reacciones de aglutinación en placa con suero anti-H y utilizando como controles solución salina y suero normal de conejo mezclado con el desarrollo bacteriano, como ya se explicó anteriormente. Estas 5 colonias se sembraron en medio de SIM en tubo, para seleccionar las colonias que mostraron

más movilidad. Una vez seleccionadas las colonias adecuadas se sembraron en 10 ml de caldo tripticasa; se incubaron en baño de agua a 37°C durante 6 h y posteriormente se sembraron varios frascos conteniendo 500 ml de medio de caldo tripticasa con 2 ml de este cultivo. Se incubaron los frascos de 18 a 24 h hasta que la turbidez del caldo fué considerable (concentración aproximada de 500 millones de bacterias por ml). Se añadió formalina a tener una concentración final del 0.6%. Esta mezcla se conservó en refrigeración a 4°C y se utilizó como antígeno para la determinación de anticuerpos anti-H en sueros problema.

El antígeno O utilizado en la reacción de Widal para determinar anticuerpos anti-O en sueros problema fué proporcionado por el Instituto Nacional de Higiene con una concentración aproximada de 200 millones de bacterias por ml.

METODO PARA DETERMINAR ANTICUERPOS ANTI-H
Y ANTI-O DE SALMONELLA TYPHI

Equipo:

Baño de agua a temperatura constante (37°C)

Incubadora

Material:

Tubos de ensayo de 13X100

Gradillas para tubos de ensayo

Pipetas graduadas de 1 ml.

Reactivos:

Solución salina al 0.85%

Antígeno H

Antígeno O

Fundamento:

Los sueros que contienen anticuerpos anti-H, al entrar en contacto con los antígenos H aglutinan en forma característica en aproximadamente 2 h a 55°C formando grandes masas esponjosas que se dispersan fácilmente.

Cuando el antígeno O se mezcla con suero que contiene los anticuerpos anti-O correspondientes en la técnica en tubo, los antígenos O aglutinan sólo después de períodos de incubación de 6 a 12 h a 55°C, formándose agregados bacterianos en forma de pequeñas masas granulares que no pueden dispersarse fácilmente (59).

Cada suero se inactivó a 50°C durante 30 min en baño de agua. En tubos de ensayo se hicieron las siguientes diluciones seriadas del suero:

T U B O	1	2	3	4	5	6	7	8
Solución salina (ml)	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Suero problema (ml)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dilución	1:10	20	40	80	160	320	640	T

Se desechan 0.5

Para determinar los anticuerpos anti-H, a cada tubo se le añadieron 0.5 ml del antígeno H. Se incubaron durante 2 h en baño de agua a 50°C y se leyeron. Los títulos de 1:40 o mayores se consideraron positivos; las pruebas se corrieron junto con sueros testigos positivos y negativos.

Para determinar anticuerpos anti-O se añadió a cada tubo 0.5 ml del antígeno O y se incubaron los tubos a 37°C durante 24 h. Se consideraron significativos los títulos de 1:40 o más. Las pruebas se corrieron con sueros testigos positivos y negativos.

CAPITULO IV

RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSION

No. Sueros	Vi Crudo	Vi Purificado	O	H
327	-	-	-	-
134	-	-	-	+
8	+	-	-	-
7	-	+	-	-
4	-	-	+	+
6	+	+	-	-
4	+	-	-	+
2	+	+	-	+
1	-	+	-	+
3	-	-	+	-

+ Se expresan como positivos los casos en que los sueros dieron títulos de 1:40 a 1:640

Del análisis de los resultados se observó que 327 de los 500 sueros obtenidos en población supuestamente normal mostraron títulos negativos para los dos métodos utilizados: hemaglutinación indirecta para determinar anticuerpos anti-Vi y la reacción de Widal para determinar anticuerpos anti-H y anti-O.

Con la prueba de hemaglutinación indirecta, 12 sueros fueron positivos cuando se utilizó el antígeno Vi crudo y negativos para el antígeno Vi purificado y 8 sueros fueron positivos con el antígeno Vi purificado y negativos con el Antígeno Vi crudo; en

este último caso se puede suponer que lo que sucedió es que al purificar el antígeno se eliminan las reacciones inespecíficas y realmente se determinan los anticuerpos anti-Vi, por lo que se recomendaría siempre purificar el antígeno Vi para realizar las pruebas; 3 sueros fueron positivos para ambos antígenos y 468, dieron resultados negativos para ambos antígenos; esto podría indicar que los anticuerpos anti-Vi no presentan títulos significativos en población abierta.

Para la reacción de Widal, sólo 3 sueros fueron positivos con el antígeno O y negativos para el H y, en tanto que 141 sueros fueron negativos para el antígeno O y positivos para el H, lo cual es explicable, ya que en general, los títulos de anticuerpos anti-H siempre son más altos que los anti-O en sueros de pacientes de fiebre tifoidea (22). 348 sueros fueron negativos para ambos antígenos, lo cual indica que la mayoría no padecía o había padecido fiebre tifoidea por lo cual no se presentaban títulos frente a ningún antígeno O u H; sólo 4 sueros fueron positivos para ambos antígenos.

Comparando entre sí los resultados de las dos pruebas, de los 500 sueros estudiados, 134 sueros dieron resultados negativos para la reacción de hemaglutinación indirecta y la determinación de anticuerpos anti-O, pero positivos frente a anticuerpos anti-H, lo cual concuerda con lo referido anteriormente (22). 3 sueros dieron resultados positivos para la prueba de hemaglutinación indirecta cuando se utilizó el antígeno Vi

crudo y resultados negativos para el antígeno Vi purificado y la reacción de Widal para ambos antígenos O y H; 7 sueros, por el contrario, dieron resultados positivos con el antígeno Vi purificado y negativo con el antígeno Vi crudo y la reacción de Widal para ambos antígeno O y H; esto podría indicar que, como se dijo anteriormente también, al utilizar antígeno purificado se eliminan reacciones inespecíficas; 4 sueros dieron resultados negativos para la reacción de hemaglutinación para ambos antígenos Vi y positivos para la reacción de Widal para ambos antígenos H y O; por el contrario, 6 sueros fueron positivos para ambos antígenos Vi y negativos para la reacción de los antígenos H y O. Dos sueros dieron resultados positivos para la prueba de hemaglutinación indirecta y para la de anticuerpos anti-H pero negativos para la determinación de anticuerpos anti-O; un suero dió resultado positivo para el antígeno Vi purificado y el H pero negativo para el Vi crudo y el O; y finalmente, 3 sueros dieron resultados negativos para ambos antígenos Vi y al H, pero positivos para el O.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que:

1. Existe una mayor persistencia de anticuerpos anti-H (147 casos de 500) en personas clínicamente sanas, que de anticuerpos anti-O (7) y anti-Vi (28).
2. Posiblemente se tiene una mayor especificidad al utilizar en la prueba de hemaglutinación indirecta el antígeno Vi purificado que el crudo (16 a 20).
3. Como el presente estudio se realizó en población abierta sin antecedentes comprobados de haber sido vacunados ó haber padecido fiebre tifoidea, no existe correlación en la presencia de anticuerpos anti-H, O y Vi, lo que hace necesario continuar el estudio, pero ahora enfocándolo a portadores comprobados bacteriológicamente y determinar que títulos de anticuerpos anti-Vi que presentan, recomendando que para mayor seguridad en los resultados la prueba se haga con sueros tratados con ó mercaptoetanol para eliminar a los anticuerpos anti-O y se emplee el antígeno Vi purificado, ya que de acuerdo a estos hallazgos es bastante específico: 16 casos posi

tivos de 500 muestras analizadas, siendo sólo 6 casos positivos de anticuerpos anti-Vi y negativos de anti-H y anti-O.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ames, W.R. and Robins, M. Age and sex as factors in the development of the typhoid carrier state and a method for estimating carrier prevalence. *Am J Public Health* 33: 221, 1943.
- 2) Anderson, E.S. Screening tests for typhoid carriers. *Lancet* II: 653, 1960.
- 3) Armijo, P.R. Curso de Epidemiología. 2a. Ed. Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, 1964.
- 4) Ashida, T. Studies on the antigenic substances of Eberthella typhosa. *Japan J Exp Med* 20: 81, 1949.
- 5) Baker, E.E.; Whiteside, R.E.; Bash, R. and Derrow, M.A. The Vi antigens of Enterobacteriaceae. Purification and chemical properties. *J Immunol* 83: 680, 1959.
- 6) Besednova, N.N. A comparative study of the efficacy of some immunological methods of diagnosis of typhoid carriers. Communication I. The application of the reaction of indirect haemolysis for the diagnosis of typhoid fever and carriers. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 16: 142, 1972.
- 7) Bhatnagar, S.S. Vi agglutination in the diagnosis of typhoid fever and in the typhoid carrier condition. *Brit Med J* 2: 1195, 1938.

- 8) Bhatnagar, S.S.; Speechly, C.C.G. and Singh, M. A Vi variant of Salmonella typhi and its application to the serology of typhoid fever. J Hyg 38: 663, 1938.
- 9) Boivin, A. and Mesrobianu, L. Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique sur quelques propriétés biologiques comparés des antigènes "O" et "Vi". Compt Rend Soc Biol 128: 9, 1938.
- 10) Bokkenheuser, V. A challenge to the validity of the Vi test for the detection of chronic typhoid carriers. Am J Public Health 54: 150, 1964.
- 11) Bokkenheuser, V. The interpretation of Vi tests. S Afr Med J 34: 691, 1960.
- 12) Bunin, K.V.; Firсанov, V.I.; Kravtsov, E.G.; Kozhemako, V.L. and Shcuckin, P.I. Peculiarities of immunological response to the administration of Vi antigen in patients suffering from typhoid fever and in experimental animals. Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol 7: 25, 1976.
- 13) Bunin, K.V.; Firсанov, V.V.; Kravtsov, E.G.; Sukhoroslova, L.I.; and Kabuka, L.P. A study of the avidity of Vi antibodies in typhoid fever patients and chronic carriers. Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol 10: 65, 1976.
- 14) Cáceres, A. y Mata, L.J. Hemaglutinación indirecta para la investigación de anticuerpos a enterobacteriaceas. Rev Lat Amer Microbiol 12: 137, 1970.

- 15) Chau, P.Y. and Chan, A.C. Modified Vi tests in the screening of typhoid carriers. *J Hyg* 77: 97, 1976.
- 16) Chernokhvostova, E.; Enseburg, K.V.; Starshinova, V. Study on the production of IgA, IgG and IgM antibodies to somatic antigens of Salmonella typhi in humans. *Clin Exp Immunol* 4: 107, 1969.
- 17) Clark, W.R.; Mc Laughlin, J. and Webster, M.E. An amino hexuronic acid as the principal hydrolytic product component of the Vi antigen. *J. Biol Chem* 230: 81, 1958.
- 18) Combiesco, D.; Combiesco, C. and Soru, E. Quelques propriétés physicochimiques, biologiques et serologiques des antigènes glucidolipidiques des Bacilles typhiques *Compt Rend Soc Biol* 126: 1081, 1937.
- 19) Combiesco, C. and Soru, E. Electrophorese des antigènes "O" et "Vi" extraits des Bacilles typhiques. *Compt Rend Soc Biol* 132: 172, 1939.
- 20) Combiesco, D.; Soru, E. and Combiesco, C. Etude des propriétés chimiques des antigènes des Bacilles typhiques. *Compt Rend Soc Biol* 129: 1003, 1938.
- 21) Crznar, I.; Frabakyova, G; Draskovicova, A. and Karolicek, J. Typhoid gamma G, gamma M and gamma A antibodies in persons with different relation to the typhoid infection. *Zentralbl Bacteriol* 231: 108, 1975.

- 22) Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. Wood, W.B.; Mc Carty, M. Microbiology. 2nd. Ed., Harper International Edition, New York, N.Y. U.S.A. 1973.
- 23) Donald, G.M.; Jarvis, F.G.; Kelsey, C.M. Physicochemical and biological properties of sonically treated Vi antigen, J Bacteriol 94: 1411, 1967.
- 24) Edwards, P.R. and Ewing, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 3th Ed. Burgess Publishing G, Minneapolis, Min. U.S.A. 1972.
- 25) Eliot. C.P. The Vi agglutination test as an aid in the detection of chronic typhoid carriers. Am J Hyg 31: 3, 1940.
- 26) Felix, A. Detection of chronic typhoid carriers by agglutination tests. Lancet II: 738, 1938.
- 27) Felix, A. Laboratory control of enteric fevers. Brit Med Bull 7: 153, 1951.
- 28) Felix, A.; Krikorian, K.S. and Reitler, R. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigen in cases of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J. Hyg 35; 421, 1935.
- 29) Felix, A. y Pitt, R.M. Virulence of B.typhosus and resistance to O antibody. J Pathol Bacteriol 38: 409, 1934.

- 30) Franklin, E.E. The immunoglobulins, their structure and function of some technique for their isolation. Progr Allergy 8: 58, 1964.
- 31) Gaines, S.; Currie, J.A. and Tully, J.G. Production of incomplete Vi antibody in man by typhoid vaccine. J Amer Epidemiol 81: 350, 1964.
- 32) Gardner, A.D. An international experiment on the Widal reaction. J Hyg 37: 124, 1937.
- 33) Grabar, R. and Corvazier, P. Sustances antigeniques et haptenes polyosidiques vide Salmonella typhi. Ann Inst Pasteur 80: 255, 1951.
- 34) Hauschka, M.S.; Neter, E. and Rubin, M.I. Studies of urinary tract infection of children. II. Identification of E.coli antibodies in serum of patients. Am J Dis Child 109: 238, 1965.
- 35) Henderson, D.W. and Morgan, W.T.J. The isolation of antigenic sustances from strains of Bacterium typhosum. Brit J Exptl Pathol 19: 32, 1938.
- 36) Heyns, K. and Kiessling, C. Strukturanklärung des Vi antigens aus Citrobacter freundii (E.coli.) 5396/38. Carbohydrate Res 3: 340, 1967.
- 37) Heyns, K.; Kiessling, G.; Linderberg, W.; Paulsen, H.E. Webster, M.E. D-galaktosaminuronsäure (2-amino-2-desoxy-

- D-galaktonsäure) als Baustein des Vi antigens. Chem Berichte 92: 2435, 1959.
- 38) Hoechst-Behring Institute. Salmonella Infektionen. Kaufman White Schema. Germany, 1974.
- 39) Hoechst-Behring Institute. Laboratory Notes for Medical Diagnostics. Germany, 1974.
- 40) Hobson, W. World Health and History. 2nd. Ed. John Wright & sons, Ltd. Bristol, U.K. 1963.
- 41) Hornick, R.B.; Greisman, S.E.; Woodward, T.E.; Du Pont, H.L.; Dawkins, A.T.; Sneyder, M.J. Typhoid fever: pathogenesis and immunological control. New Eng J Med 283: 686, 1970.
- 42) Jarvis, F.G.; Mesenko, M.T.; Martin, D.G.; Perrine, T.D. Physicochemical properties of the Vi antigen before and after mild alkaline hydrolysis. J Bacteriol 94: 1406, 1967.
- 43) Jarvis, F.G.; Mesenko, M.T. and Perrine, T.D. Some physicochemical properties of electrophoretically purified Vi antigen. Fed Proc 19: 83, 1960.
- 44) Jarvis, F.G.; Mesenko, M.T. and Tibbs, K.F. Production of Vi antigen on a chemically defined medium by a coliform Bacterium. J Bacteriol 80: 673, 1960.
- 45) Jarvis, F.G.; Mesenko, M.T. and Kyle, J.E. Electrophore-

- tic purification of the Vi antigens. *J Bacteriol* 80: 677, 1960.
- 46) Jawetz, E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A. Manual de Microbiología Médica. 6a. Ed. Editorial El Manual Moderno, México, D.F. 1975.
- 47) Joe, L.K.; Wiratmadja, N.S.; Hardjowardojo, S.D. The value of Vi agglutination as an aid in the detection of typhoid carriers on Indonesia. *Doc. Med Geogr Trop* 9: 27, 1957.
- 48) Karolcek, J.; Draskovicova, M. and Crznar, I. Investigation of the role of Vi antibodies and antibodies of IgA type in the low specific bactericidal activity of the serum in typhoid carriers. *Zentralbl Bakteriol* 232: 247, 1975.
- 49) Kauffmann, F. Serological diagnosis of Salmonella species. 1st. Ed., Mungskaard, Copenhagen, Denmark, 1971.
- 50) Kumar, K.R.; Malariya, A.N.; Murthy, R.G.; Venkatraman, M. and Monapatra, L.N. Immunological study of typhoid immunoglobulins, C₃, antibodies and leukocyte migration inhibition in patients with typhoid fever and TAB vaccinated individuals. *Infect Immunol* 10: 1219, 1974.
- 51) Landy, M. Studies on Vi antigen. VI. Immunization of human beings with purified Vi antigen. *Amer J Hyg* 60: 52, 1954.

- 52) Landy, M.; Johnson, G. and Webster, M.E. Studies on Vi antigen. VIII. Role of acetyl in antigenic activity. Amer J Hyg 73: 55, 1961.
- 53) Landy, M. and Lamb, E. Estimation of Vi antibody employing erythrocytes treated with purified Vi antigen. Proc Soc Exp Biol Med 82: 593, 1953.
- 54) Landy, M.; Trapani, R.J.; Webster, M.E.; Jarvis, F.S. Immunological properties of Vi antigen isolated by chemical fractionation and by electrophoresis. Texas Rep Biol Med 21: 214, 1963.
- 55) Landy, M. and Webster, M.E. Studies on Vi antigen. III. Immunological properties of purified Vi antigen derived from Escherichia coli 5396/38. J Immunol 69: 143, 1952.
- 56) Landy, M.; Webster, M.E. and Sagin, J.F. Studies on Vi antigen. V. Comparison of the immunological properties of Vi antigen derived from V form Enterobacteriaceae. J Immunol 73: 23, 1954.
- 57) Levin, D.; Wong, K.H.; Reynolds, H.Y.; Sutton, A. and Northrup, R.S. Vi antigen from Salmonella typhosa and immunity against typhoid fever. II. Safety and antigenicity in humans. Infect Immunol 12: 1290, 1975.
- 58) Merseles, J.G.; Divkage, D.; Connolly, C.C.; Hooke, E.W. Quantitative bacteriology of the typhoid carrier state. Am J Trop Med Hyg 13: 425, 1964.

- 59) Milner, K.C. and Jarvis, F.G. Biologic properties of electrophoretically purified Vi antigen. *Bacteriol Proc* 3: 131, 1961.
- 60) Morgan, H.R. The Salmonella. Bacterial and Mycotic Infections of man. Dubos, R.U. Ed., J.B. Lippicett Company, U.K., 1948.
- 61) Needell, M.H.; Neter, E.; Staubitz, W.J. and Bingham, W.A. The antibody (hemagglutinin) response of patients with infections of the urinary tract. *J Urol* 74: 674, 1955.
- 62) Neter, E. Indirect bacterial hemagglutination and its applications to the study of bacterial antigens and serological diagnosis. *Pathol Microbiol* 28: 859, 1965.
- 63) Neter, E.; Drislane, A.N.; Harris, A.H. and Jansen, G. T. Diagnosis of clinical and subclinical salmonellosis by means of a serological hemagglutination test. *New Eng J Med* 261: 1162, 1959.
- 64) Neter, E.; Harris, A.H. and Drislane, A.M. Comparative study of hemagglutination and agglutination tests for the determination of the antibody response of patients with Shigella sonnei dysentery. *Amer J Clin Pathol* 37: 239, 1962.
- 65) Neter, E.; Westphal, O.; Luderitz, O. and Gorzynsky, E.

- A. The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to Enterobacteriaceae. Ann N.Y. Acad Sci 66: 141, 1965.
- 66) Pérez Miravete, A. Fuentes de infección y transmisión de Salmonelosis. Salud Pública de México 16: 37, 1974.
- 67) Pérez Miravete, A. y Cabrera R. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. Salud Pública de México 15: 185, 1974.
- 68) Public Health Laboratory Service Working Party. The detection of the typhoid carrier state. J Hyg 59: 2311, 1961.
- 69) Rose, N.R. and Friedman, H. Manual of Clinical Immunology. American Society of Microbiology. 1st. Ed. Washington, U.S.A., 1976.
- 70) Saint Martin, M. y Desranleau, J.N. Results obtained with glicerolated Vi antigen in the detection of chronic typhoid carriers. Amer J Publ Hlth 41: 687, 1951.
- 71) Schubert, J.K.; Edwards, P.R. and Ramsey, C.H. Detection of typhoid carriers by agglutination tests. J Bacteriol 77: 648, 1959.
- 72) Spaun, J. Determination of Salmonella typhi O and Vi antibodies by haemagglutination. Acta Path Microbiol Scand 31: 462, 1952.

- 73) Staack, H.H. and Spaun, J. Serological diagnosis of chronic typhoid carriers by Vi haemagglutination. *Acta Path Microbiol Scand* 32: 420, 1953.
- 74) Stryckova, T. and Farkakyova, G. Characteristics of lipopolysaccharides of Salmonella typhi isolated from carriers and patients suffering from typhoid fever. *Folia Microbiol* 22: 752, 1976.
- 75) Taylor, K. Enzymatic deacetylation of Vi-polysaccharide by Vi phage II. *Biochem Biophys Res Commun* 20: 752, 1965.
- 76) Taylor, K. Physical and chemical changes of Vi-polysaccharides due to Vi phage II action. *Acta Biochim Polon* 13: 97, 1966.
- 77) Thomson, W.C. The number of bacilli harboured by enteric carriers. *J Hyg* 52: 67, 1954.
- 78) Topley, W.C.; Raistrick, H.; Wilson, J.; Stacey, M.; Challinor, S.W. and Clark, R.O.J. The immunizing potency of antigenic components isolated from different strains of Bact typhosum. *Lancet* I: 252, 1937.
- 79) Troller, J.A. Salmonella and Shigella. Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects. Defiguereido, M.P. and Splittstoesser, D.F. Eds., 129, The AVI Publishing Company; Westport, Connecticut, 1976.

- 80) Watson, K.C. Intravascular Salmonella typhi as a manifestation of the typhoid carrier state. Lancet II: 332, 1967.
- 81) Webster, M.E.; Clark, W.R. and Freeman, M.E. Evidence for an aminohexuronic acid as a hydrolytic product of Vi antigen. Arch Biochem Biophys 50: 223, 1954.
- 82) Webster, M.E., Landy and Freeman, M.E. Studies on Vi antigen II. Purification of Vi antigen from Escherichia coli 5396/38. J Immunol 69: 135, 1952.
- 83) Webster, M.E.; Sagin, J.F.; Anderson, P.R.; Breesl, S. S.; Freeman, M.E. and Landy, M. Studies on Vi antigen. IV. Physicochemical characterization of Vi antigens isolated from V form Enterobacteriaceae. J Immunol 73: 16, 1954.
- 84) Wilson, G.S. and Miles, A.A. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. 5th. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1964.
- 85) Wilson, G.S. and Miles, A. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 6th, Ed. Edward Arnold, London, 1975.
- 86) Wong, K.H.; Feeley, J.C.; Northrup, R.S. and Forlines, M. E. Vi antigen from Salmonella typhosa and immunity against typhoid fever. I. Isolation and immunological properties in animals. Infect Immunol 9: 348, 1974.

- 87) Wong, K.H.; Feeley, J.C. and Pittman, M. Effect of a Vi degrading enzyme on potency of typhoid vaccines in mice. *J Infect Dis* 125: 360, 1972.