

300627



# UNIVERSIDAD LA SALLE

INCORPORADA A LA U. N. A. M.  
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

27  
2ej

OBTENCION DE UNA VACUNA CONTRA LA FIEBRE  
TIFOIDEA A PARTIR DE PORINAS DE  
*Salmonella typhi*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
**R O C I O P A E Z M O L I N A**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ARACELI SÁNCHEZ DE CORRAL

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON  
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.

## INDICE.

I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	2
III. OBJETIVOS.	3
IV. GENERALIDADES.	4
V. MATERIALES Y METODOS.	24
VI. RESULTADOS.	32
VII. DISCUSION DE RESULTADOS.	48
VIII. CONCLUSIONES.	55
IX. REFERENCIAS.	56

## I. RESUMEN.

En base a los resultados de protección reportados por el grupo de Isibasi acerca de las porinas de *Salmonella typhi*, se decidió elaborar una preparación vacunal a partir de dichas proteínas, que presente la ventaja de eliminar los efectos colaterales producidos por las vacunas ya existentes.

Una vez que se obtuvo el producto terminado se llevaron a cabo los ensayos biológicos necesarios para su control de calidad.

Los resultados satisficieron los requisitos que exige la Secretaría de Salud, lo que sugiere que la vacuna está lista para probarse en adultos voluntarios.

## II. INTRODUCCION.

En la década de los años 70's del siglo pasado fue cuando se llevaron a cabo los primeros intentos de hacer una vacuna contra la fiebre tifoidea y desde entonces han surgido diferentes vacunas contra esta enfermedad. Entre ellas se encuentran las vacunas L y K, las cuales están hechas a base de bacterias inactivadas con calor y acetona respectivamente y ambas se administran por vía parenteral (30,80); la vacuna oral de Germanier hecha a base de una cepa de *S. typhi* deficiente en 4-UDP-galactosa epimerasa (24); y la vacuna de Robbins, elaborada a partir de antígeno Vi (70).

Los resultados obtenidos con estas vacunas no han sido del todo buenos, ya que generan entre otras cosas reacciones secundarias por la presencia de endotoxina (31,46), no inducen memoria y su periodo de protección es corto (58). Isibasi y cols, empleando un modelo murino, han demostrado que la inmunización con porinas de *Salmonella typhi* induce una respuesta inmune protectora contra el reto de la bacteria homóloga (33,34).

En base a los antecedentes descritos se propone el desarrollo de una vacuna elaborada a base de porinas de *Salmonella typhi*. Esta tendrá las características idóneas para su aplicación en países donde la fiebre tifoidea es endémica, como es el caso de México.

### III. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL.

Evaluar las características químico-biológicas de una vacuna contra la fiebre tifoidea, a base de porinas de *Salmonella typhi*, para su posible aplicación en humanos.

#### OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Identificar la cepa *S. typhi* por ensayos bioquímicos y serológicos.
- b) Obtener un lote purificado y estéril de porinas a partir de dicha bacteria.
- c) Evaluar la inocuidad de esta preparación vacunal en ratones y cobayos.
- d) Evaluar la potencia y efectividad de esta vacuna en modelos murinos, teniendo como referencia la vacuna celular.
- e) Determinar la estabilidad del producto final.

#### IV. GENERALIDADES.

##### Generalidades de la Fiebre Tifoidea.

La fiebre tifoidea es el resultado de la invasión de *S. typhi* al organismo, infección que es adquirida por vía oral, se inicia por la colonización de la bacteria en el intestino delgado a través de las células M de las placas de Peyer, posteriormente el microorganismo se disemina a la circulación por vía linfática, donde es fagocitado por macrófagos del bazo y células de Kupffer del hígado, siendo estas células su sitio principal de multiplicación, durante esta etapa de la infección (49). Una vez que la bacteria penetra al sistema biliar, la invasión al sistema hepático es facilitada por su resistencia a sales biliares, permitiendo así su multiplicación en forma masiva. De ahí, la salmonela pasa al sistema digestivo para ser finalmente eliminada en las heces; es en esta etapa donde el portador asintomático es el elemento más importante en la cadena de transmisión de la enfermedad.

Cuando la invasión ha sido provocada por grandes cantidades de bacteria, la participación de macrófagos es indispensable para el control de la infección, mientras que frente a pequeños inóculos, la acción de los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de *Salmonella typhi* a la pared intestinal (40,49).

La enfermedad se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea, dolor abdominal e hipotensión, puede presentarse con exantema, esplenomegalia, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (41); sus complicaciones más graves son hemorragia y perforación intestinal pudiendo causar peritonitis. Se sabe que gran parte de estas manifestaciones son provocadas por la liberación de endotoxina.

Aunque la fiebre tifoidea y otras enfermedades relacionadas, han sido controladas en países industrializados a través de medidas de salud pública, en países en vías de desarrollo sigue representando un grave problema, siendo el grupo más afectado el que se encuentra entre las edades de 15 a 44 años (3). Por otro lado, los individuos de mayor edad parecen poseer una relativa inmunidad, probablemente por el hecho de exposiciones frecuentes a dosis moderadas o subinfecciosas del bacilo de la tifoidea (10).

En México, la infección presenta características endémico-epidémicas ligadas al saneamiento ambiental y al almacenamiento de agua potable, así como al rápido incremento de su población y urbanización (25).

#### **Generalidades de *Salmonella typhi*.**

El género *Salmonella* comprende especies patógenas para el hombre o animales o para ambos. Son bacilos flagelados, gram-negativos, aerobios, fermentan glucosa y otros carbohidratos, rara

vez producen abundante ácido sulfhídrico, descarboxilan la lisina y ornitina, son lactosa y sacarosa negativos.

De acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, *S. typhi* pertenece al grupo D y comparte con las especies de su grupo los antígenos somáticos 9 y 12; los flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie se encuentra el antígeno Vi, de naturaleza polisacáridica, además de ser indicador de virulencia (19).

Otros componentes de antigenicidad poco estudiados son la lipoproteína de Braun y las porinas.

#### **Factores de virulencia.**

Los mecanismos de virulencia de *S. typhi* no han sido esclarecidos del todo hasta ahora; sin embargo, se ha comprobado que la importancia de su virulencia depende de la etapa de infección en la que se encuentre la bacteria.

#### **Fase de entrada.**

Nnalue y Lindeberg demostraron que el lipopolisacárido (LPS) facilita la sobrevivencia del bacilo en el tracto gastrointestinal (62). Esto lo comprobaron, mediante el uso de tres cepas mutadas de *S. choleraesuis* deficientes en antígeno O que fueron inoculadas por tres vías diferentes a ratones BALB/c. Cuando los ratones recibieron estas cepas por vía intraperitoneal o intravenosa resultaron ser tan virulentas como la cepa original, mientras que

cuando la vía de inoculación fue oral resultaron ser avirulentas.

#### *Fase de penetración.*

Durante esta etapa la movilidad, capacidad de adherencia y penetración de la bacteria, son factores importantes en la invasión de la mucosa gastrointestinal; por esta razón Jones y cols. comprobaron la importancia de la movilidad del bacilo, mediante experimentos de invasividad de *S. typhimurium* a células HeLa, encontrando que en cepas inmóviles no se producía la invasión, pues no había contacto entre los dos tipos de células, sin embargo, cuando ambas células se centrifugaron la invasión se producía (36). Estos experimentos se repitieron con *S. typhi*, dando resultados contrarios, lo que sugiere que la bacteria requiere de movilidad intrínseca para invadir células epiteliales (47).

#### *Fase de diseminación.*

Una vez que ha penetrado el tejido mucoso, la bacteria se encuentra en el torrente sanguíneo, durante esta fase es probable que el antígeno Vi funcione como factor protector del antígeno O, contra la acción de los anticuerpos o el complemento, evitando así, la fagocitosis y la acción bactericida del suero (49).

#### *Fase de crecimiento intracelular.*

Existen evidencias que apoyan la hipótesis de que la sobrevivencia de *Salmonella* en macrófagos es un factor primordial en la patogenia de la bacteria, por lo que se han propuesto tres

probables mecanismos por los cuales evade su destrucción en el interior de los fagocitos (39): a) inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma; b) interferencia con los metabolitos reactivos del oxígeno o con las enzimas lisosomales y; c) transición en el interior del citoplasma.

Se ha comprobado que *Salmonella* posee cuando menos el segundo mecanismo de evasión. Buchmeier y Heffron demostraron que este proceso requiere una regulación en el genoma bacteriano, que provoca la síntesis de más de 30 proteínas selectivas del periodo de infección de *S. typhi* a macrófagos (6).

Al respecto, en estudios simultáneos, los grupos de Mekalanos (52) y Heffron (26), demostraron que *S. typhimurium* con mutaciones en el locus regulador *phoP* (responsable de la síntesis de una fosfatasa ácida periplásmica) son avirulentas cuando se inyectan en ratones BALB/C, son incapaces de sobrevivir en macrófagos y son extremadamente sensibles a péptidos con actividad antimicrobiana, tales como las defensinas. El locus *phoP* está compuesto de dos genes presentes en un operón: *phoP* y *phoQ*, y las secuencias de aminoácidos de los productos génicos tienen alta homología con otros miembros de reguladores transcripcionales bacterianos de dos componentes que responden a estímulos ambientales, tales como *PhoB* y *OmpR*; por lo que se ha propuesto que existe en *Salmonella* un sistema regulador de dos componentes *phoP/phoQ* que regula la expresión de genes involucrados en virulencia, que codifican para

proteínas de superficie que participan en la resistencia del microorganismo a factores microbicidas del ambiente (53).

Recientemente se han identificado un grupo de proteínas de membrana externa (PME), denominadas porinas (llamadas así por constituir poros de difusión) (59,72) involucradas en la patogénesis de ciertas bacterias, uno de los ejemplos son las porinas de *S. typhimurium* que inducen la activación del complemento por la vía clásica y por la vía alterna (21); además de que son capaces de unirse a leucocitos polimorfonucleares de humanos, afectando la integridad de su membranas y su actividad funcional (78); aparentemente parecen tener relación con la adherencia e invasión de las bacterias a células epiteliales y; son capaces de inducir la liberación de histamina en células epiteliales (20).

#### **Generalidades de vacunas.**

Una vacuna ideal debe inducir inmunidad prolongada, ser específica y no provocar efectos colaterales adversos. Entre las vacunas que cumplen estos requisitos se encuentran las vacunas contra la viruela, difteria, tétanos, sarampión, rubeola y poliomielitis. Sin embargo, se han desarrollado otras vacunas como la de la fiebre tifoidea que tiene los inconvenientes de conferir protección de corta duración y producir efectos colaterales adversos.

Dentro de los conceptos modernos en la elaboración de vacunas se incluyen:

a) Las vacunas de péptidos sintéticos elaboradas en base a la secuencia de algunos determinantes antigénicos involucrados en la inducción de la inmunidad (71).

b) Vacunas recombinantes, elaboradas mediante la expresión en bacterias o virus no patógenos, del gen que codifica para la proteína responsable de la inmunidad (15).

c) Vacunas anti-idiotípicas, basadas en el concepto teórico de la red de idiotipos propuesto originalmente por Oudin y posteriormente por Jerne, en las cuales el anticuerpo representa la imagen del antígeno, que se emplea para inducir el estado de inmunidad protectora (29).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de su programa para el desarrollo de vacunas, ha establecido una estrategia específica para usarse en las investigaciones concernientes al desarrollo de vacunas, la cual comprende los siguientes puntos:

1.- Definir el mecanismo inmunológico por medio del cual se genera la protección después de la adquisición natural de la enfermedad.

2.- Identificar las partes antigénicas del organismo que inducen la protección.

3.- Identificar los genes que codifican para la expresión de los antígenos importantes para la inducción de protección.

4.- Utilizar las nuevas técnicas de biotecnología para producir dichos antígenos.

5.- Determinar inocuidad y eficacia de los antígenos producidos en modelos animales.

6.- Optimizar diseño y sistemas de producción de la vacuna.

7.- Selección del mejor candidato para vacuna.

#### **Fases en el desarrollo de una vacuna.**

Durante el desarrollo de una vacuna la participación de técnicas epidemiológicas que estudian los ensayos de seguridad y eficacia del producto, así como cualquier cambio que pudiese ocurrir durante las pruebas clínicas, son de gran ayuda ya que de los resultados reportados por ellas, dependerá la elaboración de programas de vacunación, cuya finalidad es tener el control sobre la enfermedad a través de la erradicación, eliminación o simplemente por medio de su vigilancia (4). Para algunas enfermedades la erradicación y eliminación son imposibles por lo que el control es su única opción, como es el caso de la fiebre tifoidea.

El objetivo de los estudios preliminares a Fase I, es determinar título de anticuerpos, eficacia y reacciones colaterales en un número reducido de voluntarios.

### *Fase I (Pruebas clínicas).*

En esta etapa se evalúa la seguridad del producto mediante la cooperación de dos grupos (control y prueba) de 50 voluntarios, su edad no será mayor de 50 años, para evitar que las posibles reacciones secundarias que se generen no se atribuyan a la edad del individuo.

Durante esta fase se debe de tener un buen control sobre los participantes para asegurarse que el riesgo sea mínimo, ya que algunos de ellos no recibirán beneficio profiláctico ni terapéutico; sin embargo, la ausencia de riesgo no se puede garantizar (4,28).

### *Fase II.*

Una vez que se ha comprobado su eficacia en humanos, el proceso de manufactura, toxicidad, inmunogenicidad y ensayos de protección realizados en animales, así como los resultados de fase I, se muestran a la Secretaría de Salud.

Su objetivo al igual que en fase I, es medir el título de anticuerpos, así como la naturaleza y frecuencia de las reacciones más comunes, además de que se estudia la relación dosis-respuesta (24).

Se continúa trabajando con dos grupos, cuyo tamaño es de 100 a 200 participantes.

### *Fase III.*

Etapa principal en el desarrollo de un producto, por estar dirigida hacia la población susceptible, además de que se determina su eficacia en regiones de alta incidencia (1,38).

El número de participantes depende primordialmente de tres factores:

- 1.- Incidencia de la enfermedad, indicando factores de riesgo.
- 2.- Eficacia de la vacuna
- 3.- Análisis estadístico

Además, se considera edad, sexo, salud y susceptibilidad entre otras (7).

La población elegida no debe estar afectada por diferencias biológicas, demográficas y de costumbres presentes entre ellos.

La finalidad del grupo placebo es útil solo cuando la incidencia de la infección es alta, su inclusión requiere de cuidado por dos razones, no todos los participantes reciben beneficio y la existencia de evidencias de que en otros países la vacuna sea efectiva; en este último caso no se debe incluir al grupo control (1).

Una vez que la vacuna ha pasado todas las pruebas clínicas, su manufactura y distribución pueden llevarse a cabo, así como la realización de programas de vacunación a nivel nacional, siempre y cuando se compruebe que la nueva vacuna es igual o más segura y eficaz que la vacuna en uso, esto se logra mediante la observación en la reducción de la enfermedad durante el tiempo de prueba, las notificaciones y cartas de defunción también son útiles en el monitoreo de los programas por la información que proporcionan, la que es recopilada por laboratorios y hospitales (4).

En caso de que se presenten infecciones o intoxicaciones en individuos vacunados, se debe determinar la etiología de la enfermedad, para evitar resultados erróneos.

Ninguna vacuna puede considerarse enteramente segura, esto es por cambios que pudiesen ocurrir en potencia, manufactura, almacenaje, vía de administración y aún en la población susceptible, por lo que muestras representativas de cada lote deberán ser almacenadas para pruebas posteriores (4).

#### **Vacunas contra la fiebre tifoidea.**

Los intentos para obtener una vacuna contra la fiebre tifoidea se remontan a fines del siglo pasado.

Estos se iniciaron con la inmunización de suspensiones de *S. typhi* viva, teniendo éxito en conejos y en ratones. Posteriormente

se emplearon bacilos muertos con el mismo propósito, lo que dió pie a que durante los 70 años posteriores, las investigaciones se enfocaran en vacunas parenterales de bacterias inactivadas por calor que fueron aplicadas en India, Egipto, Italia y Sudáfrica, generando una disminución significativa en la morbilidad, así como en la atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que se contagiaron con el bacilo (67,80); el uso de este tipo de vacunas continuó durante décadas sin demostrarse su eficacia real. En 1925, Besredka propuso el empleo de bacterias vivas atenuadas administradas por vía oral, aplicándose a soldados del ejército francés, los resultados no fueron alentadores ya que algunos de los individuos vacunados murieron (23,40).

No fue hasta 1955, cuando se hicieron estudios de campo auspiciados por la OMS en Yugoslavia, Polonia y la Unión Soviética, en donde se comprobó la eficacia de tres vacunas preparadas con células enteras de *S. typhi*, inactivadas ya sea con acetona, calor-fenol o alcohol. La primera también es conocida como vacuna K, y confirió mayor protección y duración, mientras que la L o la inactivada con calor y fenol, mostró menor eficacia que la K, la última fue la menos efectiva (8,27,67).

Aunque la protección inducida por una sola dosis de las vacunas K y L era aceptable, el empleo de dos dosis proporcionaba una inmunidad más confiable y de mayor duración (80).

Estas vacunas resultaron imprácticas para su aplicación masiva (46), pues los efectos colaterales que producen y la baja protección que generan no son las idóneas. El hecho de que las vacunas parenterales no son efectivas, ha motivado la búsqueda de nuevos inmunógenos. Hasta ahora se han estudiado dos vacunas orales y elaboradas a partir de bacteria viva de *S. typhi*, una de ellas es dependiente de aminoácidos aromáticos (45,69) y la otra es una mutante deficiente en 4-UDP-galactosa epimerasa (24), desarrollada por Germanier (Ty21a); los inconvenientes de esta última vacuna son su alto costo y la falta de una protección realmente efectiva y duradera en regiones donde la fiebre tifoidea es endémica (84), sin embargo, induce respuesta inmune humoral y celular a los antígenos proteínicos, incluyendo porinas de *S. typhi*.

La efectividad de ambas vacunas se evaluó en voluntarios, los resultados de la protección conferida por la cepa dependiente de estreptomycin fueron contradictorios (45), mientras que la vacuna de Germanier protegió al 87% de los individuos inmunizados (22).

A pesar de estos avances, la naturaleza de los antígenos de *S. typhi* relacionados con la respuesta inmune, no han sido totalmente esclarecidos. Las mayoría de las investigaciones encaminadas a estudiar estos inmunógenos, se han enfocado hacia los antígenos presentes en la superficie bacteriana, que son el somático O, capsular Vi y flagelar H.

Se ha demostrado que una vacuna a base del oligosacárido de repetición del LPS induce protección escasa y de corta duración en un modelo murino, a pesar de haberlo unido a proteínas (76). De igual manera el antígeno flagelar tampoco está relacionado con la inmunidad protectora, esto lo demostraron Tully y cols. a través de la inducción de anticuerpos contra el antígeno H con una cepa rugosa de *S. typhi*, en donde a pesar de tener títulos altos de anticuerpos, éstos no fueron protectores (79).

Más tarde Anderson demostró que ratones inmunizados con una mutante de *S. typhi* sin flagelos se obtenía el mismo grado de protección que los inmunizados con cepas móviles (2).

Al igual que el antígeno somático, el antígeno Vi también ha sido objeto de muchos estudios, sin embargo, varios investigadores han demostrado la falta de correlación entre los anticuerpos anti-Vi y un estado inmune protector, mientras que otros estudios revelan que el antígeno Vi es capaz de inducir protección por sí solo (70,77,85). Además, se ha encontrado que anticuerpos dirigidos contra el antígeno Vi parecen facilitar la fagocitosis, ya que bacterias con este antígeno capsular son típicamente resistentes a la fagocitosis en la ausencia de anticuerpos específicos (53).

En base a estos antecedentes Robbins y Robbins, desarrollaron una vacuna contra la fiebre tifoidea a partir de dicho antígeno (70); esta vacuna es preparada por el Instituto Merieux y ha sido

evaluada en estudios de campo en Nepal (1) y Africa del Sur (38). Los reportes de este estudio muestran una eficacia de 72 y 64%, respectivamente. Una desventaja de esta vacuna es que como el polisacárido es un antígeno timo-independiente, no genera respuesta inmune celular ni se desarrollan efectivamente células de memoria para inmunizaciones o retos posteriores (58). Por lo que se ha sugerido conjugarlo químicamente a proteínas para darle características de antígeno T-dependiente (77).

Ambas vacunas, la elaborada con la cepa Ty21a y la del antígeno Vi, han mostrado ser prácticamente inocuas con un buen grado de eficacia. Algunos esquemas recomiendan su aplicación simultánea en programas de vacunación (46). Esta estrategia podría realizarse en personas de países desarrollados que viajan a regiones donde la fiebre tifoidea es endémica; sin embargo, en los países del tercer mundo, es inaccesible debido a su alto costo y a lo impráctico de su aplicación.

Stocker y cols han desarrollado una mutante de *Salmonella typhi* auxotrófica aro<sup>-</sup> pur<sup>-</sup> para administrarla por vía oral, estas mutaciones causan dependencia nutricional de la bacteria por metabolitos que no se encuentran en los tejidos de los mamíferos, por lo que no son capaces de sobrevivir en ellos. Los resultados preliminares muestran que su utilización es segura en humanos y es capaz de inducir respuesta inmune celular; sin embargo, la respuesta serológica es pobre aún después de la ingestión de

grandes cantidades de bacteria, lo que sugiere que la cepa resulta ser muy atenuada (75), por lo que se han tratado de desarrollar cepas bacterianas que contengan una sola mutación.

Ya que las proteínas de membrana externa (PME) se encuentran en la superficie de las bacterias gram-negativas, y son accesibles a las células del sistema inmune, se considera que pueden ser antígenos importantes en la inducción de una respuesta inmune protectora específica, por esto, varios grupos de investigación han realizado estudios para evaluar la capacidad protectora de las PME de bacterias gram-negativas como *S.typhi* (34), *S. typhimurium* (43,51,81), *Haemophilus influenzae* (37), etc., en modelos murinos con resultados alentadores.

#### **Papel de las porinas.**

La membrana externa de las bacterias gram-negativas está formada por LPS, fosfolípidos y proteínas; estas últimas aparentemente son las responsables de las funciones de la membrana como son el transporte de iones y de algunos nutrientes, así como de la relación hospedero-parásito, además de servir como sitio de reconocimiento de ciertos fagos (61).

Según su abundancia se clasifican en proteínas principales y menores, dentro de la primeras se encuentran las porinas o proteínas matrices.

Se les llamó proteínas matrices por estar unidas en forma no covalente a la peptidoglicana (9), formando canales que permiten el transporte pasivo de moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular (48,60,61), se encuentran en forma regular en la superficie de la membrana externa formando estructuras triangulares constituidas por homotrímeros (61,64,68).

Kussi y cols. demostraron que las porinas, extraídas de una cepa rugosa de *S. typhimurium* protegen al ratón de un reto con una cepa lisa de la bacteria homóloga (42,43).

Otra ventaja que ofrecen las porinas es la de generar una respuesta inmune celular y de memoria (51).

Youmans y Youmans, demostraron que la fracción ribosomal de *Mycobacterium tuberculosis* inducía inmunidad protectora en el ratón contra el reto del microorganismo homólogo. Estos resultados condujeron al aislamiento de estas fracciones de diferentes bacterias e investigar su capacidad protectora (87). En 1970, se reportó que las fracciones ribosomales de *S. typhimurium* generaban protección contra la bacteria virulenta en el ratón (83). En trabajos posteriores se demostró que las fracciones ribosomales de *S. typhi* también inducían protección en ratones (57).

Con el fin de encontrar a los antígenos responsables de la protección inducida por estas fracciones ribosomales se han

realizado varios estudios, con resultados muy diversos. En los primeros trabajos, acreditaron al RNA ribosomal como el antígeno protector. Johnson presentó evidencias de que eran las proteínas ribosomales las que protegían a los ratones (35); en tanto que Smith y Biegly sugirieron que ambos antígenos, el RNA y las proteínas, se requerían para obtener una buena protección (73); sin embargo trabajos posteriores, demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella* se encontraban contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular (12,54). Más aún, Misfeldt y Johnson demostraron que las proteínas de la envoltura celular de *Salmonella typhimurium* protegían a los ratones contra la infección por esta bacteria, en un grado semejante al inducido por las fracciones ribosomales (55,56). Estos experimentos ponen en duda la efectividad de las fracciones ribosomales y apoyan la hipótesis de que los antígenos protectores de *Salmonella* se localizan en la superficie de la bacteria (50).

En base a estos antecedentes el grupo de Isibasi estudió el papel que juegan las porinas de *S. typhi* en la inducción de la protección activa contra el reto del bacilo en modelos murinos, demostrando que cantidades pequeñas de proteína eran capaces de inducir una protección de hasta el 100%, estas y otras evidencias proporcionaron resultados importantes como son:

a) Los pacientes con fiebre tifoidea produjeron anticuerpos de clase IgM hacia una PME de 28 KDa durante la fase aguda de su

padecimiento. En la convalecencia, la respuesta fue de IgG y se dirigió hacia las porinas (36 a 41 KDa) (63).

b) La administración pasiva de suero de conejo anti-PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d, confirió protección del 100% al reto con 100 DL<sub>50</sub> de *S. typhi* 9,12,Vi:d y *S. typhi* Ty2; y del 80% al reto con *S. typhimurium* (34).

c) El suero de conejo anti-PME utilizado en el ensayo de protección pasiva reconoció por inmunoelectrotransferencia, todas las PME de ambas cepas de *S. typhi* empleadas en el reto, pero solamente a las porinas de *S. typhimurium* (34).

d) Las porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d purificadas por cromatografía de exclusión molecular, electroelución e inmunoabsorbente tuvieron un pI de 4.0 a 5.0 y pesos moleculares de 114 a 128 KDa en estado nativo (cuando se encuentran asociados en forma de homotrimeros) y de 36 a 41 KDa en su forma monomérica, con una contaminación por LPS del 0.04% (66).

e) Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d confirmieron una protección del 60% al reto con 20 DL<sub>50</sub> de *S. typhi* 9,12,Vi:d (32), mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no produjeron ningún efecto (65).

f) La administración de vacuna anti-tifoídica oral indujo, en las personas estudiadas, la producción de anticuerpos anti-porinas cuantificados por el método de ELISA (5).

g) La vacunación de ratones NIH con 10  $\mu$ g de porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d indujo protección de 100% contra el reto de 500 DL<sub>50</sub> de la misma bacteria (33).

En base a estos resultados obtenidos, se decidió desarrollar una vacuna contra la fiebre tifoidea, por lo que en este trabajo se reportan las pruebas preliminares a la fase I.

## V. MATERIALES Y METODOS

### Animales de experimentación.

La toxicidad de la vacuna se evaluó en grupos de ratones de la cepa BALB/c de 13-15 gr de peso y en cobayos de 350 gr. Tres ratones de la misma cepa fueron usados para el ensayo de potencia, mientras que para la prueba de eficacia se usaron diez. Para la determinación de pirógenos se usaron conejos Nueva Zelanda y para el ensayo de estabilidad se usaron grupos de dos ratones.

### Identificación de la cepa.

Se utilizó la cepa de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, que fue caracterizada serológicamente por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la S.S. y bioquímicamente en el laboratorio.

### Obtención de antígenos.

Las bacterias se cultivaron a 37°C durante 16 hr, (fase logarítmica) en medio mínimo A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa, una vez terminado su cultivo estacionario, se pasaron a garrafones de 4 lt en un incubador rotatorio (New Brunswick Scientific Co.) por un periodo de 8 hr. Posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4°C (Sorval, Ins.), la pastilla obtenida se resuspendió en solución amortiguadora de Hepes (ácido N-2-hidroxietyl-N'-2-etano sulfónico) 0.01 M pH 7.4, conservándose en congelación hasta su uso. Durante

el cultivo de *S. typhi* se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria. Después la bacteria se recuperó en amortiguador Tris (Hidroximetilamino metano) 0.01 M pH 7.7, ajustando su absorbancia entre 1 y 1.5 a 660 nm para romperse posteriormente en un sonicador (Labline Ultratrip Labsonic System Sonicator), con intervalos de 4 min. de descanso y 1 de trabajo en baño de hielo, hasta disminuir su densidad óptica a 0.3 o 0.4. Las bacterias enteras que quedaron en la suspensión sonicada se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante se trató con DNasa y RNasa para disminuir viscosidad y eliminar ácidos nucleicos.

Las porinas de *S. typhi* fueron purificadas por una modificación al método de Nikaido (61), realizado de la siguiente manera:

1.- Concentración de membranas por ultracentrifugación a 35000 rpm por 30 min a 4°C (LS 80 ultracentrifuge Beckman Instruments, Inc.)

2.- Solubilización en Tris 0.01 M, pH 7.7, SDS al 2%

3.- Incubación por 30 min a 32°C

4.- Ultracentrifugación a 35000 rpm por 30 min a 20°C.

5.- Una segunda solubilización en la condiciones descritas.

6.- Extracción de porinas de la peptidoglicana mediante solubilización con Tris 0.05 M, pH 7.7, SDS 2%, EDTA 5mM, NaCl 0.4 M y 2-mercaptoetanol 0.05%.

7.- Incubación por 2 hr a 37°C

8.- Ultracentrifugación a 20000 rpm por 1 hr.

9.- Elución del sobrenadante por una columna de 80 x 2.6 cm de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical Co.), con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min, recuperándose fracciones de 3 ml/tubo en un colector (LKB Instruments.)

10.- Detección de las porinas a 280 nm mediante la recuperación de las fracciones que salen inmediatamente después del volumen vacío.

11.- Diálisis de las porinas en solución salina fisiológica (SSF).

#### **Esterilización por membrana.**

Las porinas obtenidas se pasaron por un filtro estéril de 0.22 µm. Los recipientes de vidrio, en los que se recibió el filtrado, se esterilizaron a 250°C por 30 minutos, los tapones se esterilizaron por calor húmedo.

#### **Determinación de proteínas.**

La cuantificación de proteínas en la preparación de porinas, se realizó de acuerdo a una curva estándar de albúmina sérica bovina, usada como proteína de referencia (Sigma Co).

#### **Envasado.**

Los envases se llenaron con un ligero exceso respecto al volumen indicado en el marbete, para permitir la extracción total del volumen deseado como lo indica la Farmacopea de 1974 (17).

Cada uno de los contenedores fue llenado con 2.15 ml en una campana de flujo laminar en donde no se tuvo contacto directo con el material previamente esterilizado.

#### Caracterización del agente vacunal.

La caracterización del antígeno se realizó por corrimiento de muestras finales en electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) según la técnica descrita por Laemlli (44).

La SDS-PAGE de porinas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments.) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos. El gel separador contenía 11.2% de acrilamida, 0.25% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

El corrimiento electroforético se llevo a cabo empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente los geles se tñieron durante 1 hr en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se decoloraron empleando una

solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fue transparente.

#### **Análisis microbiológico.**

Muestras representativas del lote final se cultivaron en medio infusión cerebro-corazón (BHI) por un periodo de 7 días a 37°C.

#### **Seguridad del producto (inocuidad).**

Para esta prueba, se usaron grupos de dos cobayos de 350 g de peso aproximado, y de dos ratones de 15 a 18 gr de peso. El producto se inoculó por vía intraperitoneal (i.p.) con 25 µg de proteína, la duración de la prueba fue de 7 días; se incluyeron grupos testigo de cada especie a los que se les inoculó por la misma vía 250 µl de SSF.

#### **Pirógenos.**

La prueba se determinó por inyección intravenosa de la vacuna en la vena marginal de conejos. La vacuna se diluyó con solución salina libre de pirógenos a modo de obtener una concentración final de 25 µg/ml, el criterio de aceptación del producto, se basó en el incremento de temperatura de cada uno de los animales, como lo establece la quinta edición de la Farmacopea Nacional (18). Esta prueba fue realizada por personal especializado en el Laboratorio Nacional de Salud Pública de la Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario.

#### **Determinación de Lipopolisacárido.**

La contaminación del producto con endotoxina se determinó por el lisado de amebocito de *Limulus polyphemus* descrito por Yin y cols. (86) Se tuvo como referencia un control positivo (LPS de *S. typhi*) y otro negativo (agua tipo inyectable).

#### **Ajuste de la bacteria.**

La bacteria empleada para los ensayos de protección, se creció en medio BHI, durante 16 hrs. Después de la incubación, se resembró en fase logarítmica (5 hrs), y su concentración se ajustó en SSF a una D.O. de 0.59-0.61, a 540 nm, lo que equivale a una concentración de  $10^9$  bacterias/ml. A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas de la bacteria hasta llegar a la concentración deseada (500 y 100  $DL_{50}$ ). El ajuste bacteriano, se comprobó haciendo una cuenta en placa en medio BHI, de las dos últimas diluciones bacterianas.

Una vez ajustada la bacteria en mucina, los ratones fueron retados con su respectiva dosis letal.

#### **Eficacia.**

La eficacia de la preparación vacunal se evaluó por su capacidad de inducir protección ante el reto de la bacteria homóloga en un modelo murino, en la que se tuvo como referencia a la vacuna celular de *S. typhi* Ty2 y como grupos control a ratones inoculados con mucina y con *S. typhi* 9,12,Vi:d.

### **Inmunogenicidad.**

Para este ensayo grupos de 3 ratones se inmunizaron con 25  $\mu$ g de la preparación vacunal, o con la vacuna celular de *S. typhi* Ty2 (como referencia) los días 0, 7 y 14. Se obtuvo suero de ratones inmunes y testigo los días 7, 14 y 21 y se evaluó la presencia de anticuerpos por el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) (16), según se describe a continuación.

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.), con 100  $\mu$ l/pozo de una solución de 5 y 10  $\mu$ g/ml de porinas en amortiguador de carbonatos 2 hrs a 37°C y posteriormente a 4°C toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó 4 veces con PBS-tween al 0.1% (PBS-t) y se llenaron los pozos con solución de bloqueo (PBS-leche al 5%) y se dejaron 1:30 hrs a 37°C, luego, se agregaron 100  $\mu$ l de diluciones de sueros y se incubó la placa 1.5 hrs a 37°C; después de 6 lavados con PBS-t se agregaron 100  $\mu$ l del conjugado (anti-conejo y anti-ratón conjugadas a peroxidasa [Sigma Co]) y se incubó la placa 1.5 hrs a 37°C, después de 6 lavados con PBS-t se adicionaron 100  $\mu$ l de solución de sustrato (o-fenilen diamina, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en amortiguador de citratos pH 5.6) y a los 10 min. la reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2.5 N. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatec).

**Vida de anaquel.**

Se determinó mediante la observación del producto a diferentes tiempos y temperaturas. Durante cada intervalo de observación (15, 30 y 60 días) se realizaron ensayos de inocuidad y de eficacia, como se describió previamente.

## VI. RESULTADOS.

### Identificación de la cepa bacteriana.

Con el fin de asegurar la pureza de la semilla de *S. typhi*, se llevaron a cabo siembras por aislamiento en tres medios diferentes (BHI, Mc Conkey y agar sangre). De las colonias crecidas en cada uno de ellos se hicieron pruebas bioquímicas que sirvieron para la identificación de la bacteria.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en cada uno de los medios

	MIO	TSI	C. de Simmons
BHI	+ - -	- + -	-
Agar sangre	+ - -	- + -	-
Mc Conkey	+ - -	- + -	-

BHI = Infusión Cerebro Corazón

MIO = Movimiento Indol Ornitina

TSI = Triple Azúcar Hierro

Estos resultados demuestran la pureza del inóculo inicial.

### **Obtención del antígeno**

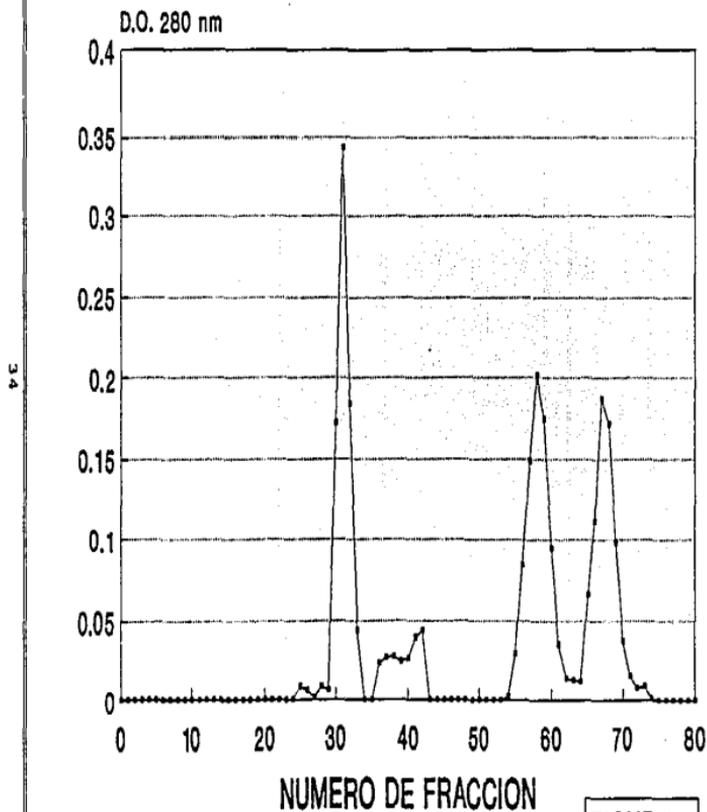
Las PME obtenidas por el método de Nikaido (61) se purificaron en columna de exclusión molecular (Sephacryl S-200) obteniéndose el perfil cromatográfico que se muestra en la figura 1, la fracción que levigó inmediatamente después del volumen vacío (fracciones 30-32) correspondió a las porinas, cuyo peso molecular en forma nativa es de 120 KDa aproximadamente.

### **Caracterización del agente vacunal**

La identificación de la proteína se evaluó a través de un seguimiento de la técnica de Nikaido por SDS-PAGE, que se muestra en la figura 2. Los carriles 1 y 10 corresponden a marcadores de pesos moleculares; 2 Sonicado; 3 Concentración de bacteria no sonicada; 4 Concentración de membrana; 5 y 6 Primera y segunda extracción con Tris-SDS-HCl, respectivamente; 7 Pastilla de Nikaido; 8 Porinas concentradas antes de pasar por columna y 9 Porinas envasadas.

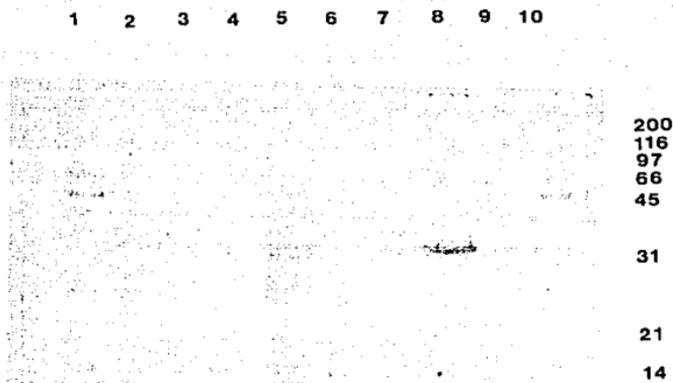
El corrimiento electroforético de las porinas muestra dos bandas, que en condiciones reductoras (monómeros) tienen un peso molecular de 36 a 41 KDa.

# CROMATOGRAMA DE PORINAS



VOLUMEN FRACCION = 4 ml

FIGURA 1



**Figura 2. Corrimiento Electroforético de las Proteínas.**

En los carriles 1 y 10 se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a: Lisozima (14 Kd), Inhibidor de tripsina (21 Kd), Anhidrasa carbónica (31 Kd), Ovoalbúmina (45 Kd), Albúmina sérica bovina (66 Kd), Fosforilasa B (97 Kd),  $\beta$ -Galactosidasa (116 Kd) y Miosina (200 Kd).

#### **Determinación de proteína.**

Esta prueba se evaluó usando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de referencia, mediante la lectura a 280 nm. La intrepolación de la D.O. de las porinas (0.3015) indicó que se tuvo una concentración de 12.5015 mg en 35 ml, por lo que su concentración por ml fue de 357  $\mu\text{g}$ . Finalmente se pasaron por una membrana estéril de 0.22  $\mu\text{m}$ , dando una concentración final de 25  $\mu\text{g}$  en 250  $\mu\text{l}$ , lo correspondiente a una dosis vacunal (figura 3).

#### **Seguridad del producto.**

El producto final se consideró seguro, ya que los animales sobrevivieron al periodo de la prueba sin presentar síntomas significativos de toxicidad ni pérdida de peso. Estos resultados se muestran en la figura 4.

# DETERMINACION DE PROTEINA

## - CURVA ESTANDAR DE BSA -

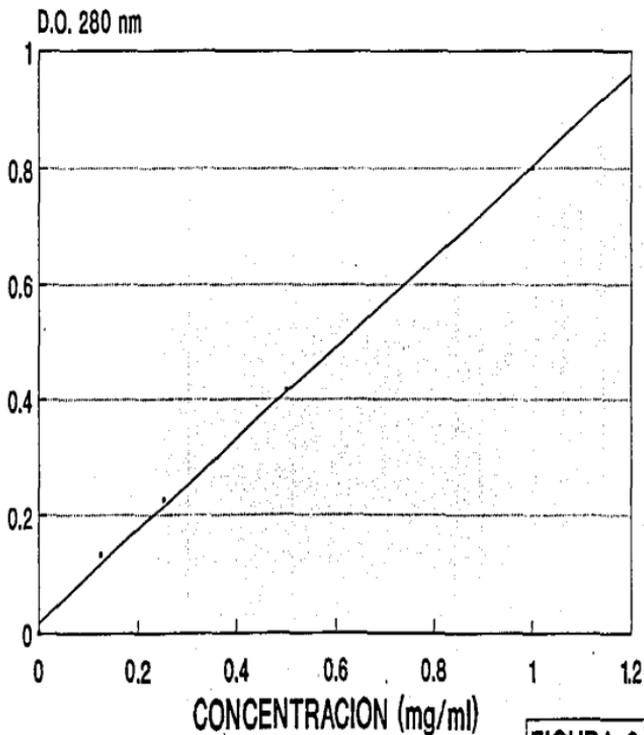
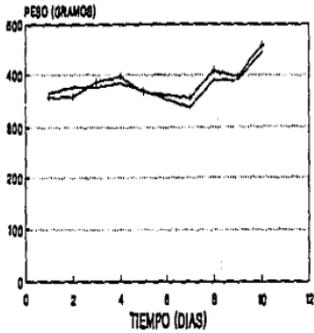


FIGURA 3

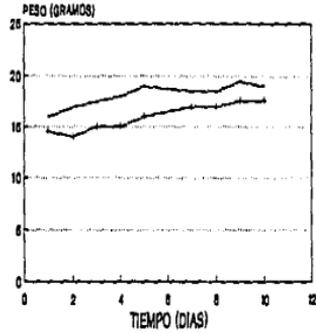
# SEGURIDAD DE PORINAS

## SEGURIDAD EN COBAYOS



— COBAYO CONTROL    ··· COBAYO POR

## SEGURIDAD EN RATONES



— RATON CONTROL    ··· RATON POR

FIGURA 4

### Análisis microbiológico

Las pruebas de esterilidad para la vacuna de porinas se realizaron durante su proceso de fabricación y envasado, las muestras se observaron durante 7 días. Se considera que el producto satisface las especificaciones de las pruebas de esterilidad, ya que no se observaron cambios en los medios de cultivo usados. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

	Ctl	tapones	vial	S.S.F.	Vacuna	envase
1 <sup>er</sup> día	-	-	+	-	-	-
2 <sup>o</sup> día	+	-	+	-	-	-
3 <sup>er</sup> día	+	-	+	+	-	-
4 <sup>o</sup> día	+	-	+	+	-	-
5 <sup>o</sup> día	+	-	+	+	-	-
6 <sup>o</sup> día	+	-	+	+	-	-
7 <sup>o</sup> día	+	-	+	+	-	-

### **Pirógenos**

Esta prueba se realizó fuera de las instalaciones del Instituto Nacional de Higiene; se enviaron 3 muestras que contenían una dosis vacunal en 1 ml, sin embargo se volvió a hacer una segunda dilución (1:5) en la que se obtuvo una concentración final de 5 µg/ml, esto en base a la estrategia empleada para la vacuna "Typhim Vi", ya que el Instituto Mérieux realiza una dilución 1:10 para determinar la presencia de pirógenos en el producto.

Esta dilución de 5 µg/ml fue la que se inyectó en la vena marginal de la oreja del conejo, obteniéndose resultados negativos. Estos resultados se muestran en la hoja siguiente.

### **Determinación de endotoxina (LAL).**

A pesar de que el fundamento de la reacción no es del todo entendida, se sabe que la presencia de endotoxina en la muestra se aprecia ya sea por un aumento en la opacidad o viscosidad del lisado del amebocito de *Limulus polyphemus* (LAL) (86); un resultado positivo se identifica por la formación de un gel consistente, mientras que uno negativo se muestra por la no gelificación de los amebocitos de limulus. La sensibilidad de la prueba es de 0.05-0.1 Unidades de Endotoxina (UE) por vial (Sigma, Co.).



SECRETARIA  
DE SALUD

DEPENDENCIA	SUBSECRETARIA DE REGULACION Y FOMENTO SANITARIO.
SECCION	LAB. MAL. DE SALUD PUBLICA.
MES	EVAL. DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS.
NUMERO DEL OFICIO	02213
EXPEDIENTE	ALPAM 4492 TORRELO GUERRA 14050

**ASUNTO:** Informe del análisis practicado al producto: VACUNA EXPERIMENTAL.  
Lote: 0001.  
Solicitud: 2062/0398.  
Recepción: 14-05-92.

México, D.F., a

02 JUN. 1992

DR. JUAN RUIZ GOMEZ.  
GERENTE GENERAL DE BIOLÓGICOS  
Y REACTIVOS.  
AMORES 1240. COL. DEL VALLE.  
03100-MEXICO, D.F.,

**DIRECTO**

Pirógenos suma del incremento máximo de temperatura en 3 animales °C..... 1.1 Pasa la prueba

Referencia: F.E.U.M., 5a., Edición., 1988.

**CONCLUSIONES:** Los ensayos reportados cumplen con las especificaciones de la literatura mencionada.

A T E N T A M E N T E .  
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCION.  
LA DIRECTORA.

*Ofelia Saldate Castañeda*  
QBP. OFELIA SALDATE CASTAÑEDA.

14 JUN 1992

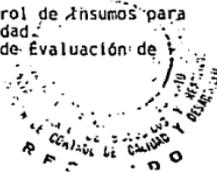
C.c.p. Dr. Julián Villarreal C.-Director Gral. de Control de Insumos para la Salud.- Mariano Escobedo 373, 6o. Piso.- Ciudad.  
C.c.p. QBP. Silvia Pérez de la Mora.- Jefe Del Depto. de Evaluación de Productos Biológicos.- Edificio.

OSC:RGR'SPM fqa.

REG: 0249.

AL CONTRARIA ESTE OFICIO CIERRE UN  
BASTO CONFECCION EN EL CUADRO DEL  
ANOTADO AUTOMATOR MEXICITEC.

**DIRECTO**



Esta técnica se realizó con tres viales, dos de ellos se usaron como controles y el tercero fue para determinar la presencia de endotoxina en la vacuna. Ambos controles dieron los resultados esperados y la muestra problema resultó ser negativa, sin embargo, tanto la opacidad como la turbidez del reactivo aumentaron, esto indica que el producto a pesar de ser negativo al ensayo, no esta exento de LPS.

#### **Eficacia.**

Tanto la vacuna celular como la de porinas resultaron ser eficaces, ya que ambas dieron un 100% de protección. Como control positivo se inocularon ratones con 500 y 100 DL<sub>50</sub> (dosis reto).

Para verificar que la solución de mucina no se encontraba contaminada, se inmunizaron i.p. a ratones testigo; el porciento de sobrevivencia fue del 100% (figura 5).

# EVALUACION DE EFICACIA PORCIENTO DE PROTECCION

43

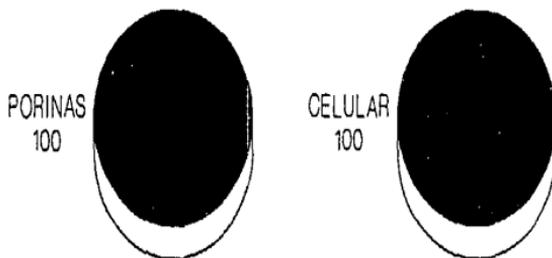


FIGURA 5

### **Inmunogenicidad.**

El título de anticuerpos anti-porinas en el suero de ratones inmunizados con la preparación de porinas o con la vacuna celular, se muestra en la figura 6.

Los niveles de anticuerpos anti-porinas, medidos por ELISA en ratones inmunizados por porinas, se encuentran dentro del intervalo de 0.25 (día 14) unidades de densidad óptica para la dilución 1:50 y 0.010 para la última dilución (1:6400), mientras que el título de anticuerpos alcanzados por la vacuna celular fue alrededor de 0.05 unidades de densidad óptica a la dilución 1:50; en cambio los ratones control presentaron niveles menores a 0.070.

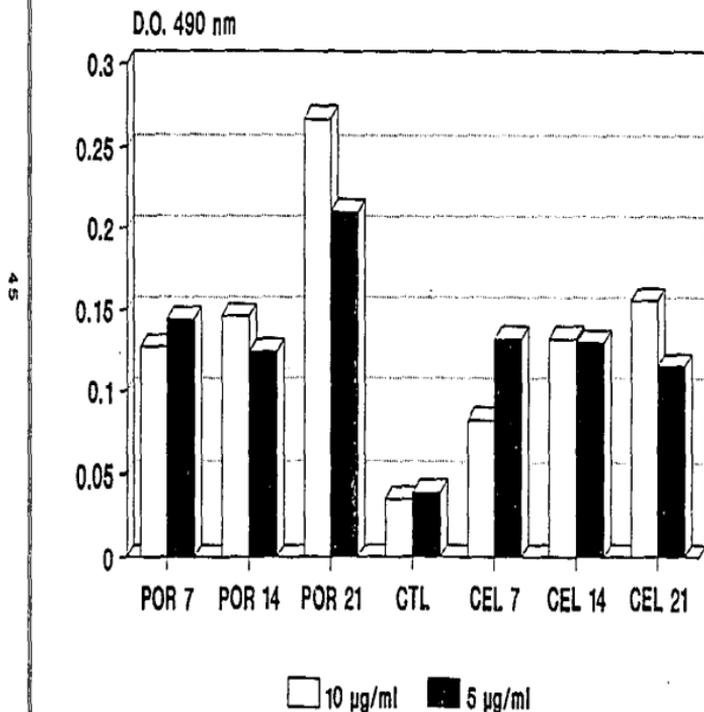
### **Vida de anaquel.**

Para determinar la estabilidad del producto, éste se conservó bajo dos condiciones de temperatura: ambiente y 4°C. Terminado el periodo de conservación, se inocularon ratones con una dosis vacunal, y se registraron los cambios de peso durante una semana. Como se puede observar en las figuras 7 y 8, no se presentaron cambios importantes, comparados con los ratones testigo que fueron inoculados con SSF.

Estos resultados demuestran que la preparación de porinas es estable a temperatura ambiente, aunque dada sus características químicas, se recomienda se conserve en refrigeración.

# INMUNOGENICIDAD

- TITULO DE ANTICUERPOS POR ELISA -



DILUCION 1:50

FIGURA 6

# VIDA DE ANAQUEL

## 15 DIAS

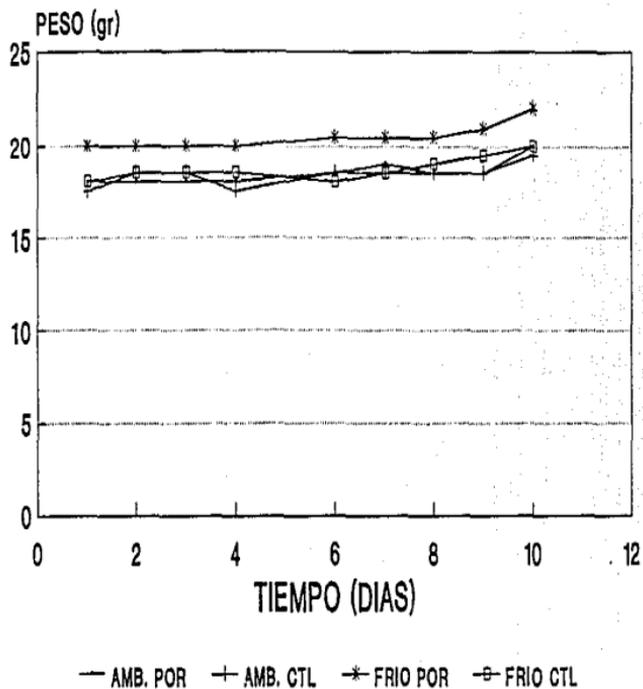
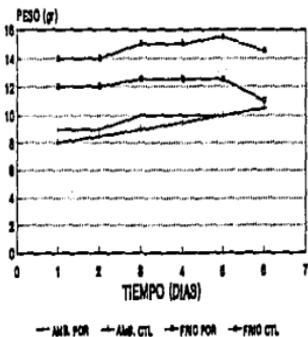
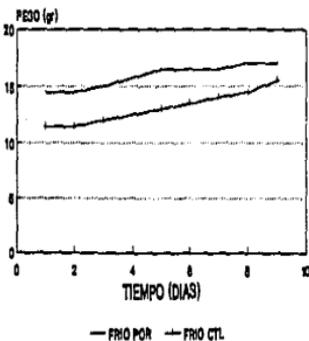


FIGURA 7

### VIDA DE ANAQUEL 30 DIAS



### VIDA DE ANAQUEL 60 DIAS

**FIGURA 8**

## VII. DISCUSION DE RESULTADOS.

A pesar de que se han desarrollado diversas vacunas contra la fiebre tifoidea, que han ayudado a disminuir tanto la morbilidad como mortalidad en los países subdesarrollados (24,30,80), ésta sigue representando un problema de salud pública. La situación económica por la que atraviesan estos países, no les permite eliminar este tipo de enfermedades ni a corto ni a largo plazo, por ésto, el desarrollo de una vacuna contra esta infección sigue siendo una alternativa para su control (46).

Con este propósito se elaboró un agente vacunal, al que se le realizaron ensayos de control químico y biológico. Después de haber pasado éstos y otros ensayos preliminares, que aseguraron tanto su inocuidad como eficacia, la vacuna puede aplicarse previamente en adultos voluntarios, para posteriormente pasar a las Fases I, II y III.

Los ensayos que se llevaron a cabo fueron: identificación de la semilla bacteriana mediante el uso de pruebas bioquímicas y serológicas, (una serotipificación es más confiable que las pruebas bioquímicas por la especificidad que presenta hacia la bacteria). El objetivo de esta prueba fue el tener la certeza de que el microorganismo con el que se trabajó durante la obtención de biomasa y antígeno proteínico, era el responsable de la etiología de la enfermedad; otra de las razones fue que en el laboratorio se

trabaja con dos tipos de cepas, *S. typhi* y *E. coli*, por lo que la realización de un control microbiológico durante el proceso de siembra, cosecha y sonicado de la bacteria, fue necesario; este último control se hizo mediante la siembra de alícuotas de cada etapa del proceso, en medios nutritivos con sus correspondientes pruebas de identificación. Los resultados fueron iguales que los reportados en la tabla 1.

La biomasa obtenida se rompió para facilitar la separación de las porinas de la membrana celular y finalmente ser purificadas por cromatografía de exclusión molecular. Cada pico fue identificado por electroforesis, el primero correspondió a las porinas y los siguientes probablemente fueron otras proteínas no detectadas, ya sea por tener una baja concentración o porque estos picos no corresponden a proteínas sino al LPS presente en la bacteria.

A pesar de que el método de Nikaido permite la extracción de las porinas con una baja cantidad de LPS (32), se realizaron las pruebas de LAL y pirógenos en conejos, que determinaron de manera semicuantitativa y cualitativa la cantidad de endotoxina presente en la muestra (84). La diferencia que existe entre ambos ensayos, es que el primero sólo detecta LPS y el segundo todo tipo de pirógenos, por otra parte las ventajas que ofrece la técnica de LAL son la reducción de costos y tiempo, así como la alta sensibilidad y sencillez de la prueba.

Los resultados fueron negativos para ambas pruebas, esto significa que el producto presentó menos de 0.1 UE/vial, según la prueba de LAL, mientras que el ensayo con conejos indica que a la dilución 1:5, la cantidad de pirógenos presentes en la vacuna es mínima, debido a que no indujo a un aumento apreciable en la temperatura de los animales.

Lo anterior es de vital importancia ya que de la cantidad de pirógenos presentes en la vacuna, dependerá la ausencia o presencia de efectos secundarios en el hombre.

Efectos colaterales tales como erizamiento de pelo, temblor generalizado, etc. se observaron en el ensayo de potencia y eficacia, cuando los ratones fueron inoculados con la vacuna celular L. Esto no pasó con la vacuna de porinas, comprobando así los resultados obtenidos por la prueba de pirógenos.

Otra de las pruebas realizadas fue la de esterilidad de la vacuna; este ensayo es uno de los de mayor importancia, porque en caso de que el producto esté contaminado no se podrían realizar el resto de los ensayos. En nuestro caso se comprobó a través de la siembra del producto en medio BHI y no en medios selectivos, esto para permitir el crecimiento de cualquier tipo de microorganismo que pudiese estar presente en la vacuna. Sin embargo, los controles que se tuvieron dieron resultados positivos probablemente por mala manipulación de la SSF, además la caja control también dió

resultados positivos, mientras que la caja Petri que contenía la muestra del producto no mostró crecimiento alguno, por lo que la vacuna se consideró estéril, pues se encuentra reportado, que en caso de contaminación, el lote del producto cumple las especificaciones del ensayo de esterilidad, siempre y cuando se demuestre por otros medios, que el resultado de dichas pruebas se puede atribuir a otros factores y no al producto (18).

Por otra parte la seguridad del producto se demostró al no observarse ningún tipo de toxicidad, ni cambios significativos en los animales de experimentación; sin embargo, tanto su seguridad como eficacia deberán seguir siendo estudiadas, por si existiera algún cambio en la vacuna o en la población susceptible, que pudiera afectar a los parámetros anteriormente mencionados (4).

La pureza de las porinas se determinó por SDS-PAGE a través de un seguimiento de la técnica de Nikaido (61) que se muestra en la figura 2. Al inicio se observaron todas las proteínas que están presentes en la bacteria (carril 2); estas bandas fueron disminuyendo en cantidad conforme se avanzó en la técnica (carriles 3 a 8), lo que sugiere que las porinas se fueron separando de la membrana hasta solo tener dos bandas que son las que corresponden al producto envasado (carril 9). En base a estos resultados, se estableció que el producto se encuentra libre de otras proteínas que puedan interferir en la prueba de protección.

El título de anticuerpos contra inmunógenos tanto en animales como en humanos, es de suma importancia pues de éste depende la aceptación o rechazo del producto, por servir como indicador de la inmunidad humoral alcanzada (11). Por esta razón se evaluaron los títulos de anticuerpos específicos en el suero de ratones sangrados los días 7, 14 y 21, posterior a la inmunización ya sea, con la vacuna L o con porinas. El título de anticuerpos anti-porinas fue mayor para las porinas que para la vacuna celular. Hay que hacer mención que los títulos de anticuerpos, así como la respuesta inmune en general varía según la cepa endogámica de ratón (13,14).

A pesar de que la fiebre tifoidea es una enfermedad exclusiva del hombre, esta infección se ha logrado estudiar en modelos murinos mediante el uso de mucina en la preparación de las suspensiones de la bacteria, la finalidad de esta sustancia es retardar la actividad de los macrófagos y aumentar la virulencia del bacilo, permitiendo así evaluar de manera más efectiva la protección inducida ya sea por la vacuna de referencia (L) o por las porinas (74).

A continuación se muestra un cuadro comparativo de ambas vacunas:

	Vacuna porinas	Vacuna celular L
DOSIS	0.25 µg/inoculación	0.5 µg/inoculación
TIT. DE ANTICUERPOS	+ +	+
EFFECTOS COLATERALES	ninguno	erizamiento de pelo
PROTECCION	100%	100%

Por otra parte, la estabilidad de la vacuna se determinó a diferentes intervalos de tiempo (15,30 y 60 días) y temperatura (ambiente y 4°C), mediante las pruebas de inocuidad y eficacia. Este último ensayo difirió a los anteriores en cuanto a la cantidad de bacteria internalizada en los ratones por haber sido inoculados con una sola dosis, los resultados muestran que el producto siguió siendo efectivo y seguro después de haber cumplido con su correspondiente vida de anaquel. Sin embargo, se aconseja conservar la vacuna a temperatura de refrigeración.

La inducción de la respuesta inmune humoral es un factor primordial que se emplea generalmente para la continuación de las fases de desarrollo de una vacuna (4). En este caso, se propone que las porinas pueden seguir empleándose para las siguientes fases de la vacuna pues, aunque el título de anticuerpos anti-porinas alcanzado fue bajo, confirió protección ante el reto de *S. typhi*.

Por otro lado se sabe que las porinas también inducen inmunidad celular (11), que aunado a la humoral les da otra ventaja para su uso como vacuna (82).

En resumen, todas y cada una de las pruebas que se realizaron a la vacuna, son necesarias para asegurar la eficacia e inocuidad del producto antes y después de su lanzamiento.

Lo anterior, justifica a las porinas como una vacuna contra la fiebre tifoidea.

## VIII. CONCLUSIONES

Las porinas de *Salmonella typhi* ofrecen protección ante el reto de 500 DL<sub>50</sub> de la bacteria homóloga en el modelo murino; además no generan efectos colaterales en ratones, cobayos, ni conejos, por lo que este producto ofrece una alternativa para el control de la fiebre tifoidea.

Por los datos obtenidos en los ensayos aquí reportados, se recomienda que la vacuna puede aplicarse en un número reducido de adultos voluntarios y dependiendo de los resultados, pasar a las pruebas de campo correspondientes a las siguientes fases.

## REFERENCIAS.

1. Acharya, IL, Lowe, CL, Thapa, R, Gurubacharya, VL, Shresta, MB, Bact, D, Cadoz, M, Schulz, D, Armand, J, Bryla, DA, Trollifors, B, Cramton, T, Schneerson, R y Robbins, JB. 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. N. Engl. J. Med. 317: 1101.
2. Anderson, ES. 1968. Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposio Series in Immunobiological Standardization. 15: 79.
3. Anuario estadístico 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, Secretaría de Salud.
4. Begg, N y Miller, E. 1990. Role of epidemiology in vaccine policy. Vaccine 8: 180.
5. Blanco, F, Arreguín, C, González, CR, Paniagua, J, Pelayo, R, Muy, M, Isibasi, A y Kumate, J. 1989. Respuesta inmune celular a antígenos de *Salmonella typhi* en humanos. VIII Congreso Nacional de Inmunología, SLP, México.
6. Buchmeier NA y Heffron F. 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. Science. 248: 730.
7. Clemens, JD y Stanton, BF. 1990. Longer term evaluation of vaccine efficacy. En: New Generation Vaccines. Woodrow, GC y Levine, MM (eds). Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA. pp 51.
8. Cvjetanovic, B y Vemun, K. 1965. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. Bull. WHO. 32: 29.
9. Di Rienzo JM, Nakamura K, Inouye M. 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly, and functions. Ann. Rev. Biochem. 47: 481.
10. Edelman R y Levine, MM. 1986. Summary of an international workshop on typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 8: 329.
11. Einsen, HN y Sisdind, GW. 1969. Variations in affinities of antibodies during the immune response. Biochemistry. 3: 996.
12. Einsenstein, TK. 1975. Evidence for O antigen as the antigenic in "ribosomal vaccines" prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 12: 364.
13. Eisenstein, TK, Deakins, LW, Killar, L, Saluk, PH y Sultzer, BM. 1982. Dissociation of innate susceptibility to *Salmonella* infection and endotoxin responsiveness in C3He/BFeJ mice and other strains in the C3H lineage. Infect. Immun. 36: 696.

14. Einsenstein, T.K.; Killar, L.M. and Sultzer B.M. 1984. Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: Mouse-Strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. J. Infect. Dis. 150: 425.
15. Ellis, RW. 1990. Recombinant-derived hepatitis B vaccine. En: New Generation Vaccines. Woodrow, GC y Levine, MM (eds). Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA. pp 439.
16. Engvall, E. and Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Immunochemistry. 8:874-879.
17. Farmacopea Nacional de Los Estados Unidos Mexicanos. Cuarta Edición. 1974. México.
18. Farmacopea Nacional de Los Estados Unidos Mexicanos. Quinta Edición. 1988. México.
19. Felix, A y Pitt, RM. 1951. The pathogenic activities of *Salmonella typhi* in relation of its antigenic constituents. J. Hyg. (Camb) 49: 92.
20. Galdiero, F, Tufano, M, Galdiero, M, Masiello, S, y Di Rosa, M. 1990. Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. Infect. Immun. 58: 3183.
21. Galdiero, F, Tufano, M, Sommesse, L, Polfore, A y Tedesco, F. 1984. Activation of complement system by porins extracted from *S. typhimurium*. Infect. Immun. 46: 559.
22. Germanier, R. 1977. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. Bol. Of. San. Panam. 82: 300.
23. Germanier, R. 1984. Typhoid fever. In Bacterial vaccines. Ed. Germanier, R. Academic Press. pp 137.
24. Germanier, R y Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *S. typhi* gal E mutant Ty21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 131: 553.
25. González, C, Ortiz, V, Rojas, R, Ramírez, A, Isibasi, A y Kumate, J. 1989. Seroepidemiología de la Fiebre Tifoidea en 8 estados del norte de la República Mexicana. XX Congreso Nacional de Microbiología. Morelia, Mich. México.
26. Groisman, E, Chiao, E, Lipps, C y Heffron, F. 1989. *S. typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7077.
27. Hejfec, LB, Salmin, LV, Lejtman, MZ, Kuz'minova, ML, Vasil'eva, AV, Levina, LA, Bencianova, TG, Pavlova, LA y Antanova, AA. 1966. A controlled field trial and laboratory study of five

typhoid vaccines in the URSS. Bull WHO. 30: 321.

28. Herrington, DA. 1990. Initial clinical evaluation of new vaccine candidates. En: New Generation Vaccines. Woodrow, GC y Levine, MM (eds). Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA. pp 43.

29. Hiernave, JR. 1988. Idiotypic vaccine and infectious disease. Infect. Immun. 56: 1407.

30. Hornick, RB, DuPont, HL, Dawkins, AT, Snyder, MJ y Woodard, TE. 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Symposia Series in Immunobiological Standardization. 15: 143.

31. Hornick, RB, Greisman, SE, Woodward, TE, Dupont, HL, Drawings, AT y Sayder, WJ. 1970. Typhoid fever pathogenesis and immunological control. N. Engl. J. Med 283: 686.

32. Isibasi, A, Ortiz, V, Moreno, J, Paniagua, J, Vargas, M, González, C y Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever: Monoclonal antibodies against *S. typhi* porins. En: Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L. y Jaz, J. eds. Cell function and disease. Plenum Press, N.Y., USA. pp 281.

33. Isibasi, A, Pelayo, R, Paniagua, J, Ortiz, V, García-Ortigoza, E y Kumate, J. 1989. Porins from *Salmonella typhi* induce a protective status against a challenge with the bacteria in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA.

34. Isibasi, A, Ortiz, V, Vargas, M, González, C, Paniagua, J, Moreno, J y Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection after immunization with outer-membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. Infect. Immun. 56: 2953.

35. Johnson, W. 1972. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fraction isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 5: 947.

36. Jones GW, Richardson LA y Uhlman D. 1981. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. J. Gen. Microbiol. 127: 1967.

37. Joo, I. 1982. Present status and perspectives of vaccination against *Haemophilus influenzae* tipe b diseases mediated by monoclonal antibody directed against a *Haemophilus* outer membrane protein. Lancet 329: 366.

38. Klugman, KP, Koornhof, HJ, Gilbertson, IT, Robbins, JB, Schneerson, R, Schulz, D, Cadoz, M, Armand, J and the Vaccination Advisory Committee. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. Lancet ii: 1165.

39. Kufmann, SHE, Munk, ME, Koga, T, Steinhoff, U, Wand-Württenberger, A, Gatrill, AJ, Flesch, I y Schoel, B. 1989. Effector T cells in bacterial infections. En: Progress in Immunology VII. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of Immunology. Melchers, F. et al eds. Springer-Verlag, RFA pg 963.

40. Kumate, J. 1979. Inmunidad, Inmunización y Vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. pp 227.

41. Kumate, J. 1980. Fiebre Tifoidea. En: Manual de Infectología. Kumate, J y Gutiérrez G. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.

42. Kussi, N, Nurmién, M, Saxén, H y Mäkelä, PH. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. Infect. Immun. 34: 328.

43. Kussi, N, Nurmién, M, Saxén, H, Valtonen, M y Mäkelä, PH. 1979. Immunization with outer major membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Infect. Immun. 25: 857.

44. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

45. Levine, MM, DuPont, HL, Hornick, RB, Snyder, MS, Woodwar, W, Gilman, HR y Libonatti, JP. 1976. Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: Potential deleterious effects of lyophilization. J. Infect. Dis. 133: 424.

46. Levine, MM, Ferreccio, C, Black, ER, Tacket, OC, Germanier, R and Chilean Typhoid Committee. 1989. Progress in Vaccines Against Typhoid Fever. Rev. Infect. Dis., 2: (Suppl 3) S552.

47. Llu, SL, Ezkal, T, Miura, H, Matsui, K y Yabuuchi, E. 1988. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. Infect. Immun. 56: 1967.

48. Lugtenberg B, Peters R, Bernheimer H, y Berendsen W. 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of outer membrane proteins of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 147: 251.

49. Mäkelä, PH, Saxén, H, Valtonen, M y Valtonen, V. 1988. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. Immunol. Lett. 19: 217.

50. Mates, A y Yosipovici, H. 1976. Localization of the protective antigens in *Salmonella typhimurium*. Microbiol. 16: 81.

51. Matsui, K y Arai, T. 1989. Specificity of *Salmonella* Porin as an Eliciting Antigen for Cell-Mediated Immunity (CMI) Reaction in Murine Salmonellosis. *Microbiol. Immunol.* 33: 1063.
52. Miller, S, Kukral, A y Mekalanos, JJ. 1989. A two-component regulatory system (phoP and phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5054.
53. Miller, SI y Mekalanos, JJ. 1989. Strategies for the development of vaccines for typhoid fever, shigellosis, and cholera. *Ann. NY Acad. Sci.* 569: 145.
54. Misfeldt, ML y Johnson, W. 1976. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 14: 652.
55. Misfeldt, ML y Johnson, W. 1977. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 17: 98.
56. Misfeldt, ML y Johnson, W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 24: 808.
57. Molinari, J y Cabrera, R. 1974. Inmunidad inducida con una preparaci3n ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 16: 199.
58. Mosier, DE y Subbarao B. 1982. Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunol. Today* 3: 217.
59. Nakae T. 1976. Outer membrane of *Salmonella*. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *J. Biol. Chem.* 251: 2176.
60. Nakae T, Ishii J. 1978. Transmembrane permeability channels in vesicles reconstituted from single species of porins from *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 133: 1412.
61. Nikaido H. 1983. Proteins forming large channels form bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods in Enzymology.* 97: 85.
62. Nnalua NA, y Lindberg AA. 1990. *Salmonella choleraesuis* strains deficient in O antigen remain fully virulent for mice by parenteral inoculation but are virulent by oral administration. *Infect. Immun.* 58: 2493.
63. Ortiz, V, Isibasi, A, Garcia-Ortigoza, E y Kumate, J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi*

in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27: 1640.

64. Osborn MJ, y Wu H. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34: 369.

65. Paniagua, J, Isibasi, A, Pelayo, R, Ortiz, V, Muy, M, González, C, García, JA, Islas, S y Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Ensayo de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. Arch. Invest. Med. (Mex.) 20: 315.

66. Pelayo, R, Isibasi, A, Paniagua, J, Ortiz, V, Muy, M, González, C, Islas, S y Kumate, J. 1989. Elaboración de un inmoadsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Arch. Invest. Med. (Mex.) 20: 279.

67. Polish Typhoid Committee. 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. Bull WHO. 32: 15.

68. Rachel R, Engel AM, Huber R, Stetter K y Baumeister W. 1990. A porin-type protein is the main constituent of the cell envelope of the ancestral eubacterium *Thermotoga maritima*. FEBS. 262: 64.

69. Reitman, M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. J. Infect. Dis 117: 101.

70. Robbins, JD y Robbins, JB. 1984. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. J. Infect. Dis. 150: 436.

71. Saul, AJ y Geysen, HM. 1990. Identification of epitopes through peptide technology. En: New Generation Vaccines. Woodrow, GC y Levine, MM (eds). Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA. pp 117.

72. Smith, CJ. 1985. Immunology of outer membrane proteins of Gram negative bacteria. En: Immunology of the bacterial cell envelope. Stewart-Tull, DES y Davis, M. eds. John Wiley & Sons. Chichester, USA.

73. Smith, RA y Biegly, MJ. 1972. Ribonucleic acid protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogen. Infect. Immun. 6: 373.

74. Spaun, J. 1964. Studies on the influence of the immunization in the active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay to typhoid vaccines. Bull. WHO 31: 793.

75. Stocker, BAD. 1986. Genetics of *Salmonella* and *Shigella* strains used as lived vaccines. En: Development of vaccines and drugs against diarrhea. Holmgren, J, Lindberg, A y Mollby, R. eds. Lund, Sweden: Studentlitteratur p. 127.

76. Svenson, SB, Nurminen, M y Linberg, CA. 1981. Artificial *Salmonella* vaccines: O-Antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 34: 328.

77. Szu, SC, Stone, AL, Robbins, JD, Schneerson, R y Robbins, JB. 1987. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. J. Exp. Med. 166: 1510.

78. Tufano, M, Ianniello, R, Galdiero, M, De Martino, L y Galdiero, F. 1989. Effect of *S. typhimurium* porins on biological activities of human polymorphonuclear leukocytes. Microb. Pathogen. 7: 337.

79. Tully, JG, Gaines, S y Tigertt, WD. 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. J. Infect. Dis. 112: 118.

80. Typhoid Panel, U.K. Departement of Technical Cooperation. 1964. A controlled field trail of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in British Gulana. Bull. WHO 30: 631.

81. Udhayakumar, V y Muthukkaruppan, Vr. 1987. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immun. 55: 816.

82. Unanue, ER. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. Annu. Rev. Immunol. 2: 395.

83. Venneman, MR, Brigley, NJ y Berry, LJ. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 1: 574.

84. Wandan, M, Serie, C, Cerisier, Y, Sallam, S y Germanier, R. 1982. Oral vaccine against typhoid: tree years results. J. Infect. Dis. 145: 229.

85. Warren, JW y Hornik, RB. 1979. Immunization against typhoid fever. Annu. Rev. Med. 30: 457.

86. Yin, T, Galanos, C, Kinsky, S, Bradshaw, RA, Wessler, S, Luderitz, O, y Sarmiento, MF. 1972. Picrogram sensitive assay for endotoxin: gelation of *Limulus polyphemus* blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta 261: 284.

87. Youmans, AS y Youmans, GP. 1965. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 99: 42.