

66
29.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"Elaboración de un Inmuno Adsorbente para la Purificación de Porinas de Salmonella Typhi"



TESIS MANCOMUNADA EXAMENES PROFESIONALES¹
FAC. DE QUIMICA

Que para obtener el Título de:

Química Farmaceutico Biologo]

P R E S E N T A N

**Sara Leticia Pavón González
Rosana Pelayo Camacho**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



1988



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.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	4
GENERALIDADES	5
PARTE EXPERIMENTAL	
EQUIPO	22
MATERIALES BIOLOGICOS Y SOLUCIONES	23
METODOS	
A) Obtención de PME y porinas	27
a.1) Cultivo bacteriano	27
a.2) Aislamiento de las PME	27
a.3) Purificación de porinas por electroelución	28
a.4) Obtención de suero de conejo anti-porinas	29
a.5) Purificación de IgG de conejo	32
a.6) Elaboración de un inmunoadsorbente para la purificación de porinas	33
B) Métodos de análisis	34
b.1) Cuantificación de proteína	34
b.2) Determinación de LPS	34
b.3) Electroforesis en geles de poliacrilamida	34
b.4) Tinción de plata para proteínas	35
b.5) Tinción de plata para LPS	36
b.6) Inmunolectrotransferencia	37
b.7) Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	39

b.8) Curva de precipitación cuantitativa	39
RESULTADOS	41
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	67
APENDICE	68
BIBLIOGRAFIA	77

INDICE DE FIGURAS

	Pags.
1). Envoltura celular de las bacterias Gram negativas.	6
2). Organización molecular de las proteínas mayores en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.	17
3). Cámara de electroelución.	30
4). Tanque de electroelución.	31
5). Sistema de electrotransferencia.	38
6). Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS. Tinción de proteínas con nitrato de plata.	42
7). Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS. Tinción de Coomassie.	43
8). Electroforesis preparativa de PNE de <u>S. typhi</u> 9.12 d Vi.	44
9). SDS-PAGE de porinas electroeluidas. Tinción de Coomassie.	46
10). SDS-PAGE de porinas electroeluidas. Tinción de Coomassie.	47
11). Determinación de Anticuerpos anti-porinas por el método de ELISA.	49
12). Determinación de Anticuerpos anti-LPS por el método de ELISA.	50
13). Curva de precipitación cuantitativa para LPS	51
14). Electrotransferencia a papel de nitrocelulosa	53

sa de las PME de S. typhi 9,12 d Vi, revela
das con suero de conejo anti-porinas elec -
troeluidas.

- 15). Inmunoelectrotransferencia a papel de nitro 54
celulosa de porinas electroeluidas.
- 16). Perfil de levigación de IgG de conejo anti- 56
porinas purificadas por columna de proteína
A-Sepharosa.
- 17). Perfil de levigación de porinas purificadas 58
a través de un inmunoabsorbente policlonal
específico.
- 18). SDS-PAGE de porinas purificadas a través de 59
inmunoabsorbente. Tinción de Coomassie.
- 19). SDS-PAGE de PME de S. typhi. Tinción de LPS 60
con nitrato de plata.
- 20). SDS-PAGE de porinas electroeluidas y pori - 61
nas purificadas a través de inmuoabsorbente
por tinción de LPS con nitrato de plata.

TERMINOLOGIA

- APS: Persulfato de amonio.
- anti-PME: Suero anti-proteínas de membrana externa.
- ACF: Adyuvante completo de Freund.
- DNasa: Desoxirribonucleasa.
- EDTA: Acido etiléndiaminotetraacético.
- ELISA: Inmuno ensayo enzimático.
- Hepes: Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico.
- Kd: Kilodaltones.
- KDO: 2-ceto-3-desoxioctanato.
- LD50: Dosis letal al 50%.
- LPS: Lipopolisacárido.
- PBS: Solución amortiguadora de fosfatos-salina.
- PME: Proteínas de membrana externa.
- RNasa: Ribonucleasa.
- SDS: Dodecil sulfato de sodio.
- SNC: Suero normal de conejo.
- TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamino.
- Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano.

RESUMEN

A partir de electroforesis preparativas, se aislaron porinas de Salmonella typhi 9,12 d Vi con un bajo contenido de LPS, las cuales se emplearon para la producción de IgG de conejo específicas. La inmunoglobulina se acopló por la reacción de bromuro de cianógeno a un soporte de sepharosa; con este inmunoadsorbente se purificaron porinas completamente libres de lipopolisacárido.

INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril aguda, causada por la ingestión e invasión intestinal de Salmonella typhi. Esta enfermedad se presenta en todo el mundo, constituyendo un problema endémico en muchos países del Lejano Oriente, Oriente Medio y Latinoamérica, incluyendo México, demostrando que es un reflejo de los niveles de sanidad y de abastecimiento de agua.

Para el control de la fiebre tifoidea se incluye, entre otras posibilidades, la vacunación. Actualmente, existen en México sólo dos vacunas reconocidas oficialmente para prevenir la enfermedad, y éstas son la vacuna tífica preparada por extracción con acetona, y la producida con bacterias completas inactivadas por calor. Ambas tienen varios inconvenientes como son: el inducir inmunidad de corta duración, por lo que es necesario reinmunizar cada dos o tres años, la vacunación requiere la aplicación de dos inyecciones subcutáneas o intramusculares y produce efectos adversos (fiebre, malestar general y postración) debidos a la presencia de endotoxina (lipopolisacárido); no se recomienda su aplicación en niños pequeños, ni es para uso general.

Los estudios encaminados a la búsqueda de una mejor vacuna contra la fiebre tifoidea de los últimos cuarenta años se basaron principalmente en el uso de la molécula lipopolisacáridica, sin embargo, los resultados obtenidos no

fueron satisfactorios.

Recientemente, las proteínas de membrana externa de las bacterias Gram-negativas han adquirido importancia desde el punto de vista inmunológico, ya que se considera en base a su localización, que son elementos clave, tanto en la patogenicidad como en la protección contra enfermedades producidas por estas bacterias.

Al respecto, estudios de la inmunogenicidad de las PME de S. typhi han demostrado que tanto el complejo PME-LPS de S. typhi 9,12 d Vi, como el suero de conejo anti-PME-LPS inducen una protección del 100% en el modelo murino, al efectuarse en éste el desafío con la bacteria correspondiente. Así mismo, se demostró que la inmunidad pasiva estaba dada aparentemente por los anticuerpos dirigidos hacia las porinas. Sin embargo, con estos resultados no se puede descartar que el LPS contaminante de las proteínas juegue un papel preponderante en la protección, por lo que el interés de este trabajo está dirigido a la obtención de las porinas de S. typhi 9,12 d Vi libres de contaminación por LPS, y así estudiar en un futuro su capacidad protectora, para su posible uso en la inmunoprofilaxis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Purificar porinas de Salmonella typhi 9,12 d Vi.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Aislar y caracterizar proteínas de membrana externa de Salmonella typhi 9,12 d Vi.
- b) Aislar porinas de Salmonella typhi 9,12 d Vi.
- c) Obtener suero de conejo anti-porinas.
- d) Purificar IgG de conejo anti-porinas de S. typhi.
- e) Elaborar un inmunoadsorbente específico que permita la obtención de porinas de S. typhi libres de LPS.

GENERALIDADES

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por Salmonella typhi; ésta es una bacteria Gram-negativa, móvil, resistente a bajas temperaturas y puede permanecer viable durante tiempos prolongados en el agua de pozos o depósitos. La bacteria es un parásito exclusivo del hombre y pertenece a la tribu III Salmonelleae de la familia Enterobacteriaceae (5). De acuerdo a la clasificación de Kauffman-White es del grupo D y comparte con 96 especies del grupo Salmonella, los antígenos somáticos 9 ó 12.

S. typhi tiene una envoltura celular constituida por la membrana citoplasmática, la peptidoglicana y la membrana externa (20)(figura 1). La membrana citoplasmática está compuesta de fosfolípidos (predominantemente fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina) y una gran variedad de proteínas. Los flagelos, que constiuyen el antígeno "d", parten de esta membrana. La peptidoglicana confiere rigidez y está formada por cadenas paralelas de polisacáridos que contienen ácido murámico y N-acetilglucosamina (5). La membrana externa está constituida por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacárido (endotoxina), el cual ocupa aproximadamente el 45% de su superficie y representa el antígeno somático "O" (6). Esta membrana actúa como una barrera, impidiendo la entrada de sustancias tóxicas tales como antibióticos y detergentes; contiene los receptores para bacteriófagos

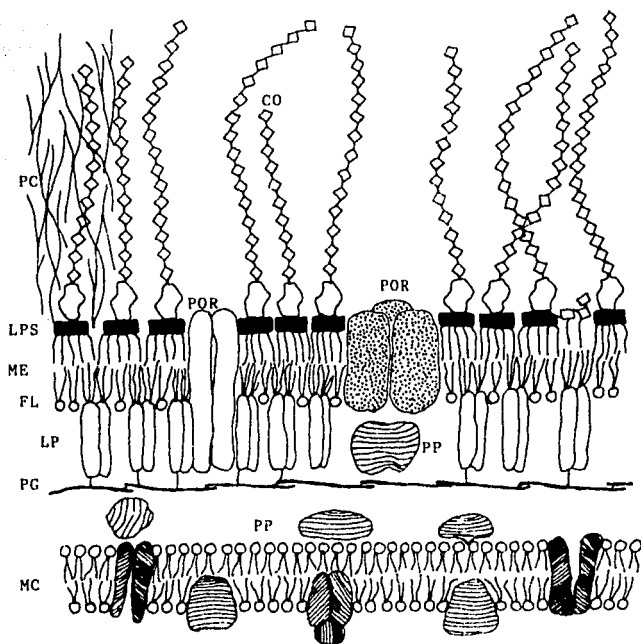


Fig.1. ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

ME:Membrana externa; LPS:Lipopolisacárido; FL:Fosfolípidos; POR:Porinas; PG:Peptidoglicano; LP:Lipoproteína; PP:Proteínas periplásmicas; MC:Membrana citoplasmática; PC:Polisacárido capsular; CO:Cadenas "O".

y colicinas y se relaciona con los procesos de conjugación, división celular y transporte de sustancias al interior de la célula (38,39,43). Asociados a la membrana externa se encuentran los pili y el antígeno "Vi" (20).

S. typhi es infectante en función de su virulencia, de la cantidad del inóculo administrado y de las condiciones específicas del huésped (22).

Las primeras descripciones de la infección tifóidica se le atribuyen a Thomas Willis en 1659, quien describió los diferentes signos y síntomas de la enfermedad, así como la duración y severidad de la misma. En 1856 William Budd estableció que la enfermedad tenía origen hídrico, por contaminación del agua con heces procedentes de individuos enfermos o portadores (22). Los llamados portadores sanos constituyen un factor importante de contagio, especialmente si son manejadores de alimentos.

La bacteria penetra en la mucosa intestinal, invade torrente sanguíneo, produciendo la infección generalizada con manifestaciones de fiebre, ataque al estado general, lesiones ulcerativas del intestino y balance nitrogenado negativo que afectan seriamente al estado nutricional. La infección muestra tendencia a recidivas con complicaciones tales como perforación intestinal.

La fiebre tifoidea es frecuente en los países subdesarrollados, incluyendo México, y en ellos tiene características endémico-epidémicas. Esto se encuentra relacionado directamen-

te con deficiencias en el saneamiento ambiental y el aprovisionamiento de agua potable.

Para el control de la fiebre tifoidea, se incluyen, entre otras posibilidades, la vacunación. La primera inmunización en humanos se realizó hace 90 años, cuando Wright en Inglaterra, y Pfeiffer y Kolle en Alemania, emplearon vacunas producidas con bacterias inactivadas por calor. Estas vacunas se utilizaron en India, Egipto, Italia y Sudáfrica, lugares donde se obtuvieron disminuciones significativas de la morbilidad y mortalidad, así como una atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que sufrieron la enfermedad (44).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas elaboradas con bacterias vivas atenuadas, administradas por vía oral. El efecto de las mismas se estudió en el ejército francés en donde, desafortunadamente, hubo muertes entre los individuos vacunados, por lo que fueron sustituidas por vacunas elaboradas con bacterias muertas (22).

Hasta 1955 no se tuvo un ensayo controlado que proporcionara información confiable acerca del valor profiláctico de las vacunas. A partir de esa fecha los estudios realizados bajo el auspicio de la Organización Mundial de la Salud en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética, han demostrado la eficacia profiláctica de la vacuna tífica preparada por extracción con acetona, la cual preserva el antígeno "Vi" (vacuna K). Esta vacuna, al igual que la producida con bacterias completas muertas por calor (vacuna L), tiene varios

inconvenientes como son: el inducir inmunidad de corta duración, por lo que es necesario reinmunizar cada dos o tres años; la vacunación requiere la aplicación de dos inyecciones subcutáneas o intramusculares y produce efectos adversos (fiebre, malestar general y postración) debidos a la presencia de endotoxina. No se recomienda su aplicación en niños pequeños, ni es para uso general (10).

Se ha estudiado el efecto protector de dos vacunas orales en humanos, elaboradas a partir de bacterias muertas; una de ellas proveniente de una cepa dependiente de estreptomycin (10) y la otra de una mutante deficiente en UDP-4-galactosa-epimerasa, que recibió el nombre de Salmonella typhi 21a (12) por el grupo de Germanier. Los resultados obtenidos con la primera no fueron satisfactorios (27). La vacuna de Germanier probó ser muy efectiva en un estudio de campo realizado en Egipto, con una protección variable entre 54-90% (10,56); sin embargo, en estudios posteriores hechos en Chile, la efectividad de la vacuna varió del 19-67%. Esta variación estuvo en relación directa con el número de dosis administradas (11).

Se ha intentado obtener efectos protectores contra la fiebre tifoidea empleando fracciones celulares. Vanneman y cols, encontraron que fracciones ribosomales de Salmonella typhimurium inducían protección en el ratón contra el reto de la bacteria (54). Estos resultados los corroboraron otros grupos (36,50); sin embargo, en todas las preparaciones ribo-

somales estudiadas se encontró contaminación por LPS y proteínas de la envoltura celular. Misfeld y Johnson demostraron que las proteínas de la envoltura celular de S. typhimurium protegían a los ratones contra la infección, con un grado semejante al inducido por las fracciones ribosomales (33).

Otra estrategia en la obtención de vacunas contra la fiebre tifoidea, fué la de tomar como referencia lo que ocurre en las neumonías por neumococo, donde la enfermedad se puede evitar por medio de una vacuna a base del polisacárido capsular específico. Tomando en consideración estos antecedentes, se extrajo del LPS de S. typhi la región polisacáridica, libre de lípido A (29), con el fin de probar su efecto protector. El polisacárido resultó ser un buen inmunógeno, pero los anticuerpos específicos que se produjeron contra él, no fueron protectores (57).

Los estudios encaminados a la búsqueda de una mejor vacuna contra la fiebre tifoidea de los últimos 40 años, están basados principalmente en el LPS. Por ello, Barber y Eylen han señalado que: "en la bacteriología, con este planteamiento del problema, se ha ocasionado un antecedente desafortunado, olvidando que los principales antígenos de Salmonella son las proteínas expuestas en la superficie bacteriana" (2).

El estudio de las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram-negativas, se pudo llevar a cabo gracias al advenimiento de métodos específicos para la separación

de membranas.

Miura y Mizushima, en 1968, describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de E. coli, empleando para ello esferoplastos preparados con lisozima y EDTA, los cuales se lisaron osmóticamente, separando posteriormente en un gradiente de sacarosa la membrana externa de la citoplasmática (34). Este procedimiento fué modificado por Osborn, con el objeto de disminuir la cantidad de LPS presente como contaminante de las preparaciones de membrana externa (42).

Schnaitman, en 1971, inició el estudio de las PME de E. coli, éstas las obtuvo por métodos más sencillos que los utilizados previamente. La técnica estaba basada fundamentalmente en el rompimiento de bacterias en una prensa francesa, seguida de la solubilización de la membrana interna con un detergente no iónico (47).

Al estudiar el patrón electroforético de las PME de E. coli, en geles de poliacrilamida-SDS, Schnaitman encontró que una banda proteica principal con un PM de 44 Kd, constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana y que estaba presente en varias bacterias Gram-negativas. A esta proteína le llamó "proteína principal de membrana externa"; poco tiempo después, él y otros investigadores (14,18,48) demostraron por electroforesis que esa proteína mayor estaba constituida por cuatro proteínas. Schmitges y Henning, por otro lado, describieron que la proteína principal se podía separar, por medio de electroforesis, en dos bandas (46).

Actualmente se sabe que el número de las proteínas de membrana externa es variable y dependen de la información genética de la bacteria. Su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo, temperatura, mutaciones, etc.

Las PME más ampliamente estudiadas, han sido las de E. coli y S. typhimurium. Di Rienzo, Nakamura e Inouye, en 1978, y Osborn y Wu en 1980, hicieron una revisión extensa de ellas (6,43), clasificándolas en proteínas principales o mayores y proteínas menores. Las primeras son las proteínas más abundantes de la membrana, pueden expresarse en más de 100,000 copias por célula y se han descrito alrededor de 10 diferentes, aunque por lo general, solamente se encuentran cinco de ellas en una misma bacteria.

Dentro de las proteínas principales están:

- 1). Proteínas matrices o porinas,
- 2). proteína modificable por el calor y
- 3). lipoproteína de Braun.

El arreglo de estas proteínas se ilustra en el esquema propuesto por Osborn y Wu (figura 2).

1). PROTEINAS MATRICES O PORINAS:

Estas proteínas se caracterizan por estar asociadas a la peptidoglicana por enlaces iónicos, por lo que, Rosenbusch en 1974, las llamó proteínas matrices (45); el número de ellas presente en cada bacteria varía dependiendo de la

cepa de origen.

Nakae y Nikaido, en 1975, demostraron que la incorporación de las proteínas matrices a vesículas artificiales de fosfolípidos y lipopolisacárido hacían a las mismas permeables a sacáridos de bajo peso molecular. Por los resultados anteriores se concluyó que la función de estas proteínas era la de formar "poros" de difusión, que permitían el paso de sustancias hidrofílicas de bajo PM. Por esta razón, se les designó con el nombre de porinas (43). Nakae, en 1976, demostró que estos poros también facilitaban el transporte de aminoácidos e iones inorgánicos, cuyos pesos moleculares no excedieran de 550 d (26). Estas observaciones se vieron apoyadas por el hecho de que mutantes de S. typhimurium y E. coli, deficientes en porinas, presentaban defectos en el transporte de moléculas (17,43).

Las proteínas matrices tienen pesos moleculares que van de 36 Kd a 40 Kd y tienen la propiedad de asociarse a la peptidoglicana por enlaces iónicos fuertes, lo que permite que se mantengan unidas a ella después de la extracción de la envoltura celular con dodecil sulfato de sodio (SDS). Estas proteínas, además, son resistentes a los ataques de enzimas proteolíticas, tienen un alto contenido de estructura beta en su configuración nativa, se encuentran localizadas en la superficie de la membrana y actúan como receptores de fagos y colicinas. Las porinas se arreglan en subunidades triméricas (cada una de las cuales constituye la unidad fun-

cional de poro) y la microscopía electrónica ha revelado que estas subunidades forman redes hexagonales en la membrana (30,43). Las porinas se identifican por los genes estructurales que las codifican para su expresión (25), así por ejemplo, la proteína OmpC es el producto del gene estructural ompC. En E. coli y S. typhimurium las porinas son codificadas por los genes ompF, ompC y phoE. Estos genes se expresan en condiciones de alta osmolaridad, baja osmolaridad y bajo fosfato, respectivamente (37). Su secuencia de nucleótidos se ha determinado y muestra gran similitud para los genes de ambas bacterias (35).

CUADRO 1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PORINAS DE
E. coli y S. typhimurium (31).

CARACTERISTICAS	OmpF	OmpC	phoE	OmpD
Peso molecular	37.2 Kd (35 Kd)	36 Kd (36 Kd)	36.78 Kd	(34 Kd)
# moléculas por célula.	10 ⁵ (10 ⁵)	10 ⁵ (10 ⁵)	10 ⁵	(10 ⁵)
Forma oligomérica.	trímero (trímero)	trímero (trímero)	trímero	(trímero)
Asociación a peptidoglicana	+	+	+	(+)
Diámetro del poro.	1.4 nm (1.4 nm)	1.3 nm (1.4 nm)	1.2 nm	(1.4 nm)

NOTA: Los datos entre paréntesis corresponden a S. typhimurium

2). PROTEINA MODIFICABLE POR EL CALOR:

Esta proteína se encuentra codificada en E. coli por el gene ompA y se trata de la proteína que se asocia más fuertemente al LPS (15). La OmpA tiene como característica principal la de variar su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida-SDS de acuerdo a la temperatura de su solubilización, ya que cuando ésta se lleva a cabo a 100°C, el peso molecular es de 33 Kd, mientras que sin calentar es de 28 Kd (9,31). Chain y cols, demostraron que el peso molecular real es de 35 Kd y que está constituida de 325 aminoácidos (31). Esta proteína es la única de la membrana externa sensible a la acción de proteasas y se encuentra expuesta en la superficie celular, por lo que actúa como receptor de fagos y colicinas y está relacionada con los procesos de conjugación (17). La OmpA y la lipoproteína de Braun contribuyen a la integridad de la membrana (31) y, al igual que las porinas, requieren de la presencia de LPS para llevar a cabo sus funciones.

3). LIPOPROTEINA DE BRAUN:

Esta proteína fue la primera que se purificó (31) y tiene un PM de 7 Kd. Está constituida por una secuencia repetitiva de 58 aminoácidos y se une a la peptidoglicana por un enlace peptídico entre el grupo amino de la lisina terminal de la lipoproteína y el grupo carboxílico del ácido diaminopimélico. Hirashima y col, en 1973, encontraron que la lipopro-

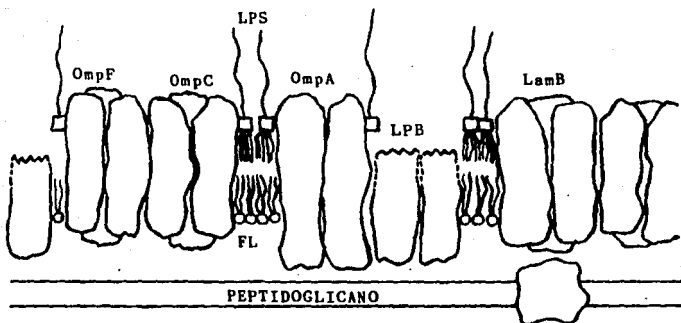


Fig.2. ORGANIZACION MOLECULAR DE LAS PROTEINAS MAYORES EN LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

LPS:Lipopolisacárido; FL:Fosfolípidos; OmpF,OmpC,LamB: Proteínas matrices o porinas; OmpA:Proteína modificable por el calor; LPB:Lipoproteína de Braun.

teína puede también existir en forma libre en la membrana externa (15).

A las proteínas que se expresan menos en la membrana externa se les denomina proteínas menores. Estas constituyen un grupo de 10 a 12 proteínas que participan en el transporte activo de moléculas tales como vitamina B12, maltosa, fierro, etc, entre ellas se incluye una fosfolipasa A. Por estar expuestas en la superficie sirven también de receptores a fagos y colicinas (6,43).

CUADRO 2. ALGUNAS PROTEINAS MENORES DE LA MEMBRANA EXTERNA DE E. coli. (31).

PROTEINA	PM RELATIVO	MOLECULAS POR CELULA	FUNCION PROPUESTA
Btu B	60,000	250	acarreador de vit.B12
Cir	74,000	?	acarreador de fierro
Fhu A	78,000	1000	acarreador de ferri-cromo
Fec	80,500	?	acarreador de fierro-citrato
Fep A	81,000	?	acarreador de fierro-entero- colina
83 K	83,000	?	acarreador de fierro

En los últimos años la membrana externa de las bacterias Gram-negativas ha cobrado gran importancia debido al papel que desempeñan las proteínas en la relación huésped-parásito, ya que se encuentran localizadas en la superficie.

Al respecto, Frasch y cols, en 1977, encontraron que las proteínas de Neisseria meningitidis grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos ya que inducían la producción de títulos altos de anticuerpos, los cuales in vitro presentaban actividad bactericida mediada por complemento (9).

Buchanan y Arko demostraron que el antígeno capaz de proteger específicamente contra la uretritis gonocócica en chimpancés, estaba presente en la membrana externa de Neisseria gonorrhoeae (4). Posteriormente, evidenciaron que las PME eran las que conferían la protección específica en cobayos a los que se había inducido una infección gonocócica experimental (3).

Adamus y cols, reportaron que la inmunización activa con PME de Shigella flexneri y Shigella sonnei protegió a los ratones del ataque a la queratoconjuntivitis shigelosa experimental (1).

Kussi y cols, en 1979, encontraron que ratones inmunizados con las porinas obtenidas de una cepa rugosa de S. typhimurium, fueron más resistentes a la salmonelosis murina al retarlos con una cepa lisa; resultados similares se obtuvieron cuando al ratón se le administró suero de conejo anti-

porinas de S. typhimurium. Para confirmar que los anticuerpos protectores eran los dirigidos hacia las porinas, absorbieron el suero con las mismas y la protección desapareció (23).

Por otro lado, se ha valorado la respuesta inmune humoral hacia las PME de S. typhi en pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea, demostrándose que dichas proteínas son inmunogénicas en el humano, ya que se encontraron anticuerpos específicos contra ellas, tanto en la fase aguda como en la fase de convalecencia de la enfermedad. Estos resultados los confirmaron Ortiz y cols en 1984, quienes demostraron que los anticuerpos anti PME de S. typhi eran de la clase IgG e IgM; los de la clase IgG dirigidos principalmente hacia las proteínas mayores y en particular hacia las porinas (41).

Finalmente, Isibasi y cols (19) aislaron, según el método de Schnaitman, PME de S. typhi 9,12 d Vi; contaminadas con 3% de LPS. Estas presentaron un patrón de corrimiento electroforético similar al descrito para S. typhimurium. El complejo proteico-LPS administrado a una concentración de 30 ug por vía intraperitoneal, indujo protección del 100% en el modelo murino, cuando se realizó el reto de hasta 500 LD50 de la cepa homóloga de S. typhi ty2 y de S. typhimurium. Por otro lado, el suero de conejo anti PME-LPS de S. typhi, protegió en un 100% a los ratones de un reto de 100 LD50 de la cepa homóloga de S. typhi ty2 y de S. typhimurium.

En el mismo trabajo se demostró que la inmunidad pasiva cruzada estaba dada aparentemente por los anticuerpos dirigidos hacia las porinas.

PARTE EXPERIMENTAL

EQUIPO

- 1). Agitador orbital de temperatura variable. New Brunswick Scientific Co. Inc.
- 2). Centrifuga Sorvall RC5C. Instruments Dupon.
- 3). Espectrofotómetro Beckman DU-7.
- 4). Sonicador Lab-Line.
- 5). Ultracentrifuga Beckman LB-M.
- 6). Sistema de electroforesis LKB.
- 7). Cámara de electroelución. C.B.S. Scientific Co. Inc.
- 8). Sistema de electrotransferencia LKB.
- 9). Lector de ELISA. Dynatec.

MATERIALES BIOLOGICOS Y SOLUCIONES

A). OBTENCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA Y PORINAS.

A.1). CULTIVO BACTERIANO

a). Cepa de Salmonella typhi 9,12 d Vi, aislada de un paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea.

b). Medios de cultivo:

- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB).

- Medio mínimo de sales "A".

c). Solución de lavado: Hepes 10mM pH 7.4.

A.2). AISLAMIENTO DE LAS PME.

a). Hepes 10mM pH 7.4, Tritón X-100 al 2%

b). Tris 50mM, EDTA 5mM pH 7.8, Tritón X-100 al 2%

A.3). PURIFICACION DE LAS PORINAS POR ELECTROELUCION.

a). Amortiguador de remojo: SDS al 2% en NH_4HCO_3 0.4M

b). Dithiotreitol al 10%

c). Amortiguador de elución: SDS 0.1% en NH_4HCO_3 0.05M

d). Amortiguador de diálisis: SDS 0.02% en NH_4HCO_3 0.01M

A.4). OBTENCION DE SUERO DE CONEJO ANTI-PORINAS.

a). Dos conejos de la cepa Nueva Zelanda, machos, de 2.5Kg

b). Solución de porinas electroeluidas

c). Adyuvante completo de Freund

A.5). PURIFICACION DE IgG DE CONEJO.

- a). Sepharosa-Proteína A (Sigma).
- b). Glicina-HCl 0.2M pH 2.4
- c). Amortiguador de fosfatos-salino 0.15M, NaCl 0.01M pH7.4

A.6). ELABORACION DEL INMUNOADSORBENTE PARA LA PURIFICACION DE LAS PORINAS.

- a). Sepharosa 6MB activada con bromuro de cianógeno (Sigma).
- b). Amortiguador de acoplamiento: Bicarbonato-salino pH8.9
- c). Etanolamina 1.0M pH 8.0
- d). Amortiguador de acetatos-salino pH 4.0
- e). Amortiguador de boratos-salino pH 8.2
- f). Tris 50mM, EDTA 5mM pH 8.0, SDS 0.2%
- g). Trietilamina 0.05M pH 11.5, SDS 0.2%

B. METODOS DE ANALISIS.

B.1). CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

- a). Solución patrón de proteína: Albúmina sérica bovina al 0.1%
- b). Carbonato de sodio al 2% (solución alcalina).
- c). Tartrato de sodio y potasio al 2%
- d). Sulfato de cobre pentahidratado al 1%
- e). Reactivo de Folin-Ciocalteus.

B.2). DETERMINACION DE LPS.

- a). Solución patrón: KDO 1 mg/ml
- b). Acido sulfúrico 0.2N
- c). Acido peryódico 0.04M

d). Arsenito de sodio al 2.6%

e). Dimetil sulfóxido.

B.3). ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

a). Solución de acrilamida.

b). Amortiguador Tris-HCl 1.5M pH 8.8

c). Amortiguador Tris-HCl 0.5M pH 6.8

d). SDS al 10%

e). APS al 10%

f). Amortiguador de muestra.

g). Amortiguador de corrimiento: Tris-Glicina pH 8.3

h). Solución fijadora.

i). Solución colorante de azul de Coomassie.

j). Solución decolorante.

B.4). TINCION DE PLATA PARA PROTEINAS.

a). Solución prefijadora de metanol-ác. acético.

b). Solución de lavado de etanol-ác. acético.

c). Solución fijadora de glutaraldehído.

d). Solución teñidora de nitrato de plata.

e). Solución reveladora: formaldehído-ácido cítrico.

B.5). TINCION DE PLATA PARA LPS.

a). Solución fijadora: isopropanol-ácido acético.

b). Solución de oxidación: ácido peryódico.

c). Solución teñidora de nitrato de plata.

d). Solución reveladora: formaldehído-ácido cítrico.

B.6). INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

- a). Amortiguador de transferencia: Tris-Glicina.
- b). Amortiguador de fosfatos-salinos pH 7.4
- c). Solución de lavado: PBS-Tween 0.1%
- d). Solución de bloqueo: PBS-gelatina 1.5%
- e). Tinta china al 0.1%
- f). Sustrato para el conjugado: Diaminobencidina-H₂O₂

B.7). INMUNOENSAYO ENZIMATICO (ELISA).

- a). Amortiguador de recubrimiento: Carbonatos pH 9.5
- b). Amortiguador de fosfatos-salino pH 7.4
- c). Solución de lavado: PBS-Tween 0.1%
- d). Solución de bloqueo: PBS-gelatina 1.5%
- e). Diluyente del 1er. anticuerpo y del conjugado:
PBS-Tween-gelatina.
- f). Amortiguador para el sustrato: Citratos pH 5.6
- g). Sustrato para peroxidasa: o-feniléndiamina-H₂O₂
- h). Acido sulfúrico 2.5N

B.8). CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA.

- a). LPS de S. typhi 9,12 d Vi.
- b). Suero de conejo anti-porinas de S. typhi.
- c). Solución salina isotónica.
- d). Hidróxido de sodio 0.1N

MÉTODOS

A). OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA Y PORINAS.

A.1). CULTIVO BACTERIANO.

La cepa de S. typhi 9,12 d Vi se creció en agar EMBddu-
rante 18 horas a 37°C; una asada bacteriológica de ese cul-
tivo se sembró en el medio mínimo A (50ml) y se incubó 12
horas a 37°C, posteriormente 25ml de este crecimiento se
inocularon a botellas de 4 litros que contenían 1.5 litros
del medio mínimo A y se incubaron con agitación a 37°C y
200 rpm, durante 8 horas, tiempo en el cual se llegó a la
fase de crecimiento logarítmico (190 unidades Klett de D.O.).

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1,650g
durante 15 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron
3 veces con una solución de Hepes 10mM a pH 7.4 y se resus-
pendieron en el mismo regulador conservándose a -20°C, has-
ta procesarse.

A.2). AISLAMIENTO DE LAS PME.

La obtención de las proteínas de membrana externa de
S. typhi se realizó de acuerdo a la técnica de Schnaitman
(47).

Las células se homogeneizaron con el fin de eliminar
los antígenos H y Vi, durante un minuto; posteriormente se
centrifugaron a 1,650g durante 15 min. Las bacterias sedimen-
tadas se resuspendieron en Hepes, hasta obtener una absor-
bancia de 1.2 a 660nm. A la suspensión bacteriana se le adi-

cionó DNasa y RNasa (20 ul/ml) y dos gotas de $MgCl_2$ 1M por cada 10 ml. Posteriormente se rompieron las células mediante sonicación a 180 watts por periodos de 2 minutos, en baño de hielo, hasta que la DO a 660 nm descendió a 0.4-0.5. Para eliminar las células enteras, el sonificado se centrifugó dos ocasiones a 1,650 g durante 5 min y el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 100,000 g/45 min. a 5°C; el sedimento (peptidoglicana y membrana externa) se resuspendió en Tris-EDTA-Tritón y se incubó a 37°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se ultracentrifugó a 100,000 g, 45min, a 37°C. El sedimento corresponde a la peptidoglicana y restos de la membrana externa, y el sobrenadante contiene las proteínas de la membrana externa.

Las PME obtenidas por el método de Schnaitman se sometieron a los siguientes análisis: cuantificación de proteínas, determinación de la cantidad de LPS presente en las muestras y electroforesis en geles de poliacrilamida.

A.3). PURIFICACION DE LAS PORINAS POR ELECTROELUCION.

El método de electroelución se llevó a cabo según lo descrito por Hunkapiller y col (16).

Se realizaron electroforesis preparativas de las PME obtenidas por el método de Schnaitman. Al finalizar la electroforesis, los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul de Coomassie; en seguida se cortó la región de los geles que contenía las bandas proteicas correspondientes a las

porinas (pesos moleculares entre 36 y 41 Kd); estos fragmentos de gel se sumergieron en amortiguador de elución por 5 min, posteriormente se cortaron en trozos pequeños los cuales se colocaron en el reservorio A de la cámara de electroelución, cubriéndolos con amortiguador de equilibrio y dithiotreitol al 10% (Figura 3 y 4). La cámara de electroelución se equilibró durante 5 horas, después de lo cual se electroeluyó a 50 volts, 16 horas y con un flujo continuo del amortiguador de 3 ml/min. Posteriormente se electrodiálizó contra amortiguador de diálisis durante 24 horas a 80 volts. Finalmente, del reservorio B de la cámara se recuperaron las porinas en un volumen de 200 μ l del amortiguador. 100 μ l de las proteínas recuperadas se utilizaron para su análisis electroforético: a) tinción de proteínas con azul de Coomassie, b) tinción de proteínas con nitrato de plata, y c) tinción de LPS con nitrato de plata. Los otros 100 μ l se almacenaron a -20°C , hasta obtener un volumen suficiente para inmunizar los conejos.

A.4). OBTENCION DE SUERO DE CONEJO ANTI-PORINAS.

Se utilizaron dos conejos de la cepa Nueva Zelanda de 2.5 Kg de peso. Previo al esquema de inmunización, se sangraron los conejos (10 ml) por la vena marginal de la oreja para la obtención de suero preinmune.

El esquema de inmunización empleado fué el siguiente:

- Días cero, 7 y 14: ambos conejos se inocularon por vía

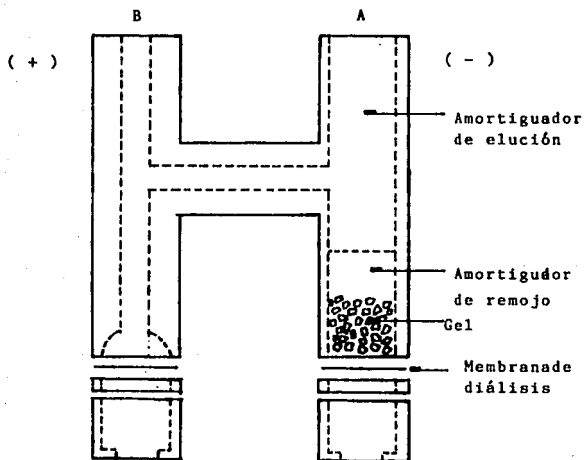


Fig.3. CAMARA DE ELECTROELUCION.

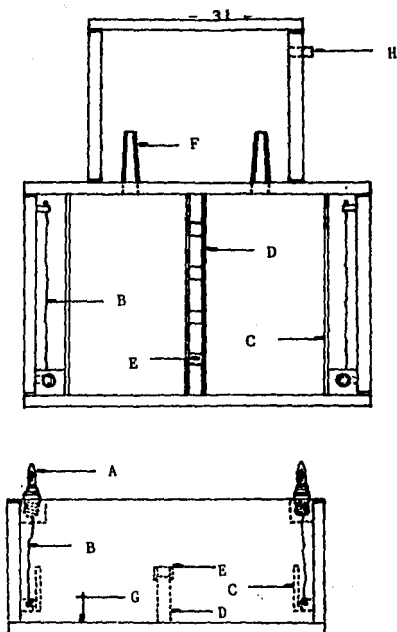


Fig.4. TANQUE DE ELECTROELUCION.

A:conexión a fuente de poder; B:electrodo de platino; C:separador; D:sostén de cámara; E:ranura de inserción; F:drenaje para amortiguador; G;base con espejo; H:conexión a la bomba peristáltica.

subcutánea con 400 μ l de la solución de porinas electroeluidas emulsificadas en un ml, de adyuvante completo de Freund (AFC).

- Día 21: ambos conejos recibieron un refuerzo con 600 μ l de porinas en un ml de ACF por vía subcutánea.

- Día 28: los conejos se sangraron por punción cardíaca. El título de anticuerpos, del suero obtenido se evaluó por ELISA.

A.5). PURIFICACION DE IgG DE CONEJO.

La purificación de las IgG de conejo anti-porinas de S. typhi se realizó a través de una columna de Sepharosa-Proteína A.

Primeramente se lavó la columna de Sepharosa-Proteína A con 5 ml de Glicina-HCl pH 2.4, y posteriormente con PBS hasta que el líquido salió con pH neutro. Se aplicaron 5 ml, del suero de conejo (previamente absorbido con LPS) y se lavó la columna con PBS hasta que la DO del líquido eluyente a 280 nm, fué cercana a cero. En seguida se levigó la IgG (unida a la proteína A) utilizando Glicina-HCl 0.2M pH 2.4.

Esta fracción (que contenía la IgG) se neutralizó de inmediato con Tris 1.0N, y después se dializó contra PBS, durante 12 hrs, a 4°C.

A.6) ELABORACION DE UN INMUNOADSORBENTE PARA LA PURIFICACION DE LAS PORINAS.

La purificación de las porinas de S. typhi 9,12 d Vi se realizó a través de un inmuoadsorbente elaborado sobre una columna de Sepharosa activada con bromuro de cianógeno (32,49).

Un gramo de Sepharosa-CNBr hidratada y lavada con 200ml de HCl 0.001M, se incubó durante toda la noche con 10 mg de IgG de conejo anti-porinas disueltos en 5 ml de amortiguador de bicarbonato salino.

La proteína no unida se lavó con amortiguador de aco-plamiento, y los grupos activos remanentes se hicieron reaccionar con etanolamina pH 8.0 durante 2 horas. Posteriormente se hicieron tres ciclos de lavados para remover proteínas adsorbidas no covalentemente, cada ciclo consistió de un lavado a pH 4.0 con amortiguador de acetatos, seguido de un lavado a pH 8.0 con amortiguador de boratos.

El gel se colocó en una columna, y después de equilibrarse con Tris-EDTA-SDS, se pasaron dos veces 2 mg de PME de S. typhi disueltos en 3 ml de Tris-EDTA-SDS. Los antígenos específicamente ligados se levigaron con trietilamina pH 11.5. Los sobrenadantes se mezclaron y se llevaron inmediatamente a la neutralidad. Finalmente la columna se lavó con amortiguador de boratos y se guardó a -4°C.

Las porinas levigadas se analizaron electroforéticamente y el gel se sometió a tinción de proteínas con azul de Cooma-

sie y a tinción de LPS con nitrato de plata.

B). METODOS DE ANALISIS.

B.1). CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas de membrana externa obtenidas por la técnica de Schnaitman, se determinó por el método de Lowry (28), utilizando albúmina sérica bovina como proteína de referencia.

B.2). DETERMINACION DE LIPOPOLISACARIDO.

La cantidad de LPS presente en las proteínas de membrana externa se determinó a través de la concentración de 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) siguiendo la técnica de Karkhanis y cols (21), empleando KDO como referencia.

B.3). ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en cámaras verticales con geles de 16 x 14 cm, en presencia de dodecil sulfato de sodio, en condiciones reductoras y sistema de amortiguador discontinuo, según la técnica descrita por Laemmli (24).

El gel introductor contenía una concentración final de 5.0% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en Tris-HCl 0.125M a pH 6.8; el gel separador contenía una

concentración de 11.2% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en Tris-HCl 0.35M a pH 8.8.

Previo al análisis electroforético, las muestras de PME en Tris-EDTA-Tritón se precipitaron durante 12 horas a -20°C con acetona (1 volumen de proteína + 6 volúmenes de acetona), posteriormente se centrifugó a 420 g durante 30 min, y el precipitado se resuspendió en amortiguador de muestra, en seguida se calentó a 100°C durante 5 min en un baño María y se colocaron en los carriles para las muestras, porcediendo al corrimiento electroforético a 20 miliamperes por placa durante 6 horas a una temperatura de 10°C .

Concluida la electroforesis, los geles se fijaron 30 min y se tiñeron con azul de Coomassie durante una hora. La decoloración se efectuó hasta lograr apreciar con claridad las bandas proteicas.

B.3.1). Electroforesis preparativas.

La electroforesis preparativa se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita anteriormente; para ello se empleó un gel introductor con un canal horizontal de 10×0.5 cm, para la muestra, de la que se depositaron 500-700 μg de PME por placa (500-700 μl). Al finalizar la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se decoloraron.

B.4). TINCION DE PLATA PARA PROTEINAS.

Para la tinción de proteínas con plata se utilizó la

técnica descrita por Oakley y cols (40).

Una vez concluido el corrimiento electroforético, el gel se sumergió en solución prefijadora durante 30 min, y se lavó con etanol-ácido acético toda la noche; posteriormente se fijó con glutaraldehído al 12.5%, 30 min y se lavó con agua destilada y desionizada durante toda la noche. En seguida el gel se sumergió en solución teñidora 10 min.; nuevamente se lavó el gel en agitación y se agregó solución reveladora hasta apreciar claramente las bandas, después de lo cual se detuvo la reacción con una solución de metanol al 50%. Una vez más se lavó el gel con agua destilada.

B.5). TINCIÓN DE PLATA PARA LPS.

La tinción de plata para LPS se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Tsai y cols (53) con el fin de observar el grado de contaminación por LPS de las muestras de porinas y de PME de S. typhi.

Las PME se corrieron electroforéticamente, después de lo cual el gel se sometió a fijación toda la noche y posteriormente a una oxidación de 5 min, con ácido peryódico; se lavó 4 veces con agua destilada y se tiñó con nitrato de plata durante 10 min en agitación; nuevamente se le hicieron lavados, y finalmente se reveló la placa en un lapso de 15 min. La reacción se detuvo con ácido acético al 1%.

5.6). INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

El método se llevó a cabo según lo descrito por Towbin (52).

Primeramente se montó el soporte para la electrotransferencia, que consiste en una rejilla de electrotransferencia de plástico, una esponja y papel filtro humedecidos con el amortiguador de transferencia. Sobre este soporte se colocó el gel de acrilamida que contenía las PME previamente sometidas a electroforesis; sobre el gel se colocó el papel de nitrocelulosa evitando la formación de burbujas y, finalmente, otro papel filtro, esponja y rejilla, a manera de emparedado. (Figura 5).

El emparedado se introdujo en la cuba que contenía amortiguador de transferencia y se electrotransfirió a 400 miliamperes durante una hora. Transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con azul de Coomassie. El papel de nitrocelulosa se cortó en dos partes, una de ellas se lavó 4 veces con solución de lavado y se tiñó con tinta china para comprobar que la transferencia de las proteínas se hubiese llevado a cabo. El otro trozo de papel se introdujo en solución de bloqueo durante dos horas y posteriormente se incubó con el suero de conejo anti-porinas diluido 1:50 durante 3 horas a temperatura ambiente, después se hicieron 4 lavados con PBS-Tween, seguidos de la incubación durante 1.5 hrs con conjugado de IgG de cabra anti-gamaglobulina de conejo unida a peroxidasa y diluida 1:500 en la solución de bloqueo.

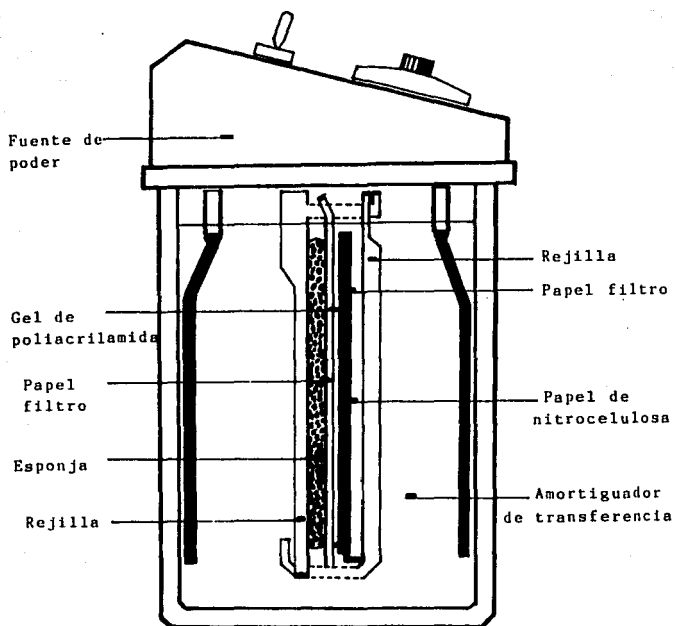


Fig.5. SISTEMA DE ELECTROTRANSFERENCIA.

Se lavó dos veces con PBS-Tween y dos veces con PBS a pH7.2, en agitación constante. Finalmente se añadió el sustrato, que permaneció en contacto con el papel durante 20 min, eliminando después el exceso con agua destilada.

B.7). ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA).

La técnica de ELISA se realizó según lo descrito por Engvall y Perlman (7).

Las placas de poliestireno de 96 pozos se mantuvieron toda la noche a 4°C, recubiertas con 100 µl del antígeno (PME y LPS) a una dilución óptima de 2 µg/ml en regulador de carbonatos, después de lo cual se lavaron 4 veces con PBS-Tween y se bloquearon con PBS-gelatina durante 3 horas a 37°C. Posteriormente se incubaron 3 horas a 37°C, con suero de conejo anti-porinas en diluciones seriadas; seguido de 4 lavados. Se incubaron por 1.5 hrs. con conjugado IgG de cabra anti-gamaglobulina de conejo unida a peroxidasa diluido 1:800. Finalmente se agregó el sustrato por 10 min, y se detuvo la reacción utilizando ácido sulfúrico 2.5N. Las lecturas se hicieron a 490 nm en el lector de ELISA.

B.8). CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA.

Se llevó a cabo la curva de precipitación (13), utilizando como antígeno LPS de S. typhi 9,12 d Vi y como anticuerpo suero de conejo anti-porinas de S. typhi, de acuerdo al siguiente protocolo:

TUBO	SUERO DE CONEJO	LPS 10µg/ml (ml)	LPS 100µg/ml (ml)	SSI (ml)	Conc. LPS (µg/ml)
1	0.1	0.1	-	0.4	1.0
2	0.1	0.2	-	0.3	2.0
3	0.1	0.5	-	-	5.0
4	0.1	-	0.1	0.4	10.0
5	0.1	-	0.2	0.3	20.0
6	0.1	-	0.5	-	50.0
7	0.1	-	-	0.5	0.0

Los tubos se dejaron a 4°C durante 2 días, posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C y el precipitado formado se disolvió en NaOH 0.1N determinándose la cantidad de proteínas por el método de Lowry (28).

RESULTADOS

1). OBTENCION DE LAS PME.

La concentración de PME de S. typhi 9,12 d Vi obtenidas por el método de Schnaitman y el contenido de LPS presente como contaminante fueron los siguientes:

Volumen de proteína obtenido: 86.0 ml

Concentración de proteína: 1.0 mg/ml

Concentración de KDO: 0.04 mg/ml

% de KDO: 4.0 %

2). ELECTROFORESIS VERTICAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El comportamiento electroforético de las PME de S. typhi 9,12 d Vi se observa en las figuras 6 y 7. Las proteínas obtenidas tuvieron pesos moleculares desde 17 hasta 70 Kd. Destaca la presencia de dos proteínas con PM entre 36 y 41 Kd; así como otras de 24 Kd y 17 Kd. Este mismo patrón puede observarse en las electroforesis preparativas de las PME de S. typhi 9,12 d Vi (figura 8).

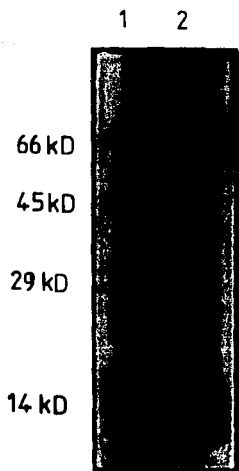


FIG. 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. TINCION DE PORTEINAS CON NITRATO DE PLATA.

Carril 1: Marcadores de pesos moleculares (albúmina sérica bovina 66 Kd, albúmina de huevo 45 Kd, anhidrasa carbónica 29 Kd y lisozima 14 Kd).

Carril 2: PME de S. typhi 9,12 d Vi, obtenidas por el método de Schnaitman.

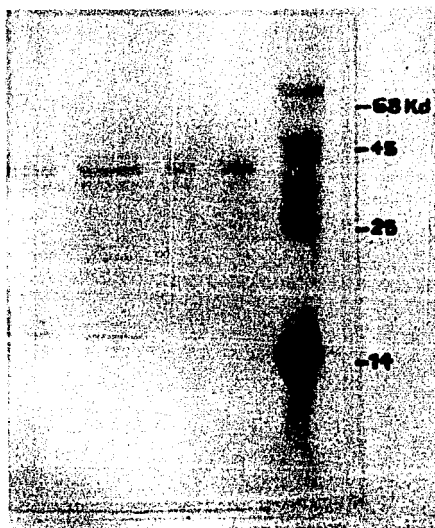


FIG. 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. TINCION DE COOMASSIE.

Carril 1 y 2: PME de S. typhi 9,12 d Vi

Carril 3 y 4: Porinas de S. typhi 9,12 d Vi

Carril 5: Marcadores de PM

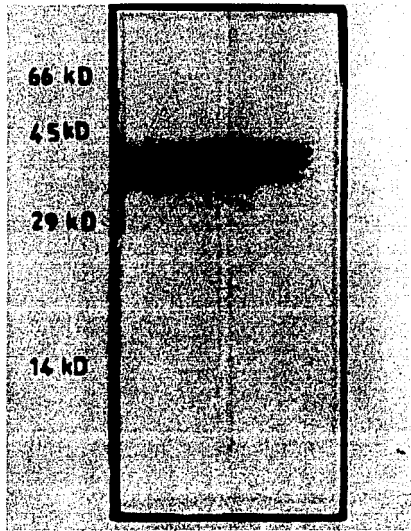


FIG. 8. ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GEL DE POLIACRILAMIDA
DE PME DE S. typhi 9,12 d Vi.

3). PURIFICACION DE PORINAS DE S. typhi 9,12 d Vi POR ELECTRO-ELUCION.

Las figuras 9 y 10 muestran el análisis electroforético en geles de poliacrilamida de las proteínas electroeluidas, observándose en ambas la presencia de dos bandas proteicas únicas con pesos moleculares entre 36 y 41 Kd. Las proteínas electroeluidas presentaron una contaminación por LPS menor del 1%, de acuerdo al contenido de KDO en la muestra.

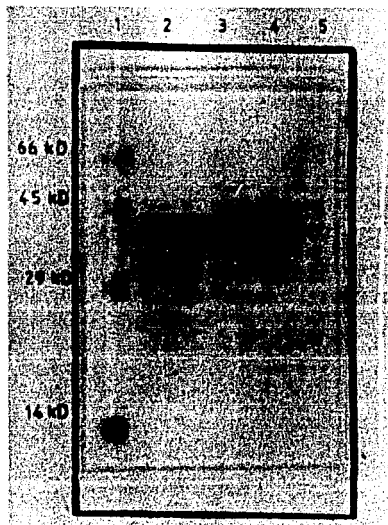


FIG. 9. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. TINCION DE COOMASSIE.

Carril 1: Marcadores de pesos moleculares

Carril 2 y 4: PME de S. typhi 9,12 d Vi

Carril 3: Porinas electroeluidas de S. typhi 9,12 d Vi

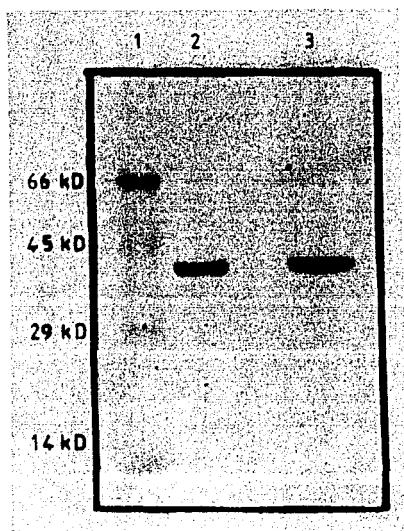


FIG. 10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. TINCION DE COOMASSIE.

Carril 1: Marcadores de pesos moleculares

Carril 2: Proteínas electroeluidas de S. typhi 9,12 d Vi

4). DETERMINACION POR EL METODO DE ELISA DE ANTICUERPOS ANTI-PORINAS Y ANTI-LPS DE S. typhi EN EL SUERO DE CONEJO.

En la figura 11 se muestran las curvas de titulación de suero normal de conejo y de suero de conejo anti-porinas electroeluidas. Como se puede observar, a una dilución 1:100, el suero inmune fué positivo (absorbancia mayor de 1.0) cuando se emplearon como antígeno 20 µg/ml de PME para recubrir las placas; mientras que el suero preinmune a la misma dilución fué negativo (absorbancia menor de 0.2).

Se observa en la figura 12, que el suero de conejo anti-porinas electroeluidas presentó una absorbancia de 0.4 a la dilución 1:100 cuando se emplearon 20 µg/ml de LPS para recubrir las placas.

5). ABSORCION DEL SUERO DE CONEJO ANTI-PORINAS DE S. typhi CON LPS.

Debido a que el suero anti-porinas contenía anticuerpos anti-LPS, se absorbió en equivalencia con 8 µg de LPS de S. typhi, según la curva de precipitación cuantitativa realizada (figura 13). Después de la absorción la reactividad hacia el LPS desapareció (absorbancia menor de 0.1). (figura 12).

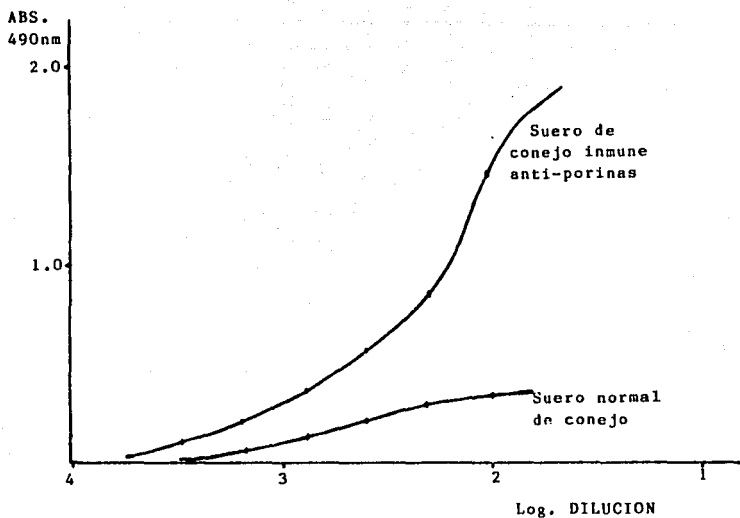


Fig.11. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-PORINAS POR EL METODO DE ELISA.

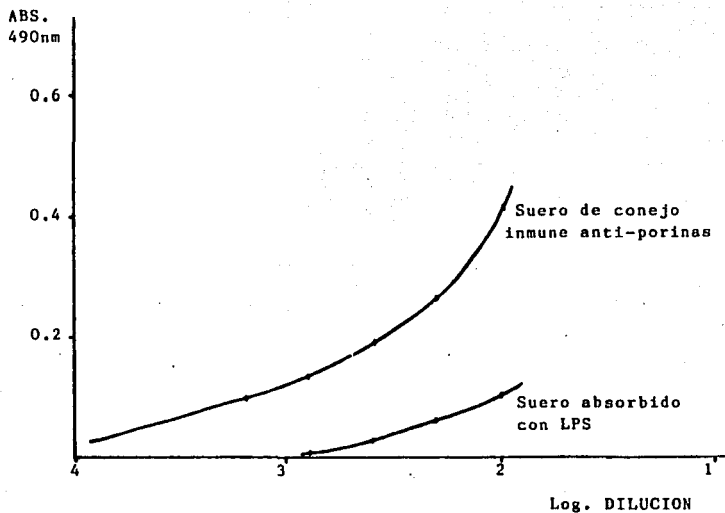


Fig.12. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPS POR
EL METODO DE ELISA.

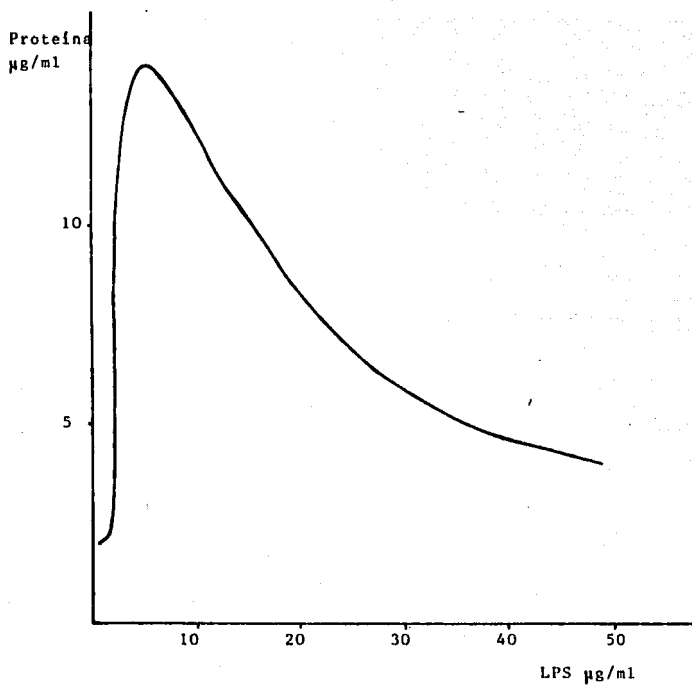


Fig.13. CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA PARA LPS.

6). IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Los sueros de conejos inmunizados con las proteínas electroeluidas reconocieron de las PME de S. typhi 9,12 dVi transferidas a papel de nitrocelulosa, únicamente a las proteínas de pesos moleculares entre 36 y 41 Kd (figura 14).

Por otro lado, el suero de conejo anti-PME reveló una sola banda de peso molecular entre 36 y 41 Kd al ponerse en contacto con proteínas electroeluidas y transferidas a papel de nitrocelulosa (figura 15).

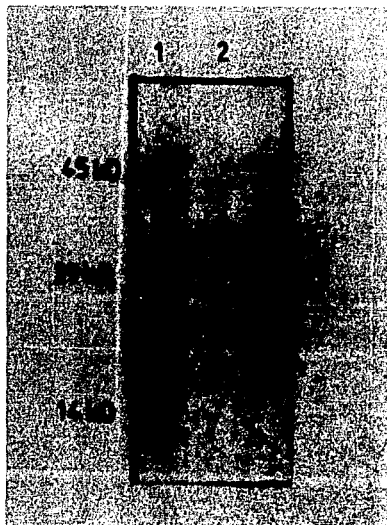


FIG. 14. ELECTROTRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA DE LAS PME DE S. typhi 9,12 d Vi, REVELADAS CON SUERO DE CONEJO ANTI-PORINAS ELECTROELUIDAS.

Carril 1: Marcadores de pesos moleculares, teñidos con tinta

Carril 2: PME de S. typhi reveladas con suero anti-porinas

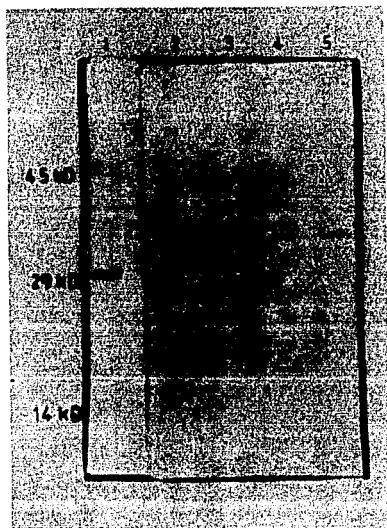


FIG. 15. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA.

Carril 1: Marcadores de pesos moleculares teñidos con tinta china.

Carril 2: Porinas electroeluidas de S. typhi, reveladas con suero de conejo antiporinas

Carril 3: PME reveladas con suero anti-porinas.

Carril 4: PME de S. typhi con SNC.

Carril 5: Porinas electroeluidas reveladas con suero de conejo anti-PME de S. typhi.

7). PURIFICACION DE IgG DE CONEJO ANTI-PORINAS POR COLUMNA DE PROTEINA A - SEPHAROSA.

El perfil de levigación de las IgG de conejo anti-porinas purificadas se muestra en la figura 16, en donde se puede observar una primera fracción correspondiente a la eliminación mediante lavados con PBS de las proteínas del suero no unidas a la columna; al cambio de pH (Glicina-HCl pH 2.4) se obtuvo una segunda fracción a una concentración de 5.28 mg/ml que correspondió a las IgG anti-porinas.

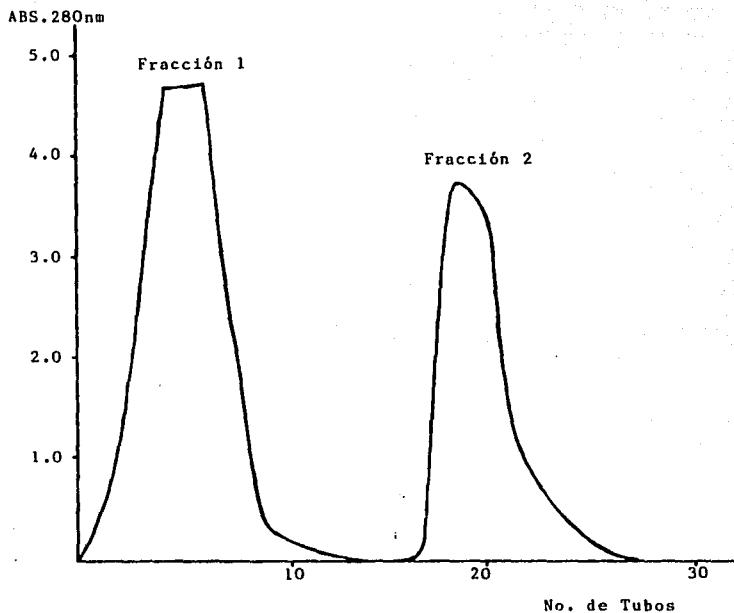


Fig.16. PERFIL DE LEVIGACION DE IgG DE CONEJO ANTI-PORINAS
PURIFICADAS POR COLUMNA DE PROTEINA A-SEPHAROSA.

8). PURIFICACION DE PORINAS A TRAVES DE UN INMUNOADSORBENTE.

Las porinas de S. typhi 9,12 d Vi se purificaron a través del inmunoadsorbente específico elaborado con las IgG anti-porinas y sepharosa. El perfil cromatográfico (figura 17) pone de manifiesto una fracción con absorbancia a 280 nm de 0.9, que corresponde a todas las PME (excepto las porinas). La segunda fracción que se obtuvo al levigar con trietilamina pH 11.5, corresponde a las porinas unidas específicamente al inmunoadsorbente, cuya concentración fué de 0.16 mg/ml.

9). ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS PORINAS PURIFICADAS.

La fracción de proteínas recuperadas del inmunoadsorbente se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida. La tinción de Coomassie para proteínas (figura 18) mostró la presencia de dos bandas proteicas únicas de pesos moleculares entre 36 y 41 Kd.

Por otro lado, las figuras 19 y 20 muestran tinciones con nitrato de plata del LPS. Se observa que tanto las PME como las porinas electroeluidas estaban contaminadas con LPS, no así las porinas purificadas a través del inmunoadsorbente, donde hay una eliminación total de contaminación por LPS.

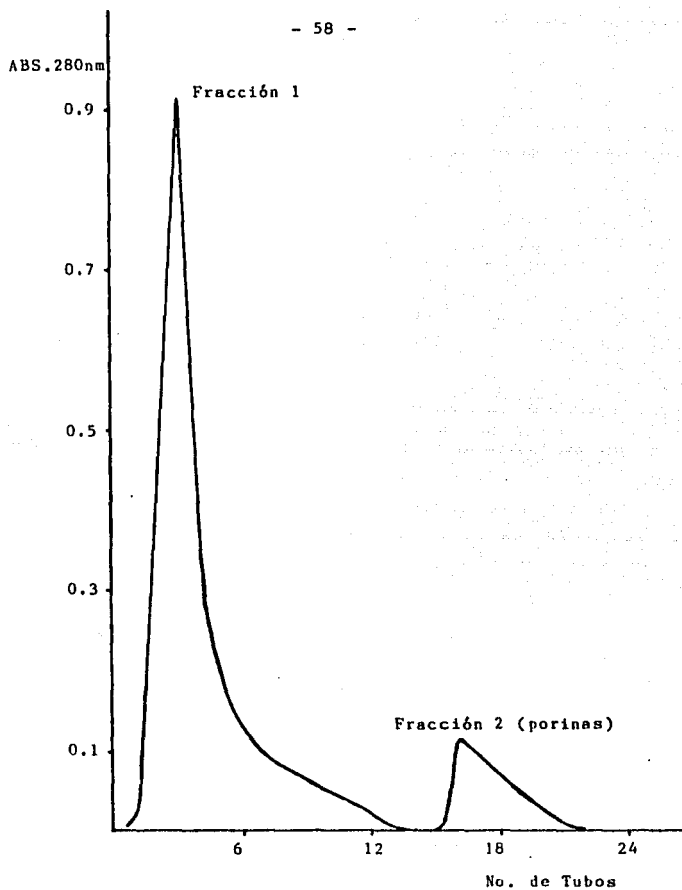


Fig.17. PERFIL DE LEVIGACION DE PORINAS PURIFICADAS A TRAVES DE UN INMUNOADSORBENTE POLICLONAL ESPECIFICO.

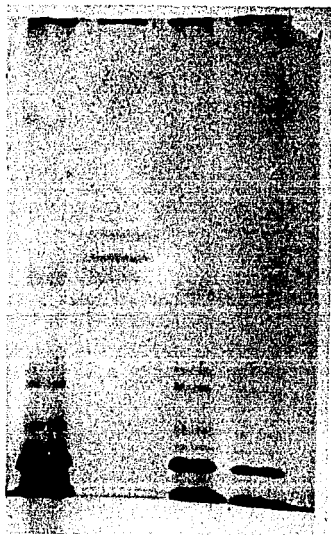


FIG. 18. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. TINCION DE COOMASSIE.

Carril 1, 3 y 4: PME de S. typhi no unidas específicamente a la columna. Lavados con Tris-EDTA-SDS.

Carril 2: Fracción de proteínas eluidas de la columna con trietilamina pH 11.5.

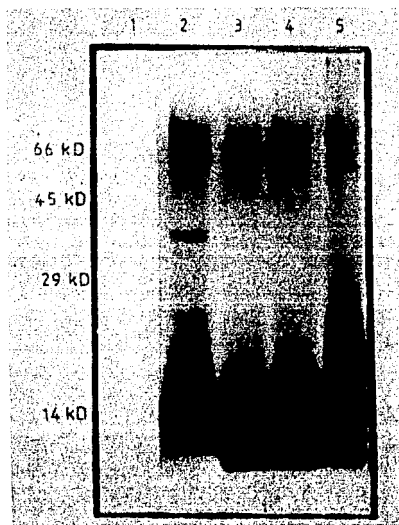


FIG. 19. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA. TINCION DE LPS CON NITRATO DE PLATA.

Carril 2: PME de S. typhi.

Carril 3, 4 y 5: LPS de S. typhi.

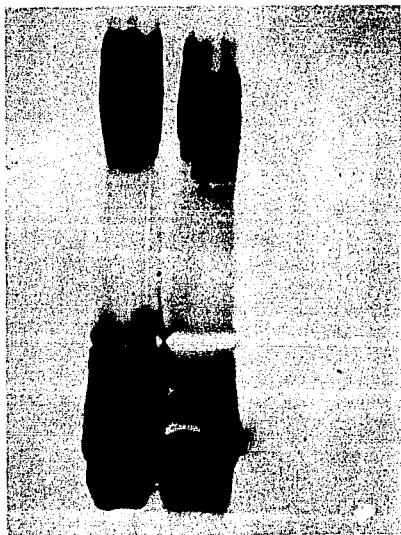


FIG. 20. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. TINCION DE LPS CON NITRATO DE PLATA.

Carril 1 y 2: PME de S. typhi no unidas específicamente a la columna. Lavados con Tris-EDTA-SDS.

Carril 3: Fracción de proteínas (porinas) eluida de la columna con trietilamina pH 11.5.

Carril 4: Proteínas electroeluidas.

DISCUSION

En el patrón electroforético de las PME de Salmonella typhi aisladas por el método de Schnaitman, se pueden observar tanto proteínas mayores como menores, con pesos moleculares que van de 17 Kd a 70 Kd. Entre las mayores destaca la presencia de dos proteínas de 36 Kd a 41 Kd, que, de acuerdo a su peso molecular, corresponden a las proteínas formadoras de canales (porinas), aunque éste es ligeramente superior al de las porinas de Salmonella typhimurium (OmpD 34 Kd, OmpF 35 Kd y OmpC 36 Kd) (31); sin embargo, el sistema de electroforesis empleado para el análisis de las proteínas influye en la determinación del peso molecular, ya que cuando se emplean PME de S. typhimurium como proteínas de referencia, los patrones electroforéticos de las PME de ambas bacterias son semejantes (8). Por otro lado, tanto en E. coli como en S. typhimurium se han aislado de 3 a 4 formas de porina (31) y su expresión en la membrana externa está regulada por factores tales como cambios en la osmolaridad y concentración de fosfatos en el medio de cultivo (31), así, la obtención de solo dos porinas a partir de Salmonella typhi, pudiera probablemente a las características del medio empleado en el cultivo de la bacteria.

Las semejanzas bioquímicas e inmunogénicas encontradas entre las porinas de S. typhi, S. typhimurium y E. coli (8), sugieren que esas proteínas tienen un origen ancestral común,

pero no necesariamente indica que todos sus determinantes antigénicos sean iguales; por lo tanto, no sería extraño encontrar regiones comunes y otras específicas en su estructura primaria, lo que se reflejaría como determinantes antigénicos "públicos" (de familia, de tribu o de especie) y determinantes antigénicos "privados" (de cepa). Tokunaga (51) y Lee (25) han aportado datos experimentales que apoyan esta hipótesis, al encontrar secuencias de aminoácidos comunes en el perfil peptídico de las porinas de E. coli y S. typhimurium, así como en el análisis de sus secuencias de nucleótidos, en donde se ha encontrado una similitud de hasta 50%.

El empleo del método de Schnaitman para la obtención de PME tiene como principales ventajas lo sencillo de la metodología y la obtención de las proteínas en su estado nativo, debido a que no se emplean procedimientos drásticos en la extracción de las mismas, aunque tiene como desventaja el contenido de LPS presente como contaminante en todas las preparaciones, ello obedece, en primer lugar, a que se trata del principal componente de la membrana externa (ocupa el 45% de la superficie bacteriana) y en segundo lugar, a que algunas PME están unidas de manera no covalente al LPS para llevar a cabo sus funciones biológicas dentro de la bacteria (6).

En experimentos de protección empleando un modelo experimental murino, se ha demostrado que el complejo PME-LPS de S. typhi aislado por el método de Schnaitman, protege al ratón de un reto 500 veces mayor a la LD50, así como el suero

de conejo anti PME-LPS induce una protección de 100 LD50; este suero, por inmunotransferencia, reconoce con mayor intensidad a las porinas (55). En base a estos antecedentes, se ha sugerido que las PME de S. typhi, y en particular las porinas, puedan ser útiles en la elaboración de una vacuna contra la fiebre tifoidea (19); pero para establecer claramente el papel de las porinas en la inmunidad, es necesario emplear en los experimentos de protección proteínas purificadas, ya que los efectos observados pudieran ser por la presencia del complejo PME-LPS.

Para purificar a las porinas se han empleado métodos bioquímicos tradicionales tales como cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico, consiguiendo con ellos enriquecer el contenido de porinas, disminuyendo a sólo 1% el contenido de LPS.

Se consideró que una forma de obtener las proteínas purificadas era recuperarlas a partir de los geles de poli-acrilamida, para lo que se empleó la electroelución. Esta técnica, en efecto, permitió separar a las porinas del resto de las PME, sin embargo, no se logró eliminar completamente al LPS, en virtud de que éste tiene una movilidad electroforética similar (figura 20). Por otro lado, la cantidad de porinas recuperadas de los geles de poli-acrilamida, fué suficiente para evocar una respuesta de anticuerpos específicos contra las porinas en conejos, demostrada mediante la reacción antígeno-anticuerpo en papeles de nitrocelulosa

que contenían todas las PME de S. typhi, en los que solamente se reconocieron las porinas (figura 15). Sin embargo, también se generaron anticuerpos anti-LPS, los que se eliminaron absorbiendo el suero, en condiciones de equivalencia, con el antígeno específico.

La cromatografía de afinidad constituye una de las mejores maneras de purificar moléculas, debido a que sus principios bioquímicos se basan en el concepto de la interacción ligando-receptor, de manera tal que en la mayoría de los casos, la cromatografía de afinidad da un grado de pureza del orden del 95%; además, no se requieren grandes volúmenes de geles, ni equipos costosos para llevarla a cabo, por lo tanto, se trata de una metodología relativamente económica, rápida y sencilla de realizar. Una manera de hacer cromatografía de afinidad es a través de inmunoadsorbentes, los cuales se elaboran acoplando a un soporte anticuerpos específicos, lo que permite retener las moléculas de interés y eliminar los contaminantes, a continuación, el material unido se recupera mediante cambios de fuerza iónica o de pH (32).

En consideración a los conceptos antes mencionados, a un soporte de sepharosa se acoplaron IgG anti-porinas, permitiéndonos contar así con un inmunoadsorbente. Las porinas purificadas en esta columna estuvieron libres de LPS, demostrado mediante tinción de plata (figura 20). Por lo tanto se cuenta con un método que permitirá obtener cantidades suficientes de proteína, para emplearse en experimentos que

permitan dilucidar su papel en la protección contra la fiebre tifoidea.

CONCLUSIONES

- 1). Las proteínas de membrana externa de Salmonella typhi 9,12 d Vi tienen pesos moleculares que van de 17 Kd a 70 Kd. Destaca un grupo de dos proteínas principales con pesos moleculares de 36 Kd a 41 Kd, las cuales se tratan de las porinas descritas en otras bacterias Gram-negativas.
- 2). El método de electroelución permite la separación de las porinas del resto de las PME de S. typhi, así como una eliminación parcial de la contaminación con LPS.
- 3). La cantidad de porinas obtenidas por electroelución es suficiente para inducir en conejos la producción de anticuerpos específicos.
- 4). El inmunoadsorbente elaborado con IgG anti-porinas sobre un soporte de sepharosa, permite obtener de una manera rápida, porinas libres completamente de LPS.

APENDICE

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

- Medio mínimo de sales "A"

fosfato de potasio dibásico (Baker)	7.0 g/l
fosfato de potasio monobásico (Baker)	3.0 g/l
citrato de sodio (Baker)	0.5 g/l
sulfato de amonio (Baker)	1.0 g/l
sulfato de magnesio (Baker)	0.1 g/l

El medio se esterilizó a 15 lb de presión, 15 min, a 120°C. Posteriormente se adicionaron 20 ml de glucosa al 12.5% (Merck), 20 mg de leucina (Sigma) y 10 ml de extracto de levadura al 5% (Bioxon), componentes que previamente habían sido esterilizados a 10 lb de presión, 10 minutos.

- Hepes 10 mM pH 7.4, Tritón X-100 al 2%

hepes (Sigma)	2.6 g/l
tritón X-100 (Sigma)	20.0 g/l

- Tris 50 mM, EDTA 5 mM pH 7.8, Tritón X-100 al 2%

Tris (Sigma)	6.05 g/l
EDTA (Sigma)	1.86 g/l
Tritón X-100 (Sigma)	20.0 g/l

- Amortiguador de remojo.

bicarbonato de amonio (Sigma)	3.16 g
SDS (Sigma)	2.00 g
agua destilada	100.0 ml

- Amortiguador de elución.

bicarbonato de amonio (Sigma)	3.95 g
SDS (Sigma)	1.00 g
agua destilada	1000 ml

- Amortiguador de diálisis.

bicarbonato de amonio (Sigma)	0.79 g
SDS (Sigma)	0.20 g
agua destilada	1000 ml

- Glicina-HCl 0.2 M pH 2.4

glicina (Sigma)	15.01 g
-----------------	---------

Ajustar el pH con HCl 2N y aforar a 1000 ml con agua destilada.

- Amortiguador de fosfatos-salino pH 7.4

cloruro de sodio (Merck)	8.70 g
fosfato ácido de potasio (Daker)	2.70 g
fosfato dibásico de sodio (Baker)	0.40 g
agua destilada	1000 ml

- Amortiguador de bicarbonatos-salino pH 8.9

carbonato de sodio anhidro 1M (Baker) 10.0 ml

bicarbonato de sodio 1M (Baker) 90.0 ml

Mezclar las soluciones de carbonato y bicarbonato. Ajustar a pH 8.9 con la solución de carbonato de sodio y aforar a 1 litro con una solución 0.5 M de cloruro de sodio (Merck)

-Etanolamina 1 M pH 8.0

etanolamina (Sigma) 61.08 ml

Ajustar el pH con HCl 2 N y aforar a 1000 ml con agua destilada.

- Amortiguador de acetatos-salino pH 4.0

acetato de sodio 0.6 M (Baker) 130.0 ml

ácido acético 0.6 M (Baker) 435.0 ml

cloruro de sodio (Merck) 4.38 g

Aforar con agua destilada a 1000 ml

- Amortiguador de boratos-salino pH 8.2

ácido bórico (Baker) 6.18 g

tetraborato de sodio (Merck) 9.54 g

cloruro de sodio (Merck) 4.38 g

Aforar con agua destilada a 1000 ml

- Tris 50 mM, EDTA 5 mM pH 8.0, SDS 0.2%

Tris (Sigma) 6.05 g/l

EDTA (Sigma) 1.86 g/l

- SDS (Sigma) 2.00 g/l
- Trietilamina 0.05 M pH 11.5, SDS 0.2%
- trietilamina (Sigma) 6.97 ml
- SDS (Sigma) 2.00 g
- Ajustar el pH con HCl 2N y aforar a 1000 ml con agua destilada.
- Acrilamida
- Acrilamida (Biorad) 30.0 g
- N-N-bismetilén acrilamida (Biorad) 0.80 g
- Aforar a 100 ml con agua destilada y desionizada, filtrar en papel Whatman 41 y mantener a 4°C en frasco color ámbar.
- Amortiguador Tris-HCl 1.5M pH 8.8
- Trizma base (Sigma) 18.15 g
- Ajustar el pH con HCl 2N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.
- Amortiguador Tris-HCl 0.5M pH 6.8
- Trizma base (Sigma) 6.00 g
- Ajustar el pH con HCl 2N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.
- Amortiguador de muestra.
- Tris-HCl pH 6.8 25.0 ml

SDS al 10%	2.00 ml
Azul de bromofenol al 1% (Sigma)	0.10 ml
Glicerol (Baker)	10.0 ml
2-mercaptoetanol (Sigma)	5.00 ml

- Amortiguador de corrimiento electroforético.

Trizma base (Sigma)	3.00 g
Glicina (Sigma)	14.4 g
SDS (Sigma)	1.00 g
Aforar a 1000 ml con agua destilada y desionizada.	

- Solución fijadora para electroforesis.

metanol (Merck)	400.0 ml
ácido acético (Baker)	70.0 ml
agua destilada	530.0 ml

- Solución colorante de Coomassie.

metanol al 50% (Merck)	454.0 ml
ácido acético (Baker)	46.0 ml
azul de Coomassie (Sigma)	1.20 g
Agitar durante una hora y filtrar en papel Whatman 41.	

- Solución decolorante para azul de Coomassie.

metanol (Merck)	50.0 ml
ácido acético (Baker)	25.0 ml
agua destilada	925.0 ml

- Solución prefijadora para tinción de proteínas con nitrato de plata.

metanol (Merck)	50.0 ml
ácido acético (Baker)	10.0 ml
agua destilada	100.0 ml

- Solución de lavado

etanol (Merck)	5.0 ml
ácido acético (Baker)	7.0 ml
agua destilada	100.0 ml

- Solución fijadora

glutaraldehído (Sigma)	12.5 ml
agua destilada	100.0 ml

- Solución teñidora

hidróxido de amonio (Baker)	1.0 ml
hidróxido de sodio 0.1N (Baker)	21.0 ml
nitrato de plata al 20% (Merck)	4.0 ml
agua destilada	74.0 ml

- Solución reveladora

ácido cítrico al 1% (Baker)	2.5 ml
formaldehído (Baker)	0.25 ml
agua destilada	500.0 ml

- Solución fijadora para tinción de LPS con nitrato de plata.

alcohol isopropílico (Baker)	56.0 ml
ácido acético (Baker)	14.0 ml
agua destilada	200.0 ml

- Solución de oxidación

ácido peryódico (Merck)	1.05 ml
isopropanol 25% en ac. acético 7%	4.0 ml
agua destilada	150.0 ml

- Solución teñidora

hidróxido de sodio 0.1N	28.0 ml
hidróxido de amonio (Baker)	1.0 ml
nitrato de plata al 20%	5.0 ml
agua destilada	115.0 ml

- Solución reveladora

ácido cítrico (Baker)	50.0 mg
formaldehído (Baker)	0.5 ml
agua destilada	200.0 ml

- Amortiguador de transferencia

trizma base (Sigma)	18.15 g
glicina (Sigma)	86.40 g
metanol (Merck)	1200 ml
agua destilada	4800 ml

- Solución de lavado.

PBS pH 7.4	1000 ml
tween 20 (Baker)	1.0 ml

- Solución de bloqueo

gelatina bacteriológica (Difco)	1.50 g
PBS pH 7.4	100.0 ml

- Solución de tinta china

tinta china (comercial)	0.25 ml
PBS-Tween al 1%	250.0 ml

- Sustrato para el conjugado

diaminobencidina (Sigma)	50.0 mg
Tris-HCl 0.1M pH 7.6	100.0 ml
peróxido de hidrógeno al 30% (Merck)	0.10 ml
Filtrar en papel Whatman 41.	

- Amortiguador de recubrimiento para ELISA

carbonato de sodio (Baker)	7.0 g
bicarbonato de sodio (Baker)	28.0 g
agua destilada	1000 ml

- Solución diluyente del 1er. Ac y del conjugado

tween 20 (Baker)	0.1 ml
------------------	--------

gelatina bacteriológica (Difco)	0.5 ml
PBS pH 7.4	100.0 ml
- Amortiguador de citratos pH 5.6	
citrato de sodio (Baker)	29.0 g
ácido cítrico (Baker)	4.10 g
agua destilada	1000 ml
- Sustrato para peroxidasa	
o-feniléndiamina (Sigma)	6.0 mg
citratos pH 5.6	12.0 ml
peróxido de hidrógeno al 30% (Merck)	0.01 ml
- Acido sulfúrico 2.5 N	
ac. sulfúrico conc. (Baker)	69.4 ml
agua destilada	1000 ml

BIBLIOGRAFIA

- 1). Adamus, G., Mulczyk, D., Witkowska, Ramanowska, E. "Protection Against Keratoconjunctivitis Shigellosa Induced by Immunization with Outer Membrane Proteins of Shigella sp." Infec. and Immun. 30: 321-324. (1980).
- 2). Barber, C., Eyles, E. "The Unfortunate Role Precedent in Bacteriology I. The Main Antigens of Salmonella: The Proteins." Zentralbl Bakteriell Parasitenk Infektionskr Hyg Abt Orig. Reih. 234: 53-59. (1971).
- 3). Buchanan, T., Pearce, W., Schoolnick, G., Arko, R. "Protection Against Infection with N. gonorrhoeae by Immunization with Outer Membrane Protein Complex and Purified Pili." J. Infect. Dis. 136: (supl)132-137. (1977).
- 4). Buchanan, T. and Arko, R. "Immunity to Gonococcal Infection Induced by Vaccination with Isolated Outer Membrane of Neisseria gonorrhoeae in Guinea Pigs." J. Infect. Dis. 135: 879-887. (1977).
- 5). Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W. PRINCIPLES OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY. A Harper International Edition. New York, N.Y. (1978).
- 6). Di Rienzo, J., Nakamura, K., Inouye, Y. "The Outer Membrane protein of Gram Negative Bacteria: Biosynthesis Assembly and Functions." Ann. Rev. Biochem. 47: 481-523. (1978).
- 7). Engvall, E., Perlman, P. "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." Immunochem. 8:874-879 (1971).

- 8). Favela Ebergenyi, F.J. "Aislamiento y caracterización de proteínas de membrana externa de diferentes cepas de S. typhi. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Mayo, 1987.
- 9). Frascch, C., Robbins, J. "Protection Against Group B Meningo cöccal Disease. Immunogenicity of Serotype 2 Vaccine and Specificity of Protection in a Guinea Pig Model." J. Exp. Med. 147: 629-644. (1978).
- 10). Germanier, R. "Situación actual de la inmunización contra la Fiebre Tifoidea." Bol. of Sanit. Panam. 82:300-311. (1977).
- 11). Germanier, R. "The live Oral Typhoid Vaccine Ty 21a: Recent Field Trial Results." Sclavo International Conference on Bacterial Vaccines and Local Immunity. Siena, Italy. p.10-12.
- 12). Germanier, R., Furer, E. "Isolation and Characterization of S. typhi gal E mutant Ty 21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine." J. Infect. Disease. 131: 553-558. (1975).
- 13). Heidelberg, M. "Quantitative Studies on the Precipitin Reaction the Determination of Small Amounts of a Specific Polysaccharide." J. Exp. Med. 55: 555-561. (1932).
- 14). Henning, V., Hohn, B., Sonntag, I. "Cell Envelope and Shape of E. coli K12. The Ghost Membrane." Evr. J. Biochem. 39: 27-36. (1973).

- 15). Hirashima, A., Wu, H., Venkateswaran, P., Inouye, M. "Two of a Structural Lipoprotein in the Envelope of E. coli" J. Biol. Chem. 248: 5654-5659. (1973).
- 16). Hunkapiller, M., Lujan, E., Ostrander, F. and Hood, L. "Isolation of Microgram Quantities of Proteins from Polyacrylamide gels for Aminoacid Sequence Analysis." Methods in Enzymology 91: 227-236. (1983).
- 17). Inouye, M. (ed). "Bacterial Outer Membranes Biogenesis and Functions." John Wiley and Sons. New York. (1979).
- 18). Inouye, M., Yee, M. "Homogeneity of Envelope Proteins E. coli Separated by Gel Electrophoresis." J. Bacteriol. 113: 304-312. (1973).
- 19). Isibasi, A., Calva, E., Ortiz, V., Fernández, M., Hernández, A. y Kumate, J. "Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antígenos de membrana externa." Simposio Avances en el Uso de Vacunas 1885-1985. p. 109-115. (1985).
- 20). Joklik, W. K., Willet, H. P., Amos, D. B. ZINSSER MICROBIOLOGY. 17^a Ed. Appleton Centruy Crofts. p. 106-134.
- 21). Karkhanis, Y., Zelther, J., Jackson, J., Carlo, D. "A New Improved Microassay to Determine 2-ceto-3-deoxy-octanate in lipopolysaccharide in Gram negative Bacteria". Anal. Biochem. 85: 595-601. (1978).
- 22). Kumate, J. "Inmunidad, Inmunización y Vacunas." 2a. edición, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. p. 227-247. (1970).
- 23). Kussi, N., Murrinen, M., Saxen, H., Mattivaltonen. "Outer

- Membrane Proteins in Experimental Salmonellosis of Mice." Infect. and Immun. 25: 857-862.
- 24). Laemmli, U. "Cleavage of structural proteins during the assembly the of bacteriophage T4." Nature 227: 680-685. (1970).
- 25). Lee, D., Schnaitman, C. "Comparison of Outer Membrane Porin Proteins Produced by Escherichia coli and Salmonella typhimurium." J. Bacteriol. 142: 1019-1022. (1980).
- 26). Lee, D., Schnaitman, C., Pugsley, A. "Chemical Heterogeneity of Major Outer Membrane Pore Proteins of Escherichia coli." J. Bacteriol. 138: 861-870. (1979).
- 27). Levine, M., Du Pont, H., Hornick, R., Snyder, M., Woodward, W., Gilman, H., Libonatti, J. "Attenuated, streptomycin dependent S. typhi oral vaccine: Potential deleterious effect of lyophilization." J. Infect. Dis. 133: 424-429. (1976)
- 28). Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. "Protein Measurement with the Phenol Reagent." J. Biol. Chem. 193: 265-276. (1951)
- 29). Lüderitz, O., Galanos, D., Lehman, M., Nurminen, E., Rietschel, E., Rosenfelder, M., Simon, M., Westphal, O. "Lipid A: Chemical Structure and Biological Activity." J. Inf. Dis. 128: 9. (1973).
- 30). Luggtenberg, B., Bronstein, H., Selm, N., Peters, R. "Peptidoglycan Associated Outer Membrane Proteins in Gram Negative Bacteria." Biochem. et Biophys. Acta 465: 571-578 (1977).
- 31). Luggtenberg, B. and Van Alphen, L. "Molecular Architecture

- and Functioning of the Outer Membrane of E. coli and other Gram Negative Bacteria." Biochem. Biophys. Acta. 737: 51-115. (1983).
- 32). Manual de Cromatografía de Afinidad. Principios y métodos. Editado por Pharmacia Fine Chemicals.
- 33). Misfeldt, M., Johnson, W. "Identification of Protective Cell Surface Proteins in Ribosomal Fraction from S. typhimurium." Infect. Immun. 24: 808-816. (1978).
- 34). Miura, T., Mizushima, S. "Separation by Density Gradient Centrifugation of Two Types of Membranes from Seroplast Membrane of E. coli K12." Biochem. Biophys. Acta. 150: 159-161. (1968).
- 35). Mizuno, T., Chou, M., Inouye, M. "A Comparative Study on the Genes for Three Porins of the E. coli Outer Membrane." J. Biol. Chem. 258: 6032-6940. (1983).
- 36). Molinari, J., Larraalde, C. "Acquired Immunity to Murine Typhoid Induced in Mice with Ribosomal Fraction of Salmonella typhimurium." Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16: 189-197. (1974).
- 37). Muzuno, T., Chou, M., Inouye, M. "A Unique Mechanism Regulating Gene Expression: Translational Inhibition by a Complementary RNA Transcript." /Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 1966-1970. (1984).
- 38). Nikaido, H. y Nakae, T. "The Outer Membrane of Gram Negative Bacteria." Adv. Microb. Physiol. 20: 163-250. (1979).
- 39). Nikaido, H. y Veara, M. "Molecular Basis of Bacterial Ou-

- ter Membrane Permeability." Microbiol. Rev. 49: 1-32 (1985).
- 40). Oackey,B.,Kirsch,D.,Morris,R. "A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels." Anal. Biochem. 105: 361-363. (1980).
- 41). Ortiz,V.,Isibasi,A.,García,E.,Kumate,J. "Estudio de la inmunogenicidad de PME de S. typhi empleando el método de Inmunolectrotransferencia." Archivos de Investigación Médica. 16 supl.1:6 (1985).
- 42). Osborn,M.,Gander,J.,Parisi,E.,Carson,J. "Mechanism of Assembly of Outer Membrane of S. typhimurium: Isolation and Characterization of Cytoplasmic and Outer Membrane. J. Biol. Chem. 247: 3962. (1972).
- 43). Oshorn,M.,Wu,C. "Proteins of the Outer Membrane of Gram Negative Bacteria." Ann. Rev. Microbiol. 34: 369-432. (1980).
- 44). Pérez,N.,Cabrera,R. "Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica." Rev. Salud Pública de México XV: 185-194. (1974).
- 45). Rosenbusch,J. "Characterization of the Major Envelope Protein from E. coli." J. Biol. Chem. 249: 8019-8029. (1974).
- 46). Schmitges,C. and Henning,U. "The Major Proteins of the E. coli Outer Cell Envelope Membrane. Heterogeneity of Protein I." Eur. J. Biochem. 63: 47-52. (1976).
- 47). Schnaitman,C. "Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid,

- Triton X-100 and Lysozyme on the Morphology and Chemical Composition of the Cell Wall of Escherichia coli." J. Bacteriol. 108: 553-556. (1971).
- 48). Schnaitman, C. "Outer Membrane Proteins of E. coli, III Evidence that the Major Proteins of E. coli OIII Outer Membrane Consist of Four Distinct Polypeptide Species. J. Bacteriol. 118: 442-453. (1974).
- 49). Schneider, C., Newman, R., Sutherland, R., Asser, U., Greaves, M. "A One Step Purification of Membrane Proteins Using a High Efficiency Immunomatrix." J. Biol. Chem. 257: 10766-10769. (1982).
- 50). Smith, R., Biegly, N. "Ribonucleic Acid Protein Fractions of Virulent S. typhimurium as Protective Immunogens. Infect. Immun. 6: 373-383. (1972).
- 51). Tokunaga, H., Tokinaga, M., Nakae, T. "Characterization of Porins from the Outer Membrane of Salmonella typhimurium." Eur. J. Biochem. 95: 433-439. (1979).
- 52). Towbin, H., Stachelin, T., Gordon, J. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedures and Some Applications." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75. (1979).
- 53). Tsai, C., Frasch, C. "A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels." Anal. Biochem. 119: 115-119. (1982).
- 54). Vanneman, M., Brigley, N., Berry, L. "Immunogenicity of Ribonucleic Acid Preparations Obtained from S. typhimurium. Infect. Immun. 1: 574-582. (1970).

- 55). Vargas,M y Tellez-Girón,J. "Evaluación de la actividad protectora de las proteínas de membrana externa de S. typhi en un modelo experimental murino. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán, Oct. 1987.
- 56). Wandan,M.,Serie,C.,Cerisier,Y.,Sallam,S.,Germanier,R. "Controlled Field Trial of Live S. typhi Strain Ty21a Oral Vaccine Against Typhoid: Tree Years Results." J. Infect. Dis. 145: 292-293. (1982).
- 57). Warren,J.,Hornick,R. "Immunization Against Typhoid Fever." Ann. Rev. Med. 30: 457-472. (1979).