



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

33
74
NO REPTORADO
23/01/88
22/01/88
39
MEX?

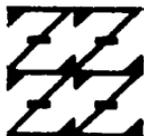
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DETECCION DE ANTICUERPOS SERICOS DE
TIPO IgG E IgA ESPECIFICOS PARA
SALMONELLA TYPHI EN PORTADORES
ASINTOMATICOS DE FIEBRE TIFOIDEA
UTILIZANDO EL ANALISIS DE
INMUNOADSORBENTE LIGADO A
ENZIMA (ELISA).

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
VERONICA ALEJANDRA HERNANDEZ GUZMAN
MA. DEL ROCIO ROBLEDO CARREON

FALLA DE ORIGEN

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO QUE NO SE
DE NUESTRA COPIA

MEXICO, D. F.

1995



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio
de Inmunología L-313 de la Facultad de
Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Bajo la asesoría de:

Q.F.B.: Yolanda Flores Cabrera

M.C. : Maurilio Flores Pimentel

AGRADECIMIENTOS

AL JURADO:

- Presidente: DR. Ruben Marroquín Segura.
- Vocal: Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera.
- Secretario: M.C. Maurilio Flores Cabrera.
- Suplente: Q.F.B. Fco. Javier Parada García.
- Suplente: Q.F.B. Ma. de Lourdes Vega N.

**GRACIAS POR SU VALIOSA COLABORACION
EN LA REVISION DE ESTA TESIS.**

A MIS ASESORES:

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera.

M.C. Maurilio Flores Pimentel.

**Mi gratitud por su orientación y disposición
en todo momento.**

AL DR. RUBEN MARROQUIN S.

**Porque gracias a sus consejos y disposición
en todo momento fue posible la realización
de este trabajo.**

A MIS PADRES:

MARIA Y LUIS

Porque gracias a sus consejos, apoyo y cariño he logrado terminar este trabajo y porque se que al concluirlo los lleno de una gran satisfacción.

A MIS SUEGROS Y CUÑADAS:

MA. DE LA LUZ Y JOAQUIN

Porque de no ser por su valiosa ayuda y comprensión no hubiera sido posible la realización del presente trabajo; de esta manera les doy las gracias por la confianza depositada en mí.

A MI ESPOSO ANGEL.

Porque gracias a tu confianza y ayuda logré llegar a la meta que juntos nos fijamos ya que con tu amor y entusiasmo me alentaste a concluir este trabajo.

A MI PEQUEÑO HIJO :

LUIS ANGEL

Porque tu presencia en mi vida ha servido de estímulo para seguir adelante y porque la conclusión de este trabajo significa que el tiempo que nos privamos de estar juntos no fue tiempo perdido.

A MI HERMANO:

JOSE LUIS

**Porque sentí tu apoyo como hermano y amigo
sin esperar nada a cambio y porque tus consejos me
fueron de gran ayuda en momentos difíciles.**

... y a todas aquellas personas que creyeron en mí.

RESUMEN

La fiebre tifoidea es una enfermedad causada por la bacteria de S. typhi, que es un bacilio Gramnegativo, móvil no esporulado, anaerobio facultativo. Los portadores asintomáticos de esta enfermedad continúan eliminando la bacteria por heces durante meses o toda la vida provocando brotes epidémicos sobre todo en las zonas donde los hábitos de higiene y salud no son los adecuados. En estos individuos se observa que los títulos de anticuerpos de tipo IgA e IgG específicos para S. typhi permanecen elevados durante 48 semanas y 2 años respectivamente. Como respuesta inmunológica causada por la presencia del agente causal.

En este estudio se cuantifican los anticuerpos contra el antígeno "O" de S. typhi por la reacción de Widal y los títulos de IgA e IgG específicos para S. typhi por el método de ELISA en derechohabientes del IMSS "Los Reyes" y del ISSSTE "Zaragoza" de la ciudad de México quienes presentaban un diagnóstico diferente a fiebre tifoidea, con el objeto de encontrar portadores asintomáticos de esta enfermedad utilizando una cepa pura de S. typhi cultivada en agar infusión cerebro-corazón e incubada a 37°C durante 24 horas. Se removieron las colonias con solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) y se cultivaron en botellas de Roux con agar peptona de caseína incubándose a 37°C durante 24 horas.

La masa bacteriana fue removida del medio con con PBS y se le realizaron dos lavados por centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos. El paquete celular fue resuspendido en PBS y se le adicionó una mezcla de fenol-agua (9:1) sometándolo a calentamiento para separar las fases y así obtener el lipopolisacárido (LPS).

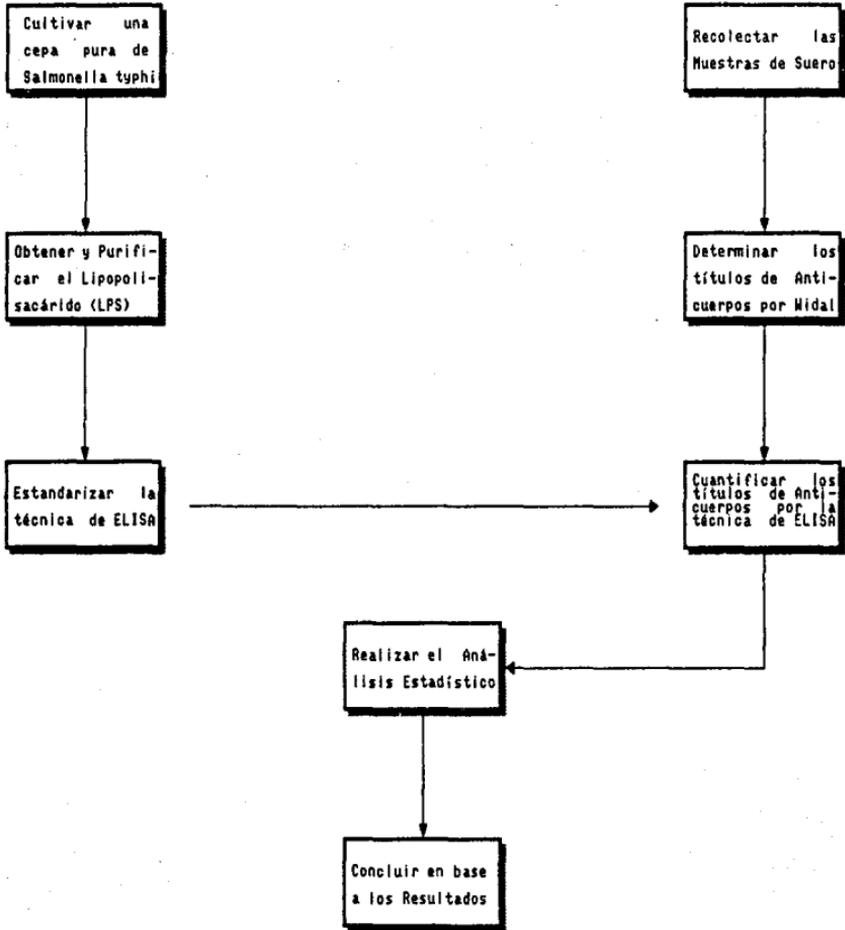
La fase acuosa fué filtrada y dializada en una membrana de celulosa durante 3 días en PBS. Posteriormente el LPS fué cuantificado por el método de fenol-H₂SO₄.

Las muestras de suero fueron descomplementadas a 56°C durante 30 minutos y se les cuantificó el título de anticuerpos específicos para el antígeno somático de S. typhi por la reacción de Widal; asimismo se cuantificaron los títulos de anticuerpos de tipo IgG e IgA por el método de ELISA utilizando una dilución 1:500 y el LPS a una concentración de 4 µg/100ml. anteriormente fijado a las placas de microhemaglutinación.

Las fueron colocadas en las placas de microhemaglutinación e incubadas a 37 °C durante una hora . se lavaron 5 veces con PBS-Tween con intervalos de un minuto y se le adicionaron conjugados de peroxidasa de rábano anti-IgG humana y peroxidasa de rábano anti-IgA humana con una incubación a 37 °C durante una hora. Nuevamente las placas fueron lavadas y para revelar se utilizó sustrato de peroxidasa de rábano con una incubación de 37 °C durante 15 minutos. La reacción fué detenida con H₂SO₄ 2.5 N y fueron leídas a 492 nm.

Se encontró que un 13.33 % de la población estudiada presentó un título de anticuerpos específicos para *S. typhi* por la reacción de Widal iguales o superiores a 1:80, correspondiendo un 10.25 % a mujeres y un 3.08 % a hombres, porcentajes que fueron apoyados por los valores obtenidos mediante la técnica de ELISA.

DIAGRAMA DE FLUJO



INDICE

EL SISTEMA INMUNE	2
IgA	3
IgG	5
FIEBRE TIFOIDEA	8
Antecedentes históricos	8
Agente etiológico	10
Clasificación	10
Morfología y tinción	10
Características de cultivo	10
Características bioquímicas	11
Resistencia	11
DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD	12
ANTIGENOS	12
Antígeno H	12
Antígeno O	12
Antígeno Vi	12
TOXINAS	14
Polsacárido central	14
Lípido A	14
PATOGENIA	16
MANIFESTACIONES CLINICAS	19
EPIDEMIOLOGIA	20
DIAGNOSTICO	21
Diagnóstico microbiológico	21
Diagnóstico serológico	22
TRATAMIENTO	23
PREVENCION	25
ELISA	26
Método competitivo	26
Metodo indirecto	26
Fase sólida	28
Lavados	28
Conjugados	28
Sustrato	29
Medición de la actividad enzimática	29

FUNDAMENTACION DEL TEMA	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
HIPOTESIS	33
OBJETIVOS	34
MATERIAL Y METODOS	35
Material biológico	36
Equipo	37
Medios de cultivo	37
Medios para pruebas bioquímicas	38
Reactivos	38
DISEÑO EXPERIMENTAL	40
Aislamiento e identificación	41
Obtención del Lipopolisacárido	41
Purificación y cuantificación del lipopolisacárido	42
Recolección de muestras	43
Inactivación del complemento	43
Determinación de anticuerpos contra el antígeno somático de <i>S. typhi</i>	44
Determinación de anticuerpos séricos de tipo IgA e IgG	44
RESULTADOS	46
GRAFICAS	55
DISCUSION DE RESULTADOS	67
CONCLUSIONES	69
APENDICE	70
BIBLIOGRAFIA	76

I N T R O D U C C I O N

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa, aguda, causada por S. typhi el cual es un bacilo Gramnegativo, móvil, no esporulado y anaerobio facultativo (1,2). La enfermedad se caracteriza clínicamente por fiebre elevada, cefalea, malestar general, tos, dolor abdominal con estreñimiento o diarrea entre otros síntomas(3,4,5).

Aproximadamente una tercera parte de los individuos que han tenido fiebre tifoidea continúan eliminando la bacteria por heces durante largos períodos de tiempo sin que presenten síntomas de la enfermedad, a estos individuos se les conoce como portadores asintomáticos, y constituyen un peligro para la salud ya que pueden generar brotes epidémicos (6,7). La forma de transmisión de la bacteria se efectúa por contacto directo a partir de enfermos o portadores asintomáticos, o indirecto por diversos vehículos como son: agua y leche contaminados con heces; y vegetales de consumo en crudo que han sido regados con agua negras (8).

En la sociedad en que vivimos, fácilmente se puede adquirir la infección debido a que no se siguen los hábitos de higiene adecuados, por tal motivo es de gran importancia detectar a los portadores asintomáticos de fiebre tifoidea, aprovechando de que los títulos de anticuerpos séricos de tipo IgA e IgG específicos para S. typhi se mantienen elevados en estos individuos, lo que hace posible su cuantificación mediante la Reacción de Widal, inmunofluorescencia o ELISA (6,9,10). Para dicho propósito se realizó un estudio en 195 pacientes con un cuadro clínico diferente al de la fiebre tifoidea que acudieron a los centros hospitalarios, IMSS "Los Reyes" y al ISSSTE "Gral. Ignacio Zaragoza" en los cuales se cuantificó el título de anticuerpos de tipo IgA e IgG específicos para S. typhi mediante la Reacción de Widal y el Método de ELISA; y se encontró que un 13.33 % de los pacientes entran en la categoría de portadores asintomáticos ya mencionados.

E L S I S T E M A I N M U N E

El sistema inmune está constituido por aquellos órganos y tejidos que se encargan del reconocimiento de los antígenos, esto es, llevan a cabo la respuesta inmune. Este sistema está formado por células linfáticas y no linfáticas, como son los órganos linfáticos y células de la sangre (11).

La respuesta inmune se traduce en la destrucción o neutralización del antígeno y se realiza por dos mecanismos: por un lado, se lleva a cabo la producción de anticuerpos, y por otro, por la aparición de células sensibilizadas. Cuando la vía efectora es la producción de anticuerpos, se habla de inmunidad humoral y, cuando es de células sensibilizadas, de inmunidad celular (12).

En ambos casos, la respuesta inmune es más eficaz después de un primer contacto, puesto que en él se selecciona el clon celular correspondiente determinando sensibilización y amplificación por las células de memoria (13).

La respuesta inmune humoral se caracteriza por la aparición de anticuerpos capaces de reaccionar con los antígenos que desencadenan su producción (12).

Se trata de globulinas plasmáticas o inmunoglobulinas (46).

La respuesta humoral es función de los linfocitos B y de sus células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (12).

En el hombre existen 5 clases de inmunoglobulinas denominadas IgA, IgG, IgM, IgD e IgE con estructuras químicas y funciones características; formadas por 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas ligeras (L) unidas entre sí por puentes disulfuro. Las cadenas H contienen casi el doble de los aminoácidos de las cadenas L y en ellas radica la especificidad y propiedades particulares de cada una de las inmunoglobulinas. Las cadenas L son comunes en todas las inmunoglobulinas y son de tipo Kappa (κ) o Lambda (λ) (12,15,16).

El tratamiento enzimático de las inmunoglobulinas con papaína rompe la molécula en 3 fragmentos, 2 de los cuales son idénticos y se combinan con un antígeno por lo que se les denomina "fragmentos unidores del antígeno" (Fragment, antigen binding - Fab); el tercer fragmento es cristalizante y no presenta afinidad por el antígeno; se le conoce como "fragmento cristalizante" (Fragment, cristallizable - Fc) (13,15,17).

I g A

La IgA está presente en el suero en forma monomérica (IgA sérica), pero tiende a formar polímeros mediante la asociación con la cadena J (componente de unión) y la pieza secretora. Esta inmunoglobulina se encuentra en fluidos corporales como son: saliva, lágrimas, calostro y secreciones gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias (12,15,18).

Las células plasmáticas ubicadas en el subepitelio de el bazo, ganglios linfáticos y glándulas mamarias, producen moléculas de IgA, que van a la circulación general, en forma de monómero o dímero. El dímero circulante en su paso a través del epitelio glandular o de la superficie intestinal fija el componente secretor, previo a la secreción formándose así la IgA secretora (16,18,19,20). La IgA secretora mantiene la integridad de las membranas mucosas inhibiendo su colonización por los microorganismos, neutralizando toxinas y previniendo la penetración de bacterias a través de sus superficies, pero no es capaz de activar el complemento (18,19,22,23).

I g G

La IgG es la inmunoglobulina más abundante en el suero, presente en forma monomérica que tiene a su cargo la protección contra la mayoría de las enfermedades infecciosas (12,21).

Esta inmunoglobulina caracteriza la respuesta humoral de tipo secundario que es más potente y prolongada que la respuesta primaria. La IgG aparece después de la producción de IgM (18).

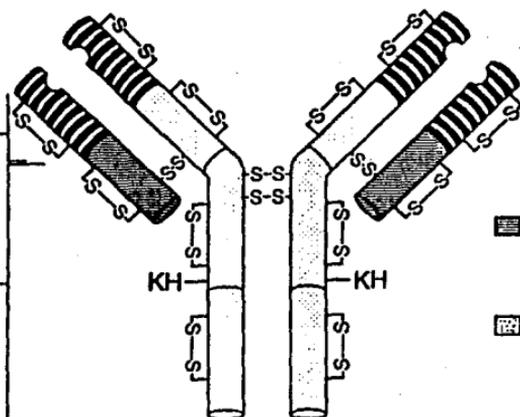
Las células plasmáticas que se encuentran en las porciones medulares de los ganglios linfáticos y en la pulpa roja del bazo realizan la síntesis activa de IgG como consecuencia de una estimulación antigénica (13,16,23).

Estructura

Lado fijando
el antígeno

Región
variable

Región
constante



- ▨ cadena L
tipo κ
tipo λ
- ▩ cadena H
cadena γ (IgG)

-S-S- Puentes disulfúricos
CH Carbohidratos

Fig. 2 . Estructura de la Molécula de IgG
Fuente (Kaplan AL, Pesce JA. 1990)

PROPIEDADES DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Propiedad	IgA	IgG
Fórmula Molecular	monómero, dímero	monómero
Otras Cadenas	pieza S y cadena J sólo en el dímero	-----
Subclases	IgA1 e IgA	IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4
Valencia	2	2
Peso Molecular	160,000	150,000
Constante de Sedimentación	7S en el Monómero 11S en el Dímero	6.6S
Porcentaje de Carbohidratos	7	9
Niveles en Suero (mg / 100 ml)	210 +/- 50	1250 +/- 50
Porcentaje en Suero	7 - 15	75 - 85
Vida Media (días)	5.8	29
Producción (mg/kg/día)	24	99
Fijación del Complemento	-----	Sí
Atraviesa la Placenta	No	Sí
Otras Propiedades Biológicas	Anticuerpos en Se- creciones mucosas	Respuesta Inmune Secundaria
Se une a células	-----	Macrófagos Neutrófilos

Cuadro 1. Propiedades de las Inmunoglobulinas
Fuente (Paul EW. 1989)

F I E B R E T I F O I D E A

Antecedentes Históricos.

La palabra tifoidea proviene de la raíz griega Tiphos que significa humo y estupor. Probablemente la relación entre ambos significados proviene de la sensación de atontamiento y obnubilación que sentían los griegos al inhalar el humo utilizado desde la época de Hipócrates para apaciguar a las abejas con el fin de obtener la miel. Es por esto que el tifo debe su nombre al estado estuporoso que lo acompaña y la fiebre tifoidea porque es parecida a esta (6,24).

La semejanza entre ambas enfermedades ocasionó en el pasado una gran confusión y diferentes autores comparten el crédito de haberlas diferenciado. Huxhan (1782) trazó las diferencias clínicas de la " fiebre nerviosa lenta " (tifo) y la " fiebre maligna putrefacta " (tifoidea), y en 1829 Pierre-Charles-Alexandre-Louis realizó la descripción de las manifestaciones clínicas y alteraciones patológicas de la fiebre después de estudiar 138 casos, incluyendo 50 letales; encontró que la enfermedad tenía un comienzo brusco de fiebre y escalofrío seguido de estupor y diarrea, que poco después era acompañada de manchas rosadas; por lo que se le nombró desde ese momento Fiebre Tifoidea. También refirió las complicaciones de la hemorragia y de la perforación intestinal; notó que la toxemia o la infección severa provocaba la muerte de los pacientes; asimismo reconoció que los cambios patogénicos se hallaban principalmente en el intestino, nódulos linfáticos, mesentéricos y bazo.

En 1837 Gerhardt describió las lesiones intestinales causadas por la enfermedad (6,23,24).

La etiología y transmisión de la fiebre tifoidea fue de gran controversia hasta que en 1856 William Budd, basándose en datos epidemiológicos encontró que el padecimiento era transmitido a través de agua contaminada por heces de personas enfermas de fiebre tifoidea, cuyo bacilo fue identificado por Eberth en 1880 en cortes anatómicos de los ganglios mesentéricos y bazo de las personas muertas de fiebre tifoidea (25). La bacteria fue cultivada por Gaffky en 1884; y posteriormente en 1896, Gruber y Durham demostraron la presencia de aglutininas en sangre de cerdos inmunizados con el bacilo de la fiebre tifoidea. En este mismo año Widal introdujo a la clínica la cuantificación serológica de aglutininas.

Los primeros intentos de vacunación fueron realizados por Wright en 1896 (22,32).

Una vez identificado el agente causal de la fiebre tifoidea, se realizaron investigaciones de su estructura para determinar el componente que daba origen a las manifestaciones clínicas, encontrándose que se debían a la presencia de una toxina denominada endotoxina cuya historia data de 1870, después de que Roberto Koch estableció que cada enfermedad infecciosa era causada por una bacteria específica (27).

Diez años después, investigadores de diferentes nacionalidades encontraron que las bacterias causantes de las enfermedades infecciosas producían compuestos bacterianos denominados toxinas.

Inicialmente se aislaron los "venenos" o toxinas (proteínas) responsables de la difteria, tétanos y botulismo; que se inactivaban con calor, denominadas toxoides (27).

Centanni realizó investigaciones de la sustancia termoestable, aislada de *S. typhi* en conejos, y le dio el nombre de pirotoxina. De 1930 a 1940, los investigadores Andre Boivin, Walter T.J. Morgan y Walter F. Goebel trabajaron con extractos puros de la endotoxina y concluyeron que dicha toxina termoestable aparecía en las paredes celulares de las bacterias Gramnegativas, que presentaban una constitución glucosídica (azúcares polimerizados), lipídica (complejos de ácidos grasos) y proteica (27).

Posteriormente se encontró que la pirotoxina, endotoxina y lipopolisacárido (LPS) tenían la misma constitución química; y se dejó de usar el término pirotoxina por ser considerado inapropiado (27).

Agente Etiológico: Salmonella typhi.

Clasificación: El bacilo de la fiebre tifoidea pertenece al género Salmonella, familia Enterobacteriaceae y especie Salmonella typhi. Esta bacteria está incluida en el grupo D de la clasificación de Kauffman-White de las Salmonellas, compartiendo con 96 especies de este grupo los antígenos somáticos 9,12. Los flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie de la bacteria se encuentra el antígeno "Vi". La forma abreviada 9,12,d,Vi equivale a Salmonella typhi (1,6,7).

Morfología y Tinción. Es un bacilo no esporulado, corto y grueso que mide de 0.5 a 0.8 micras de ancho y de 1 a 3.5 micras de longitud; presenta movilidad debido a que posee de 9 a 12 flagelos. Es Gramnegativo y se tiñe fácilmente con colorantes ordinarios, como azul de metileno y fenol-fucsina. En el frotis no se observa una disposición particular de las bacterias (25).

Características de Cultivo. Esta bacteria es anaerobia facultativa, crece fácilmente en medios de cultivo simples en los que las colonias son generalmente un poco más pequeñas y transparentes que los microorganismos coliformes; generalmente no se distinguen de estos últimos por su morfología a menos de que crezcan en medios diferenciales (28).

En medios de agar EMB, Desoxicolato y Salmonella-Shigella muestran colonias incoloras. En agar Sulfito de Bismuto las colonias son negras, rodeadas por una zona también negra o negra pardusca. En agar Verde Brillante aparecen como colonias opacas, blanco-rosadas rodeadas de un medio rojo brillante (28).

Se desarrollan entre límites de pH de 6 a 8, y a temperaturas que van de 15 a 41 °C. Su temperatura óptima es de 37 °C.

Características Bioquímicas. *Salmonella typhi* fermenta glucosa, dextrosa, maltosa, manitol, dextrina y trealosa sin producir gas; no fermenta lactosa, sacarosa, salicina, rafinosa ni adonitol, es rojo de metilo y citrato positiva, descarboxila lisina, arginina y ornitina; en agar TSI produce una reacción alcalina sobre ácida (KIA), con ligero ennegrecimiento debido a la producción de H₂S; reduce los nitratos a nitritos, es indol, urea y Voges-Proskauer negativo, no licua la gelatina ni desamina a la fenilalanina, además carece de actividad citocromo oxidasa (28).

Resistencia. Los bacilos de la tifoidea mueren por calor y por desinfectantes químicos casi con la misma rapidez que la mayoría de los microorganismos no esporulados. Son destruidos por el proceso de pasteurización cuando se encuentran en la leche. Sobreviven fuera del cuerpo más tiempo que otras bacterias patógenas, y por esta razón la tifoidea es transmitida con frecuencia por el agua, leche y otros alimentos contaminados. En las heces depositadas en fosas sépticas o en el suelo. Los bacilos tienden a morir rápidamente, pero algunos pueden sobrevivir más de 24 h y varias semanas durante el invierno. Sobreviven en aguas contaminadas alrededor de una semana; en ostras y mariscos, hasta un mes; en la leche y productos lácteos, no sólo pueden sobrevivir, sino también multiplicarse. Sin embargo, estos bacilos no tiene existencia continuada fuera del cuerpo humano, únicamente presentan mayor resistencia a las condiciones ambientales que la mayoría de los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas y son transmitidos a veces de persona a persona por medio de agua y alimentos contaminados (8).

Se ha encontrado que *S. typhi* es relativamente resistente a ciertos productos químicos como verde brillante, tetrationato de sodio y desoxicolato de sodio, que inhiben el crecimiento de los coliformes (29).

Determinantes de Patogenicidad. Se encuentran relacionados los antígenos estructurales y toxinas.

- **Antígenos.** *S. typhi* posee antígenos de importancia clínica; el flagelar "H", el somático "O" y el "Vi" asociado a la virulencia de la bacteria (30,31).

Antígeno H. El término "H" deriva del alemán "Hauch", que significa aliento. Se utilizó para describir la fina capa de crecimiento de los *Proteus* en la superficie de las placas de agar húmedas que semeja el aspecto empañado de un vidrio al arrojar el aliento sobre él. Es un antígeno termolábil, protéico, presente en los flagelos. Se inactiva por el calor, alcohol y ácidos; es resistente al formol el cual fija los flagelos originando suspensiones bacterianas flageladas que, aunque también contienen el antígeno "O" se comportan como suspensiones flageladas puras. La aglutinación flagelar es rápida, forma brumos grandes, blandos y algodonosos que rápidamente se deshacen por agitación (30,31).

Antígeno O. el término "O" proviene del alemán "Onne" (que significa sin). Se aplicó a las formas de *Proteus* no invasoras (sin flagelos) y actualmente se usa como término genérico para denominar los antígenos somáticos de todos los bacilos coliformes. Son antígenos somáticos complejos de polisacáridos que forman parte de LPS, además son utilizados para la clasificación antigénica de las diferentes especies de *Salmonella*. Se obtienen al calentarlas suspensiones bacterianas de *S. typhi* a 50 - 56 °C para destruir los antígenos "H" y "Vi". En presencia del anticuerpo específico producen una aglutinación lenta y granular, que no se destruye con agitación (aglutinación somática) (12,31,32).

Antígeno Vi. Es un antígeno capsular o K (del alemán Kapsel); muy parecido al antígeno O presente en la pared celular de bacterias recién aisladas (de *S. typhi*, *S. paratyphi C* y *S. dublin*) que impide el reconocimiento de los antígenos "O" por sus anticuerpos específicos. Se extrae con ácido tricloroacético pero es más sensible al calor en presencia de agua y al tratamiento con soluciones alcalinas diluidas (30,31,32).

El antígeno "Vi" junto con el antígeno "O", son los responsables de la virulencia además, los anticuerpos contra el antígeno "Vi" son de carácter protector (7,28,32).

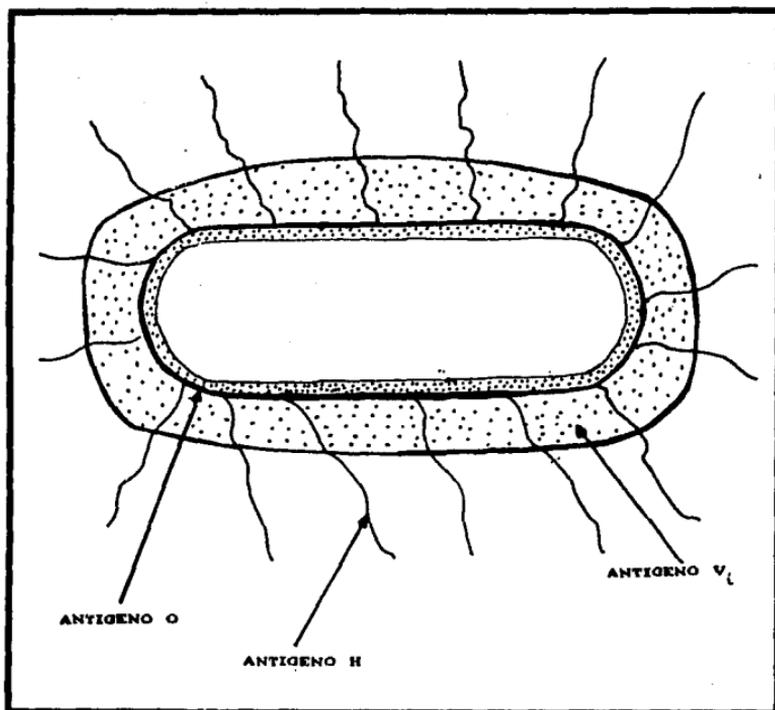


Fig.3. Localización de los Antígenos de Salmonella
Fuente (Pérez P.J. 1992)

- **Toxinas.** Contiene una endotoxina común a las enterobacterias la cual está constituida por el lípido A, el polisacárido central y los antígenos "O"(32).

Lípido A. Está constituido de glucosamina, fosfato y largas cadenas de ácidos grasos de 14 átomos de carbono como son, los ácidos β -hidroximirfístico, láurico, mirfístico y palmítico. Las glucosaminas están unidas por enlaces β -1,6 para formar disacáridos, en tanto que los ácidos grasos le confieren las características lipoidales. Esta fracción es la responsable de la toxicidad, así como de la similitud de las manifestaciones clínicas observadas con las endotoxinas de las diferentes especies (2,27,33).

Polisacárido Central. Esta región se divide en dos áreas centrales; una interna y otra externa. El centro interno (la parte unida al lípido A) está constituido de ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO), heptosa, etanolamina y fosfato. El centro externo (la parte unida al polisacárido) está constituida por glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina.

Cabe mencionar que el KDO está constituido de 8 átomos de carbono y se encuentra en todas las endotoxinas uniendo el polisacárido a el lípido A. Esta región es común en las bacterias Gramnegativas, lo que explica las reacciones cruzadas que se presentan entre las diferentes especies (2,33).

Polisacárido O. A esta fracción también se le conoce como Antígeno O, el cual se conecta al núcleo y varía de una cepa a otra. Contiene glucosa, ramnosa, y manosa, y, generalmente, uno o más desoxiazúcares poco comunes como la abecuesa, colitosa, paratosa y tibelosa. Estos azúcares están conectados en secuencias repetidas de 4 ó 5 azúcares (a menudo ramificados) (2,33,34).

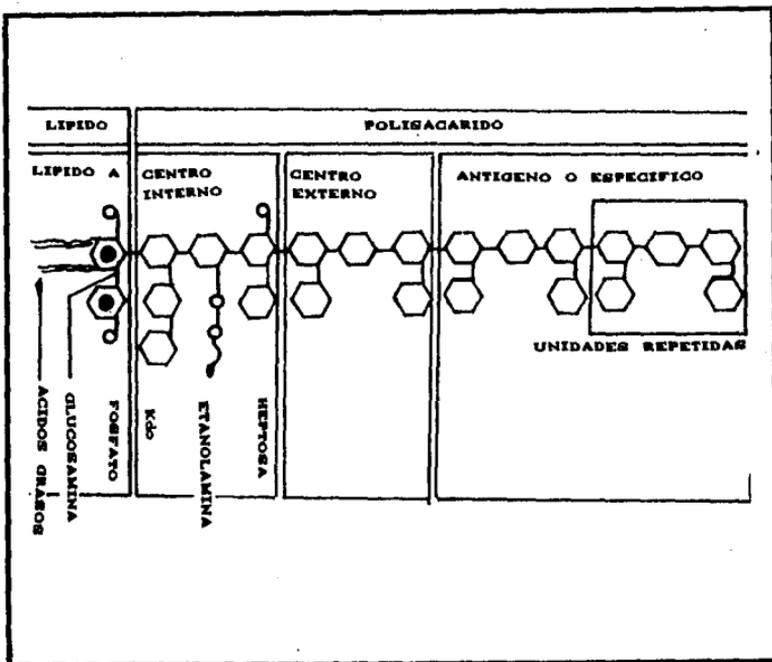


Fig. 4. Estructura de la Endotoxina
Fuente (Scientific American,1992)

P A T O G E N I A

S. typhi penetra por vía oral, sin embargo la infección se establece en función de varios factores entre los que destacan los siguientes:

A) La presencia del antígeno "Vi". Este antígeno le confiere una mayor agresividad a la bacteria.

B) Cantidad de Inóculo. Un inóculo de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de heces es suficiente para producir las manifestaciones clínicas de fiebre tifoidea.

C) Condiciones del huésped. Existe una mayor susceptibilidad a la infección en pacientes que tienen disminuida o anulada la acidez gástrica por hipocloridia, acloridia o gastrectomía; cuando se le administran antibióticos que inhiben la función de la flora normal; desnutrición; presencia de procesos tumorales y, cuando se administra una terapia inmunosupresora. Asimismo, la presencia de alteraciones o cálculos en la vesícula biliar facilitan el establecimiento del estado de portador crónico (6,9,32,35).

La bacteria ocasiona daño cuando ingresa por vía oral con el agua o los alimentos, llegan al intestino delgado donde se fijan a los receptores de las microvellosidades de las células del fleon y penetran por un mecanismo semejante a la fagocitosis (endocitosis) con degeneración de las células de la mucosa. Posteriormente llegan a la submucosa donde rápidamente son fagocitados y se desarrollan en el citoplasma de los macrófagos, que las transporta por los vasos linfáticos a los ganglios mesentéricos y por el conducto torácico a la sangre, lo que produce la primera fase de la bacteremia que coincide con el comienzo de las manifestaciones clínicas. En esta fase se difunden por diversos órganos y tejidos, y por la vesícula biliar llegando nuevamente al intestino, donde producen una reacción inflamatoria en las placas de Peyer, con necrosis y formación de úlceras, que pueden producir hemorragias y perforación intestinal (6,9,32,35).

En la fase de bacteremia, los microorganismos liberan endotoxina y, por otra parte, al difundir en el organismo, pueden localizarse y dar lugar en algunos casos, a infecciones supuradas en otros órganos y tejidos, manifestándose mucho después de la enfermedad. Al desaparecer las manifestaciones clínicas de la fiebre tifoidea, *S. typhi*, reside intracelularmente en el Sistema Retículoendotelial, particularmente en el hígado donde, por la resistencia a la acción bactericida de la bilis, permanece en el árbol biliar extrahepático, con excreción intermitente al tubo digestivo, por donde los portadores convalescentes o crónicos pueden excretar 10^{11} salmonellas por gramo de heces (2,28).

La fiebre y los síntomas tóxicos son producidos por la endotoxina (9).

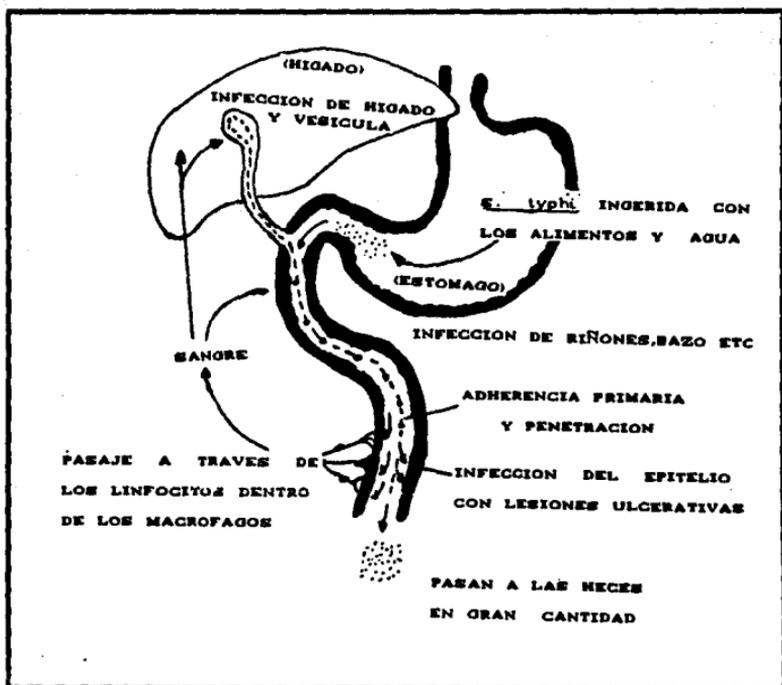


Fig. 5. Patogenia de la Fiebre Tifoidea
 Fuente (Jensen MM, Wright D. 1987)

M A N I F E S T A C I O N E S C L I N I C A S

El período de incubación es de 7 a 14 días; a partir de entonces se presenta malestar general, astenia, anorexia, cefalea y poco después náusea y vómito; también se presenta fiebre, la cual es vespertina, intermitente, con elevaciones entre 39 y 40 °C (6).

Al examen físico destaca el mal estado general, palidez y decaimiento, la lengua es saburral y la faringe es congestiva, además el abdomen está meteorizado, es doloroso y se palpan zurridos, sobre todo en el cuadrante inferior derecho (6).

En menos del 10 % de los casos puede verse al final de la primera semana la roseola tifoídica, que consiste en una erupción congestiva y hemorrágica, localizada en la parte inferior del abdomen y en la cara interna de los muslos (6).

Existen también alteraciones en el aparato digestivo que consisten principalmente en estreñimiento, excepto en lactantes en los que predomina la diarrea generalmente profusa y con sangre; dolor abdominal difuso de moderada intensidad y meteorismo (6).

La fiebre tifoidea sin tratamiento microbiano efectivo puede prolongar sus manifestaciones durante 4 semanas con tendencia paulatina a disminuir la fiebre y la gravedad de los trastornos digestivos. El descenso de la fiebre se debe a la lisis de la bacteria (6,36).

E P I D E M I O L O G I A

Portadores. Una tercera parte de los individuos que han tenido fiebre tifoidea eliminan los bacilos 3 semanas después del comienzo de la enfermedad, y un 10 % durante 8 a 10 semanas; clasificándolos como portadores convalescientes. Algunos continúan eliminando la bacteria durante 6 meses o más, y en muchos casos, varios años o toda la vida. A estos individuos se les conoce como portadores crónicos, los cuales no presentan síntomas de la enfermedad, pero son capaces de producir brotes epidémicos (7,28).

El estado de portador crónico es raro en los niños y ocurre más comunmente a medida que aumenta la edad, siendo cerca de 3 veces más común en las mujeres que en los hombres. Es posible que esta característica de sexo y edad están relacionados con la mayor prevalencia de enfermedad vesicular en las mujeres de mayor edad, lo que favorece la persistencia de los microorganismos en el conducto biliar (5,32).

La transmisión de la fiebre tifoidea se efectúa por contacto directo o indirecto a partir de enfermos o portadores, lo que constituye el principal mecanismo de transmisión de la enfermedad. Se presenta con mayor frecuencia el contagio indirecto por medio de diferentes vehículos; a) el agua, contaminada con heces de enfermos o portadores (aguas residuales), da lugar a epidemias afectando a la mayor parte de la población que la consume; b) leche y sus derivados (quesos frescos, natillas, helados, etc.) que producen pequeños brotes entre los consumidores, c) los crustáceos cultivados con aguas contaminadas (ostras, mejillones); d) los vegetales de consumo en crudo, fertilizadas con heces de enfermos o portadores. Asimismo, las moscas, que se posan en materiales contaminados, facilitan la transmisión de la enfermedad (8).

El mejoramiento de las condiciones socioeconómicas y los hábitos higiénicos de una población inciden directamente en la disminución de la endemia (9,32,37).

D I A G N O S T I C O

Las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de la fiebre tifoidea más comunes son de 2 tipos: microbiológicas y serológicas (6).

A) Diagnóstico Microbiológico. Se efectúa por el aislamiento e identificación de la bacteria causal en sangre, heces, orina, médula ósea y líquido cefalorraquídeo del paciente (21).

Hemocultivo. Es el método de elección. Se realiza al sembrar de 5 a 10 ml de sangre del enfermo obtenido durante el período febril los que son colocados en un medio apropiado para permitir el desarrollo de la bacteria (medio para hemocultivo), que posteriormente es aislada e identificada con la utilización de medios selectivos y diferenciales así como también por pruebas bioquímicas. Este estudio permite conseguir de 90 a 100 % de resultados positivos durante la primera semana de la enfermedad, proporción que disminuye en las siguientes semanas (6,8).

Coprocultivo. Las heces se siembran directamente o previo enriquecimiento como son caldo tetrionato, caldo selenito-cistina, etc.; en medios moderadamente selectivos (medio de SS) o muy selectivos (medio de Wilson Blair). Posteriormente, las colonias sospechosas son identificadas con la utilización de pruebas bioquímicas.

El coprocultivo se emplea para detectar portadores asintomáticos de fiebre tifoidea, después de haber padecido la enfermedad (6,8,32).

Urocultivo. Se aísla la bacteria de S. typhi de la orina a partir de la 3a. semana sembrando placas de agar sangre y medios poco selectivos (MacConkey, EMB).

Los cultivos son positivos en aproximadamente 25 % de los casos y se utilizan sobre todo cuando existe una infección de vías urinarias que aparece con mayor frecuencia en los niños (6,32).

Mielocultivo y Cultivo de Líquido Cefalorraquídeo (LCR). La bacteria se aísla también de médula ósea y LCR sobre todo en las 2 primeras semanas de la enfermedad; se obtienen cultivos positivos en 90 % de los casos y se recomienda utilizarlo cuando los hemocultivos son negativos, en especial después de haber administrado antimicrobianos (6,8,32).

B) Diagnóstico Serológico. La determinación de anticuerpos contra la bacteria de *S. typhi* se realiza por métodos de aglutinación como lo es la Reacción de Widal o por métodos inmunoenzimáticos como ELISA (6).

Reacción de Widal. Los anticuerpos contra *S. typhi* aparecen en el suero durante la primera y segunda semana de la enfermedad, al principio con títulos bajos de 1:40 que posteriormente van aumentando y alcanzan su máximo hacia la tercera semana de la enfermedad. Un título superior de 1:40 de anticuerpos contra el antígeno "O" tiene ya una significación diagnóstica; los anticuerpos contra el antígeno "H" dan títulos mayores pero son menos específicos (29).

ELISA. Esta técnica permite determinar la concentración de un antígeno o de un anticuerpo usando uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) mediante un trazador enzimático (38).

T R A T A M I E N T O

Los medicamentos utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea son; cloranfenicol, ampicilina, amoxicilina, furozamina y trimetropina con sulfametoxazol entre otros. Sin embargo, no se recomienda la utilización de estos medicamentos sin tener un diagnóstico confirmatorio debido a que son medicamentos de amplio espectro (6,9,37).

MEDICAMENTOS

Antibiótico	Vía	Dosis
^b Cloranfenicol	oral o i.v	50 mg/kg/dfa en 4 dosis
Ampicilina	oral o i.v.	100 mg/kg/dfa en 4 dosis
Trimetoprim-sulfametoxazol	oral	2-3 tabletas/12 h.
	i.v.	100 mg/kg/dfa en 2 dosis
^b Ciprofloxacina	oral	500 mg/12 h
^c Ofloxacina	oral	200-300 mg/8-12 h
^c Norfloxacina	oral	400 mg/8-12 h
^c Pefloxacina	oral	400 mg/8 h

^a Las dosis citadas son las más habituales. La duración más aceptada es de 14 días.

^b No se deben superar los 30 g durante todo el tratamiento.

^c Las dosis de cefalosporinas y quinolonas no están definitivamente establecidas, al igual que la duración del tratamiento, sin embargo se han obtenido excelentes resultados con tratamientos cortos (5-7 días).

Cuadro 2. Medicamentos
Fuente (Pérez PJ. 1992)

P R E V E N C I O N

La fiebre tifoidea ha sido controlada en algunos países desarrollados aplicando los principios de higiene y salud pública; sin embargo, en los países menos desarrollados esta enfermedad es aún endémica.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado una vacuna contra la fiebre tifoidea. Sin embargo, no se ha logrado obtener una vacuna adecuada para la prevención de la fiebre tifoidea debido a que el tiempo de protección es corto (aproximadamente 2 años), asimismo, es eficaz en un 75 % de los casos (6,7,32,37).

E L I S A

Los métodos inmunoenzimáticos son de dos tipos: homogéneos y heterogéneos; en el primero una enzima es acoplada a un antígeno que al reaccionar con el anticuerpo se altera la actividad enzimática, debido probablemente a una inhibición en el lugar de entrada del sustrato al conjugado antígeno-anticuerpo durante la formación del complejo antígeno-anticuerpo y es utilizado únicamente para sustancias de bajo peso molecular como son; drogas, hormonas esteroideas o tiroxina; en el segundo, el antígeno es fijado a un soporte sólido y se eliminan los reactivos que no reaccionan después de cada incubación. Los métodos inmunoenzimáticos heterogéneos son de tres tipos: competitivos, sandwich e indirectos (38,39).

Método Competitivo. La base de este método es la competición entre el antígeno sérico y el antígeno marcado con una enzima, que se unen a los anticuerpos específicos fijados a un soporte sólido. En esta técnica la concentración de los productos del sustrato son inversamente proporcionales a la concentración del antígeno marcado o del antígeno sérico. Este método se aplica a gran variedad de sustancias como β -2-microglobulina, progesterona, anti-HBc, etc. (39).

Método de Sandwich. Este método resulta útil para determinar antígenos capaces de unirse a dos anticuerpos.

Se incuba un anticuerpo en fase sólida con el antígeno específico, después de un lavado se añade el anticuerpo marcado enzimáticamente. La actividad enzimática es proporcional a la concentración existente de antígeno (14,39).

Método Indirecto. Se utiliza para medir la concentración de anticuerpos en muestras de fluidos biológicos, el antígeno es fijado al soporte sólido que reacciona con el anticuerpo de la muestra y posteriormente vuelve a reaccionar con anti-anticuerpo unido a una enzima.

En este método se siguen los siguientes pasos:

- 1. Se fija el antígeno correspondiente al soporte sólido; el antígeno no pegado se elimina por lavado.**
- 2. La solución que contiene el anticuerpo se incuba con la fase sólida sensibilizada, y se elimina por lavado el anticuerpo no fijado.**
- 3. El complejo Antígeno-Anticuerpo inmovilizado se incuba con un exceso de un anti-anticuerpo unido a una enzima; se elimina por lavado lo que no reacciona.**
- 4. Se adiciona el sustrato y el cambio de color es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.**
- 5. El cambio de color es detectado por observación directa o mediante el uso de un espectrofotómetro (38).**

FASE SOLIDA. Para que la mayor parte de los anticuerpos se unan a los antígenos fijados al soporte sólido, es necesario tener un pH, temperatura y concentración salina similares a los valores fisiológicos (pH de 7.2, 37 °C y concentración equivalente a 0.15 M de NaCl).

El antígeno o el anticuerpo se une covalentemente a los soportes sólidos tales como celulosa y poliacrilamida; y por adsorción pasiva a tubos, perlas, discos o microplacas de titulación. No todos los sitios activos de la superficie son ocupados por el antígeno o el anticuerpo en la fase sólida, por lo que es necesario utilizar proteínas inertes como seroalbúmina bovina, caseína, suero entero, gelatina, etc. que bloquean los sitios activos de la fase sólida que quedaron libres (14,18,38).

LAVADOS. Los lavados son de gran importancia, ya que si no se realizan correctamente, pueden disminuir la especificidad y la reproducibilidad de la técnica. Si no son suficientes, los resultados serán elevados, ya que los antígenos o anticuerpos no específicos pueden quedar unidos a la fase sólida por adsorción, pero si son excesivos pueden arrastrar tanto al reactivo unido específicamente como al complejo antígeno-anticuerpo. Una solución de lavado adecuada es un buffer de fosfato salina Tween 20 (PBS-Tween) (14,17,18,38).

CONJUGADOS. El conjugado enzimático se prepara por unión covalente de una enzima con un anticuerpo o un antígeno. Las enzimas más usadas son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina, aunque se utilizan muchas otras.

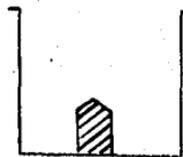
Los criterios de selección de una enzima apropiada son: actividad elevada, estabilidad y que al reaccionar con el sustrato, sea medible.

Las técnicas disponibles para conjugar covalentemente las enzimas a los antígenos o anticuerpos son muy variadas; la más usada es la reacción con glutaraldehído (reactivo bifuncional) descrito por Avrameas que se realiza en uno o en dos pasos para la peroxidasa (14,17,18,38).

SUSTRATO. Cualquiera que sea la enzima utilizada, es preciso seleccionar el sustrato específico para la enzima a fin de aumentar al máximo su actividad catalítica. Los sustratos deben ser estables; sensibles antes y después de la degradación, además los sustratos cromogénicos deben ser incoloros inicialmente y fuertemente coloridos tras la degradación enzimática (14,17,18,38).

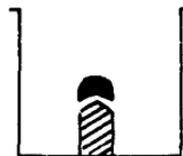
MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA. La valoración de la prueba se puede efectuar por comparación visual o fotométrica de la intensidad cromática de la muestra a investigar con las intensidades de color de los controles positivo y negativo (18,38,39,40).

1. ANTIGENO ADSORBIDO A LA PLACA



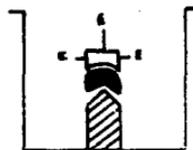
LAVAR

2. AÑADIR SUERO. EL ANTICUERPO ESPECIFICO SE UNE AL ANTIGENO



LAVAR

3. AÑADIR ANTIGLOBULINA MARCADA CON ENZIMA QUE SE UNE AL ANTICUERPO



LAVAR

4. AÑADIR SUSTRATO. CANTIDAD HIDROLIZADA = CANTIDAD DE ANTIGENO PRESENTE.



Fig. 6. Método de ELISA Indirecto
Fuente (Rose NR, Friedman H. 1984)

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Las salmonellas son bacterias que producen infecciones en el hombre, en los animales o en ambos. En el hombre pueden producir dos cuadros clínicos característicos fundamentales: a) Gastroenteritis o enterocolitis, tipo toxoinfección alimentaria b) infecciones entéricas, tipo fiebre tifoidea. Este estudio se enfoca a la descripción de las infecciones entéricas tipo fiebre tifoidea. La fiebre puede ser producida por *S. typhi*, *S. paratyphi* serotipos A,B y C (fiebres tifoparatóxicas) y en raras ocasiones por otros serotipos (*S. sendai*). Estos microorganismos se caracterizan en general por su alta patogenicidad en especial *S. typhi*, ya que la presencia del antígeno "O", y sobre todo del antígeno "Vi" le confieren cierta resistencia hacia la acidez gástrica y a otros mecanismos de defensa inespecíficos (9,32). Los microorganismos ingresan por vía oral a través del agua, alimentos y fomites contaminados; después de un período de incubación de 10 a 14 días se presentan las manifestaciones clínicas como náusea, vómito, fiebre y dolor abdominal con estreñimiento o diarrea, entre otros (32). Durante la convalecencia y después de la desaparición de la enfermedad una pequeña proporción de enfermos continúan eliminando la bacteria por heces durante varias semanas (portadores convalescientes) o aún persistir como tales durante uno o varios años (portadores crónicos)(32). Existen factores predisponentes que facilitan el establecimiento del estado de portador crónico como es la presencia de alteraciones o cálculos de la vesícula biliar.

En los sueros de los individuos con fiebre tifoidea se observa un aumento significativo de IgM en todas las etapas de la enfermedad, aumento de IgA en la primera semana y elevación de los títulos de IgG a partir de la tercera semana de la evolución de la enfermedad (10). Sin embargo, en los portadores crónicos los títulos de IgG e IgA permanecen elevados dependiendo de la cantidad de microorganismos que albergue el huésped (9). Aunque un cuadro clínico sugiera fiebre tifoidea, el diagnóstico confirmatorio deber establecerse a partir del aislamiento de la bacteria en sangre periférica (hemocultivo), heces fecales (coprocultivo), médula ósea (mielocultivo) y orina (urocultivo) (3,32). Dado que en ocasiones por medio de un cultivo de sangre, médula ósea, heces y orina no es posible determinar el agente etiológico, ya sea por el tiempo que se requiere para realizarlos o por una mala toma de muestra; se ha recurrido a los estudios inmunológicos como son la determinación de anticuerpos por métodos de aglutinación como es la Reacción de Widal o por métodos inmunoenzimáticos como ELISA, etc. (8,9).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fiebre tifoidea se presenta como un problema de salud pública sobre todo en países subdesarrollados en donde los portadores asintomáticos de fiebre tifoidea no siguen las normas de higiene básicas ya sea por falta de conocimiento o por falta de recursos originando con esto brotes epidémicos debido a que eliminan hasta 10^{11} bacterias de *S. typhi* por gramo de heces contaminando fácilmente sus manos después de la defecación, depositando de esta forma las bacterias en alimentos y bebidas que son de consumo humano (6,8,9).

En este estudio se pretende cuantificar los anticuerpos de tipo IgG e IgA contra *S. typhi*, para detectar posibles portadores crónicos de fiebre tifoidea en una determinada población, mediante pruebas de aglutinación (Reacción de Widal), la cual es una prueba de rutina en los laboratorios clínicos y posteriormente estandarizar un método inmunoenzimático (ELISA) para utilizarlo como un método alternativo de diagnóstico.

H I P O T E S I S .

Si existen portadores asintomáticos de fiebre tifoidea en una determinada población, los títulos de anticuerpos séricos de tipo IgG e IgA específicos para Salmonella typhi, se mantendrán elevados y por lo tanto será posible su cuantificación mediante el método de ELISA.

O B J E T I V O S .

- Obtener el Lipopolisacárido de Salmonella typhi mediante el método de Galanos.
- Recolectar muestras de sueros de pacientes asintomáticos de fiebre tifoidea.
- Determinar los títulos de anticuerpos contra el antígeno somático "O" de Salmonella typhi, utilizando el kit de reacciones febriles.
- Determinar los títulos de anticuerpos de tipo IgA e IgG en suero, contra el lipopolisacárido de S. typhi por el método de ELISA.
- Correlacionar los valores obtenidos en las reacciones febriles y en ELISA para detectar posibles portadores asintomáticos.

MATERIAL Y METODOS

Material

ESPECIFICACION.

- Cajas de Petri	PYREX
- Tubo de ensayo de 13x100	PYREX
- Tubos de ensayo de 18x150	PYREX
- Matraz Erlenmeyer de: 50,100,250 y 500 ml	PYREX
- Pipetas Pasteur	
- Agitador con gendarme	
- Vasos de precipitados de: 50, 100, 250, 500 y 1000 ml	PYREX
- Probetas graduadas de 10, 50, 100 y 500 ml	PYREX
- Celdas para el Espectrofotómetro	BAUCH & LOMB
- Pipetas graduadas de: 0.1, 0.2, 5.0 y 10.0 ml	PYREX
- Matraces volumétricos de : 50, 250, 1000 y 2000 ml	PYREX
- Placa de vidrio para aglutinación	
- Equipo de destilación	PYREX
- Termómetro	PROPPER TROPHY
- Asa bacteriológica	
- Mechero Fischer	
- Mechero Bunsen	
- Gradillas	
- Espátula de acero inoxidable	
- Pinzas de tres dedos con nuez	
- Soporte universal	
- Anillo metálico	
- Tripie	

ESPECIFICACION:

- Rejilla de asbesto
- Manguera
- Gasa
- Algodón
- Botellas de Roux
- Tela
- Filtros con membrana estéril
- Membranas de celulosa para diálisis
- Aplicadores de madera
- Placas de microtitulación
- Micropipeta de 100 microlitros
- Pipeta de Embolo de 20 a 100 microlitros
- Marcador
- Bulbos de plástico
- Tapones de plástico
- Puntas para pipeta automática
- Piseta
- Barra magnética

NALGENE
SIGMA

COSTAR
COOKE LAB.PROD
BAND-W-GERMANY

Material Biológico:

- Sueros de pacientes asintomáticos de fiebre tifoidea.
- Cepa pura de Salmonella typhi.
- Conjugados:
 - anti-IgA peroxidasa de rábano
 - anti-IgG peroxidasa de rábano
- Kit comercial de antígenos de Salmonella typhi:
 - Antígeno somático O
 - Antígeno somático O

CAPPEL 20
CAPPEL 20

BIGAUX
INV. DIAG.

Equipo:

- Microscopio
- Bomba de vacío
- Estufa de incubación
- Centrífuga Clínica
- Baño de agua con temperatura controlada
- Espectrofotómetro Espectronic 20
- Refrigerador 11 pies³
- Potenciómetro
- Espectrofotómetro para ELISA
- Parrilla de agitación
- Olla express de 12 lt
- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Agitador
- Reloj

ESPECIFICACION:

ZEISS
KOBLENZ
RIOSSA
SOL-BAT
SYSTEM-253
BAUSCH & LOMB
MABE
SARGENT-WELCH
DYNATECH MR-250
TERMOLYNE
PRESTO STEELE
OHAUSS
METTLER H-80
VORTEX-GENIE
ENG. CLOOK SYS.

Medios de Cultivo:

- Agar MacConkey
- Agar Salmonella Shigella
- Agar Verde brillante
- Agar Sulfito de bismuto
- Agar Infusión cerebro-corazón
- Agar peptona de caseína

BIOXON
BIOXON
BIOXON
BIOXON
DIBICO
BIOXON

ESPECIFICACION.

Medios para Pruebas Bioquímicas:

- LIA	BIOXON
- MIO	BIOXON
- TSI	MERCK
- SIM	MERCK
- RM-VP	BIOXON
- Citrato de Simmons	MERCK
- Gelatina bacteriológica	J.T. BAKER
- Urea de Christensen	BIOXON
- Caldo Lactosa Rojo de Fenol	BIOXON
- Caldo Sacarosa Rojo de Fenol	BIOXON
- Caldo Manitol Rojo de Fenol	BIOXON
- Caldo Maltosa Rojo de Fenol	BIOXON
- Caldo Glucosa Rojo de Fenol	BIOXON

Reactivos:

- Fenol	J.T.BAKER
- Acido Sulfúrico concentrado	J.T. BAKER
- Fosfato de Sodio dibásico dodecahidratado	J.T. BAKER
- Fosfato de potasio monobásico	J.T. BAKER
- Cloruro de Potasio	MERCK
- Cloruro de Sodio	QUIM. MONTERREY
- Fosfato de Sodio Monobásico anhidro	TEC. QUIMICAS
- Carbonato de Sodio Anhidro	J.T. BAKER
- Bicarbonato de Sodio	J.T. BAKER
- Tween 20	SIGMA
- Cristal Violeta	TEC. QUIMICAS
- Safranina	SIGMA
- Orto-Fenilendiamina	SIGMA
- Peróxido de Hidrógeno	PROD. QUIMICOS

ESPECIFICACION:

- Yoduro de Potasio
- Yodo
- Alcohol
- Acetona
- Oxalato de Amonio
- Acido Cítrico
- Glucosa anhidra
- Ovoalbúmina
- Leche semidescremada
- Agua bidestilada en equipo de vidrio

J.T. BAKER
J.T. BAKER
J.T. BAKER
J.T. BAKER
TEC. QUIMICAS
MERCK
MERCK
SIGMA

D I S E Ñ O E X P E R I M E N T A L

- I. Aislamiento e identificación de Salmonella typhi.
- II. Obtención del Lipopolisacárido de Salmonella typhi.
- III. Purificación y cuantificación del Lipopolisacárido.
- IV. Recolección de las muestras de pacientes asintomáticos de fiebre tifoidea.
- V. Inactivación del complemento .
- VI. Determinación de anticuerpos contra el antígeno somático " O " de Salmonella typhi, utilizando el kit de reacciones febriles por el método de Widal.
- VII. Determinación de anticuerpos séricos de tipo IgG e IgA específicos para S. typhi por el método de ELISA.
- VIII. Realización del Análisis Estadístico.
- IX. Análisis de Resultados.

I. Aislamiento e Identificación de Salmonella typhi.

1. Se aísla la bacteria en medios diferenciales (Agar MacConkey) y selectivos (Agar Salmonella - Shigella, Verde Brillante y Sulfito de Bismuto).

2. Se siembra la colonia sospechosa en los siguientes medios para realizarle las pruebas bioquímicas:

- Medios sólidos: LIA, MIO, TSI, Citrato de Simmons.

- Medios semisólidos: Gelatina Bacteriológica.

- Medios líquidos: RM - VP, Urea de Christensen, Lactosa, Sacarosa, Manitol, Glucosa (41, 42, 43, 44).

II. Obtención del Lipopolisacárido de Salmonella typhi por el método de Galanos.

1. Preparar 300 ml de agar infusión cerebro-corazón y vaciar el medio en 10 cajas de petri estériles; sembrar la bacteria e incubar a 37 °C durante 24 horas.

2. Remover las colonias con PBS (Amortiguador Salina Fosfatos).

3. Preparar 500 ml de agar peptona de caseína y vaciar el medio en 10 botellas de Roux (50 ml por cada caja).

4. Vaciar aproximadamente 3 ml del medio agar peptona de caseína a las botellas de Roux y distribuirlo por toda la superficie del medio. Incubar a 37 °C durante 24 hrs.

5. Remover la masa bacteriana con PBS (5 ml de PBS por cada botella de Roux).

6. Reunir las suspensiones bacterianas (50 ml aproximadamente).

7. Para eliminar el medio de cultivo realizar dos lavados con PBS; en cada lavado centrifugar a 3000 rpm durante 45 min.

8. Resuspender el paquete celular de cada tubo en 3 ml de PBS.

9. A cada tubo agregar 3 ml de la mezcla fenol - agua (9:1), agitar y dejar en refrigeración durante 24 hrs.

10. Agitar los tubos e introducirlos a un baño de agua a 70 °C durante 90 minutos.

11. Dejar enfriar y centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos.

12. Separar la fase acuosa. Reextraer la interfase y la fase fenólica con 3 ml de PBS en el baño de agua a 70 °C durante 60 minutos (45).

13. Reextraer la interfase y la fase fenólica en las mismas condiciones durante 30 minutos.

14. Reunir los extractos acuosos y filtrarlos con una membrana estéril (6.7).

III. Purificación y Cuantificación del Lipopolisacárido.

1. Dializar los extractos acuosos en una membrana de celulosa, durante 3 días con cambios de PBS cada 24 h (44,45).

2. Cuantificar el Lipopolisacárido mediante el método de fenol-ácido sulfúrico (47).

2.1 Realizar una curva patrón empleando una serie de 10 tubos.

2.2 Colocar 0.1, 0.2, 0.3, 0.4,...., 1.0 ml de un estándar de concentración 0.1 mg/ml y llevar a 2 ml con agua destilada. El blanco se hace con 2 ml de agua destilada.

2.3 Agregar a cada tubo 0.1 ml de fenol al 80 % y 5 ml de H_2SO_4 concentrado.

2.4 Realizar diluciones del LPS (1:10, 1:50 y 1:100) en agua destilada.

2.5 Tomar 2 ml de cada dilución y agregar 0.1 ml de fenol al 80 % y 5 ml de H_2SO_4 concentrado.

2.6 Dejar reposar los tubos de 20 a 30 minutos y leer a 490 nm (47).

IV. Recolección de Muestras de Pacientes Asintomáticos de Fiebre Tifoidea.

Recolectar 190 muestras de sueros de pacientes que acuden al Hospital Regional Los Reyes (IMSS) y al Hospital Gral. Ignacio Zaragoza (ISSSTE).

V. Inactivación del complemento

Introducir los sueros en un baño de agua a temperatura constante de 56 °C durante 30 minutos. Guardar los sueros a - 20 °C hasta su empleo (48).

VI. Determinación de Anticuerpos Contra el Antígeno Somático de S. typhi. Utilizando el Kit de Reacciones Febriles.

1. Mantener el antígeno a temperatura ambiente, agitarlo ligeramente antes de efectuar la prueba.
2. Utilizar una placa de vidrio para aglutinación y depositar de izquierda a derecha 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml del suero del paciente en la hilera correspondiente.
3. Agregar una gota del antígeno somático a cada dilución del suero.
4. Mezclar el suero y el antígeno con un aplicador; agitar suavemente la placa por rotación durante 2 minutos.
5. Inclinar la placa y observar la aglutinación (38,49).

VII. Determinación de Anticuerpos Séricos de Tipo IgG e IgA Específicos para Salmonella typhi por el Método de ELISA.

1. Diluir el antígeno de S. typhi (LPS) en amortiguador de carbonatos a una concentración de 4 µg/ 100 ml.
2. Colocar 100 µl del antígeno prediluido en cada uno de los pozos de la placa de microhemaglutinación.
3. Dejar en cámara húmeda a 4 °C durante 24 hrs.
4. Tirar el sobrenadante y bloquear con una mezcla de leche al 5 % y ovoalbúmina al 2 % en PBS e incubar a 37 °C durante 1 hr.

5. Tirar el sobrenadante y lavar 5 veces con PBS-Tween, dejando actuar 1 minuto la solución de lavado antes de tirar los sobrenadantes.
6. Realizar una dilución de las muestras de sueros 1:500 en PBS y colocar 100 µl de la dilución correspondiente en cada pozo, dejando el pozo 96 como testigo negativo del anticuerpo. Incubar a 37 °C durante 1 hr.
7. Tirar el sobrenadante y lavar 5 veces con PBS-Tween, dejando actuar 1 minuto la solución de lavado antes de tirar los sobrenadantes.
8. Preparar los conjugados anti-IgG peroxidasa de rábano y anti-IgA peroxidasa de rábano, realizando una dilución 1:1000 en leche al 5%.
9. Adicionar 100 µl de los conjugados a cada pozo de la placa de microhemaglutinación correspondiente. Incubar a 37 °C durante 1 hora.
10. Tirar el sobrenadante y lavar 5 veces con PBS-Tween, dejando actuar 1 minuto la solución de lavado antes de tirar los sobrenadantes.
11. Adicionar 100 µl del sustrato de peroxidasa e incubar a 37 °C durante 15 minutos.
12. Detener la reacción con H₂SO₄ 2.5 N, colocando en cada pozo 50 µl.
13. Leer la densidad óptica a 492 nm (14,48).

R E S U L T A D O S

A los pacientes que entraron en este estudio se les tomó en cuenta su edad y sexo; siendo los resultados agrupados de acuerdo al título de la Reacción de Widal

TABLA No. 1 DE RESULTADOS

No. Pac.	Edad	Sexo	Tit. Widal	ELISA	
				IgG	IgA
				Absorbancia (nm)	
113	51	2	0.00	0.119	0.072
174	34	1	0.00	0.119	0.090
184	31	1	0.00	0.140	0.289
157	29	1	0.00	0.154	0.050
195	51	1	0.00	0.158	0.000
126	37	1	0.00	0.159	0.138
33	47	2	0.00	0.179	0.098
192	49	2	0.00	0.180	0.000
186	47	1	0.00	0.180	0.119
65	46	1	0.00	0.186	0.109
131	33	1	0.00	0.188	0.024
30	61	2	0.00	0.188	0.110
178	37	1	0.00	0.197	0.069
148	50	1	0.00	0.200	0.364
175	45	2	0.00	0.209	0.150
165	77	2	0.00	0.211	0.119
46	70	1	0.00	0.214	0.199
150	40	2	0.00	0.226	0.045
76	57	1	0.00	0.226	0.126
166	51	2	0.00	0.235	0.145
41	49	2	0.00	0.239	0.175
188	29	2	0.00	0.242	0.099
95	67	1	0.00	0.253	0.060
171	25	2	0.00	0.254	0.095
190	53	1	0.00	0.255	0.125
153	5	2	0.00	0.257	0.046
94	16	1	0.00	0.260	0.131
137	38	2	0.00	0.272	0.468
60	63	2	0.00	0.275	0.109
104	24	2	0.00	0.276	0.088
172	62	2	0.00	0.285	0.115
167	11	2	0.00	0.285	0.116
97	52	1	0.00	0.287	0.402
40	52	1	0.00	0.288	0.102
151	56	1	0.00	0.291	0.119
134	70	1	0.00	0.292	0.147
56	23	2	0.00	0.294	0.082

Edad = Años

1=Masculino

2=Femenino

No. Pac.= Número de Paciente

Continuación de la Tabla No. 1

No. Pac.	Edad	Sexo	Tit. Widal	ELISA	
				IgG	IgA
				Absorbancia (nm)	
37	70	2	0.00	0.298	0.131
155	26	2	0.00	0.298	0.390
44	38	2	0.00	0.303	0.082
143	78	2	0.00	0.311	0.057
115	54	2	0.00	0.311	0.217
53	78	1	0.00	0.316	0.240
75	34	2	0.00	0.318	0.171
169	15	1	0.00	0.319	0.107
91	63	2	0.00	0.320	0.155
185	15	2	0.00	0.322	0.111
168	40	1	0.00	0.326	0.149
77	53	1	0.00	0.327	0.039
154	68	2	0.00	0.327	0.267
129	63	2	0.00	0.328	0.073
161	28	2	0.00	0.328	0.002
66	47	2	0.00	0.331	0.153
64	34	2	0.00	0.334	0.131
72	36	1	0.00	0.334	0.116
101	27	1	0.00	0.335	0.172
67	47	2	0.00	0.336	0.156
176	62	2	0.00	0.338	0.218
194	56	2	0.00	0.338	0.000
130	41	2	0.00	0.338	0.121
105	29	2	0.00	0.338	0.132
90	40	2	0.00	0.349	0.268
170	47	1	0.00	0.350	0.134
34	71	2	0.00	0.351	0.129
86	53	2	0.00	0.353	0.126
43	53	1	0.00	0.355	0.169
42	49	1	0.00	0.359	0.292
156	48	1	0.00	0.360	0.351
187	52	1	0.00	0.365	0.111
158	17	2	0.00	0.365	0.068
123	15	2	0.00	0.366	0.078
3	26	2	0.00	0.369	0.218
1	60	2	0.00	0.372	0.134
183	56	2	0.00	0.374	0.151
177	24	1	0.00	0.375	0.174

Edad= Años

1=Masculino

2= Femenino

No. Pac. = Número de paciente

Continuación de la Tabla No. 1

No. Pac.	Edad	Sexo	Tit. Widal	ELISA	
				IgG	IgA
				Absorbancia (nm)	
122	33	2	0.00	0.384	0.521
145	42	2	0.00	0.387	0.434
92	45	1	0.00	0.389	0.150
54	52	2	0.00	0.390	0.081
22	85	1	0.00	0.400	0.316
182	24	2	0.00	0.402	0.422
8	33	2	0.00	0.405	0.217
120	59	2	0.00	0.405	0.241
35	25	2	0.00	0.407	0.429
99	5	2	0.00	0.407	0.363
88	70	1	0.00	0.412	0.496
109	25	2	0.00	0.412	0.144
57	47	2	0.00	0.415	0.194
26	65	2	0.00	0.418	0.538
132	55	1	0.00	0.419	0.568
47	16	1	0.00	0.422	0.240
191	43	2	0.00	0.423	0.047
29	38	2	0.00	0.426	0.240
74	70	1	0.00	0.435	0.207
2	30	2	0.00	0.437	0.311
103	24	2	0.00	0.442	0.227
106	28	2	0.00	0.456	0.260
7	55	1	0.00	0.461	0.260
160	70	1	0.00	0.461	0.728
162	66	2	0.00	0.462	0.360
19	26	2	0.00	0.465	0.224
51	83	2	0.00	0.472	0.113
100	42	1	0.00	0.473	0.144
13	12	1	0.00	0.473	0.545
27	50	2	0.00	0.473	0.274
82	55	2	0.00	0.478	0.115
83	72	1	0.00	0.481	0.397
159	17	2	0.00	0.485	0.044
36	53	2	0.00	0.485	0.252
24	79	1	0.00	0.500	0.317
6	52	2	0.00	0.510	0.347

Edad=Años

1=Masculino

2=Femenino

No. Pac.= Número de Paciente

Continuación de la tabla No. 1

No. Pac.	Edad	Sexo	Tit. Widal	ELISA	
				IgG	IgA
				Absorbancia (nm)	
23	73	1	0.00	0.519	0.225
179	24	2	0.00	0.526	0.169
28	53	1	0.00	0.555	0.257
135	32	2	0.00	0.556	0.201
5	54	2	0.00	0.556	0.321
52	14	2	0.00	0.559	0.240
193	69	1	0.00	0.567	0.056
133	32	1	0.00	0.580	0.861
107	25	2	0.00	0.581	0.161
114	62	2	0.00	0.587	0.270
78	30	2	0.00	0.590	0.069
12	49	1	0.00	0.592	0.322
138	63	1	0.00	0.609	0.124
59	66	1	0.00	0.609	0.233
48	64	1	0.00	0.612	0.231
17	69	2	0.00	0.628	0.587
119	30	2	0.00	0.631	0.145
39	64	2	0.00	0.636	0.498
4	30	2	0.00	0.645	0.376
9	30	2	0.00	0.661	0.558
25	57	2	0.00	0.669	0.239
50	53	2	0.00	0.691	0.308
20	43	2	0.00	0.716	0.828
87	86	2	0.00	0.718	0.142
181	45	1	0.00	0.745	0.566
16	55	2	0.00	0.751	0.179
81	65	1	0.00	0.764	0.147
188	38	1	0.00	0.799	0.438
173	31	2	0.00	0.827	0.603
80	13	2	0.00	0.886	0.325
49	28	1	0.00	0.888	0.083

Edad= Años 1=Masculino 2= Femenino No. Pac. = Número de Paciente

TABLA No. 2 DE RESULTADOS

No. Pac.	Edad	Sexo	Tit. Widal	ELISA	
				IgG	IgA
					Absorbancia (nm)
142	8	1	1:40	0.079	0.023
89	18	2	1:40	0.204	0.026
111	21	2	1:40	0.214	0.052
127	46	1	1:40	0.238	0.091
112	57	2	1:40	0.284	0.309
71	51	1	1:40	0.286	0.225
189	36	2	1:40	0.289	0.236
96	52	2	1:40	0.298	0.125
124	76	2	1:40	0.315	0.126
128	51	1	1:40	0.316	0.374
32	26	2	1:40	0.328	0.122
58	65	2	1:40	0.348	0.199
31	76	2	1:40	0.359	0.393
136	73	2	1:40	0.385	0.365
118	59	1	1:40	0.408	0.074
149	37	1	1:40	0.425	0.026
93	73	1	1:40	0.429	0.316
14	38	2	1:40	0.455	0.596
147	68	1	1:40	0.555	0.170
62	62	2	1:40	0.564	0.417
146	32	1	1:40	0.597	0.093
64	64	2	1:40	0.625	0.690
144	44	2	1:40	0.728	0.202
121	26	1	1:40	0.740	0.643
10	52	2	1:40	0.742	0.746
61	64	2	1:40	0.462	0.199

Edad= Años 1= Masculino 2= Femenino No. Pac. = Número de Paciente

TABLA No. 3 DE RESULTADOS

No. Pac.	Edad	Sexo	Tit. Widal	ELISA	
				IgG	IgA
				Absorbancia (nm)	
79	46	2	1:80	0.194	0.094
163	26	2	1:80	0.227	0.123
63	72	2	1:80	0.258	0.158
116	76	2	1:80	0.263	0.320
38	55	1	1:80	0.313	0.421
73	53	2	1:80	0.315	0.521
55	38	1	1:80	0.334	0.126
84	8	1	1:80	0.365	0.092
68	23	2	1:80	0.370	0.222
139	76	2	1:80	0.416	0.138
102	24	2	1:80	0.473	0.294
117	41	2	1:80	0.491	0.213
18	26	1	1:80	0.512	0.234
11	25	2	1:80	0.555	0.106
125	24	2	1:80	0.565	0.173
45	41	2	1:80	0.571	0.194
85	65	1	1:80	0.652	0.310
98	42	2	1:80	0.807	0.539
15	52	2	1:80	0.820	0.483

Edad=Años

1=Masculino

2=Femenino

No. Pac.=Número de Paciente

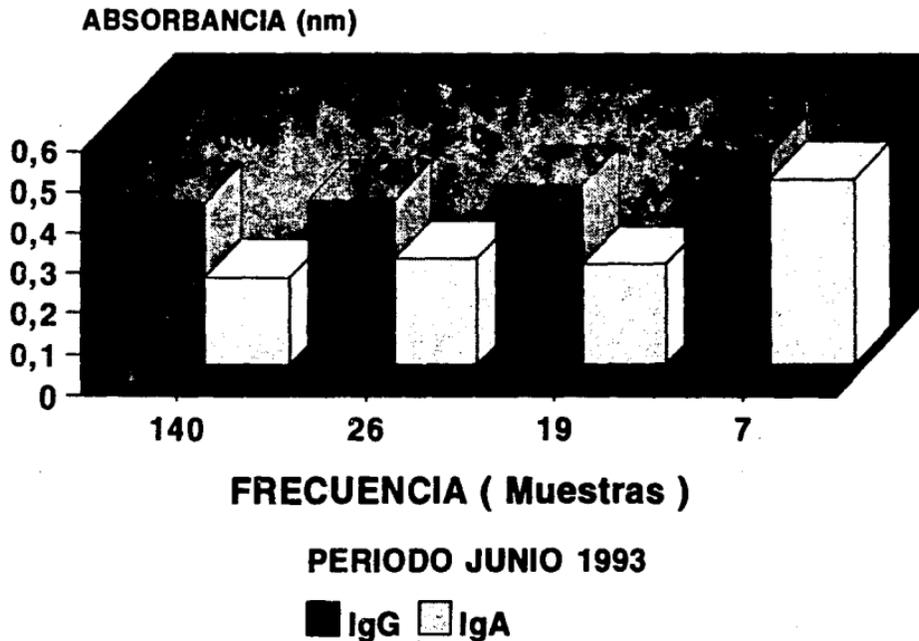
TABLA No. 4 DE RESULTADOS

No. Pac.	Edad	Sexo	Tit. Widal	ELISA	
				IgG	IgA
				Absorbancia (nm)	
152	46	1	1:160	0.269	0.052
108	29	2	1:160	0.480	0.293
21	56	1	1:160	0.483	0.335
141	52	2	1:160	0.510	0.741
110	21	2	1:160	0.545	0.537
69	55	2	1:160	0.643	0.814
140	45	2	1:160	0.755	0.450

Edad= Años 1=Masculino 2=Femenino No. Pac. = Número de Paciente

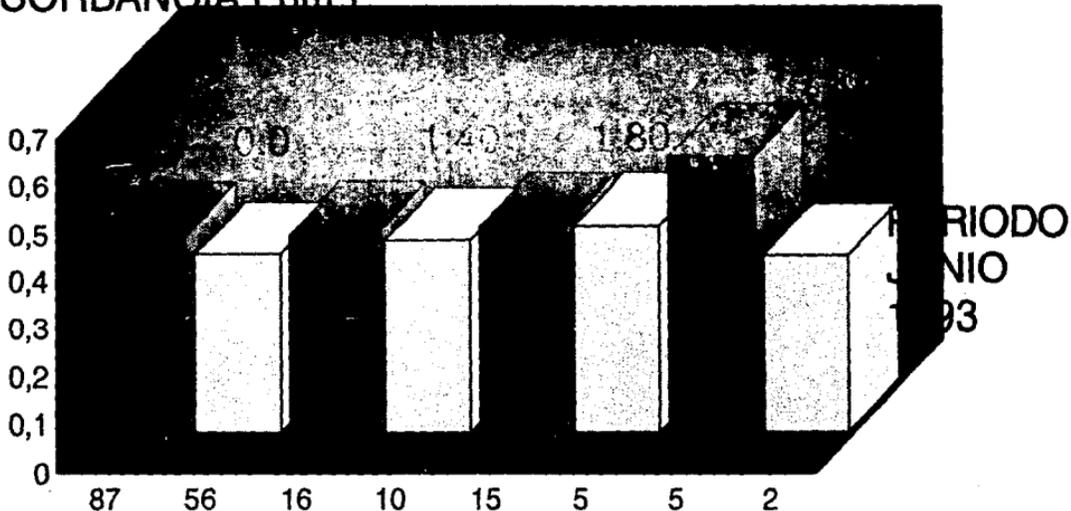
GRAFICAS

RELACION DEL TITULO DE IgA E IgG DETERMINADAS POR ELISA, CON RESPECTO A LA Rx DE WIDAL



RELACION DE IgA DETERMINADA POR ELISA EN COMPARACION CON Rx DE WIDAL CONSIDERANDO EL SEXO

ABSORBANCIA (nm)



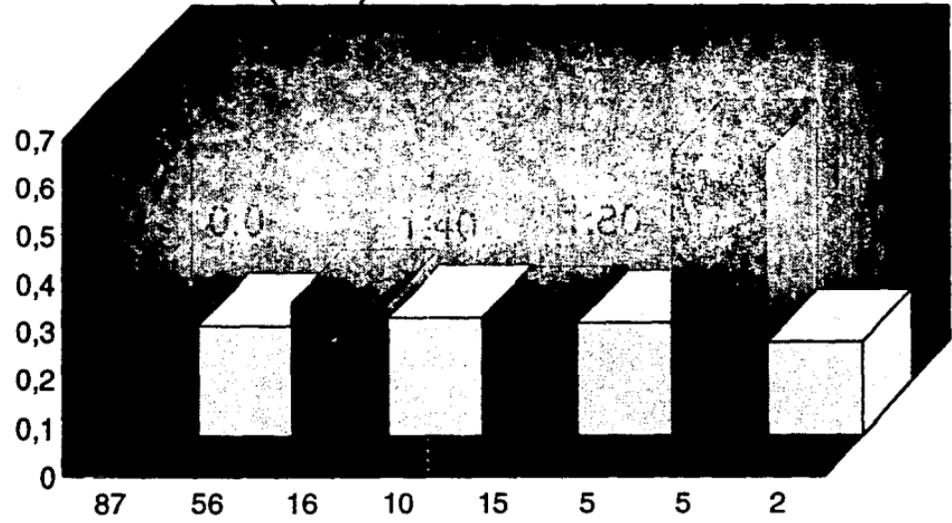
■ MUJERES □ HOMBRES

FRECUCENCIA (MUESTRAS)

GRAFICA 2

RELACION DE IgA DETERMINADA POR ELISA
 EN COMPARACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO EL SEXO

ABSORBANCIA (nm)



■ MUJERES □ HOMBRES

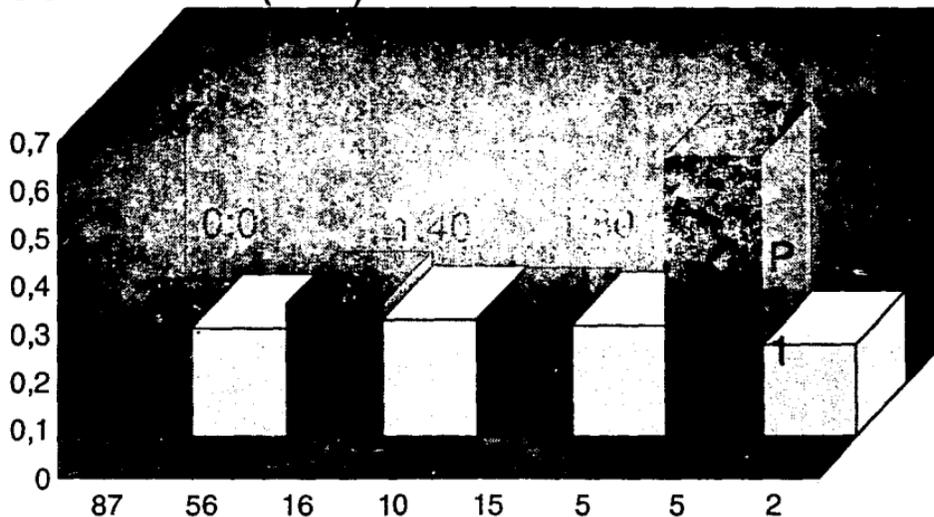
PERIODO
 JUNIO 1993

GRAFICA 3

FRECUENCIA (MUESTRAS)

RELACION DE IgA DETERMINADA POR ELISA
EN COMPARACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO EL SEXO

ABSORBANCIA (nm)



■ MUJERES □ HOMBRES

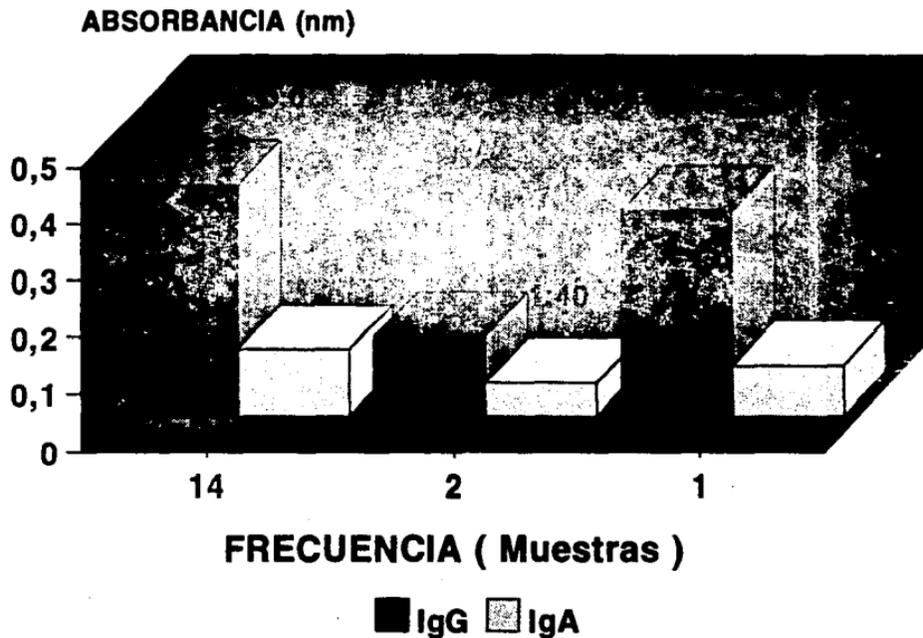
PERIODO
JUNIO 1993

GRAFICA 3

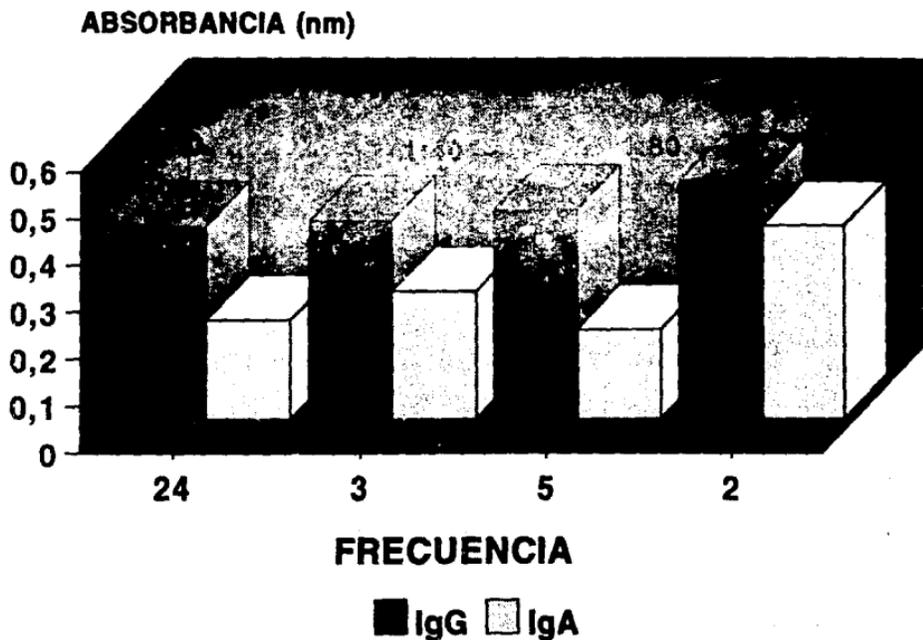
FRECUENCIA (MUESTRAS)

58

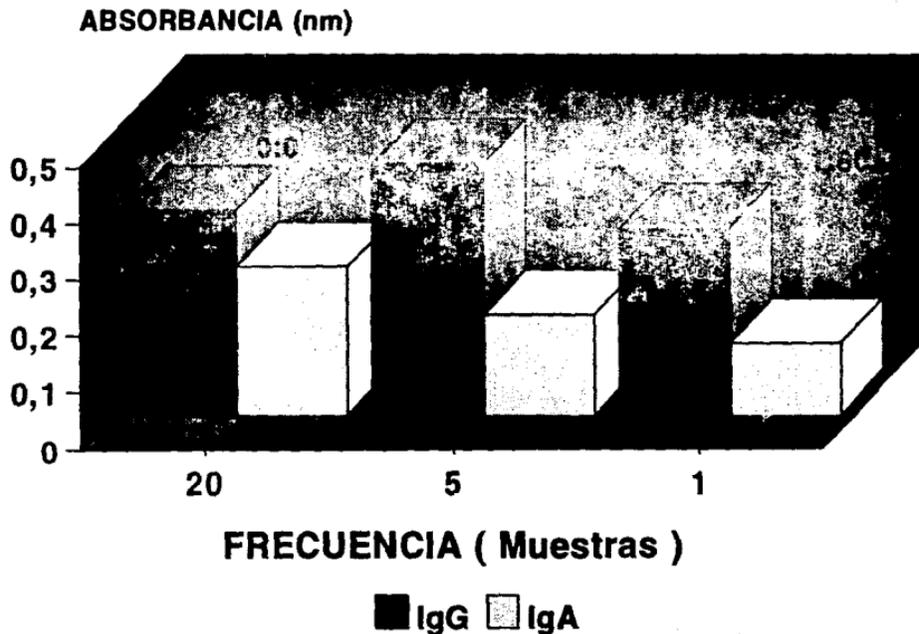
RELACION DE IgG E IgA DETERMINADAS POR ELISA EN RELACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO LA EDAD (0 A 20 AÑOS)



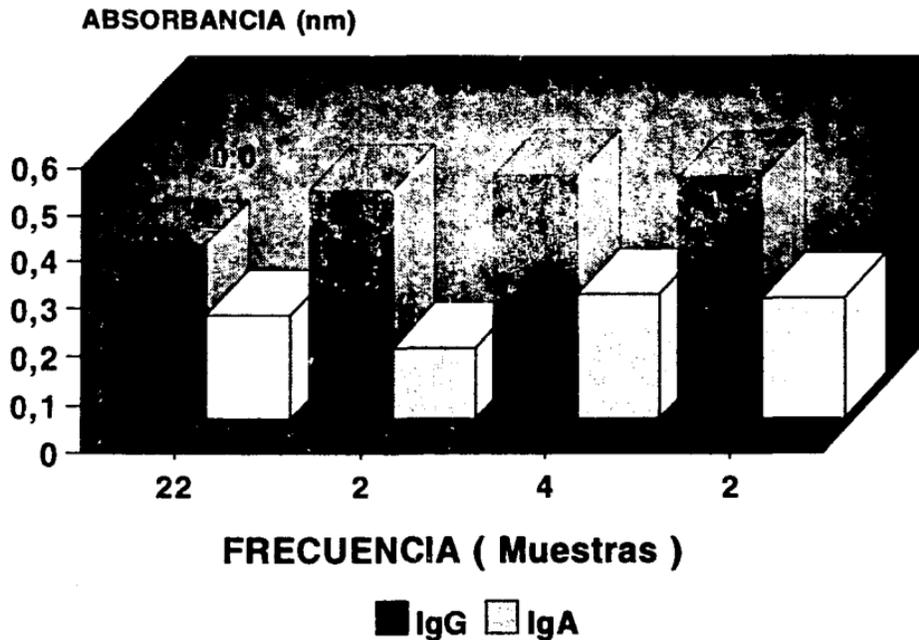
RELACION DE IgG E IgA DETERMINADAS POR ELISA EN RELACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO LA EDAD (21 A 30 AÑOS)



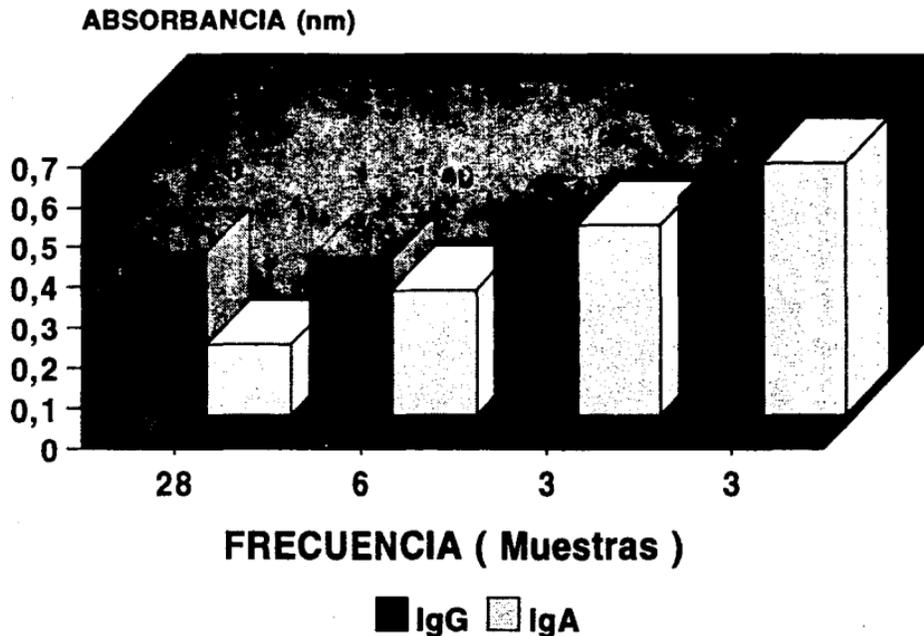
RELACION DE IgG E IgA DETERMINADAS POR ELISA EN RELACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO LA EDAD (31 A 40 AÑOS)



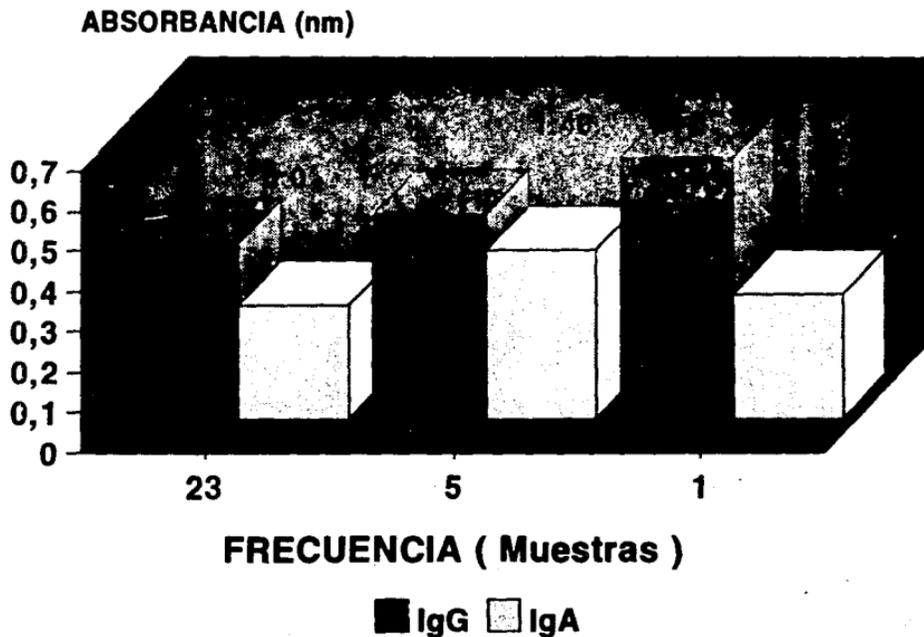
RELACION DE IgG E IgA DETERMINADAS POR ELISA EN RELACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO LA EDAD (41 A 50 AÑOS)



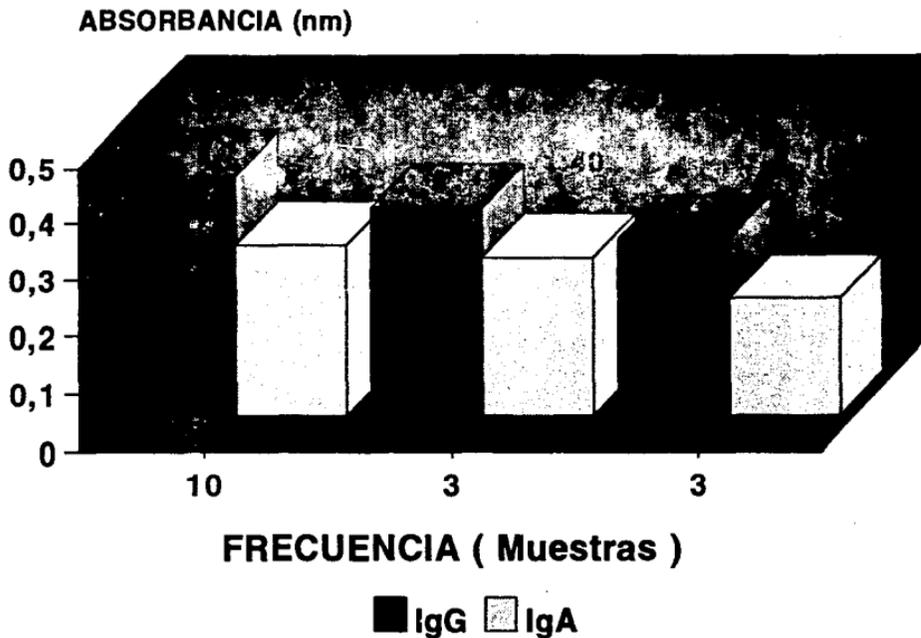
RELACION DE IgG E IgA DETERMINADAS POR ELISA EN RELACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO LA EDAD (51 A 60 AÑOS)



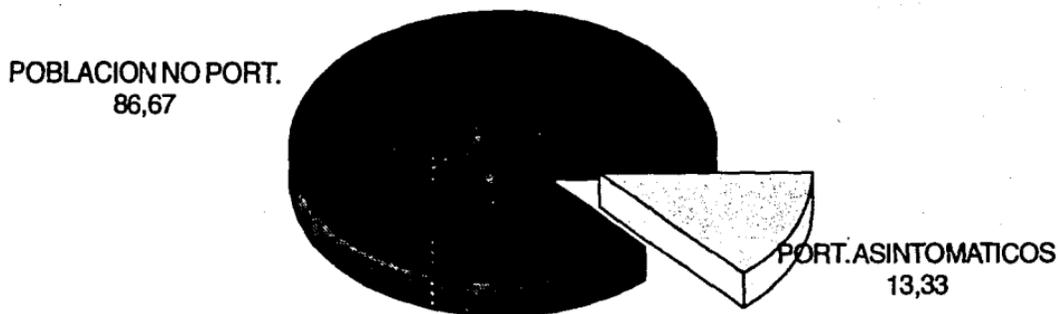
RELACION DE IgG E IgA DETERMINADAS POR ELISA EN RELACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO LA EDAD (61 A 70 AÑOS)



RELACION DE IgG E IgA DETERMINADAS POR ELISA EN RELACION CON LA Rx DE WIDAL CONSIDERANDO LA EDAD (71 EN ADELANTE)



PORCENTAJE DE PORTADORES ASINTOMATICOS DE FIEBRE TIFOIDEA EN LA POBLACION ESTUDIADA



D I S C U S I O N D E R E S U L T A D O S

GRAFICA No. 1 En esta gráfica se relacionaron las medias de las adsorbancias para las inmunoglobulinas de tipo IgA e IgG específicas para *S. typhi* obtenidos por ELISA con respecto al título de IgG obtenido por la reacción de Widal en muestras de pacientes que acudieron a los centros hospitalarios estudiados en los que se observó que conforme los títulos de Widal aumentaban, también lo hacían los títulos de IgA e IgG obtenidos por ELISA.

Aunque únicamente se podían comparar los títulos de anticuerpos de tipo IgG (ya que Widal únicamente valora anticuerpos de este tipo para el antígeno "O" de *S. typhi*), los anticuerpos de tipo IgA apoyaron los valores de IgG obtenidos por ELISA mostrando que la infección era reciente.

GRAFICA No. 2 En esta gráfica se asociaron las medias de las absorbancias de IgG con respecto al sexo y se encontró que las mujeres presentaron títulos más altos que los encontrados en los hombres, lo cual concuerda con la bibliografía consultada en la que se reporta que el estado de portador crónico es tres veces más común en mujeres que en hombres y aumenta conforme a la edad.

Los factores de mayor importancia que favorecen esta prevalencia son los siguientes: a) Enfermedad vesicular, b) Administración indiscriminada de antibióticos, c) El estrés, que origina colitis ulcerosa y, d) Desnutrición (debido a que las mujeres son multíparas).

En este estudio no fue posible realizar una comparación con respecto a la edad de las mujeres debido a que la frecuencia de edades no fue constante.

GRAFICA No. 3 En esta gráfica se asociaron las medias de las absorbancias de IgA con respecto al sexo; y al igual que en la gráfica No.2 se encontró que las mujeres presentaron títulos más altos que los hombres, a excepción del grupo con valores negativos para la reacción de Widal, probablemente debido a un error experimental.

GRAFICA No. 4 En estas gráficas se relacionaron las medias de las absorbancias para IgG e IgA obtenidas por ELISA con respecto a la edad de cada grupo.

En las gráficas 4-D, 4-E y 4-F se observó que las absorbancias para IgG aumentaban conforme aumentaban los títulos de la reacción de Widal, asimismo se encontró que las absorbancias más altas aparecían en el grupo de 61 a 70 años, como consecuencia de que a una edad avanzada las defensas del individuo van disminuyendo siendo más susceptibles a la infección.

Las gráficas 4-A y 4-C no siguieron el mismo comportamiento que las gráficas anteriores debido a que el número de pacientes fue, muy reducido por lo que los resultados fueron poco representativos.

GRAFICA No. 5 En la bibliografía se reporta que cuando existen títulos de anticuerpos contra el antígeno "O" de *S. typhi*, iguales o mayores de 1:80 cualquiera que sea el título de anticuerpos contra el antígeno "H" es significativo de infección actual, asimismo hace mención de que el porcentaje de portadores asintomáticos de fiebre tifoidea es de un 3 %. En el caso de la población estudiada se observó que un 13.33 % de pacientes presentaron títulos contra el antígeno "O" de *S. typhi* iguales o superiores de 1:80 sin que presentaran manifestaciones de la enfermedad considerándolos portadores asintomáticos de fiebre tifoidea, asimismo el porcentaje obtenido resultó superior al valor reportado debido a que las condiciones socioeconómicas de las poblaciones estudiadas fueron diferentes.

C O N C L U S I O N E S

1. Se obtuvo el LPS de *S. typhi* mediante el método de Galanos cultivando una cepa pura de *S. typhi* en agar infusión cerebro-corazón durante 24 hrs. a 37 °C. Es recomendable cultivar la bacteria en estas condiciones, ya que de no ser así las colonias pasan de la forma lisa a rugosa, con esta mutación aparece el antígeno "Vi" el cual enmascara al antígeno "O" impidiendo la obtención del LPS.

2. Para la estandarización de la técnica de ELISA se encontró que la concentración adecuada del LPS fué de 4 µg/ml y para los sueros problema una dilución de 1:500.

3. A los sueros problema se les determinó el título de anticuerpos de tipo IgA e IgG mediante el método de ELISA y el título de anticuerpos de tipo IgG por el método de Widal.

4. De la población estudiada se encontró que aproximadamente un 13.33 % son portadores asintomáticos de fiebre tifoidea del cual un 10.25 % corresponde a mujeres y un 3.08 % corresponde a hombres debido a que existe una mayor prevalencia de enfermedad vesicular además del uso indiscriminado antibióticos, desnutrición y padecimientos intestinales (colitis) entre otras causas.

5. No fue posible obtener una relación directa con respecto a la edad y los portadores asintomáticos, debido a que los grupos de edades fueron muy reducidos por lo que se recomienda para una futura investigación considerar límites de edad y un mayor número de muestras.

6. Se demostró que el método de ELISA es funcional ya que se pueden analizar gran número de muestras, además de que es altamente sensible.

A P E N D I C E D E M E D I O S D E C U L T I V O Y S O L U C I O N E S

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar MacConkey. Suspender 50 g de medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Dejar remojar 15 min. y hervir con agitación continua hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave (15 min. a 121 °C). Dejar enfriar y vaciar en cajas de petri estériles.

Agar Salmonella-Shigella. Suspender 60 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Remojar 15 min. y posteriormente agitar para obtener una suspensión homogénea, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto. No esterilizar en autoclave. Verter en placas.

Agar Verde Brillante. Suspender 58 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Dejar enfriar y verter en cajas de petri.

Agar Sulfito de Bismuto. Suspender 52 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Mezclar hasta obtener una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Dejar enfriar a 45 °C y continuar agitando para dispersar el precipitado. Verter en cajas de petri.

Agar Infusión Cerebro-Corazón. Suspender 52 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Remojar durante 15 min. y posteriormente calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

Para obtener mejores resultados el medio debe usarse el mismo día de su preparación.

Agar Peptona de Caseína. Suspender 30 g de peptona deshidratada y 15 g de agar bacteriológico deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Remojar durante 15 min. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. Dejar enfriar y distribuir en botellas de Roux.

Agar de Hierro y Lisina. Suspender 33 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Remojar 15 min. calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos con tapón. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. y enfriar en posición inclinada.

Agar MIO. Disolver 31 g del polvo deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Calentar hasta ebullición durante un minuto y disolver completamente. Vaciar en tubos y esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión durante 15 min.

Agar TSI. Suspender 65 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Dejar remojar 15 min. y hervir hasta completa disolución. Vaciar en tubos con tapón y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Dejar solidificar en posición vertical.

Agar SIM. Suspender 30 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada, dejar remojar por 15 min. y hervir hasta completa disolución. Vaciar en tubos con tapón y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Dejar solidificar en posición vertical.

Agar Citrato de Simmons. Suspender 22 g del medio deshidratado en 1.0 lt. de agua destilada. Dejar remojar durante 15 min. Calentar hasta ebullición agitando constantemente hasta completa disolución.

Vaciar en tubos con tapón. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Dejar solidificar en posición inclinada.

Agar Gelatina. Suspender 120 g de gelatina deshidratada en 1.0 lt. de agua destilada y remojar durante 15 min. Calentar hasta ebullición durante un minuto y vaciar en tubos con tapón. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Dejar solidificar en posición vertical.

Rojo de Metilo-Voges Proskauer. Suspender 17 g del polvo en 1.0 lt. de agua destilada. Disolver calentando y hervir aproximadamente un minuto. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Caldo Urea. Disolver 3.87 g del polvo deshidratado en 100 ml de agua destilada. Esterilizar a 5 lb de presión durante 7 a 10 min. ó a 8 lb durante 20 min. Si se prepara e inocular inmediatamente este medio, da buenos resultados sin esterilizar.

Caldo Rojo de Fenol y el carbohidrato correspondiente. Disolver 20 g del polvo en 1.0 lt. de agua destilada. Emplear tubos de Durham para investigar la producción de gas. Esterilizar de 116 a 118 °C durante 15 min.

SOLUCIONES.

- Solución Amortiguadora de Fosfatos-Salina(PBS) pH=7.2

Pesar:

8.0 g de NaCl

0.2 g de KCl

1.15 g de Na_2HPO_4

0.20 g de KH_2PO_4

Disolver en agua bidestilada y aforar a 1.0 lt. y almacenar a 4 °C.

- Solución Amortiguadora De Recubrimiento

Carbonato-Bicarbonato pH=9.6

Pesar:

1.59 g de Na_2CO_3

2.93 g de NaHCO_3

Disolver en agua bidestilada y aforar a 1.0 lt. Almacenar a 4 °C Por no más de dos semanas.

- Solución De Lavado PBS-Tween pH=7.4

Pesar las mismas cantidades de los reactivos para la soln. amortiguadora PBS. Disolverlos en agua bidestilada y agregar 0.5 ml de Tween 20. Aforar a 1.0 lt. y almacenar a 4 °C.

NOTA: Adicionar el Tween un poco antes de llegar al aforo para evitar la formación de burbujas que impidan la visualización del mismo.

- Solución Amortiguadora Del Sustrato pH=5.0

Preparar en agua bidestilada:

Acido Cítrico 0.1 M

Na₂HPO₄ 0.2 M

- Sustrato de Peroxidasa De Rábano Picante pH=5.0

Mezclar:

24.3 ml de ácido cítrico 0.1 M

25.7 ml de Na₂HPO₄ 0.2 M

Adicionar a esta mezcla 20 ul de H₂O₂ al 30 % .Por cada 10 ml de esta mezcla adicionar 4 mg de orto-fenilendiamina.

- Cristal Violeta.

Pesar:

2.0 g de cristal violeta

0.8 g de Oxalato de Amonio

Disolver el oxalato y el cristal violeta en 20 ml de etanol al 95 % .Diluirlo con 100 ml de agua destilada.

- Safranina.

Medir:

2.5 ml de Safranina O

100 ml de Etanol al 95 %

Disolver la safranina en el etanol y preparar una dilución 1:10 en agua destilada antes de su uso.

- Lugol.

Pesar:

1.0 g de I_2

2.0 g de KI

Disolver el KI en agua y añadir el I_2 lentamente hasta que se disuelva. Completar a un volumen de 100 ml con agua destilada. Filtrar y conservar en frasco con tapa hermética.

B I B L I O G R A F I A .

1. Delaat AN. Microbiología. México: Editorial Interamericana, 1980: 182-186.
2. Joklik KW, Willett PH, Amos BD. Microbiología. Zinsser. 18ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1987: 129-133, 387-388, 712-715.
3. Pelczar MJ, Reid RO, Chan ECS. Microbiología. 4ª ed. México: Mc. Graw Hill, 1984: 523-531.
4. Verger GG. Atlas práctico para el médico general. Enfermedades infecciosas. España: Editorial Salvat, 1983: 4 ..
5. Petersdorf GR, Adams OR. Principios de medicina interna. Harrison. 6ª ed. México: Editorial Mc. Graw-Hill, 1983: vol. 1: 1383-1386.
6. González, GM. Estado actual de la fiebre tifoidea en México. *Trat Med Prac Enf Inf III* 1984; 28: 15-33.
7. Burrows W, Moulder J W. Tratado de microbiología de Burrows. 4ª ed. México: Editorial Interamericana, 1984: 429-443.
8. Burdon LK, Williams PR. Microbiología. 6ª ed. México: Editorial Publicaciones Cultural, 1986: 627-638.
9. Fanta NE, Kraljevic OR. Fiebres tíficas. Fiebres tifoidea y paratifoidea. *Infectología*. 1981; 3: 203-211 .
10. Sarasombath S, Banchuin N, Sukosol T, Rungpitarangsi B, Masatit S. Systemic and intestinal immunities after natural typhoid infection. *J. Clin Microbiol* 1987; 25 (6): 1088
11. Rose RN, Milgram F, Van Oss JC. Principios de inmunología. México: Editorial CECSA, 1983: 65-78 .
12. Roitt J. Essential immunology. 6ª ed. U.S.A. :Editorial Blackwell Scientific Publications, 1988:41 .
13. Stites PD, Terr IA. Inmunología básica y clínica. 7ª ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1992.
14. Kaplan AL, Pesce JA. Química clínica. Argentina :Editorial Médica Panamericana, 1990: 238-241.
15. Nota R. Bases de inmunología. Argentina: Editorial López L., 1978: 44-49.
16. Wexley AJ, Godd AR. Principios de inmunología clínica. España: Editorial Acribia, 1980: 44-49.

17. Kaplan AL, Szabo LL. Clinical chemistry interpretation and techniques. 3ª ed. Philadelphia: Editorial Lea and Febiger, 1988: 240.
18. Margni AR. Inmunología e inmunológica. 4ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1990: 571-586, 617-626.
19. Amos, WMG. Inmunología básica. España: Editorial Acribia, 1986: 49-52.
20. Bartholomeusz RC. Assays for total and antigen specific polimeric IgA in serum based on binding to secretory complement. J. Immunology Methods 1987; 247-255.
21. Todd JC. Diagnóstico y tratamiento clínicos para el laboratorio. 8ª ed. España: Editorial Salvat, 1991: 1205-1212.
22. Paul WE. Fundamental immunology. New York: Editorial Raven Press, 1989: 226.
23. Starr PM, Ingraham LT, Raffel S. Annual review of microbiology. U.S.A.: 1976: 436-438.
24. Frank H, Neffer MD. The ciba collection of medical illustrations. Digestive sistem. U.S.A.: Editorial Ciba Pharmaceutical Company, 1980: 140-149.
25. Calderón JE. Conceptos clínicos de infectología. 4ª ed. México: Editorial Fund. Méndez Cervantes, 1977: 280-294.
26. Gatell, JM, Mensa J, Moreno A. Enfermedades infecciosas. Licenciatura. España: Editorial Salvat, 1990: 363-364.
27. Rietschel ET, Braude H. Bacterial endotoxins. Scientific American 1992; 267: 26-36
28. Sonnerwirth CA, Jarret L. Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico. Gradwohl. 8ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1988: 1624-1929.
29. Capella BA, Tay ZJ, Muro R. Nociones elementales de microbiología. 2ª ed. México: Editorial Francisco Méndez Cervantes, 1984: 162-166.
30. Pérez PJ. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España: Editorial Doyma, 1992: 647-657.
31. Davies BD, Dulbecco R, Eisen HN. Tratado de microbiología. 2ª ed. España: Editorial Salvat, 1980: 267, 533-535.
32. Pumarola A, Rodríguez DA, García JA. Microbiología y parasitología médica. España: Editorial Salvat, 1984: 405-419.
33. Braude IA, Davies EC. Microbiología clínica. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1984: 72-78.
34. Bock DT, Madigan TM. Biology of microorganisms. 15ª ed. U.S.A.: Editorial Prentice Hall, 1984: 412.
35. Jensen MM, Wright DN. Introducción a la microbiología médica. México: Editorial Prentice-Hall Hisp, 1987: 333.

36. Botero RD, Restrepo MJ, Borrero RJ. Fundamentos de medicina. Enfermedades infecciosas. 3ª ed. Colombia: Editorial C.I.B, 1984: 552-555.
37. Witton JC. Microbiología. 3ª ed. México: Editorial Continental, 1980: 122-126, 388-395.
38. Rose NR, Friedman H. El laboratorio en inmunología clínica. 2ª. ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1984: 414-426, 524-527.
39. Boehringer M. Enzimounoensayo según el principio de ELISA. Principios y aplicación. Boehringer Mannheim. México.
40. O' Beirne JA, Cooper RH. Heterogeneous enzyme immunossay . J. Histochemistry and Cytochemistry 1979; 27 (8): 1148-1162 .
41. MANUAL BIOXON. Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico. Bioxon de México. México.
42. Finegold SM, Baron EJ. Diagnóstico microbiológico. 7ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1991: 724-780.
43. MacFadin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Editorial Médica Panamericana, 1990.
44. Koneman WE. Diagnóstico microbiológico. México: Editorial Médica Panamericana, 1989: 152-185.
45. Hernández VR, Muñoz O, Garduño RG, González AS. Contrainmunolectroforesis para la identificación de anticuerpos contra antígenos "O" de Salmonella typhi. Arch Invest Med 1979;10: 23-31 .
46. Weir DM. Immunochemistry. Handbook of experimental immunology . 3ª ed. London: Editorial Blackwell Scientific Publications, 1979: 2.9-2.11.
47. Dubois M, Guilles KA, Hamilton JK. Colorimetric method for determination of gars and related sustances. Annal Chem 1956; 28: 380-410
48. Hernández VR, Sánchez CJ, Dfaz GC, Muñoz HO. Utilización de la técnica de ensayo enzimático inmunoespecífico (ELISA) para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. I. Estandarización de la técnica. Arch Invest Med 1980; 11 (1): 137-145 .
49. Lynch MJ, Raphael S, Meller LD. Métodos de laboratorio. 2ª ed. México: Editorial Interamericana, 1988: 995-996.