

11261
20/13

Inmunidad experimental inducida con proteínas obtenidas de
Salmonella typhi y Salmonella typhimurium.

José Luis Molinari Soriano

1987

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

11261

24
13

Inmunidad experimental inducida con proteínas obtenidas de
Salmonella typhi y Salmonella typhimurium.

José Luis Molinari Soriano

1987

FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

Introducción -----	1
Materiales y Métodos -----	13
Resultados -----	25
Discusión -----	55
Resumen -----	60
Abstract -----	61
Referencias -----	62

Introducción

Existen líneas de investigación en curso con la finalidad de encontrar vacunas antibacterianas, una de ellas está dedicada al estudio de inmunógenos para uso en humanos que sea útil en la prevención de la fiebre tifoidea.

La enfermedad está causada por una bacteria patógena. Salmonella typhi. Este bacilo fue aislado por primera vez en 1880 por Eberth de ganglios linfáticos mesentéricos de pacientes. Salmonella typhi es un parásito obligado del hombre, es gram negativo, móvil y pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Puede ser determinado bacteriológicamente por sus reacciones fermentativas y sobre la base de sus antígenos de superficie. El antígeno "O" contiene un lipopolisacárido, que es un factor importante de virulencia, pues las cepas que han perdido este antígeno, son menos virulentas de las que sí lo tienen. Los antígenos flagelares "H", están constituidos por proteínas. El antígeno "Vi" es un homopolímero de ácido N-acetilgalactosaminurónico, que se correlaciona con la virulencia de S. typhi en el ratón. Sin embargo su relación con virulencia en el ser humano no está clara.

El hombre adquiere la infección al ingerir alimentos contaminados con materia fecal de enfermos con fiebre tifoidea o de portadores asintomáticos. La mayor parte de

los microorganismos ingeridos son probablemente inactivados por la acidez del jugo gástrico. Los bacilos que superan esta barrera invadiendo la mucosa del intestino delgado, penetran entre las células epiteliales y alcanzan el tejido linfoide de las placas de Peyer donde proliferan en células fagocíticas mononucleares produciendo después necrosis focal y alcanzando la corriente sanguínea, las endotoxinas son liberadas en la sangre por lisis bacteriana, ocasionando algunos síntomas, y produciendo septicemia, los bacilos pueden localizarse y multiplicarse en ganglios linfáticos, amígdalas, pulmones, bazo, hígado, riñones, médula ósea, a veces en el sistema nervioso central dando lugar a meningoencefalitis (Morgan 1965, Molinari 1970). Durante la enfermedad, entre el 50 a 80% de los pacientes excretan junto con sus heces a los bacilos de la tifoidea.

Los síntomas clínicos más comunes son cefalea, anorexia, fiebre que en promedio alcanza 39°C acompañada de bradicardia. Durante la primera semana el paciente está postrado, puede haber diarrea aunque la constipación es más frecuente y se acompaña de dolor y distensión abdominal y distensión. en este periodo puede haber tos y bronquitis. Al inicio de la segunda semana aparecen con frecuencia manchas rosadas, esplenomegalia y la fiebre permanece elevada. En los casos graves el paciente tiene delirio y muestra el estado tifoideo. Después de la tercera semana la

curva de temperatura muestra remisiones matinales y regresa a la normalidad por lisis gradual. Se presenta leucopenia en muchos casos caracterizada por un descenso de polimorfonucleares y ausencia de eosinófilos.

Durante la primera y segunda semanas los hemocultivos son positivos, y menos frecuentemente durante la 3era. semana, los coprocultivos pueden ser positivos desde el principio y a menudo permanecen hasta el final de la convalecencia. La Salmonella es a menudo encontrada en la orina durante la 2a y 3era. semana y puede ser excretada por un periodo considerable después de la convalecencia. Los cultivos de médula ósea pueden mostrar bacilos cuando los hemocultivos son negativos. Los bacilos de la tifoidea son encontrados con frecuencia en la médula ósea, en el bazo y la vesícula biliar está invariablemente parasitada.

Un ataque de fiebre tifoidea usualmente confiere inmunidad. La recuperación está asociada con la aparición en sangre de anticuerpos contra S. typhi. Estos anticuerpos alcanzan niveles apreciables durante las, 2a y 3era. semanas de la enfermedad. Existen evidencias de que estos anticuerpos están presentes durante la fase aguda de la enfermedad, en recaídas y en el momento de progreso hacia un final fatal (Gay 1918). Estas evidencias sugieren que la inmunidad humoral no es la única que está involucrada en la recuperación.

Parece probable que los anticuerpos circulantes eliminan a los bacilos extracelulares de la sangre, pero no a aquellos dentro de las células del bazo, médula ósea, tejido linfoide intestinal etc.

La inmunización en humanos para prevenir la fiebre tifoidea fué iniciada por Pfeiffer y Kolle por un lado y Wright (1896) por otro trabajando independientemente, usando vacunas de bacilos muertos por calor y conservados en fenol, Salmon y Smith quienes habían mostrado 10 años antes que las palomas podían ser protegidas contra una infección fatal: por inoculación con Salmonella muerta por calor. Durante una guerra colonialista en Sudáfrica se inmunizaron tropas inglesas, más tarde durante la primera guerra mundial volvió a probarse la eficacia de esta vacuna; sin embargo las dudas y críticas concernientes a esta vacuna pudieron eliminarse por la serie de ensayos de campo realizados durante los años 60s. Uno de los factores que contribuyó a esto fué el uso de cepas lisas de S. typhi para la producción de la vacuna.

La mayoría de los ensayos de campo se han llevado a cabo en escolares que viven en áreas endémicas de fiebre tifoidea. La información complementaria se ha obtenido de estudios cuidadosos con desafíos en voluntarios humanos. (Germanier 1984).

Dos preparaciones vacunales han sido establecidas como

preparaciones de referencia internacional por el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud, la vacuna inactivada con calor-fenol (vacuna L) y la vacuna inactivada con acetona (vacuna K), la preparación de estas vacunas y sus características han sido descritas por la División de Inmunología, del Instituto de Investigación de la Armada Walter Reed (1964). Los resultados de los ensayos de campo realizados en Yugoslavia y Guyana en 1964, Polonia en 1965 y en la URSS en 1966, probaron la eficacia de estas vacunas que confirieron una protección estadísticamente significativa, aunque la vacuna K fué ligeramente más potente que la L. La vacuna K fue efectiva entre el 73 y 93% mientras que la L mostró una eficacia del 51 al 77%. En Guyana la vacuna K confirió protección durante 3 años en el 93% y en el 81% durante 4 años después de la inmunización (Germanier 1984).

Estas vacunas fueron probadas por Hornick et al. (1970) en voluntarios a quienes se les aplicaron tres dosis en vez de dos como en los ensayos de campo y fueron desafiados de 3 meses a 1 año por vía oral con diversas dosis de S. typhi virulenta.

Se comprobó que no había protección contra dosis de 10⁷ bacilos, esta dosis produjo fiebre tifoidea en el 50% de los controles, ninguna diferencia significativa pudo notarse entre las vacunas K y L.

La Organización Mundial de la Salud organizó en Yugoslavia un programa de inmunización estrictamente controlado en el campo y se mostró que una vacuna fenolizada conteniendo Ag "O" pero no "Vi" fue efectiva en reducir la tasa de infección. Sin embargo Callender y Luippold 1943 inmunizaron con esa vacuna estandar a un grupo de hombres quienes posteriormente fueron expuestos a agua contaminada, la incidencia de fiebre tifoidea entre el grupo inmunizado fue de 7% comparado con 1.1% del grupo vacunado. Los resultados sugirieron que la protección conferida por vacunación fue solo relativa, ya que algunos casos ocurrieron en grupos inmunizados. La dosis infectante puede ser muy grande y en algunos casos los mecanismos de inmunidad pueden ser superados, explicándose de esta manera la falla de la vacuna para conferir protección completa en todas las circunstancias (Syverton et al. 1946).

Aunque todas las dudas acerca de la eficacia de las vacunas muertas parenterales en uso han sido despejadas, aún siguen siendo insatisfactorias, debido a las reacciones indeseables que producen tales como procesos inflamatorios extensos y muy dolorosos, cefalea, fiebre, malestar general; por lo que es necesaria la búsqueda de vacunas que no induzcan estos efectos secundarios, que tengan más potencia, que induzcan inmunidad más duradera,

que su producción no sea muy costosa y sean prácticas en su aplicación.

Experimentalmente se han podido obtener cepas mutantes atenuadas de S. typhimurium capaces de inducir protección comparable a la inducida por una infección subletal de una cepa virulenta. (Germanier and Fürer 1971) A partir de estos resultados se ha experimentado con una cepa de S. typhi Ty21a atenuada como un candidato para una vacuna viva oral. Estas mutantes Gal E están caracterizadas por la falta de UDP-galactosa epimerasa, esta enzima es la responsable de la síntesis de UDP-galactosa a partir de UDP-glucosa, como consecuencia de este defecto no hay UDP-galactosa disponible, no se pueden formar las cadenas laterales del lipopolisacárido o antígeno "O", sin embargo cuando la galactosa es añadida al medio, UDP-galactosa puede ser sintetizada vía galactosa 1-fosfato. En estas condiciones el LPS del tipo liso puede ser sintetizado. Esta reversión fenotípica ocurre in vivo permitiendo que estas mutantes Gal-E mantengan su capacidad inmunizante. Como resultado del defecto en la epimerasa, la galactosa exógena tomada no puede ser metabolizada y se acumula en las células en forma de galactosa 1-fosfato y UDP-galactosa, lo que produce lisis de las células.

Esta cepa Ty21a fue probada en 155 voluntarios

humanos a los que se les dió de 5 a 8 dosis con intervalos de 3 a 4 días conteniendo $3-10 \times 10^{10}$ bacilos viables, no se observaron efectos indeseables. De 5 a 9 semanas después de la última inmunización, las personas vacunadas fueron desafiadas con 10^9 bacilos virulentos, incluyeron doce hombres no vacunados que sirvieron como controles. Los resultados mostraron una eficacia del 87%, 7 de los vacunados se enfermaron de fiebre tifoidea mientras que en el grupo control se enfermaron 53 personas; debe señalarse que estos estudios fueron realizados con una dosis alta de vacuna cosechada recientemente (Gilman et al. 1977).

Un ensayo de vacunación fue realizado con esta vacuna oral en Egipto (Wahdhan et al.; 1982). 32,388 niños de 6 a 7 años fueron vacunados con tres dosis de $1-8 \times 10^9$ bacterias de la cepa Ty21a, se incluyó un grupo control sin vacuna y otro grupo el que se administró placebo, la eficacia se siguió durante 3 años. Se encontró una incidencia del 0.6 (1 caso) en el grupo vacunado (Incidencia = No. de casos X cada 10,000), 14.6 (22 casos) en el grupo del placebo y 14.8 (38 casos) en el de niños no vacunados. Con estos datos se estimó una protección del 95%, los resultados indicaron que esta vacuna es segura, estable y efectiva contra fiebre tifoidea por un periodo de tres años. Se ha teorizado sobre la posibilidad de que esta cepa avirulenta e inmunogénica de Salmonella typhi

Ty21a sea capaz de acarrear determinantes antigénicos de otras bacterias o de virus (Germanier 1984).

La investigación científica relacionada con vacunas contra *Salmonella*, ha sido enfocada en general a los papeles inmunogénicos de los componentes de las preparaciones ribosomales obtenidas de *Salmonella typhimurium*, Venneman y Berry (1971) encontraron una elevada inmunogenicidad de las vacunas ribosomales. Margolis y Bigley (1972) por un lado, así como Smith y Bigley (1972) han atribuido a los complejos RNA-proteína el papel de inmunógenos activos. Mientras que Houchens and Wright (1973) reportaron que una glicoproteína, o un mucopolisacárido co-purificado con ribosomas, podrían ser las sustancias responsables de la inmunidad inducida con preparaciones ribosomales. Eiseinstein (1975) reportó que los antígenos "O" que contaminan las proteínas como el ARN de los extractos ribosomales, son los responsables de parte de la actividad protectora. En este sentido Hoops et al. (1976) reportaron que componentes extrínsecos adheridos a la superficie y no constituyentes propios de los ribosomas, eran los responsables de un grado excelente de inmunidad. En cambio los resultados de Jonhson (1973) apuntaron hacia que el componente inmunogénico de los ribosomas era una proteína o un grupo de proteínas. Molinari y Larralde (1974) encontraron que las

preparaciones ribosomales obtenidas de Salmonella typhimurium inducen en el ratón un alto grado de inmunidad que fue más evidente entre las 3 y 4 semanas post-inmunización y que se sigue manteniendo alto tres meses después. Esta preparación permanece activa y muy estable cuando se liofiliza y mantiene a 4°C. La potencia de estas preparaciones se mantiene por arriba de los 6 años (datos no publicados). Análisis inmunolectroforéticos mostraron que esas preparaciones ribosomales se habían copurificado con lipopolisacárido, y se corroboró por estudios de microscopía electrónica la presencia de componentes probablemente membranales. Molinari et al. (1976) encontraron que estas preparaciones ribosomales indujeron inmunidad en el 100% de los ratones al ser inoculadas por vía subcutánea y usándose un desafío oral con 5.5×10^9 de Salmonella typhimurium virulenta creciendo en fase logarítmica. En contraste en el grupo control se observó un 72% de mortalidad. Se puede pensar, aunque sería complejo comprobarlo que dosis de 5.5×10^9 de la Salmonella virulenta creciendo en su fase exponencial, es difícil que pudieran ser ingeridas de modo natural, por lo tanto se puede predecir que estos inmunógenos en dosis óptimas pueden proteger al hombre contra la cantidad de S. typhi que éste ingiera con alimentos contaminados.

Molinari et al. (1975) encontraron que preparaciones ribosomales obtenidas de Salmonella typhi Ty2 protegieron al 100% de los ratones inmunizados contra el desafío con tres cepas diferentes de S. typhi y que estudios de tolerancia en humanos voluntarios mostraron solo una leve reacción inflamatoria en el sitio de inoculación.

Los resultados obtenidos con la vacuna ribosomal son satisfactorios sin embargo el uso de estas preparaciones para inmunizar en gran escala, a conglomerados humanos, se ve limitada por la pequeña cantidad de ribosomas obtenidos por cada litro de cultivo. La producción de una vacuna de esta índole a escala industrial implicaría costos muy elevados tanto por la metodología que se requiere para la obtención de estas preparaciones, como la inmensa masa bacteriana que se necesitaría cosechar para obtener preparaciones que serían exiguas.

Ante esta perspectiva se plantea llevar a cabo una investigación que considere los siguientes objetivos: diseñar un método que utilice una infraestructura sencilla y que permita la obtención de extractos altamente inmunogénicos a partir de células de S. typhi y de S. typhimurium creciendo en fase exponencial, y que adicionalmente tenga un rendimiento óptimo por litro de cultivo. Estudiar si estos extractos inmunogénicos son inócuos o tienen propiedades tóxicas. Si inducen en

humanos efectos indeseables o son bien tolerados, y finalmente llevar a cabo una caracterización inmunoquímica de los extractos, con el fin de estudiar aisladamente cada componente inmunogénico.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas se utilizaron para este estudio Salmonella typhi Ty2 y Salmonella typhimurium (obsequiadas por el Dr. J. Martuscelli, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. por el Dr. J. Fernández de Castro, Instituto Nacional de Higiene, SSA. y por el Dr. L. Filloy, Hospital Infantil de la Ciudad de México) y se mantuvieron en cultivos de caseína-peptona y soya-peptona agar (Merck).

Para la preparación de cultivos; se emplearon frascos conteniendo siete litros de caseína-peptona soya-peptona en caldo, se inocularon con 50 ml de cultivos de Salmonella typhi o Salmonella typhimurium crecidas durante toda la noche. Estos cultivos se incubaron a 37°C durante 4 a 5 horas. Las células bacterianas se cosecharon por centrifugación a 7000 x g durante 15 min a 4°C en una centrifuga Sorvall y el sedimento bacteriano se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Animales de laboratorio. Se usaron ratones albinos de la cepa CD-1 con un peso entre 20 a 24 g de una colonia de nuestro bioterio, para todos los experimentos de inmunidad. Además se trabajó con ratas blancas de la cepa Wistar del mismo bioterio pesando entre 200 y 250 g para las pruebas de endotoxina. Finalmente se emplearon conejos blancos de Nueva Zelanda para la obtención de antisueros.

Obtención de material inmunogénico e inmunización. Los antígenos bacterianos se obtuvieron a partir de polvos acetónicos obtenidos a su vez de las células bacterianas siguiendo el método de Fessenden et al. (1967). Las células de la pasta bacteriana se resuspendieron en acetona fría previamente deshidratada con cloruro de calcio. La suspensión se agitó durante 10 min y se pasó a través de un filtro de vidrio usando una bomba de vacío, se agregó acetona limpia y se repitieron los pasos hasta la filtración. Las células se lavaron con cloroformo frío de la misma manera. El material se dejó en una cámara de vacío en refrigeración durante 48 h con el objeto de eliminar el cloroformo residual. La siguiente metodología fue diseñada para la obtención de antígenos a partir de los polvos bacterianos acetónicos. Estos polvos se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 0.01 M, a pH 7.2, conteniendo cloruro de magnesio 0.012 M, sacarosa 0.25 M, cloruro de potasio 0.1 M y desoxicolato de sodio al 0.4%, al final se añadió deoxirribonucleasa (Merck) a una concentración de 20 ug/ml, se incubó a 38°C durante 1 h con agitación constante y se dializó contra el mismo amortiguador sin sacarosa ni desoxicolato durante tres días con cambios frecuentes. El material dializado se centrifugó a 36,000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente, se filtró a través

de una membrana milliporo de 0.22u, se liofilizó y se guardó en refrigeración. Los productos finales para su prueba se denominaron: Vacuna Nueva de Salmonella typhi y Vacuna Nueva de Salmonella typhimurium. (Tato, et al. 1979).

Se obtuvieron preparaciones ribosomales de Salmonella typhi Ty2 siguiendo los métodos descritos en otros trabajos (Molinari et al. 1974 ab).

Los ratones se inmunizaron con diferentes dosis de las vacunas nuevas resuspendidas en 0.1 ml de solución salina isotónica estéril por vía subcutánea. La segunda dosis se administró siete días después.

Para obtener antígenos purificados a partir de la vacuna nueva de S. typhi, se cargó una columna de 1.6 x 60 cm de DEAE-cellulosa (Whatman) equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.02M,, pH 8.0, y se aplicaron 300 mg del complejo inmunogénico obtenido de S. typhi. El flujo se ajustó a una velocidad de 60 ml/h, las fracciones se eluyeron incrementando la concentración de cloruro de sodio por pasos. La salida de proteínas se verificó con un analizador ultravioleta UA-5 (ISCO) a una longitud de onda de 280 nm, se colectaron alícuotas de 3.5 ml. La absorbancia del material en cada tubo se estimó en un espectrofotómetro Carl Zeiss a 280 nm. El material de los tubos de cada pico se mezcló, se dializó contra un

amortiguador de fosfatos 0.02 M pH 8.0 y se liofilizó. El material inmunogénico de la fracción "4" se colocó en una columna de 1.5 x 50 cm de Sephadex G-50, previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 8.0. Las proteínas se eluyeron con el mismo amortiguador a una velocidad de flujo de 60 ml/h. Todos los procedimientos de fraccionamiento se realizaron a 4°C. Detalles menores serán dados en "Resultados".

Para obtener antígenos purificados a partir de la vacuna nueva de S. typhimurium, se preparó una columna de 1.6 x 60 cm de DEAE-cellulosa (Whatman) equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 8.0, se emplearon 300 ug del complejo inmunogénico obtenido de S. typhimurium. El flujo se ajustó a una velocidad de 69 ml/h, las fracciones se eluyeron incrementando la concentración de cloruro de sodio por pasos.

La elución se realizó del mismo modo que el fraccionamiento para la VN de S. typhi. El material de las fracciones 3,4 y 5 se mezclaron y se recromatografiaron en una columna de Sephadex G-200, el equilibrio de este material y la elución de las proteínas se hizo con amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 8.0, recuperándose en alícuotas de 3 ml. De las fracciones obtenidas, la 6 se recromatografió en Sephadex G-50. Los ratones de la cepa CD-1 de ambos sexos de 20 ± 1 gr de peso, se inmunizaron

con dosis conocidas de VN de S. typhimurium así como con material de fracciones de DEAE-cellulosa, Sephadex-G-200 y Sephadex G-50, la segunda dosis de refuerzo se aplicó a los 7 días.

El antígeno "Vi" se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Webster et al. (Kwapinski 1972) y los antígenos flagelares "H" se purificaron de acuerdo al método de Uchida et al. (Kwapinski 1972). Se inmunizaron con dosis conocidas de la nueva vacuna (VN) a ratones de la cepa CD-1 de ambos sexos con un peso de 16 ± 0.5 g así como con fracciones de DEAE-cellulosa y de Sephadex G-50 por vía subcutánea. Los ratones controles se inocularon con salina isotónica estéril o antígeno "Vi". Siete días después los ratones inmunizados recibieron un refuerzo.

Para la prueba de inmunidad y prueba de potencia relativa: Los ratones que habían sido inmunizados con material de la vacuna nueva de Salmonella typhimurium fueron desafiados siete días después de la segunda inmunización con 100 Dosis Letales al 50% equivalente a 14×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de Salmonella typhimurium virulenta. Los ratones que habían sido inmunizados con material de la vacuna nueva de Salmonella typhi o con la vacuna estándar (Vacuna tifoídica inactivada con calor-fenol (amablemente) obsequiada por el Instituto Nacional de Higiene SSA, México) fueron

desafiados siete días después de la segunda inmunización con $10 \times DL_{50}$ equivalentes a 3×10^8 UFC de Salmonella typhi virulenta por vía intraperitoneal incluida en 5% de mucina (Army Medical Department Research and Graduate School 1960). Para el desafío, las células bacterianas fueron cosechadas a la mitad de su crecimiento exponencial. La inmunidad se reporta como el número de animales que sobrevivieron al desafío sobre el número total de ratones desafiados; el tiempo de observación fue de 21 días post-desafío en los experimentos con Salmonella typhimurium y 5 días en los experimentos con Salmonella typhi Ty2. Los ratones inmunizados con VN de Salmonella typhi con sus fracciones de DEAE-cellulosa, y Sephadex G-50 fueron desafiados por vía intraperitoneal con 3 a $10 DL_{50}$ equivalente a 3×10^8 UFC de la S. typhi creciendo a la mitad en su fase exponencial. Las células de reto se resuspendieron en caseína-peptona soya peptona fresca con 13% de sulfato de condritín. Treinta minutos antes del desafío, los animales fueron inoculados por vía endovenosa con 0.850 mg de acetato de plomo solubilizado en 0.1 ml de agua bidestilada.

Finalmente, los ratones inmunizados con VN de S. typhimurium y sus fracciones de DEAE-cellulosa, Sephadex-G-200 y Sephadex G-50, fueron desafiados con diversas dosis letales (ver Resultados) al 50% por vía intraperitoneal.

Para los experimentos con S typhi el tiempo de observación post-desafío fue de 3 a 5 días. Para los experimentos con S. typhimurium el tiempo de observación post-desafío fue de 21 días.

En cada experimento de protección se estimó la virulencia de cada microorganismo simultáneamente al desafío por el método de Reed y Muench (Batson 1956). La significancia estadística de los resultados se determinó por la prueba de chi cuadrada (Spiegel 1970).

La concentración de proteínas tanto de los extractos antigénicos denominados vacunas nuevas, como de sus fracciones obtenidas por diversos pasos cromatográficos se determinó por el método de Lowry et al. (1951). La concentración de ARN se estimó por el método del Orcinol (Ashwell 1957). La del ADN por el reactivo de p-nitrofenilhidracina Welbs y Lury (1960). Los azúcares reductores se estimaron por el método de la Antrona (Ashwell 1957). La albúmina sérica bovina (Sigma), el ARN de levadura "tórula" y ADN de timo de ternera de (Sigma) y glucosa (Baker) se usaron como estándares.

Se adquirieron antisueros para la identificación serológica de las cepas usadas (BBL Becton Dickinson y Compañía) así como sueros anti-Vi y anti O correspondientes a antígenos de Salmonella typhi y Salmonella typhimurium. Se inocularon conejos blancos de

Nueva Zelanda con dosis repetidas de las vacunas nuevas a dosis de 100 ug por vía intradérmica, los antígenos se incluyeron en gel de hidróxido de aluminio al 3.5% e hidróxido de magnesio al 4% como adyuvantes (v/v). Se administraron 5 dosis a intervalos de 7 días. Los conejos se sangraron cinco días después de la última inoculación por la vena de la oreja, la sangre se dejó coagular durante 3 h a 4°C y después se separó el suero por centrifugación.

Para estudiar la reacción antígeno-anticuerpo se usaron: A) Inmunolectroforesis siguiendo una técnica descrita por Clausen (1971), se preparó uno por ciento de agar purificado (Difco) en amortiguador de veronal 0.05 M, pH 8.0. Se utilizaron 5 antígenos: Vacuna Nueva de S. typhimurium, su LPS, Vacuna Nueva de S. typhi Ty2, su LPS y preparación ribosomal de S. typhi Ty2. Diez ul de la suspensión de 150 mg/ml de cada una de las vacunas nuevas y de la preparación ribosomal de S. typhi Ty2 y 20 ul; de una solución de 5 mg/ml de cada LPS fueron depositados en su respectivo pozo. La electroforesis se llevó a cabo a 300 V y 2.7-3.3 mA por laminilla durante 2 h. Después, se aplicaron 200 ul de suero de conejo anti-vacuna nueva de S. typhi o de S. typhimurium en el canal correspondiente y se incubaron durante 48 h; los geles se lavaron con salina 0.15 M durante tres días con cambios frecuentes, se

secaron y se tñeron con amido negro al 0.1% en ácido acético al 10%. B) Inmunodifusión en agar purificado (Merck) al 1% en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 8.5, siguiendo el método de doble difusión de Ouchterlony (Clausen 1971). Se depositaron 25 ul de antisueros y de antigenos en sus pozos correspondientes, las laminillas se dejaron a temperatura ambiente durante 48 h, se lavaron con salina 0.15 M durante 5 días, se secaron y tñeron con amido negro al 0.1% en ácido acético al 10%.

Para conocer la presencia de endotoxina en las VN y de sus fracciones se siguió el método de Selye et al. (1972), ya que una inyección intravenosa de acetato de plomo incrementa la sensibilidad de la rata a las endotoxinas de diversas enterobacterias más de 100,000 veces lo normal. El lipolisacárido LPS se obtuvo de ambas cepas de *Salmonella* de acuerdo al método de Westphal (Kwapinski 1972). Se usaron ratas blancas de la cepa Wistar con un peso de 200 ± 10 g las cuales se inyectaron con dosis de 10 a 20 ug de cada vacuna nueva o de sus fracciones de DEAE-cellulosa o de Sephadex mezcladas con 5 mg de acetato de plomo, otro grupo con 1 ug de LPS y otros grupos con dosis de 20 ug de cada una de las VN de sus fracciones de DEAE-cellulosa y de Sephadex 200 y 50.

La prueba de toxicidad aguda se realizó solamente con la VN de *Salmonella typhi*, para tal fin, se inocularon

ratones con dosis graduadas de este material por vía subcutánea para estimar el grado de toxicidad de este producto y conocer la dosis tóxica al 50% (DT₅₀) y extrapolando al Margen de Seguridad para uso en humanos (Goldstein et al. 1969).

También se estudió la prueba de tolerancia en voluntarios siguiendo las "Recomendaciones para guía médica en investigación clínica" (Declaración de Helsinki 1964). Se inoculó a un grupo de voluntarios (a los cuales se les informó cabalmente sobre el estudio y se obtuvo su consentimiento), con 1 ug de proteína de vacuna nueva de S. typhi intradérmicamente resuspendido en 0.1 ml solución salina, y a otro grupo 0.1 ml de vacuna estándar conteniendo 1×10^8 UFC de S. typhi muertas por calor y preservadas en fenol. Antes de la administración de estas vacunas, cada persona se sangró para obtener el suero preinmune. Una semana más tarde todos los voluntarios fueron reinoculados en la misma forma (ningún voluntario tuvo antecedentes de padecer fiebre tifoidea o de ser vacunado contra esta enfermedad, tampoco se les advirtió cual vacuna iba a ser probada en ellos). Ambos grupos se observaron durante 72 h después de cada inoculación. Los signos y síntomas se registraron diariamente. Los resultados se expresaron en porcentaje. Las lesiones inflamatorias producidas por ambas vacunas fueron medidas

diariamente, los resultados se estimaron como el promedio del diámetro del eritema. Todos los participantes fueron sangrados 7 días después de la segunda inoculación y su suero se usó para estimar la producción de anticuerpos contra antígenos de *Salmonella* por la prueba de fijación de complemento al 50% de hemólisis de acuerdo al método de Fulton y Dumbell (1949).

La vacuna nueva de *S. typhi*, sus fracciones DEAE-cellulosa 4 y 19 y los antígenos flagelares "H" fueron resuspendidos en agua destilada y una gota de cada suspensión se depositó en una malla de cobre de 400 mesh cubierta con una película "Formvar", se dejó precipitar durante un minuto y se eliminó el exceso, se añadió una gota de ácido fosfotúngstico al 2% a un pH de 6.8 y se secó con aire de acuerdo al método de Dawes (1971). Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico Jeol JEM-100b operado a 60 kV.

El peso molecular de las proteínas contenidas en la VN de *S. typhi* y su fracción 4, fue estimado por electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS de acuerdo al método de Weber y Osborn (1969). Muestras por duplicado fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10%, se aplicó una corriente de 8 mA/gel durante 7 h a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con azul brillante de coomasie G-250 y, desteñidos con solución

desteñidora estándar. Las proteínas de referencia fueron citocromo c (12,400), Quimotripsina (23,500), apoferritina (48,000), albúmina sérica bovina (67,000) y globulina (160,000 daltones) (Schwartz-Mann).

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de inmunidad en el modelo murino de fiebre tifoidea son muy significativos, ya que todas las dosis de la VN de *S. typhimurium* indujeron altos niveles de protección contra el desafío de 100 x DL₅₀ del microorganismo virulento. Varios experimentos se hicieron con resultados similares, uno de los cuales se ilustra en el cuadro 1, donde puede verse que el 50% de los ratones controles murió a los 4.5 días, mientras que los ratones inmunizados sobrevivieron del 90 al 100% durante todo el tiempo de observación después del desafío. Los análisis estadísticos mostraron que estos resultados son altamente significativos teniendo un valor de $p < 0.001$.

CUADRO 1

Sobrevida de ratones inmunizados con vacuna nueva
de *Salmonella typhimurium* y desafiados con
100 x DL₅₀ del microorganismo virulento.

dosis inmunizante ug	sobrevivientes total	sobrevida %	Tiempo Letal al 50%
200	10/10	100	21
100	10/10	100	21
50	10/10	100	21
2	9/10	90	21
1	10/10	100	21
0.5	9/10	90	21
control	0/10	0	4.5

21 días en que el 50% de los animales murieron

90% < 0.001

control inoculados con salina

En la prueba de potencia relativa con la VN de S. typhi, es muy importante destacar que 1 ug de proteína de este material indujo un alto nivel de inmunidad contra 10 X DL₅₀ de la salmonella virulenta, ya que sobrevivió el 100% de ratones inmunizados, mientras que la vacuna estándar solo protegió al 67% de los animales inmunizados con 1 X 10¹² células, estos resultados se resumen en el cuadro 2. Considerando que el peso de una célula bacteriana es en promedio de 10⁻¹² g (Stanier 1972), el peso total de 10¹² células de la vacuna estándar, podría ser 100 veces mayor que 1 ug de la VN de S. typhi que debe de ser del orden de 10⁻¹⁰ g.

CUADRO 2

Sobrevida de ratones inmunizados con vacuna nueva de Salmonella typhi o con vacuna estándar y desafiados con 10 X DL₅₀ del microorganismo virulento.

vacuna nueva			vacuna estándar		
dosis inmunizante ug	sobrevivientes total	sobrevida %	dosis inmunizante	sobrevivientes total	sobrevida %
1.0	12/12	100	10 ¹²	8/12	67
0.1	7/12	58	10 ⁷	4/12	33
0.01	2/12	17	10 ⁶	1/12	8
control	0/12	0	control	0/12	0

Unidades formadoras de colonias

En la prueba de endotoxina, murieron cuatro ratas inoculadas intravenosamente por la vena de la cola con 1 ug de LPS obtenido de Salmonella typhimurium mezclado con 5 mg de acetato de plomo. Otras cuatro ratas inoculadas con 5 ug de VN de S. typhimurium mezclados con 5 mg de acetato de plomo también murieron. Este resultado es una evidencia de la presencia de LPS en la vacuna nueva de S. typhimurium. Pero en los grupos controles inoculados con 1 ug de LPS, 100 ug de vacunas nuevas o con 5 mg de acetato de plomo los animales sobrevivieron. Por otro lado, las ratas inoculadas con 10 ug de vacuna nueva de S. typhi mezclados con 5 mg de acetato de plomo estuvieron muy intoxicadas pero no murieron, lo que indica que en esta vacuna debe haber menos de 1 ug de LPS por cada 10 mg de proteína.

Los resultados obtenidos con el modelo murino (Cuadro 1) y con la prueba de potencia relativa (Cuadro 2) muestran que ambas preparaciones de las vacunas nuevas tienen un alto potencial inmunogénico.

En la prueba de toxicidad aguda, los ratones inoculados con dosis graduadas de vacuna nueva de S. typhi Ty2 fueron observados durante 14 días y pesados cada 7 días post-inoculación; las muertes se registraron diariamente. Los resultados se resumen en el cuadro 3. Solo con la dosis más alta se registró toxicidad, por lo que esta dosis

de 10,000 ug podría representar la dosis tóxica al 30% ya que murieron tres ratones de diez inoculados. Aquí cabe considerar que una dosis efectiva al 50% (dosis que protegió al 50% de los animales desafiados podría ser inferior a 1 ug de la vacuna nueva de S. typhi cuadro 2. Por lo que al margen de seguridad para uso humano debe ser muy alto en base a la fórmula:

$$\text{Margen de seguridad} = \frac{\text{Dosis tóxica}_{50}}{\text{Dosis efectiva}_{50}} = \frac{10,000}{0.1} = >100,000$$

CUADRO 3

Sobrevida de ratones inoculados con diversas dosis de vacuna nueva de *S. typhi* Ty2 con el objeto de conocer la toxicidad de este producto biológico.

peso en gramos					
dosis ug	número ratones	antes inoculación	7 días después	15 días después	sobrevida %
		X	Y	I	
10,000	10	25.0	25.0	26.4	70
1,000	10	25.5	26.5	26.4	100
100	10	25.5	27.3	28.3	100
10	10	25.8	27.4	28.4	100
control§	10	24.0	26.5	26.7	100

§inoculados con salina estéril 0.1 ml.

La prueba de tolerancia se realizó en voluntarios para confrontar efectos indeseables inducidos por la vacuna nueva de *S. typhi* Ty2 y por la vacuna estándar inactivada por calor-fenol. Los resultados se resumen en el cuadro 4. La inoculación de 1 ug de proteína de la vacuna nueva resuspendida en 0.1 ml de salina estéril por vía intradérmica, indujo en 15 personas un proceso inflamatorio indoloro con un diámetro promedio de su eritema de 7 y 21 mm, 24 h después de la primera y segunda inoculación respectivamente. En contraste, 1×10^{10} células de *S. typhi* de la vacuna estándar inoculadas en las mismas condiciones, indujeron en todos los voluntarios un proceso

inflamatorio con un promedio del diámetro de 52 y 50 mm. Esta inflamación se acompañó de dolor intenso en el 67% de las personas inoculadas la primera vez y en el 45% después de la segunda inoculación. El prurito local intenso fue otra de las reacciones indeseable inducida por la vacuna estándar que manifestó el 55% de las personas inoculadas durante el tercer día post-inoculación. Es muy importante señalar que las instituciones de salud, inoculan a los adultos con una dosis 5×10^8 salmonellas muertas y 2.5×10^8 células en niños de la vacuna estándar. En los ensayos de campo la inoculación de esta vacuna ha inducido efectos indeseables en la población inyectada (Yugoslav typhoid comission 1964).

CUADRO 4

Efectos indeseables inducidos por la inoculación
intradérmica de vacuna nueva de S. typhi Ty2 o
por la vacuna estándar (en voluntarios humanos).

	No. de casos	eritema		dolor		prurito		cefalea
		I en mm	local	local	local	%		
		días	días	días	días	días	días	
Vacuna Nueva		1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	
1a. dosis 1 ug	15	7 3 -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
2a. dosis 1 ug	15	21 - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
Vacuna Estándar								
1a. dosis								
3x10 ¹⁰	11	52 60 12	67 9 -	- - 55	- 18 -			
2a. dosis								
3x10 ¹⁰	11	50 52 11	45 9 -	- 9 9	-			

Bacilos de Salmonella typhi muertos por calor-fenol.

Los sueros de los voluntarios inmunizados con una u otra vacuna se utilizaron para determinar el título de anticuerpos fijadores de complemento. El suero de conejo anti-vacuna nueva de S. typhi fue utilizado como estándar positivo. Los resultados se agruparon en frecuencias y porcentajes, (cuadro 5). La vacuna nueva de S typhi a la dosis de 1 ug (dos dosis) fue capaz de inducir un alto título de anticuerpos en humanos, el 75% de los sueros

tenían un título entre 1/512 y 1/4096. Por el contrario la vacuna estándar indujo títulos entre 1/17 y 1/512 en el 50% de las personas inoculadas; en el resto no se detectaron anticuerpos por la metodología usada para ambos grupos de sueros. Los análisis previos a la inoculación fueron negativos.

Se obtuvieron 211 mg peso seco de la vacuna nueva de S. typhi Ty2 por litro de cultivo. Los análisis químicos de este material dieron los siguientes resultados: proteínas el 72.17%, ARN el 22.09%; azúcares reductores el 3.76% y ADN el 0.95%. La vacuna de S. typhimurium estaba constituida por el 88.9% de proteínas; el 6.6% de ARN; 4.06% de azúcares reductores y 0.45% de ADN.

Los análisis por microscopía electrónica mostraron que la vacuna nueva de S. typhi estaba constituida por un material homogéneo de partículas muy pequeñas. No se observaron otras estructuras como paredes celulares o fragmentos de ella, ni fragmentos membranales, ni filamentos de ADN. Lo que evidenció de que el método para obtener material antigénico eliminó las estructuras mencionadas.

CUADRO 5

Título de anticuerpos en sueros de voluntarios humanos inoculados
con vacuna nueva de Salmonella typhi Ty2 o vacuna estándar
estimado por la prueba de fijación de complemento al 50%.

Vacuna Nueva 1 ug 2 dosis				Vacuna Estándar (1x10 ⁸ bacilos) 2 dosis			
Título R F C ₅₀	Frecuencias	x de Frecuencias	Y	Título R F C ₅₀	Frecuencias	x de Frecuencias	Z
0 (2 sueros)	0-10	0	17	0 (5 sueros)	0-10	0	50
376	11-100	37	8	17 23	11-100	20	20
512 640 768 768	101-1000	672	33	108 450 512	101-1000	357	30
1008 2624 3072 3584 4096	1001-10000	3036	42				
Total Z			100				100

§promedio de cuatro ensayos.

Los análisis inmunolectroforéticos mostraron que la vacuna nueva de S. typhimurium probada contra su antisuero produjo 21 sistemas de antígeno-anticuerpo, distribuidos en todo el campo eléctrico, 11 de las cuales tenían carga eléctrica negativa. El LPS obtenido de S. typhimurium probado contra el suero anti-vacuna nueva de S. typhimurium produjo dos bandas de precipitación las cuales mostraron identidad entre sí (Fig. 1). Los antígenos de la vacuna nueva de S. typhi produjeron probados contra su antisuero, 4 bandas de precipitación (Fig. 2). En tanto que la preparación ribosomal probada contra este antisuero, produjo solamente una banda de precipitación, la cual estaba en la misma posición a una de las 4 bandas de la vacuna nueva de S. typhi. Ty2 no formó bandas de precipitación cuando se probó contra la vacuna nueva de S. typhi apoya aún más de que esta vacuna debe tener muy poco LPS, lo cual hace pensar que las proteínas de S. typhi deben jugar un papel preponderante en la inducción de la inmunidad. Dos de los diez sueros probados obtenidos de voluntarios inoculados con vacuna nueva de S. typhi y dos de siete sueros de humanos inoculados con 1×10^8 bacilos de la vacuna estándar produjeron una banda de precipitación anódica, cuando los sueros del primer grupo reaccionaron con 30 mg/ml de la vacuna nueva y en el segundo grupo cuando 150 mg/ml de



Fig. 1.- Inmunoelectroforesis de material de la vacuna nueva de S. typhimurium (pozo superior) y su lipopolisacárido. (pozo inferior) probado contra suero de conejo anti-vacuna nueva de S. typhimurium. Note 21 líneas de precipitación en el sistema superior y 2 en el inferior.

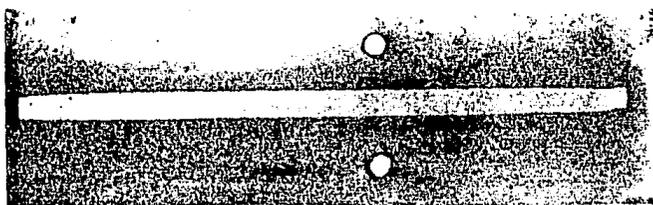
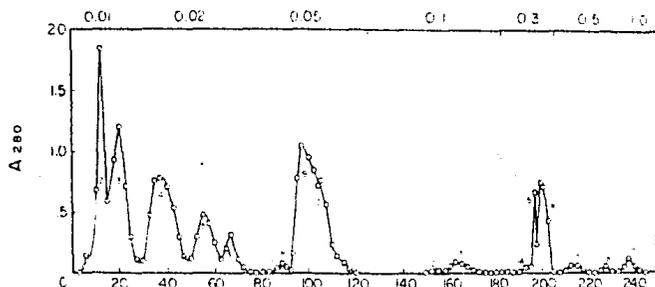


Fig. 2.- Inmunoelectroforesis de material de la vacuna nueva de S. typhi Ty2 (pozo superior) y de la preparación ribosomal (pozo inferior) probado contra suero de conejo anti-vacuna nueva de S. typhi Ty2. Note 4 líneas de precipitación en el sistema superior y 1 en el inferior.

La separación cromatográfica de 300 mg de vacuna nueva de S. typhi en DEAE-cellulosa produjo 19 fracciones. Una de las cuales era rica en proteínas, por lo que se probaron para conocer su inmunogenicidad. Los resultados de la prueba de inmunidad mostraron que seis de esas fracciones fueron capaces de inducir inmunidad en el ratón contra una infección. Los resultados de la cromatografía se pueden observar en la figura 3, los de inmunogenicidad en el cuadro 4.

Amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 8

NaCl (M)



F R A C C I O N E S

Fig. 3. Fraccionamiento de material denominado Vacuna nueva de Salmonella typhi, se cromatografiaron 300 mg a través de una columna de DEAE-cellulosa, el material se eluyó incrementando la concentración de NaCl en amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 8.0.

CUADRO 6

Sobrevida de ratones inmunizados con 10 ug de VN de Salmonella typhi y algunas de sus fracciones de DEAE y desafiados con 3x10⁸ del microorganismo virulento, número de proteínas detectadas por electroforesis y determinación de antígenos "Vi" y "O" en la vacuna como en sus fracciones de DEAE.

fracción inmunizante	sobrevivientes		sobrevida %	No. de bandas/ electroforesis	antígenos	
	total				O	Vi
VN	10/10		100	21	+	+
4	8/10		80	1	-	-
15	8/10		80	15	-	+
16	8/10		80	13	-	+
17	9/10		90	5	-	+
18	7/10		70	5	-	+
19	8/10		80	1	-	+
Vi	8/10		80		-	+
control	1/10		10			

*p<0.01
 **p<0.001
 ***p<0.01

Las otras fracciones probadas fueron la 1,2,9,10 y 12, de estas solo la fracción 2 indujo inmunidad en 6 de 10 ratones que sobrevivieron al reto de $3 \times DL_{50}$ de S. typhi Ty2, estas fracciones contuvieron de 2 a 4 proteínas que fueron evidenciadas por electroforesis, ninguna de estas fracciones contenía antígenos O, ni Vi. Por lo que las únicas fracciones que se consideraron con un buen nivel inmunogénico son las que aparecen en el cuadro 6. De ellas, la número 4 contenía una sola proteína que estaba exenta de antígenos O y Vi. La fracción 19 también contenía una sola proteína copurificada con antígeno Vi. El resto de las fracciones contenía de 5 a 15 proteínas, de estas la fracción 17 fue la que indujo el porcentaje más alto de protección (90%).

Es conocida la resistencia natural del ratón a la infección con S. typhi. En este sentido fue necesario bloquear el "sistema fagocítico mononuclear" de los ratones usando acetato de plomo. Las dosis de acetato de plomo apropiadas fueron exploradas previamente a las pruebas de inmunidad (datos no mostrados). Otro factor que se consideró importante, fue el incluir las bacterias para el desafío en caldo de infusión de cerebro-corazón, que contenía 13% de sulfato de condroitin al 13%, con el objeto de que las células bacterianas dispusieran por un lado de un medio apropiado de desarrollo intraperitonealmente y

protección con el sulfato de condroitin por el otro.

Se realizaron por lo tanto, experimentos con el fin de conocer la influencia del acetato de plomo, del condroitin sulfato y del caldo infusión de cerebro-corazón; sobre pruebas de desafío en animales no inmunizados. Los resultados pueden verse en el cuadro 7; *S typhi* no fué capaz de matar a un número importante de ratones cuando el desafío no contenía ni sulfato de condroitin ni acetato de plomo. Por otro lado ni el sulfato de condroitin ni el acetato de plomo juntos o separados tuvieron influencia sobre la mortalidad.

CUADRO 7

Influencia del acetato de plomo y del sulfato de condroitin sobre el desafío con 3 DL₅₀ de *S. typhi* resuspendidas en caldo infusión cerebro-corazón en ratones no inmunizados.

Grupos	Desafío 3DL ₅₀	Acetato-Plomo 850 ug	Sulfato de Chondroitin 13Z	Sbv ^t ---- Total	Sobrevida %
1	+	+	+	1/10	10
2	-	-	+	10/10	100
3	-	+	-	10/10	100
4	+	-	+	7/10	70
5	-	+	+	10/10	100
6	+	+	-	10/10	100
7	+	+	-	8/10	80
8	+	-	-	10/10	100

^tSbv = Sobrevivientes/Total

El material de la vacuna nueva de S. typhi y 10 de sus fracciones de DEAE-cellulosa fueron estudiadas por electroforesis. Por este método, se determinó que la VN estaba constituida al menos por 21 proteínas, sus subfracciones mostraron poseer de 1 a 15 proteínas, los resultados pueden ser observados en las figuras 4 y 5 algunos se resumen en el cuadro 6.

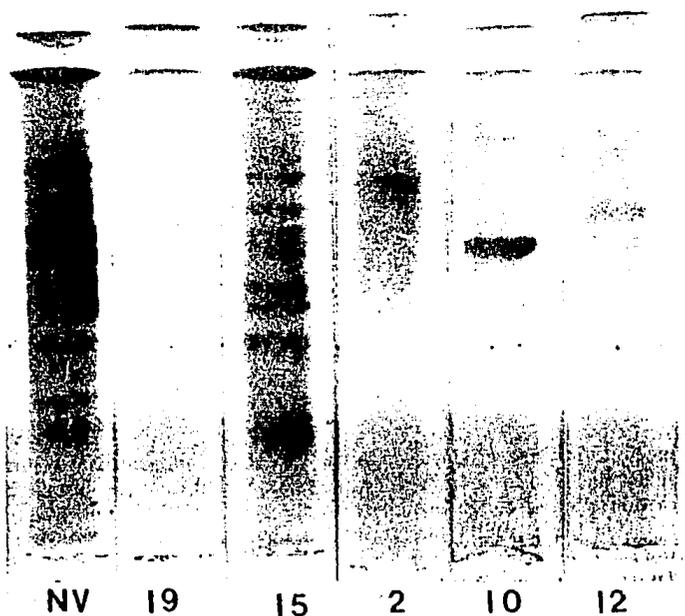


Fig. 4. Electroforesis de la VN de S. typhi y algunas de sus fracciones de DEAE

NV 4 H 17 18 15 16

Fig. 5. Electroforesis de la VN de S. typhi y de algunas de sus fracciones de DEAE.

Se estudió la presencia de antígenos "O", "Vi" y "H" en la VN de S. typhi y de sus fracciones de DEAE. El antígeno "O" fue detectado solo en la VN a muy bajas concentraciones, ya que 10 ug de la VN mezclados con 5 mg de acetato de plomo mataron al 50% de las ratas inoculadas, es de estimarse que debe haber menos del 5% de endotoxina en la VN de S. typhi.

En los grupos controles, murió el 100% de ratas

inoculadas con 1 ug de endotoxina de S. typhi mezclado con 5 mg de acetato de plomo. En cambio sobrevivió el 100% de las ratas inoculadas ya sea con 5 mg de acetato de plomo, o con 1 ug de endotoxina de S. typhi inoculados por separado. Ninguna de las fracciones de DEAE-cellulosa reveló la presencia de endotoxina. Las pruebas de inmunodifusión mostraron evidencias que el antígeno Vi fue eluido con las últimas cinco fracciones de DEAE-cellulosa (figs. 6 y 7). La fracción cuatro constituida por una sola proteína no formó ninguna línea de precipitación contra el suero anti-Vi (datos no mostrados). La Vacuna Nueva produjo al menos 7 sistemas antígeno anticuerpo al reaccionar con su antisuero. Uno de estos sistemas formó una línea de identidad con la línea de precipitación formada entre el antígeno Vi y el suero antivacuna nueva, la cual se continuó con las líneas de precipitación producidas por las fracciones 15 y 16. En cambio las fracciones 4 y 19 no produjeron bandas de precipitación; los resultados pueden verse en la figura 7. Ya que las fracciones 4 y 19 mostraron una banda en electroforesis (que sugiere una proteína por banda), y de que estas fracciones indujeron un alto nivel de inmunidad contra la infección de S. typhi, se estudiaron por otros procedimientos con el objeto de purificar sus proteínas y conocer mejor su participación en inducir inmunidad como proteínas purificadas.

Los geles de poliacrilamida-SDS de una nueva electroforesis mostraron 25 bandas de proteína para la Vacuna Nueva y 3 bandas en la fracción 4 (fig.8). Una de estas bandas, la más conspicua tenía un peso molecular estimado en 8,800 daltones, las otras dos cuya concentración era mucho menor y eran apenas visibles en el gel de poliacrilamida, tenían 26000 y 38000 daltones. La estimación de los pesos moleculares de las proteínas de la VN estaban en un rango de 8,800 a 80,000 daltones.

La fracción 4 fue recromatografiada en una columna de Sephadex G-50 con el objeto de separar sus proteínas y purificarlas. Dos fracciones fueron eluidas, las que se probaron para conocer su inmunogenicidad y ser estudiadas por electroforesis para verificar su purificación. Una sola banda de proteína se observó en el gel de poliacrilamida-SDS correspondiente a la fracción 4b (fig. 9). En el análisis electroforético de la fracción 4b, dos geles fueron teñidos con azul de coomassie y otros dos fueron sumergidos en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 ug/ml durante 24 horas. Estos últimos geles se observaron bajo luz ultravioleta, una banda fluorescente se detectó a una distancia de migración de 5.7 cm, la misma distancia de migración que se observó en la banda de proteína de los geles teñidos con azul de coomassie, estos resultados sugieren que este

comportamiento dual, sea debido a un complejo ARN-proteína, ya que por un lado el material de la fracción 4b tratado con bromuro de etidio fluoresció y por otro se tiñó con un colorante afín a proteínas.

Las pruebas de inmunidad de la fracción 4b mostraron que esta "ribonucleoproteína" fue capaz de inducir un buen nivel de inmunidad contra el reto de 10 X DL₅₀ de S. typhi, en contraste las proteínas de la fracción 4d no tuvieron un papel significativo en la inducción de inmunidad.

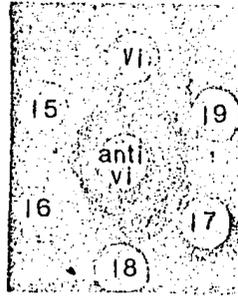


Fig. 6. Inmunodifusión de fracciones de DEAE de VN de S. typhi y antígeno Vi contra suero Anti-Vi.

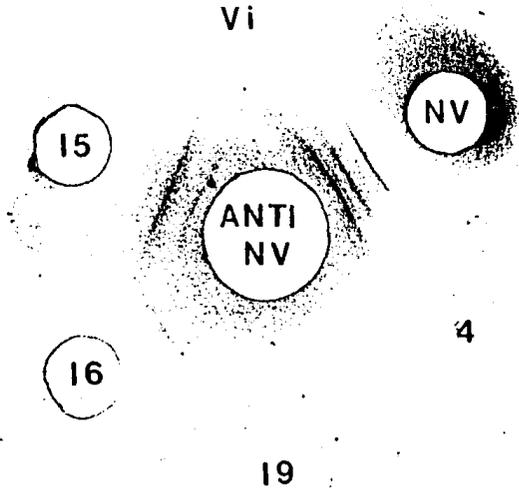


Fig. 7. Inmunodifusión de la VN de S. typhi y algunas de sus fracciones DEAE y antígeno Vi contra suero anti VN.

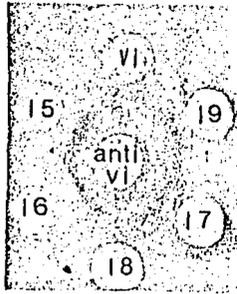


Fig. 6. Inmunodifusión de fracciones de DEAE de VN de *S. typhi* y antígeno Vi contra suero Anti-Vi.

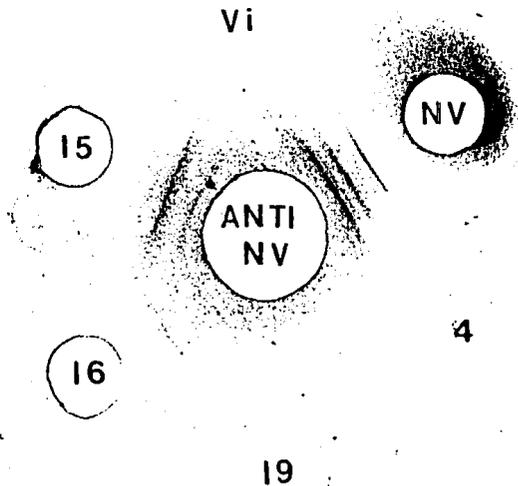


Fig. 7. Inmunodifusión de la VN de *S. typhi* y algunas de sus fracciones DEAE y antígeno Vi contra suero anti VN.

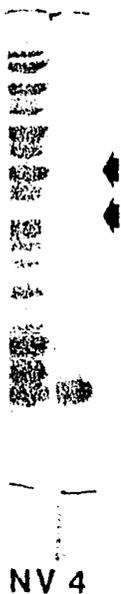


Fig. 8

4b

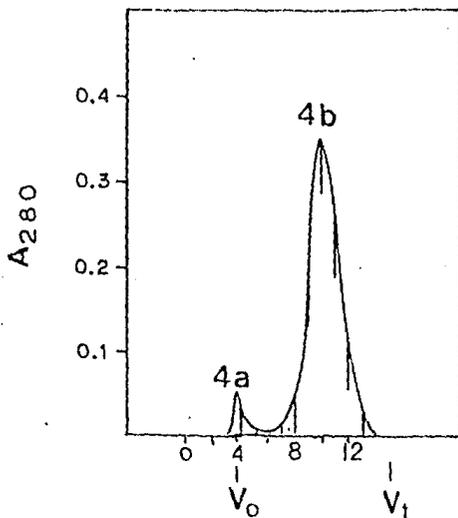


Fig. 9

Fig. 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de la VN de *S. typhi* y su fracción DEAE 4.

Fig. 9. Cromatografía de la fracción 4 en Sephadex G-50.

4b) Electroforesis de la fracción 4b



Fig. 8

4b

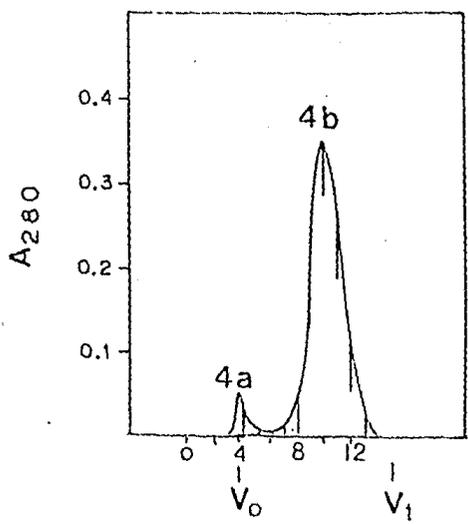


Fig. 9

Fig. 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de la VN de *S. typhi* y su fracción DEAE 4.

Fig. 9. Cromatografía de la fracción 4 en Sephadex G-50.
4b) Electroforesis de la fracción 4b

CUADRO 8

Sobrevida de ratones inmunizados con 15 ug (dos dosis) de la VN, de su fracción 4 de DEAE-celulosa y de las subfracciones de Sephadex G-50 y desafiados con $10 \times DL_{50}$ de Salmonella typhi Ty2

Fracción Inmunizante	<u>Sobrevivientes</u> total	Sobrevida I
NV	10/10	100†
4	5/10	50
4a	5/10	50
4b	8/10	80††
Control	1/10	10

† p < 0.001

††p < 0.01

En virtud de que la fracción 19 contenía antígeno Vi, fue necesario dilucidar el papel inmunogénico de su proteína, de tal manera que parte del material de esta fracción 19 fue procesado con fenol para desnaturalizar la proteína (método de Westphal, Kwapinski 1971); y dializado contra amortiguador de fosfatos pH 7.2, posteriormente se aplicaron en ratones, dosis de 10 y 40 ug equivalentes a proteína para conocer la inmunogenicidad del material remanente (antígeno Vi) e indirectamente el papel inmunogénico de la proteína. Los resultados de la prueba de inmunidad se resumen en el cuadro 9. Los ratones inmunizados con 10 ug de la fracción 19 sobrevivieron en un 80% (control positivo).

En cambio los ratones inmunizados con material de la fracción 19 tratada con fenol con 10 y 40 ug equivalentes de proteína, sobrevivieron en un 37 y 66% respectivamente. Lo que puede ser interpretado como que la sobrevivencia de los ratones inmunizados con la fracción 19 íntegra tiene que deberse en mayor parte a la proteína y no al antígeno Vi cuya concentración en las dosis usadas en las pruebas de inmunidad debe ser muy baja.

CUADRO 9

Sobrevida de ratones inmunizados con VN de *S. typhi*, la fracción de DEAE-cellulosa 19, y con material de la fracción tratada con fenol al 88% y desafiados con 3D₅₀ del microorganismo virulento.

Fracción Inmunizante	Dosis en ug	Sobrevida %
VN	10	100%
19	10	80%
19####	10	37
19####	40	66###
Control	-	10

§p<0.001

##p<0.01

###p<0.02

####p fracción 19 tratadas con fenol.

Las fracciones 4 y 19 fueron estudiadas por microscopía electrónica, con el objeto de verificar si no tenían antígenos flagelares "H" en estas fracciones. Los resultados no mostraron evidencias de la presencia de flagelos o restos flagelares en estas fracciones (fig. 10).

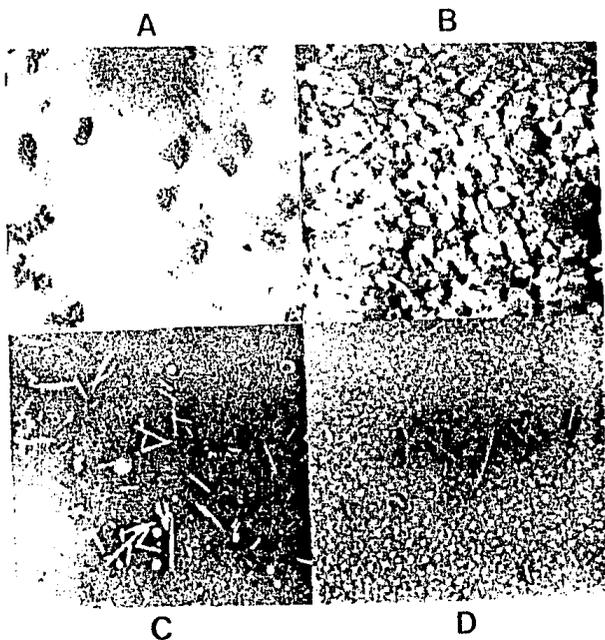


Fig. 10. A) Fracción 4; B) Fracción 19; C) Antígenos H y D) Antígenos H tratados con desoxicolato X 25,000

Finalmente, se estudiaron por espectrofotometría las fracciones 4 y 19 en un rango de longitud de onda de 215 a 300 nm. Ambas fracciones tenían un máximo de absorbanza de 260 nm (fig. 11).

La vacuna nueva de *S. typhimurium* fue estudiada también en sus diferentes componentes cromatográficos con el fin de obtener información sobre el papel de las proteínas en la inducción de inmunidad.

Se separaron por cromatografía en columna de DEAE-cellulosa, 300 mg de vacuna nueva de S. typhimurium.

El perfil de elución se muestra en la fig. 12. La separación por intercambio iónico produjo al menos 10 fracciones, las cuales se probaron en ratones para conocer su inmunogenicidad. Solamente las fracciones 3,4 y 5 indujeron inmunidad. En la figura 12 puede verse que estas fracciones se eluyeron muy cerca y conformaron la fracción más grande del fraccionamiento. Por electroforesis se evidenció que la fracción 3 contenía al menos 16 bandas de proteína, la fracción 4 contenía 15 y la fracción 5 contenía 9 bandas. La mayor parte de estas bandas estaba compartida en las 3 fracciones (fig. 13).

Los estudios de endotoxina revelaron que solamente la fracción 3 contenía endotoxina en concentraciones muy bajas pues mientras con 20 ug de esta fracción mezclada con 5 mg de acetato de plomo sobrevivió el 75% de las ratas inoculadas con la VN (20 ug + 5 mg de PbAc) sobrevivió el 25%.

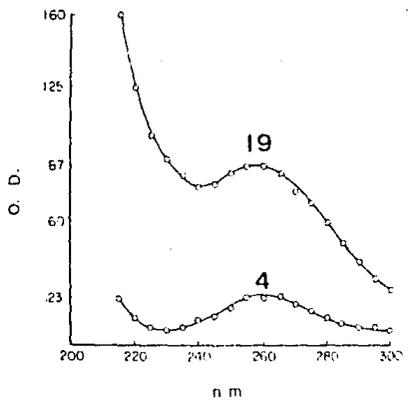


Fig. 11. Espectro de absorbancia de las fracciones 4 y 19 de DEAE de S. typhi Ty2.

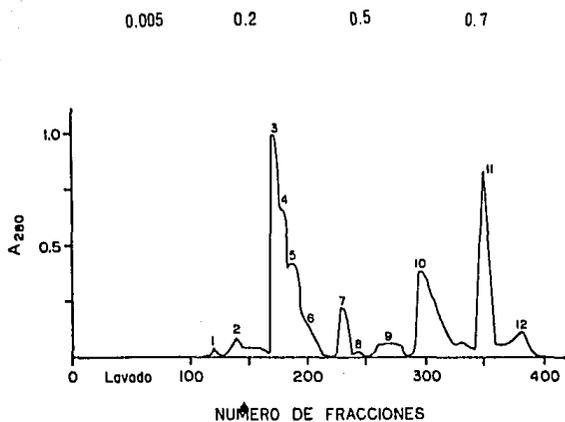


Fig. 12. Cromatograma de VN de S. typhimurium a través de DEAE-cellulosa. Se eluyó con NaCl aumentando la concentración por pasos.

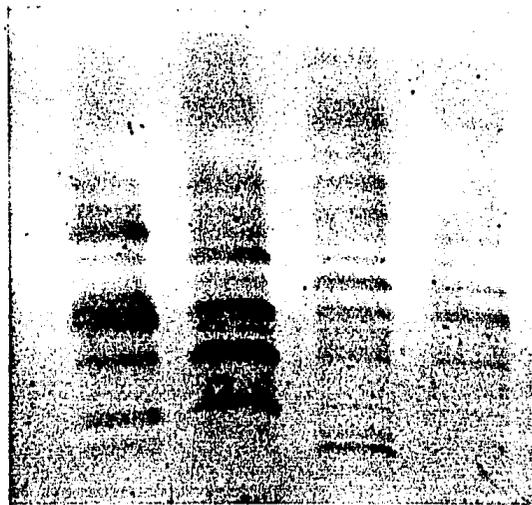


Fig. 13. Electroforesis de VN de S typhimurium y de alguna de sus fracciones de DEAE.

DISCUSION

Las proteínas de S. typhi involucradas en la inmunidad contra fiebre tifoidea son poco conocidas. La dificultad más importante para la obtención de este conocimiento ha sido la falta de un modelo experimental apropiado. Para estimar la efectividad de las proteínas de S. typhi como inmunógenos contra la infección del microorganismo virulento, en el modelo experimental usado aquí, fue necesario emplear condiciones "artificiales" con el objeto de producir mortalidad en los ratones probados. Con esas condiciones, las pruebas de inmunidad fueron estimadas en base a las proporciones de sobrevivencia de los ratones.

Los resultados muestran que se ha podido obtener un complejo inmunogénico a partir de Salmonella typhi o de Salmonella typhimurium, el cual ha inducido en el ratón un alto grado de inmunidad contra la infección del microorganismo respectivo. Los análisis realizados a dichos complejos revelaron que su composición es fundamentalmente de proteínas, 24 para el de S. typhi y 25 para el de S. typhimurium.

El material se caracterizó por ser soluble, de carecer de sustancias y estructuras bacterianas que no son inmunogénicas, como la pared celular, ADN y lípidos (membranas); de tener una toxicidad muy baja o nula a

concentraciones inmunizantes, de no inducir efectos indeseables en humanos, como los producidos por la vacuna estándar (VN de S. typhi Ty2). De inducir en voluntarios una respuesta humoral muy alta comparada con la escasa respuesta inducida con la vacuna estándar; y un atributo más que puede ser considerado importante, es el alto rendimiento de este material inmunizante por litro de cultivo (210 mg peso seco/litro).

El fraccionamiento de VN de S. typhi permitió aislar al menos dos proteínas muy inmunogénicas una de las cuales pareció estar formando un complejo con ARN, lo que sería, molecularmente una ribonucleoproteína de 8,800 daltones y la otra que se copurificó con antígeno Vi. Ambas proteínas parecían estar exentas de cualquier otro material inmunogénico como antígeno "O" y antígeno flagelar "H". Estos resultados dan una evidencia clara de la participación de algunas proteínas en la inducción de inmunidad contra S. typhi. Lo que concuerda y podría apoyarse con los resultados obtenidos con proteínas parcialmente purificadas de S. typhimurium que indujeron un alto grado de inmunidad contra el desafío infeccioso de S. typhimurium (Velazco y Molinari datos no publicados).

Las fracciones 4 y 19 del fraccionamiento con DEAE de la VN de S. typhi parecen ser proteínas diferentes en base a su conducta durante el fraccionamiento, así como por

electroforesis. Será necesario realizar más estudios para caracterizar mejor a la proteína de la fracción 19 ya que el estudio espectrofotométrico sugiere que pudiera ser también una ribonucleoproteína.

En otras fracciones inmunogénicas se pudo evidenciar también el antígeno Vi, estas fracciones que indujeron un alto grado de inmunidad ($P < 0.01$ a 0.001), estaban constituidas por varias proteínas (de 5 a 15, ver cuadro 6); por lo tanto, cabe la posibilidad de que estas proteínas estén involucradas en la inmunidad, en este sentido, se planea hacer un estudio ulterior que determine este postulado y dilucidar el papel del antígeno Vi en la protección, ya que ha sido reportado que el antígeno Vi no siempre induce inmunidad (Diena et al 1977 y Hornich et al. 1979). Misfeldt y Johnson (1977 y 1978) confirmaron que las proteínas aisladas de preparaciones ribosomales y de la superficie celular fueron protectoras contra una infección de S. typhimurium (microorganismo homólogo). Todo lo cual apoya el énfasis de Barber y Eylan (1974, 1975 y 1976) de que proteínas aisladas de S. typhimurium y S. enteritidis fueron capaces de proteger a ratones contra la infección del microorganismo virulento. Kuusi et al. (1981) aislaron de la membrana externa de S. typhimurium, proteínas denominadas porinas que son buenos inmunógenos contra S. typhimurium.

Velazco y Molinari aislaron recientemente (datos no publicados) proteínas de diversos pesos moleculares diferentes a los reportados para las porinas mostradas por Kuusi et al. (1981), que indujeron un alto nivel de inmunidad contra el resto del microorganismo virulento. Más recientemente, Killion y Morrison (1986) indujeron protección contra S. typhimurium con un LPS-Lípido A-asociado a complejos protéicos.

Los resultados presentados en este trabajo abren la posibilidad de estudiar la relación huésped-parásito en cuanto a las proteínas de S. typhi y las respuestas inmunes que dé el huésped a la estimulación de dichas proteínas.

Una propuesta para continuar este trabajo sería el uso de proteínas de S. typhi purificadas como inmunógenos en voluntarios humanos para estudiar la conducta de linfocitos y monocitos circulantes de estos individuos in vitro en presencia de S. typhi. Patterson y Youmans (1970) han mostrado que se puede analizar la inmunidad celular contra tuberculosis en cultivo de células.

La vacuna nueva de S. typhi tiene un potencial inmunogénico alto, ya que con 1 ug de proteína se indujeron altos títulos elevados de anticuerpos, sin embargo no se ha podido asegurar el papel protector de esos anticuerpos. El modelo murino mostró que

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

concentraciones bajas de la nueva vacuna de S. typhimurium indujeron un alto nivel de inmunidad pues con 0.5 ug de proteína se protegieron al 90% de los ratones inmunizados.

Esta alta inmunogenicidad aunada a su baja toxicidad hacen de este material, un producto biológico excelente para ser probado en poblaciones humanas donde la fiebre tifoidea es aún endémica y representa un serio problema de Salud Pública.

Se obtuvieron complejos inmunogénicos a partir de Salmonella typhi Ty2 y Salmonella typhimurium. Este material indujo en ratón un alto nivel de protección contra el desafío del microorganismo virulento homólogo.

Estos complejos contenían al menos 25 proteínas diferentes las cuales constituían el 80% del total de cada complejo. En virtud de la metodología diseñada, este material inmunogénico carecía de paredes celulares, ADN y de lípidos. El material obtenido de Salmonella typhi comparado con la vacuna estándar (vacuna de S typhi elaborada con microorganismos muertos por calor y fenol) tuvo una capacidad inmunogénica mas alta; no indujo efectos indeseables en voluntarios humanos, como un proceso inflamatorio intenso y doloroso producido por la vacuna estándar. Es inócua, pues desde el punto de vista de toxicidad en el ratón tuvo un margen de seguridad muy alto para su uso en humanos. Finalmente, indujo en los voluntarios un título muy alto de anticuerpos fijadores de complemento ($P < 0.001$) en comparación con el título inducido por la vacuna estándar.

El fraccionamiento de estos complejos inmunogénicas evidenció que existen al menos 2 ribonucleoproteínas, en el de S. typhi y algunas proteínas en el de S. typhimurium involucradas en la inmunidad respectiva.

Abstract

Immunogenic complexes from Salmonella typhi and Salmonella typhimurium were obtained. These material induced on mice a high degree of protection against the challenge of the homologous microorganism.

These complexes contained at least 25 different proteins which formed the 80% of each immunogenic complex. These immunogenic material did not has cellular wall, DNA or lipids. The immunogenic complex obtained from S. typhi was compared with the standard vaccine (vaccine of S. typhi made with heat-phenol inactivated microorganisms). It had a higher immunogenic ability and it did not induce undesirable effects like the intense and painful inflammatory process produce by the standard vaccine. The new vaccine was innocuous, because its toxicity in mice was very low even to very high doses.

Finally, it induced in human voluntarees a higher production of antibodies which were estimated by the complement fixation test ($p < 0.001$) than the induced by the standard vaccine. The fractionation of these immunogenic complexes on DEAE-cellulose and Sephadex-G50 and 200 gave evidence that there are at least two ribonucleoprotein from S. typhi and several proteins from S. typhimurium involved in the protection against the homologous infection.

Referencias

- Army Medical Department Research and Graduate School, Laboratory of Biological Products. Preparation and testing of mucine suspensions; for enhancement of the virulence of Salmonella typhosa. Michigan Department of Health, 1960.
- Ashwell, G., Colorimetric analysis of sugars, in "Methods in enzymology" (S.P. Colowick & N.D. Kaplan), 3, (pp. 73-105), Academic Press, New York, 1957.
- Barber, C. & Eylan, E., The proteins from S enteritidis: their protective role in mice and the antibodies induced during infection with the homologous strain. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 1974, 226 A, 331-335.
- Barber, C. & Eylan, E., Confirmation of the protective role of proteins from S. typhimurium in infection of mice with their natural pathogen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 1975, 230 A, 461-465.
- Barber, C. & Eylan, E., The unfortunate role of precedent in bacteriology. - I. The main antigens of salmonellae: the proteins. Zbl. Bakt., I. Abt. orig. 1976, 234 A, 53-59.
- Clausen, V., Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. in "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology" (T.S. Work & E. Work), (pp. 447-463), North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1971.
- Dawes, J.C., Negative Staining, in: "Biological Techniques in Electron Microscopy" (p. 145-148). Barnes & Noble, New York, 1971.
- Declaration of Helsinki. Recommendations guiding doctors in clinical research. World med. J., 1964, 11, 281.
- Diena, B.B., Ryan, A., Wallace, R., Johnson, E.M., Baron, L.S. & Ashton, F.E., Effectiveness of parenteral and oral typhoid vaccination in mice challenged with a Salmonella typhi Salmonella typhi-murium hybrid.. Infect. Immun., 1977, 15, 997-998.
- Eisenstein, T.K., Evidence for O antigens as the antigenic determinants in: "Ribosomal vaccines prepared from Salmonella". Infect. Immun., 1975, 12, 364-377.

- Fessenden, J.M., Darenberg, M.A. & Racker, A., Mitochondrial acetone powder, in: "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick & N.O. Kaplan). 10 (p. 528-529). Academic Press, New York, 1967.
- Fulton, F., & Dumbell, K.R., The serological comparison of strains of influenza virus. J. gen. Microbiol., 1949, 3, 97.
- Germanier, R., Typhoid Fever, in: "Bacterial Vaccines (R. Germanier ed). pp 137-165, Academic Press, New York, 1984.
- Gilman, R.H., Hornick, R.B., Woodward, W.E., Dupont, H.L., Snyder, M.J., Levine, M. M. and Libonati, J.P. Evaluation of a UDP-Glucose-4-Epimeraseless Mutant of Salmonella typhi as a Live Oral Vaccine J. Infect Dis. 1977 136; 717-723.
- Goldstein, A., Aronow, L. & Kalman, S.M., The evaluation of drug toxicity in lower animals and in man, in: "Principles of drug action. The basis of pharmacology". (p. 350-351), Harper & Row, Publ., New York, 1969.
- Hornick, R.B., Greisman, S.E., Woodward, T.E., Dupont, H.L., Dawkins, A.T. & Snyder, M.J. Typhoid Fever: Pathogenesis and Immunological control. N. Engl. J. Med. 1970 283; 686-691.
- Hoops, P., Prather, N.E., Berry, L. J. & Ravel, J.M., Evidence for an extrinsic immunogen in effective ribosomal vaccines from Salmonella typhi-murium. Infect. Immun., 1976, 13, 1184-1192.
- Houchens, D.P. & Wright, G.L., Immunity to Salmonella typhi-murium infection: characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis. Infect. Immun., 1973, 7, 507-511.
- Johnson, W., Ribosomal vaccines. II. Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic acid and protein isolated from Salmonella typhi-murium. Infect. Immun., 1973, 8, 395-399.
- Killion, J.W. and Morrison, D.C. Protection of C3H/He J Mice from Lethal Salmonella typhimurium LT2 Infection by immunization with Lipopolyssaccharide-Lipid A-Associated Protein Complexes. Infect. Immun. 1986 54; 1-8.

- Fessenden, J.M., Darenberg, M.A. & Racker, A., Mitochondrial acetone powder, in: "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick & N.O. Kaplan). 10 (p. 528-529). Academic Press, New York, 1967.
- Fulton, F., & Dumbell, K.R., The serological comparison of strains of influenza virus. J. gen. Microbiol., 1949, 3, 97.
- Germanier, R., Typhoid Fever, in: "Bacterial Vaccines (R. Germanier ed). pp 137-165, Academic Press, New York, 1984.
- Gilman, R.H., Hornick, R.B., Woodward, W.E., Dupont, H.L., Snyder, M.J., Levine, M. M. and Libonati, J.P. Evaluation of a UDP-Glucose-4-Epimeraseless Mutant of Salmonella typhi as a Live Oral Vaccine J. Infect Dis. 1977 136; 717-723.
- Goldstein, A., Aronow, L. & Kalman, S.M., The evaluation of drug toxicity in lower animals and in man, in: "Principles of drug action. The basis of pharmacology". (p. 350-351), Harper & Row, Publ., New York, 1969.
- Hornick, R.B., Greisman, S.E., Woodward, T.E., Dupont, H.L., Dawkins, A.T. & Snyder, M.J. Typhoid Fever: Pathogenesis and Immunological control. N. Engl. J. Med. 1970 283; 686-691.
- Hoops, P., Prather, N.E., Berry, L. J. & Ravel, J.M., Evidence for an extrinsic immunogen in effective ribosomal vaccines from Salmonella typhi-murium. Infect. Immun., 1976, 13, 1184-1192.
- Houchens, D.P. & Wright, G.L., Immunity to Salmonella typhi-murium infection: characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis. Infect. Immun., 1973, 7, 507-511.
- Johnson, W., Ribosomal vaccines. II. Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic acid and protein isolated from Salmonella typhi-murium. Infect. Immun., 1973, 8, 395-399.
- Killion, J.W. and Morrison, D.C. Protection of C3H/He J Mice from Lethal Salmonella typhimurium LT2 Infection by Immunization with Lipopolyssaccharide-Lipid A-Associated Protein Complexes. Infect. Immun. 1986 54; 1-8.

- Kuusi, N., Nurminen, M., Saxén, H., and MaKeLa, P.H. Immunization with Major Outer Membrane Protein (Porin) Preparations in Experimental Murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide *Infect. Immun.* 1981. 34; 328-332.
- Kwapinski, V.B., Preparation of flagellar antigens, preparation of Vi antigen and lipopolysaccharide preparation, in "Methodology of immunochemical and immunological research" (pp. 38-39; 46; 80-81), John Wiley & Sons, New York, 1972.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol serial reagent. *J. biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
- Margolis, J.M. & Bigley, N.J., Cytophilic macroglobulin reactive with bacterial protein in mice immunized with ribonucleic acid-protein fraction of virulent Salmonella typhi-murium. *Infect. Immun.* 1972, 6, 390-397.
- Misfeldt, M.L. & Johnson, W., Protective ability of Salmonella ribosomal protein and RNA in inbred mice. *Infect. Immun.*, 1978, 21, 286-291.
- Misfeldt, M.L. & Johnson, W., Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fractions from Salmonella typhi-murium. *Infect. Immun.*, 1978, 24, 808-816.
- Molinari, J.L. Estudio Bacteriológico sobre Meningo-encefalitis Bacteriana aguda. *Rev. Fac. de Med. (México)*, 1970 Vol. XIII, 371-373.
- Molinari, J.L. y Larralde, C. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with fractions of Salmonella typhimurium. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 1974 16, 189-197.
- Molinari, J.L. y Cabrera, R. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de Salmonella typhi Ty2. *Rev. Lat-amer Microbiol.* 1974. 16, 199-204.
- Molinari, J.L., Flisser, A. y Cabrera, R. Inmunidad inducida con fracción ribosomal obtenida de S. typhi. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 1975. 17, 149-156.

- Molinari, J.L., Gavilanes, M. y Tato, P. Vacuna ribosomal obtenida de Salmonella typhimurium probada contra el desafío del microorganismo virulento administrado por vía bucal. Rev. Arch. de Inv. Med. 1976. 127-136, Vol. 7, No. 3.
- Molinari, J.L., Yépez, L., Tato, P., and Méndez, L. Ribonucleic Acid-Protein purified from Salmonella typhi involved in experimental immunity. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. 1981, 132 D, 25-41.
- Morgan, H.R. The Enteric Bacteria in: Mycotic Infections of Man. (Dubos, R. and Hersch. J.G. eds.). pp. 610-648. J.B. Lippincott Company. Philadelphia, Montreal, 1965.
- Patterson, R.J. & Youmans, G.P., Demonstration in tissue culture of lymphocyte-mediated immunity to tuberculosis. Infect. Immun., 1970, 1, 600-603.
- Patterson, R.J. & Youmans, G. P., Multiplication of Mycobacterium tuberculosis within normal and immune mouse macrophages cultivated with and without streptomycin. Infect. Immun. 1970, 1, 30-40.
- Reed, L.J. & Muench, H., A simple method of estimating fifty percent end points. Amer. J. Hyg., 1938, 27, 493-497.
- Selye, H., Tuchweber, B. & Bertok, L., Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins. J. Bact., 1966, 91, 884-890.
- Smith, R.A. & Bigley, N.J. Ribonucleic acid-protein fractions of virulent Salmonella typhi-murium as protective immunogens. Infect. Immun., 1972, 6, 377-383.
- Spiegel, M. R., Teoria y problemas de estadísticas 1970. (p.203), MacGraw Hill, México,
- Syverton, J.T., Ching, R.E., Cheever, F.S., and Smith, A.B. Typhoid and paratyphoid A in immunized military personnel. JAMA, 1946, 131; 507-514
- Tato, P., Flisser, A., Gavilanes, M. & Molinari, J.L. Immunogenic complexes obtained from Salmonella typhi-murium and Salmonella typhi Ty2 by the bacterial acetone powder method. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1979, 130 A, 47-60.

- Velazco, G.* y Molinari, J.L. Proteínas de Salmonella typhimurium involucradas en inmunidad contra fiebre tifoidea murina (En preparación) (*Tesis de Maestría en Microbiología Médica).
- Venneman, M.R., Bigley, N.J.. & Berry, L.J., Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from Salmonella typhi-murium. Infect. Immun. 1970, 1, 574-582.
- Wahdan, M.H., Sérié, C., Cerisier, Y., Sallam, S., and Germanier, R. A Controlled Field Trial of Live Salmonella typhi Strain Ty21c oral Vaccine Against Typhoid: Three-Year Results. J. Infect. Dis. 1982, 145; 292-295.
- Walter Reed Army Institute of Research Preparation of dried acetone-inactivated and heath-phenol inactivated typhoid vaccine. Bul. W.H.O. 1964, 30: 625-646
- Weber, K., & Osborn, M., The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis J. Biol. Chem. 1967, 16; 4406-4412.
- Welbs, J.M. and Lury, Y.B. Development in the chemical determinations of nucleic acids Met. biochem. Anal. 1960. 6; 1-30
- Yugoslav typhoid comission. A controled field trial of the effectiveness of acetone-dried and inactivated and heath-phenol inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. Bull. Org. mond. Santé. 1964, 30; 623-630.