

336427

1



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

PLANTEL CHAPULTEPEC
ESCUELA DE Q.F.B.
INCORPORADA A LA UNAM

RESPUESTA INMUNE HUMORAL A PORINAS DE
S. typhi EN HUMANOS CON LA VACUNA *Ty21a*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:
ADRIANA GODINEZ MORENO

DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. ROSA MARÍA SALAZAR GONZÁLEZ

MÉXICO, D.F. 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES

Con amor y respeto por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y con el eterno agradecimiento para la realización de mi carrera.

A MI ESPOSO ANTONIO

Con amor y cariño en aquellos momentos difíciles de mi vida.

A MI ASESOR

M. en C. ROSA MARIA SALAZAR GONZALEZ

Con gratitud por sus valiosos consejos y sus acertadas indicaciones y por enseñarme el maravilloso mundo de la ciencia.

A LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

En agradecimiento por los conocimientos adquiridos dentro de ella.

AL DR. ARMANDO ISIBASI

Por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio de Inmunología .

A todas mis compañeros del laboratorio de Inmunología cuyo inapreciable apoyo hicieron posible la realización de este trabajo y sin olvidar a todas aquellas personas que hacen que la ciencia avance y sea posible la erradicación de las enfermedades infecciosas.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI a cargo del Dr. Armando Isibasi Araujo y bajo la dirección de la M. En C. Rosa María Salazar González.

INDICE

I. Resumen	
II. Introducción	1
1. Propiedades generales de la Respuesta Inmune	1
1.1 Tipos de respuesta inmune específica	2
1.2 Células y tejidos del sistema inmune	3
1.3 Tejidos Linfoides	8
1.4 Anticuerpos	9
1.5 Funciones de los anticuerpos	11
1.6 Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida	13
2.0 El sistema del complemento	14
2.1 Componentes del complemento	15
2.2 Activación del sistema del complemento	15
3.0 Fiebre Tifoidea	18
3.1 Etiología	18
3.2 Epidemiología	20
3.3 Patogénesis y Patología	21
3.4 Fiebre Tifoidea como un Problema de Salud Público	22
3.5 Vacunas disponibles	23
III. Objetivos	29
IV. Hipótesis	30
V. Materiales y métodos	31
5.1 Material, equipo y reactivos utilizados	31
5.2 Preparación de soluciones utilizadas	32
5.3 Ensayo de Elisa para Porinas y LPS de <i>Salmonella typhi</i>	35
5.4 Cuenta viable para <i>Salmonella typhi</i>	36
5.5 Ensayo de anticuerpos bactericidas	36
VI. Resultados	38

VII. Análisis de resultados	89
VIII. Conclusiones	92
IX. Perspectiva	93
X. Bibliografía	94

I. RESUMEN

La fiebre tifoidea es todavía un importante problema de salud pública, sobre todo en países en vías de desarrollo. Actualmente existen cuatro vacunas contra la enfermedad elaboradas a base de *Salmonella typhi*; dos vacunas que se aplican por vía parenteral, una elaborada a partir de bacterias inactivadas con calor y preservadas en fenol y otra inactivada con acetona. Estas producen reacciones colaterales, además, la inmunidad protectora que generan es poco eficiente y de corta duración, por lo que no se recomienda para su aplicación en niños y ancianos. Una vacuna oral elaborada con bacterias atenuadas de *Salmonella typhi* Ty21a, sus inconvenientes son su alto costo y la necesidad de aplicarla con un antiácido en tres ocasiones y una vacuna parenteral elaborada a partir del antígeno Vi de *S. typhi*, es efectiva pero de corta duración y debido a su naturaleza polisacáridica no induce memoria inmunológica y no es efectiva en niños menores de tres años.

El trabajo de investigación que se ha venido realizando en el Laboratorio de Inmunoquímica del C.M.N. siglo XXI, esta basado en la creación de una nueva vacuna contra fiebre tifoidea, que consiste en proteínas de membrana externa (PME) de *Salmonella typhi* llamadas porinas.

El papel de las porinas como inmunógenos en la fiebre tifoidea se ha demostrado ampliamente en estudios recientes; en el suero de pacientes con fiebre tifoidea se detectaron anticuerpos de clase IgM durante la fase aguda de la enfermedad, y anticuerpos de clase IgG durante la fase de convalecencia, específicos a porinas, demostrando que durante la infección las porinas son antígeno blanco de la respuesta inmune humoral.

Tomando en cuenta el antecedente de que las porinas son inmunógenos en pacientes con fiebre tifoidea, en este trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral a las porinas de *Salmonella typhi* en sueros de 6 pacientes sanos dentro de un rango de edad entre los 20 y 30 años siendo dos hombres y cuatro mujeres vacunados por vía oral con la vacuna de Germanier Ty21a para fiebre tifoidea. Se determinaron títulos e isotipos de anticuerpos anti-porinas y anti-LPS de *S. typhi* por el método de ELISA. Se determinó además la presencia de anticuerpos bactericidas como posible mecanismo efector de la protección conferida por la vacuna de Germanier. Los resultados demuestran que las porinas de *Salmonella typhi* son blanco de la respuesta inmune humoral en pacientes y en este caso en los individuos vacunados, por lo que se consideran como buen candidato a vacuna contra fiebre tifoidea. La ausencia de anticuerpos bactericidas inducidos por la vacuna Ty21a, sugiere que los anticuerpos específicos a la vacuna detectados en suero, pueden contribuir a la inmunidad protectora conferida por la vacuna de otra manera.

II. MARCO TEORICO

1. Propiedades Generales de la Respuesta Inmune

El término inmunidad deriva de la palabra latina "*immunitas*", y hace referencia a la exención de diversas obligaciones civiles y procesamientos legales ofrecidos a los senadores romanos durante el desempeño de sus cargos. Desde el punto de vista histórico, inmunidad significa protección frente a la enfermedad infecciosa. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune.²

Una definición mas completa y moderna considera a la inmunidad como una reacción a las sustancias extrañas, incluyendo a los microorganismos así como a las macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, sin que dicha reacción tenga una repercusión fisiológica o patológica.²

Los individuos sanos se encuentran protegidos contra los microorganismos por medio de diferentes mecanismos. Algunos de estos mecanismos incluyen la inmunidad innata, que se limita a la capacidad para discriminar un microorganismo de otro, siendo su función muy parecida frente a la mayoría de los agentes infecciosos.²

Los elementos esenciales de la inmunidad innata son: 1) barreras físicas y químicas, como epitelios y sustancias antimicrobianas; 2) proteínas sanguíneas entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 3) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y otros leucocitos. La inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra los microorganismos.

Existen mecanismos de defensa mucho más evolucionados que son estimulados tras la exposición a agentes infecciosos y cuya intensidad y capacidad defensiva

aumentan después de la ulterior exposición a un determinado microorganismo, esta forma de inmunidad que se desarrolla como una respuesta a la infección, se le denomina inmunidad adaptativa o inmunidad específica.²

Las características de la inmunidad adaptativa son: especificidad para moléculas diferentes; especialización, que las capacita para responder de forma singular a distintos tipos de microorganismos; y a su capacidad para recordar con más fuerza al mismo microorganismo tras exposiciones repetidas. Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos, entre ellos los anticuerpos. Las sustancias extrañas que inducen respuestas inmune específicas o son blanco de tales respuestas se denominan antígenos.²

1.1 Tipos de respuesta inmune específica

La generación de respuestas inmunes específicas se produce habitualmente tras la exposición de un individuo a un antígeno extraño. Las respuestas inmunes específicas se clasifican en dos tipos, según el componente del sistema inmune que participa en la respuesta.²

En la inmunidad humoral participan moléculas de la sangre que son las responsables de reconocer y eliminar a los antígenos; estas moléculas se llaman anticuerpos. En la inmunidad mediada por células, también llamada inmunidad celular, participan células llamadas linfocitos T.²

La inmunidad humoral y la inmunidad celular están mediadas por respuestas a distintos tipos de linfocitos. Las células de la inmunidad humoral son los linfocitos B, los cuales responden a la presencia de antígenos extraños transformándose en células productoras de anticuerpos, mientras que los linfocitos T son los mediadores de la inmunidad celular.²

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, ya que los anticuerpos se pueden unir a éstos y ayudar a su eliminación; por el contrario, microorganismos intracelulares como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan dentro de los fagocitos y otras células del huésped donde son inaccesibles a los anticuerpos circulantes, la defensa frente a este tipo de infecciones corre a cargo de la inmunidad mediada por células, que funciona favoreciendo la destrucción de los microorganismos que se encuentran en los fagocitos, o favoreciendo la muerte de las células infectadas.²

El sistema inmune posee varias propiedades que son de importancia fundamental para su función normal. Estas son: la especificidad por distintos antígenos, la diversidad del reconocimiento del antígeno, memoria de la exposición al antígeno, respuestas especializadas para distintos microorganismos, limitación propia, y capacidad para discriminar entre lo propio y lo extraño.²

La respuesta inmune específica se inicia a partir del reconocimiento de antígenos extraños por linfocitos específicos, los cuales responden proliferando y diferenciándose a células efectoras cuya función es eliminar el antígeno. La fase efectora de la inmunidad específica requiere la participación de varios mecanismos de defensa, incluyendo el sistema del complemento, fagocitos, células inflamatorias y citocinas.²

1.2 Células y tejidos del sistema inmune

Las células del sistema inmune están presentes en condiciones normales en células circulantes en la sangre y linfa, formando grupos anatómicamente definidos en los órganos linfoides y como células dispersas en casi todos los tejidos exceptuando el sistema nervioso central.²

El sistema inmune ha desarrollado tejidos especializados, llamados órganos linfoides periféricos que concentran a los antígenos introducidos a través de puertas de entrada comunes (piel y tractos gastrointestinal y respiratorio). Los mismos tejidos atraen linfocitos y otras células necesarias para iniciar respuestas inmunes específicas.²

Los linfocitos son las células que específicamente reconocen y responden a los antígenos extraños, las fases de reconocimiento y activación de la respuesta inmune dependen de células no linfoides, llamadas células accesorias, las cuales no son específicas para antígenos diferentes. Los fagocitos mononucleares, las células dendríticas y otras poblaciones celulares funcionan como células accesorias en la inducción de respuestas inmunes.²

Las respuesta inmune está mediada por linfocitos, que son las únicas células en el organismo capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes determinantes antigénicos. Como todas las células sanguíneas, los linfocitos se originan en la médula ósea. En las fases iniciales de su desarrollo, los linfocitos no producen receptores de superficie para los antígenos y, por lo tanto no responden frente a los antígenos. A medida que maduran, comienzan a expresar los receptores para los antígenos, responden a la estimulación antigénica y evolucionan hacia diferentes clases funcionales.²

Los linfocitos constan de diferentes subgrupos que difieren en sus funciones y productos proteicos, aunque todos ellos parecen morfológicamente similares. Una clase de linfocitos son los linfocitos B, las primeras fases de maduración de la célula B tienen lugar en la médula ósea. Los linfocitos B son las únicas células-capaces de producir anticuerpos. Los receptores para los antígenos en el linfocito B son formas de anticuerpos unidos a la membrana. La interacción de los antígenos con estos anticuerpos de membrana inicia la secuencia de activación de las células B, que termina en el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos.²

La segunda clase principal de linfocitos son los linfocitos T, cuyos precursores provienen de la médula ósea y después migran y maduran en el timo. Los linfocitos T se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, siendo células T cooperadoras y células T citotóxicas. Las principales funciones de los linfocitos T son regular todas las respuestas inmunes frente antígenos proteicos y ayudar en su calidad de células efectoras en la eliminación de microorganismos intracelulares.²

Los linfocitos T colaboradores y citotóxicos muestran una especificidad poco común por los antígenos: reconocen sólo antígenos peptídicos unidos a proteínas que están codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan sobre la superficie de otras células. Estas células T reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular pero no a los antígenos solubles. Las células T cooperadoras secretan hormonas proteicas llamadas citocinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T así como de otras células, entre ellas las células B y los macrófagos.²

Los linfocitos T citotóxicos lisan las células que producen antígenos extraños, como células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares.²

Las células B productoras de anticuerpos con frecuencia se diferencian hacia formas evolucionadas llamadas células plasmáticas. Las células plasmáticas se encuentran sólo en los órganos linfoides y en los sitios donde se produce la respuesta inmune, y normalmente no circulan por la sangre ni por la linfa. Se cree que las células plasmáticas son células diferenciadas con una capacidad de división mitótica pequeña o nula, y son en esencia, fábricas para la síntesis y secreción de anticuerpos.²

Algunos de los linfocitos T y B estimulados por un antígeno no se diferencian hacia células efectoras. En lugar de ello, evolucionan a linfocitos de memoria, que son capaces de sobrevivir durante largos períodos de tiempo,

quizá 20 años o más, aparentemente sin estimulación antigénica. Las células de memoria son funcionalmente inactivas, no producen moléculas efectoras a no ser que sean estimuladas por los antígenos. El desarrollo de las células de memoria es vital para el éxito de la vacunación como método que confiere inmunidad duradera contra las infecciones.²

Algunas de las células de la progenie de linfocitos estimulados por un antígeno proliferan, pero, en lugar de diferenciarse hacia células efectoras o células de memoria, mueren mediante un proceso conocido como apoptosis, este proceso es una forma de muerte celular fisiológica regulada, en la que el núcleo sufre condensación y fragmentación, la membrana plasmática muestra gemación y vesiculación, y la célula muerta es rápidamente fagocitada sin que libere su contenido. La muerte celular programada representa un importante mecanismo homeostático en el sistema inmune, cuya principal función es mantener más o menos constante la cantidad de linfocitos a lo largo de toda la vida.²

El sistema fagocítico mononuclear constituye la segunda población celular en importancia del sistema inmunitario, y consta de células que tienen una estirpe común y cuya función principal es la fagocitosis. Es por lo tanto, más apropiado clasificar a los monocitos y macrófagos como miembros del sistema fagocítico mononuclear.²

Toda las células del sistema fagocítico mononuclear se originan en la médula ósea y, tras su maduración y posterior activación, pueden adquirir diferentes tipos morfológicos. El primer tipo de célula que entra en la sangre periférica después de la médula ósea y que no está completamente diferenciado y se le denomina monocito.²

Una vez que colonizan los tejidos, estas células maduran y se convierten en macrófagos.²

Los macrófagos se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos y reciben nombres especiales para designar localizaciones específicas. Por ejemplo, en el sistema nervioso central son las "células de microglia"; las que revisten los capilares sinusoidales del hígado se llaman "células de Kupffer"; y los fagocitos multinucleados del hueso se denominan "osteoclastos". Algunos fagocitos mononucleares pueden diferenciarse en otra clase celular llamada célula dendrítica.²

Los macrófagos fagocitan partículas extrañas como microorganismos, macromoléculas, entre ellas antígenos, e incluso tejidos propios que están dañados o muertos, por ejemplo, los eritrocitos viejos. También fagocitan activamente partículas recubiertas por proteínas del complemento. Las sustancias fagocitadas son degradadas dentro de los macrófagos por enzimas lisosomales. Los macrófagos funcionan como las principales "células barredoras del cuerpo".²

Las células dendríticas son células accesorias que juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune, se identifican morfológicamente por tener proyecciones membranosas o espinosas. Existen dos tipos de células dendríticas: Las células dendríticas interdigitantes, que están presentes en el intersticio de la mayoría de los órganos, son muy abundantes en las zonas ricas en células T de los ganglios linfáticos y el bazo, y se encuentran dispersas por toda la epidermis de la piel, en donde reciben el nombre de "células de Langerhans" . Estas células son capaces de captar antígenos que entran a través de la piel y transportarlos hacia los ganglios linfáticos de drenaje, en donde se pone en marcha la respuesta inmune.²

El segundo tipo de células dendríticas se llaman "células dendríticas foliculares" porque están presentes en los centros germinales de los folículos linfoides de los ganglios linfáticos, bazo y tejido linfóide asociado a mucosas. Las células dendríticas foliculares atrapan antígenos unidos a anticuerpos o productos del complemento y los expresan en su superficie para que sean reconocidos por los linfocitos B.²

Además de los linfocitos y los fagocitos mononucleares, tenemos otros leucocitos sanguíneos, llamados granulocitos, los cuales participan en la fase efectora de la respuesta inmune específica.²

Los granulocitos se clasifican según las características de tinción de sus gránulos predominantes. Los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares por su núcleo multilobulado y de variada morfología, son los más numerosos. Responden rápidamente a los estímulos quimiotácticos; fagocitan y destruyen partículas extrañas, como microorganismos; pueden ser activados por citocinas producidas sobre todo por macrófagos y células endoteliales, también poseen receptores para un tipo de anticuerpo llamado inmunoglobulina (Ig) G y para proteínas del complemento, migran y se acumulan en lugares donde se activa el complemento.²

Los eosinófilos actúan principalmente en la defensa contra determinados tipos de agentes infecciosos. Los eosinófilos expresan receptores para una clase de anticuerpo llamado IgE. Son particularmente eficaces destruyendo agentes infecciosos que estimulan la producción de IgE, como los helmintos.²

Los basófilos expresan receptores de alta afinidad por la IgE y, por tanto, se unen con avidez a los anticuerpos IgE libres. Estos granulocitos son células efectoras de la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE.²

1.3 Tejidos linfoides

Los tejidos linfoides se pueden clasificar en dos grupos: 1) los órganos generadores, también llamados tejidos linfoides primarios, son los tejidos en los que los linfocitos expresan por primera vez los receptores antigénicos y alcanzan la madurez fenotípica y funcional, y 2) los órganos periféricos, también llamados tejidos linfoides secundarios, lugares donde se inicia y desarrolla la respuesta de los linfocitos a los antígenos extraños.²

Dentro de los órganos linfoides generadores de los mamíferos se incluyen la médula ósea, de donde proceden todos los linfocitos, y el timo, donde las células T maduran y alcanzan el estado de competencia funcional. Los tejidos linfoides periféricos comprenden los ganglios linfáticos, el bazo, el tejido linfático asociado a mucosas y el sistema inmune de la piel.²

Los ganglios linfáticos son los lugares a donde son transportadas y concentradas las proteínas antigénicas de la linfa, y donde se inicia y desarrolla la respuesta inmune frente a estos antígenos. El bazo es el órgano donde se inicia la respuesta a los antígenos procedentes de la sangre. La organización estructural de los tejidos linfoides favorece el contacto íntimo y las interacciones entre las poblaciones de células que cooperan en la generación de la respuesta inmune.²

1.4 Anticuerpos

Se sabe que los efectos protectores de la inmunidad humoral están mediados por una familia de glucoproteínas estructuralmente relacionadas llamadas anticuerpos. Los anticuerpos siempre inician sus efectos biológicos al unirse a los antígenos. La unión del anticuerpo al antígeno, aunque no es totalmente covalente, es sin embargo, exquisitamente específica para un antígeno frente a otro y a menudo es muy fuerte. Los anticuerpos, las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y los receptores para el antígeno de la célula T constituyen las tres clases de moléculas que utiliza el sistema inmunitario para reconocer específicamente a los antígenos.²

Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B unidos a la membrana, y estas moléculas actúan como receptores de la célula B. Los anticuerpos también se producen en una forma secretada por la progenie de células B que se diferencian en respuesta a la estimulación antigénica. Estos anticuerpos secretados se unen al antígeno y desencadenan varias de las funciones efectoras del sistema inmune.²

Los anticuerpos están presentes dentro de compartimientos unidos a la membrana citoplasmática (retículo endoplásmico y complejo de Golgi) y sobre la superficie de los linfocitos B, que son las únicas células capaces de sintetizar anticuerpos. Los anticuerpos están presentes en el plasma (porción líquida) de la sangre y, en menor proporción en el líquido intersticial de los tejidos donde se acumulan los anticuerpos secretados por las células B.²

Están unidos a la superficie de determinadas células efectoras, como los fagocitos mononucleares, células asesinas naturales (NK) y células cebadas, que no sintetizan anticuerpos, pero poseen receptores específicos para unir anticuerpos. También están presentes en los fluidos secretados como el moco y la leche, en los cuales se transportan específicamente ciertos tipos de anticuerpos.²

Todas las moléculas del anticuerpo tienen una estructura general similar que es responsable de ciertas características físico-químicas comunes, como la carga y solubilidad. Todos los anticuerpos tienen una estructura central común y dos cadenas ligeras idénticas (cada una aproximadamente de 24 kilodalton (kD) y dos cadenas pesadas idénticas (de unos 55 ó 70 kD).²

Los anticuerpos pueden dividirse fácilmente en un número pequeño de clases y subclases distintas basándose en sus características físicoquímicas como el tamaño, carga, solubilidad y en su comportamiento frente a los antígenos. A las clases de anticuerpos también se les denomina isotipos y en el hombre se denominan IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Los isotipos IgA e IgG pueden subdividirse en subclases, o subtipos, llamados IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente.²

Las cadenas pesadas de todos los anticuerpos de un isotipo o subtipo comparten grandes regiones de secuencias de aminoácidos idénticas que les diferencian de los anticuerpos que pertenecen a otros isotipos o subtipos.²

Las cadenas pesadas se designan por las letras del alfabeto griego según corresponda al isotipo general del anticuerpo: la IgA1 contiene cadenas pesadas $\alpha 1$; la IgA2, $\alpha 2$; la IgD, δ ; la IgE, ϵ ; la IgG1, $\gamma 1$; la IgG2, $\gamma 2$; la IgG3, $\gamma 3$; la IgG4, $\gamma 4$; y la IgM, μ .²

Las distintas funciones efectoras de los anticuerpos están mediadas por diferentes isotipos y subtipos, hay dos isotipos de cadenas ligeras de anticuerpos, denominadas κ y λ . Las cadenas ligeras no intervienen en las funciones efectoras de los anticuerpos.²

Los dominios amino terminales de las cadenas pesadas y ligeras, se designan como regiones variables (V) para diferenciarlas de las zonas más conservadas del resto de la cadena o regiones constantes (C). Las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras explican el reconocimiento del antígeno y las regiones C de las cadenas pesadas son responsables de iniciar las funciones efectoras. Las moléculas de Ig mantienen separadas en el espacio las funciones efectora y de reconocimiento.²

1.5 Funciones de los anticuerpos

La función efectora de un anticuerpo se inicia tras la unión con el antígeno. Una vez que tiene lugar esta unión, las consecuencias son distintas dependiendo de la estructura, localización anatómica y el isotipo del anticuerpo.²

IgM. La IgM está compuesta de cinco "monómeros" en forma de Y unidos mediante sus troncos. La IgM generalmente es el primer anticuerpo secretado durante la respuesta inmune. En la circulación aglutina antígenos (debido al gran número de sitios de unión de antígeno) activa proteínas del complemento y estimula la fagocitosis de microbios atacados por macrófagos.³

IgG. La IgG, el anticuerpo más abundante en la sangre, está compuesto de un solo "monómero". Activa tanto el complemento como a los macrófagos. Algunos procesos de transporte especial llevan IgG por la placenta, donde protege al feto en desarrollo en contra de enfermedades.³

IgA. La IgA es un dímero de dos monómeros unidos por sus troncos. Una proteína adicional enrollada en los troncos de los anticuerpos ayuda a la IgA a ser secretada desde la circulación hasta la saliva, lágrimas y moco; por lo tanto, la IgA es abundante en los tractos respiratorio y digestivo. Une microbios en estas superficies, impide que entren al cuerpo, y permite eliminarlos del cuerpo con el moco u otras secreciones. Así, la IgA representa una primera línea de defensa para las mucosas.³

IgE. La IgE, el "anticuerpo de las alergias", está compuesto de un solo monómero. El tronco de la IgE se une a las células cebadas en el tejido conectivo y a ciertos leucocitos, incluyendo basófilos y eosinófilos. Su función normal es la protección en contra de parásitos, los cuales son eliminados al estornudar y toser, acciones inducidas por la activación de las células cebadas y debilitadas o eliminadas por la activación de los eosinófilos. Las respuestas alérgicas son producidas cuando sustancias inocuas se unen a la IgE. La alergia se desencadena al estimular la síntesis de anticuerpos IgG que unen el mismo antígeno que los anticuerpos IgE. Si están presentes anticuerpos IgG suficientes, unen la mayor parte del antígeno alérgico e impiden que los antígenos alérgicos hagan contacto con la IgE.³

IgD. La IgD es un monómero, que generalmente se encuentra unido a las membranas plasmáticas de las células B. Su función no es conocida; puede funcionar principalmente como receptor de antígeno.³

Los anticuerpos son también una herramienta de gran valor en el laboratorio. Se utilizan RIA (radioinmunoanálisis) y ELISA, del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay (análisis inmunoabsorbente ligado a la enzima) para cuantificar antígenos en solución. La inmunoprecipitación y el "Western blotting" (transferencia de proteínas) se usan para la purificación y análisis estructural de antígenos proteicos. El clasificador de células mediante citometría de flujo se utiliza para caracterizar, identificar y purificar poblaciones celulares que expresan determinados antígenos de superficie.²

1.6 Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida.

Son inmunoensayos que permiten determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático. Esta reacción debe hacerse en un medio de fuerza iónica, pH, tensión superficial y concentración proteica apropiadas para que todas las moléculas de anticuerpo se unan al antígeno en fase sólida, y el mínimo posible de estas moléculas u otras se unan inespecíficamente al soporte sólido al que está unido el antígeno.⁶

La utilización de las reacciones enzima-sustrato ofrece la ventaja inherente de que las enzimas son magnificadores biológicos. De este modo un pequeño número de moléculas de enzima puede convertir un gran número de moléculas de sustrato a un producto medible. Un protocolo práctico de ELISA es el inmunoanálisis directo donde el antígeno unido al soporte, es detectado por un anticuerpo conjugado a una enzima.⁶

En el inmunoanálisis directo la reacción se completa mediante la adición de antiinmunoglobulina, conjugada a una enzima, la cual es dirigida contra la especie del anticuerpo utilizado para fijar al antígeno.⁶

2. El sistema del complemento

El sistema del complemento comprende un grupo de más de 30 proteínas séricas y de la superficie celular que interactúan con otras moléculas del sistema inmune y entre ellas mismas de una manera muy controlada, contribuyendo con muchas de las funciones efectoras de la inmunidad humoral y la inflamación.²

Charles Bordet demostró que si se añadía a las bacterias suero fresco que contenía un anticuerpo antibacteriano a temperatura fisiológica (37°C) las bacterias se lisaban. Sin embargo, si se calentaba el suero a 56° C o más, perdía su capacidad lítica. Esto no se debía a una disminución de la actividad de los anticuerpos, ya que éstos son termoestables e incluso el suero calentado era capaz de aglutinar las bacterias. Bordet concluyó que el suero debía contener otro componente termolábil que ayuda o "complementa" la función lítica de los anticuerpos y lo denominó complemento.²

La presencia del complemento en el suero de todos los animales es independiente del estado inmune del animal, esto es, sus niveles no se incrementan por inmunización. Muchas de las proteínas que conforman el sistema del complemento tienen actividad enzimática, aunque circulan como zimógenos o enzimas no activadas. Cuando se activan *in vivo*, estas proteínas ejercen diversos efectos sobre otras proteínas, y sobre células alterando su fisiología y la homeostasis tisular. Estos cambios promovidos por la activación del sistema del complemento son los responsables de la reacción inflamatoria cuyas manifestaciones son: dolor, calor, rubor (enrojecimiento) y pérdida de la función. El complemento es, así un mediador muy importante de la inflamación.⁸

2.1 Componentes del complemento

Los componentes del complemento son, en su gran mayoría, glicoproteínas con diferentes características fisicoquímicas. Algunos se designan con la letra C y un número: C1 (constituido por los subcomponentes C1q, C1r y C1s), Otros componentes del complemento se denominan como factores y se designan con letras: factor H, factor D, factor B, factor P, aun otros se designan con nombres descriptivos: inhibidor de C1 (C1INH), inactivador de C3B (C3bINA), etc.⁸

2.2 Activación del sistema del complemento

El sistema del complemento se activa de dos maneras; en una llamada vía clásica la cual requiere la presencia de anticuerpos, y la otra denominada vía alterna en la que éstos no participan.⁸

Vía clásica. En la vía clásica, sólo los anticuerpos de las clases IgM e IgG (subclases IgG1-IgG3) son capaces de promover la activación del complemento, pero se requiere que los anticuerpos estén combinados con el antígeno homólogo, es decir, en forma de complejos inmunes.⁸

La activación del complemento por la llamada "vía clásica" requiere de la presencia de complejos antígeno-anticuerpo. La disposición de dos moléculas adyacentes de IgG, o de una sola molécula de IgM, propicia la interacción de sus fragmentos Fc con el subcomponente C1q del componente C1 (un complejo de C1q, C1r y C1s, estabilizado por Ca^{++}). Tal interacción origina cambios conformacionales en la molécula de C1 que dan como resultado la activación de los subcomponentes C1r y C1s. Activados, estos subcomponentes se comportan como enzimas (esterasa/proteasa) que modifican y activan a los componentes C4 y C2. Primero C4, y luego C2, se rompen en dos fragmentos, uno grande (C4b y C2a) y uno pequeño (C4a y C2b).⁸

Los fragmentos grandes C4b y C2a se fijan a sitios sobre la membrana celular y, como complejo activado (c1,4b,2^a), ejercen su actividad de "C3 convertasa" sobre el componente C3. Este componente se hidroliza para dar origen a los fragmentos C3b (de mayor tamaño) y C3a (más pequeño). Como C4b y C2a; C3b se fija a la membrana y junto con ellos participa en la activación de los componentes restantes; C5, C6 y C7, los cuales se activan en bloque y así se asientan sobre la membrana celular. La interacción en la membrana para formar un complejo de mayor tamaño que conduce a la formación de agujeros a través de los cuales ocurre la lisis celular.⁸

Vía alterna. La activación del complemento también puede ocurrir en ausencia de anticuerpo a través de la llamada vía alterna. En esta vía de activación no participan los primeros componentes del complemento (C1, C4, y C2) y la activación se promueve por diversos polisacáridos presentes en algunos microorganismos cuyas superficies carecen de ácido siálico o tienen muy bajo contenido del mismo.⁸

En esta vía de activación del complemento participan, además de los componentes C3 a C9, los componentes H, B, D, el inactivador de C3b (C3bINA) y la properdina (P). La activación comienza cuando el componente C3, en la forma de C3b (resultante de la vía clásica) o de C3bH₂O (producido por efecto de algunas proteasas del suero), interacciona con ciertos polisacáridos presentes en la superficie de algunos microorganismos, sobre todo levaduras y bacterias. Cuando C3 (como C3b o C3bH₂O) se mantiene en solución, interacciona espontáneamente con el componente H formando el complejo C3bH, el cual es altamente susceptible al efecto del inactivador de C3b (C3bINA). El C3b afectado por C3bINA se transforma en C3bi, un producto hemolíticamente inactivo.⁸

El C3b fijado a la superficie de los microorganismos activadores del complemento ya no es capaz de interaccionar con el componente H, pero en cambio interacciona con el componente B para formar el complejo C3bBb. Este complejo exhibe la actividad de C3 convertasa que transforma a C3 en C3a y C3b.⁸

La actividad de C3 convertasa del complejo es de vida media muy corta pero ésta se alarga considerablemente cuando el complejo interacciona con la proteína (P), una proteína estabilizante del complejo. La C3 convertasa y el C3b promueven la activación de los componentes subsecuentes del complemento (C5, C6, C7, C8 y C9) y dan origen a las diversas actividades biológicas del sistema, incluyendo la lisis de las células.⁸

Las funciones biológicas del sistema del complemento son la citólisis, opsonización de microorganismos e inmunocomplejos para la eliminación fagocítica, producción de la inflamación, estimulación de las respuestas inmunes humorales y solubilización y eliminación de inmunocomplejos.²

Muchas proteínas del plasma, se suman a miembros de el sistema del complemento involucrados en la respuesta inmune innata a microbios. La lectina unidora de manosa (del inglés MBL) es una proteína del plasma que funciona como una opsonina. Esta pertenece a la familia de las colectinas, son llamadas así porque estas proteínas contienen un dominio de colágeno separado por una región de cuello desde un dominio de lectina dependiente de calcio. La MBL es semejante a el receptor de manosa a macrófagos une carbohidratos con terminales de manosa y fucosa, donde son típicamente encontrados en superficies celulares de microbios glicoproteínas y glicolípidos. De esta manera MBL es un modelo de receptor que une a microbios pero no células de mamíferos. MBL es un hexamero que es estructuralmente similar a el componente C1q de el sistema del complemento. MBL une a un receptor de la superficie de macrófagos que es llamado el receptor C1q porque este también une a C1q. Este receptor esta involucrado en la fagocitosis de microbios que son opsonizados por MBL. Mas aún, MBL puede interactuar con otras dos proteínas del complemento, C1s y C1r para activar la vía clásica del complemento.¹

MBL circulante es asociada a una proteasa serina que puede directamente activar el componente del complemento C3 y así de paso ambas vías la vía clásica y la alterna. Esta vía es llamada la vía de las lectinas por activación del complemento. ¹

3. Fiebre Tifoidea

Fiebre Tifoidea es una enfermedad infecciosa aguda generalizada de el sistema reticuloendotelial, tejido linfoide intestinal y vesícula biliar que es causado por *Salmonella typhi*, es única para humanos. Esta es caracterizada por fiebre, dolor de cabeza, apatía, postración, tos, esplenomegalia, erupciones cutáneas y leucopenia.^{5,7}

En la era preantibiótica, el curso de la enfermedad corría sobre varias semanas, y era acompañado por un ritmo de casos fatales de un 10 a un 20 %.⁷

3.1 Etiología

Salmonella typhi es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, no capsulada, no forma esporas, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonellae* y especie *S. typhi*, móvil, rango de tamaño de 2 a 3 μm X 0.6 μm . Fermenta glucosa con la producción de ácido y no de gas, no fermenta lactosa o sucrosa, supuesta identificación es basada en pruebas bioquímicas y su identificación definitiva esta establecida en pruebas serológicas para antígenos somáticos "O" que forma parte del LPS (lipopolisacárido) y contiene carbohidratos específicos útiles en la identificación serológica de la especie, el antígeno de superficie que incluye al antígeno "H", flagelar. Cepas frescas aisladas de pacientes expresan sobre su superficie una cápsula polisacáridica que es el antígeno Vi (virulencia).^{5,7}

La bacteria tiene una estructura típica de las bacterias Gram-negativas con dos membranas, una citoplasmática (interna) y otra externa, entre las cuales se dispone

la péptidoglicana y varios tipos de proteínas. En la membrana externa está el lipopolisacárido (LPS) que tiene actividad endotóxica y diversas proteínas.⁴

De acuerdo a la clasificación de Kauffman White, *S. typhi* pertenece al grupo D y comparte con otras especies del mismo grupo a los antígenos somáticos 9,12; sus flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie se encuentra el antígeno Vi, el cual es un polisacárido homopolimérico lineal del ácido α -1,4-2desoxi-2-N-acetilgalacturónico que cubre a la bacteria como un antígeno capsular y es un indicador de la virulencia de la cepa.⁴

Se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas de la fiebre tifoidea son provocadas por la liberación de la endotoxina que, entre otros efectos, induce fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B. La infección induce la producción de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas, sin embargo ni su presencia o título correlacionan con el desarrollo de protección contra las recaídas o las re infecciones. Sólo algunos estudios sugieren que los anticuerpos contra el antígeno H son indicadores de resistencia a la fiebre tifoidea. Aunque los anticuerpos secretorios principalmente IgA impiden la adherencia de *S. typhi* a la pared intestinal, únicamente confieren protección contra inóculos pequeños de bacterias.⁴

Debido a su localización, las proteínas de membrana externa (PME) en las bacterias Gram-negativas tienen gran importancia en la relación hospedero-parásito. Esto se pudo entender después del advenimiento de métodos específicos que permitieron separar la membrana externa de la citoplasmática. Miura y Mizushima describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de *Escherichia coli* empleando esferoplastos preparados con lisozima y EDTA, que se lisaron por choque osmótico y posteriormente se separaron ambas membranas mediante un gradiente de sacarosa. El método anterior fue modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME.⁴

Las evidencias de que las PME están expuestas al medio externo llevaron a investigar su eficacia como inmunógenos. Frasch y col. encontraron que las PME de *Neisseria meningitidis* grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos. Los anticuerpos anti-PME presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento. Por otro lado, Kussi y col. demostraron que las porinas, proteínas principales de la membrana externa, extraídas de una cepa rugosa de *Salmonella typhimurium* protegen al ratón de un reto con una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos. Las porinas en su calidad de antígenos proteicos ofrecen la ventaja sobre los de naturaleza polisacáridica de inducir anticuerpos de mayor afinidad y favorecer una respuesta inmunológica celular y de memoria.⁴

3.2 Epidemiología

Los humanos son el único reservorio de *Salmonella typhi*, así como el único huésped natural. La infección es transmitida cuando el huésped susceptible ingiere comida o agua que esta contaminada de materia fecal.⁷

El origen de la infección con *Salmonella typhi* es un paciente con fiebre tifoidea o un portador de *Salmonella typhi*. Los pacientes con fiebre tifoidea excretan grandes cantidades de *Salmonella typhi* en heces o en orina, y los bacilos viables se pueden presentar en vómito, secreciones respiratorias o pus.⁵

Además, un portador crónico es un importante origen de infección, a menudo excreta 10^6 o mas bacilos viables por gramo de heces.⁵

El bacilo tifoideo puede sobrevivir por semanas en agua, hielo, polvo, y aguas residuales. La comida o agua contaminada directamente con excretas humanas es un origen usual de la infección.⁵

El agua puede ser contaminada directamente por excretas que contienen *Salmonella typhi* o puede ser introducida por una falla en la sanitización o en la tubería del agua. La comida de consumo humano puede ser contaminada por excretas de portadores o pacientes con tifoidea. Ostras y otros mariscos pueden ser infectados por mareas de agua contaminada y pueden ser los responsables de una infección.⁵

Con la introducción de tratamiento de agua, incluyendo filtración y desinfección con cloro, la incidencia de fiebre tifoidea bajo considerablemente en las grandes ciudades de Estados Unidos, a pesar de la existencia de un reservorio de *Salmonella typhi* en portadores crónicos.⁷ El estado de portadores crónicos entéricos es más común en mujeres, casi el 85% de los casos de fiebre tifoidea son sobre los 50 años de edad, alrededor del 75% de los casos de fiebre tifoidea es en personas menores de 30 años de edad.⁵

Fiebre tifoidea permanece endémica en muchas áreas menos desarrolladas del mundo, donde la contaminación fecal del agua aún ocurre. Estas incluyen muchos países de África, Asia y Latinoamérica.⁷ En áreas donde la fiebre tifoidea es común, la incidencia de la enfermedad se incrementa durante el verano.⁵

3.3 Patogénesis y Patología

Salmonella typhi es una bacteria altamente invasiva que pasa a través de mucosa intestinal de los humanos rápida y eficientemente para alcanzar el sistema reticuloendotelial, donde después de un período de incubación de 8 a 14 días, se presenta la enfermedad sistémica.⁷

Las personas ingieren el microorganismo, el cual se encuentra dentro de comida y agua contaminada, del tamaño del inoculo y el tipo de vehículo influye grandemente el ritmo de ataque para fiebre tifoidea y también afecta el periodo de incubación.⁷

Dosis de 10^9 y 10^8 de patógenos de *Salmonella typhi* ingeridos por voluntarios contenidos en 45 ml de leche descremada inducen enfermedad clínica en 98% y 89% de individuos, respectivamente; dosis de 10^5 organismos causaron fiebre tifoidea en 28 a 55% de los individuos, mientras que ninguno de 14 sujetos quienes ingirieron 10^3 organismos desarrollaron la enfermedad.⁷

El antígeno Vi es una propiedad de virulencia. Félix y Pitt, quienes originalmente describieron el antígeno y le dieron este nombre, mostraron que el antígeno Vi es el causante de la patogenicidad de *Salmonella typhi* para el ratón. Virtualmente todas las cepas frescas aisladas de pacientes poseen este polisacárido capsular. Observaciones epidemiológicas y estudios en voluntarios dicen que las cepas de *Salmonella typhi* que poseen Vi son mas virulentas que aquellas cepas que carecen de este polisacárido.⁷

Para los portadores crónicos, durante la primera fase de bacteremia de la enfermedad que sigue de la ingestión del bacilo de tifoidea y después de que se cimienta en el sistema reticuloendotelial, también alcanza la vesícula biliar, el cual es un órgano donde *Salmonella typhi* tiene una predilección remarcable. Dentro del 2 al 5% de los pacientes, la infección dentro de la vesícula biliar llega a ser crónica.⁷

3.4 Fiebre Tifoidea como un Problema de Salud Público.

La fiebre tifoidea continúa siendo un problema de salud en los países en vías de desarrollo y en algunos países industrializados. Se ha estimado que cada año mas de 33 millones de casos y mas de 500,000 muertes ocurren a nivel mundial que son debidos a fiebre tifoidea.⁷

Tres poblaciones tienen altos indices de desarrollar fiebre tifoidea y deberían beneficiarse desde una inmunoprofilaxis con una segura, efectiva barata y practica vacuna. Estas incluyen niños en áreas endémicas, viajeros y personal militar de

países industrializados quienes visitan ciudades en vías de desarrollo, y microbiólogos clínicos. En áreas endémicas, fiebre tifoidea es una principal causa de ausentismo en el trabajo o en la escuela.⁷

3.5 Vacunas disponibles

Vacunas de células muertas. La primera inmunización experimental contra la infección por *S. typhi* se realizó en 1886, cuando Frankel y Simmons lograron proteger a conejos inyectándoles dosis subinfectantes de la bacteria viva. Un año después, Baumer y Peliper reportaron resultados semejantes en ratones. Más tarde, Kilkovich demostró que los bacilos muertos también son capaces de inducir protección en modelos animales. Con estas observaciones, en 1887 Wright en Inglaterra e independientemente Pfeiffer y Kolle en Alemania, decidieron administrar en humanos bacterias inactivadas con objeto de generar protección. La vacuna de Pfeiffer, por ejemplo se preparaba haciendo crecer la bacteria en medio sólido, una vez cosechada era muerta por calor y tratada posteriormente con fenol.⁴

La utilización masiva de estas vacunas fue exitosa, pues la morbilidad por fiebre tifoidea disminuyó cuando se aplicó en muchos individuos de la India, Egipto, Italia y Sudáfrica.⁴

Además, en los sujetos que adquirían la enfermedad a pesar de estar vacunados sus cuadros clínicos eran considerablemente menos severos. Debido a estos resultados, el uso de vacunas tifoídicas elaboradas con bacterias muertas continuó durante décadas. Sin embargo, no fue posible comparar la eficacia de las preparaciones obtenidas en diferentes lugares, por la falta de modelos animales donde probarlas, falta de correlación entre el estado de inmunidad alcanzado y algún indicador serológico en el individuo, así como la ausencia de estudios epidemiológicos controlados.⁴

Por lo anterior, en 1955 la Organización Mundial de la Salud (OMS), promovió la realización de estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética para determinar la eficacia de tres vacunas preparadas con células completas de *S. typhi* inactivadas respectivamente con acetona, calor-fenol o alcohol. La vacuna "K" inactivada con acetona, resultó ser la que confirió la máxima protección y la de mayor duración. La vacuna "L", inactivada con calor-fenol, mostró eficacia intermedia y la inactivada con alcohol demostró ser la menos efectiva.⁴

Algunos investigadores han atribuido la mayor eficiencia protectora de la vacuna "K" a que es la que contiene mayor cantidad de antígeno Vi. Aunque es aceptable la protección que confiere una sola dosis de la vacuna "K" o de la "L", el empleo de dos dosis proporciona una inmunidad más confiable. Sin embargo, estas vacunas completas de administración parenteral tienen como inconvenientes el que producen reacciones secundarias importantes debido a la endotoxina que contienen y que solamente protegen en forma efectiva ante inóculos infectantes menores o iguales a 10^5 bacterias, por lo que no se recomienda emplearla en rutina.⁴

Vacunas con cepas atenuadas de *Salmonella typhi*. Existe una vacuna de este tipo que es una cepa deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa desarrollada por Germanier como Ty21a. La cepa de Ty21a fue desarrollada por Germanier y Fűrér en 1975.^{4,14,21.}

Tiene una mutación en el gene gal E que causa una deficiencia en la enzima UDP-4-galactosa epimerasa. Ty21a fue derivada de una cepa de tipo salvaje Ty2 por tratamiento con el agente mutagénico nitrosoguanidina. Una mutante fue seleccionada ya que exhibía una completa ausencia de actividad de la enzima uridil difosfatasa-4-galactosa epimerasa y una reducción de aproximadamente 80% en la actividad de otras dos enzimas, galactoquinasa y galactosa-1-fosfato uridil transferasa. La cepa de *S. typhi* carece del antígeno Vi y no produce H₂S. Esta cepa fue designada como Ty21a.^{7,13}

En el comercio existe una vacuna llamada Vivotif producida por el Instituto Suizo de Sueros y Vacunas y que emplea la cepa Ty21a de *Salmonella typhi*.⁴ Cada formulación de la vacuna, sea cápsula o sobre de liofilizado contiene de 2 a 6×10^9 bacterias / dosis.⁷ Se administra una cápsula con capa entérica cada tercer día hasta completar cuatro. Las cápsulas se deben mantener en refrigeración y se tienen que tomar las cuatro cápsulas para alcanzar el máximo de eficiencia.⁴ Los inconvenientes de esta vacuna son su alto costo y la necesidad de aplicarla junto con un antiácido por 3 veces.

Con la formulación de cápsulas entéricas cubiertas, un programa de cuatro dosis es recomendado en los Estados Unidos y Canadá, mientras que en otros países del mundo un régimen de tres dosis es usado. La vacuna Ty21a es administrada con un intervalo de un día entre cada dosis. Uno de los ensayos con las cápsulas entéricas cubiertas de Ty21a en Santiago de Chile, mostró que la inmunización con cuatro dosis dentro de un periodo de 8 días provee mayor protección que tres dosis. Basándose en estos resultados de este ensayo, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos y El Comité de Drogas de Canadá autorizaron un programa de inmunización con cuatro dosis cada dos días.⁷

Se llevaron a cabo dos ensayos en Chile e Indonesia, en donde se comparó la eficacia de tres dosis de Ty21a administradas en cápsulas entéricas cubiertas, contra aquellas administradas en una suspensión líquida. Las dosis de la vacuna fueron dadas cada dos días en el ensayo realizado en Chile, mientras que en Indonesia las dosis fueron administradas una semana aparte. En cada uno de estos ensayos, tres dosis de Ty21a dentro de la formulación líquida demostraron mejor protección que las cápsulas entéricas cubiertas. Del ensayo realizado en Chile, la diferencia en el nivel de eficacia por las dos formulaciones fue significativamente alta. Desde 1997, la formulación líquida ha sido autorizada, con un régimen de inmunización de tres dosis que recomiendan un intervalo de un día entre cada dosis.^{7,11}

Una formulación líquida fue comercializada después, esta demostró una protección superior que las cápsulas entéricas cubiertas, sobre tres años de investigación en un ensayo de campo al azar realizado en el Área Sur Occidente y en el Área Norte, de Santiago. La vigilancia en el ensayo del Área Occidente fue continuado durante otros cuatro años más. En el Área Occidente (un total de 7 años) y en el Área Sur Occidente /Área Norte por dos años adicionales (total de 5 años). Datos de investigaciones adicionales fueron analizados para averiguar la duración de la protección conferida por estas formulaciones de Ty21a en cápsulas entéricas cubiertas (administradas cada dos días), confirieron 67% de protección sobre 3 años y 62% de protección sobre 7 años de investigación, mientras que tres dosis de una formulación líquida (administradas cada dos días) confirieron 77% de protección sobre 3 años y 78% sobre 5 años de investigación. Basándose en la excelente aceptabilidad clínica, la facilidad de administración oral, y su larga eficacia durante al menos siete años, se propuso una inmunización masiva en escuelas, como una medida de control en áreas donde la incidencia de fiebre tifoidea es alta y *Salmonella typhi* es resistente a antibióticos.^{16, 17}

Vacuna a base del polisacárido capsular Vi. La vacuna de mas reciente ingreso al comercio está elaborada a partir del antígeno capsular Vi de *S. typhi*, se aplica por vía parenteral, es efectiva pero de corta duración y debido a su naturaleza polisacáridica no induce memoria inmunológica y no es efectiva en niños menores de 3 años.¹³

El polisacárido Vi se ha relacionado con la virulencia y aunque varios investigadores han demostrado la falta de correlación entre los anticuerpos anti-Vi y un estado protector, otros estudios revelan que el antígeno Vi por si solo es capaz de inducir protección. En 1934 Félix y Pitt informaron la presencia tanto de dicho antígeno en cepas de *S. typhi* aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, como la de anticuerpos anti-antígeno Vi en el suero de estas personas.^{4, 12, 20}

Con un modelo murino en los años setenta, Wong observó que la mayor efectividad de la vacuna inactivada con acetona sobre la inactivada por calor-fenol se debe a la mayor contenido del antígeno Vi en la primera. Más tarde, él mismo logró purificar el antígeno Vi sin desnaturalización y demostró que continuaba siendo inmunogénico y seguro.⁴

En 1984, Robbins y Robbins lograron preparar dos lotes de antígeno Vi, ambos resultaron buenos inmunógenos, sin embargo uno de ellos generó reacciones adversas, debido a su contenido de lipopolisacárido contaminante. El lote que se obtuvo a través del Instituto Mérieux, en Francia, se utilizó para realizar pruebas de campo en Nepal y en Sudáfrica.⁴ Se administró una sola dosis (25 µg) de antígeno Vi por vía parenteral mostró una eficacia de un 70% durante 17 meses de seguimiento y 64% de eficacia en Sudáfrica sobre 21 meses de vigilancia. El ensayo en Nepal incluye a todas la edades desde preescolar hasta adultos, mientras que el ensayo en Sudáfrica fue desarrollado en niños escolares. Un reporte posterior de Sudáfrica mostró que sobre los siguientes tres años la eficacia fue del 55%.^{9,16}

El inconveniente de esta vacuna es que por su naturaleza polisacáridica se comporta como antígeno T-independiente y por tanto no induce memoria inmunológica. Por estos motivos se ha sugerido conjugarlo químicamente con proteínas para conferirle características de un verdadero antígeno T-dependiente, pues se sabe que las proteínas, a diferencia de los polisacáridos, inducen respuesta mas prolongada con anticuerpos de mayor afinidad y favorecen la respuesta inmunológica celular, por otro lado se subraya la importancia que este tiene en la virulencia de la cepa infectante, así como la conveniencia de conservarlo durante la preparación de vacunas.⁴

Fiebre tifoidea es aún un problema de salud pública sin resolver en la mayoría de los países del tercer mundo. La principal causa de la prevalencia de la enfermedad esta relacionada a una inadecuado deposito de heces fecales aunado a un inapropiado suministro de agua. Tan grande como estos problemas que no son resueltos, las enfermedades entéricas permanecerán como una de las principales causas de morbilidad en países del tercer mundo. Una alternativa es el desarrollo de una vacuna efectiva contra *Salmonella typhi*.¹⁰

Las vacunas disponibles actualmente no son satisfactorias por dar efectos indeseables, carecer de un efecto sostenido o ambos. Las proteínas de membrana externa han sido consideradas como importantes antígenos en la inducción de una respuesta inmune específica de protección contra la infección por bacterias Gram-negativas, las porinas de *Salmonella typhi* se están evaluando como vacuna contra fiebre tifoidea en donde actualmente en México los estudios se encuentran en fase 1, por lo que se espera contar con una vacuna contra la fiebre tifoidea que sea efectiva, que induzca una protección duradera, libre de efectos secundarios, que se pueda aplicar a niños y adultos, barata, estable a temperatura ambiente y de fácil aplicación.⁴

Fiebre tifoidea puede ser algún día erradicada del mundo, por lo que se requiere una combinación de tratamiento de agua y la provisión de una buena sanitización para disminuir la transmisión, una protección sistémica para detectar acarreadores crónicos de tifoidea y un tratamiento a los acarreadores para disminuir el reservorio de la infección, aunque esto se restringe en los países del tercer mundo donde se carece de recursos económicos para llevarse a cabo, por lo que es sumamente necesario una nueva vacuna bien tolerada y altamente efectiva contra fiebre tifoidea.⁷

III. OBJETIVOS

OBJETIVO PARTICULAR

- Evaluar la respuesta inmune humoral a las porinas de *Salmonella typhi* en voluntarios vacunados por vía oral con la vacuna Ty21a

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar los títulos e isotipos de anticuerpos anti-porinas y anti-LPS de *Salmonella typhi* por el método de ELISA.
- Comprobar si estos anticuerpos son bactericidas mediante un ensayo en placa utilizando la bacteria completa.

IV. HIPÓTESIS

Se sabe que la vacuna oral de Germanier Ty21a contra fiebre tifoidea induce respuesta inmune humoral a los antigenos "O" y "H" de *Salmonella typhi* así como respuesta inmune celular anti-porinas de la bacteria en humanos, por otro lado en pacientes con fiebre tifoidea se han encontrado anticuerpos IgM e IgG anti-porinas, con estos antecedentes se espera que la vacuna Ty21a sea capaz de inducir respuesta inmune humoral contra porinas de *S. typhi*.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Material, equipo y reactivos utilizados

Equipo utilizado

- Balanza analítica, marca Ohaus
- Campana de flujo laminar, marca Veco
- Centrifuga, marca Hettich, modelo 35R
- Congelador Ravco, marca Diana
- Espectrofotómetro, marca Beckman, modelo DU 640
- Incubadora, marca Shel-Lab, modelo 2100
- Incubadora con agitación, marca JEIO-TECH, modelo SI-300/300R
- Lector de Elisa, marca DYNEX
- Maxi-Shaker, marca Heto
- Potenciómetro, marca CORNING, modelo 10

Material

- Cajas petri estériles, marca Technicare
- Multipipetas de 10 a 100 μ l.
- Pipetas de 0.5 a 1000 μ l.
- Pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 ml.
- Placas de Elisa de 96 pozos, marca Costar
- Propipeta
- Tubos cónicos graduados, estériles para centrifuga de 50 ml, marca Labcon
- Tubos cónicos graduados, estériles de 15 ml, marca CORNING

Reactivos

- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 2.5 N
- Agua Oxigenada (H_2O_2)
- Agar Bacteriológico, marca Bioxon
- Anticuerpos de cabra anti IgG, anti IgM humano conjugado con peroxidasa, marca ZIMED
- Anticuerpos de ratón anti IgG₁, anti IgG₂, anti IgG₃, y anti IgG₄ humano, conjugado con peroxidasa, marca ZIMED
- Caldo de soya tripticaseína, marca Bioxon
- Leche descremada
- Ortofenildiamina, marca SIGMA
- Tween 20, marca SIGMA

Material Biológico

- Cepa de *Salmonella typhi* ATCC 9993

5.2 Preparación de soluciones utilizadas

Medio Mínimo A

Pese exactamente:

Fosfato dibásico de potasio 3.5 g.

Fosfato monobásico de potasio 1.5 g.

Sulfato de amonio 0.5 g.

Citrato de sodio 0.25 g.

Disuelva en 500 ml de agua destilada, esterilice a 121°C, 15 minutos.

Extracto de Levadura

Pese exactamente 25 g de extracto de levadura

Disuelva en 500 ml de agua destilada, esterilice a 121°C, 15 minutos.

Glucosa

Pese exactamente 62.5 g de glucosa

Disuelva en 500 ml de agua destilada, esterilice a 121°C, 15 minutos.

Sulfato de Magnesio

Pese exactamente 125 g de sulfato de magnesio

Disuelva en 500 ml de agua destilada, esterilice a 121°C, 15 minutos.

Preparación de Medio Mínimo A "Suplementado"

Añada a 500 ml de Medio Mínimo A estéril:

Solución de extracto de levadura 10.5 ml

Solución de glucosa 21.0 ml

Solución de sulfato de magnesio 2.1 ml

Medio Soya Trypticaseina

Pese exactamente:

Medio Soya Trypticaseina 7.5 g.

Agar Bacteriológico 2.0 g.

Disuelva en 250 ml de agua destilada, hierva hasta disolver completamente, esterilice a 121° C, 15 minutos.

Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH: 7.4

Pese exactamente:

Cloruro de sodio 8.7 g.

Fosfato monobásico de sodio 0.7 g.

Fosfato dibásico de sodio 2.7 g.

Disuelva en 500 ml de agua destilada

Ajuste el pH y afore a 1000 ml con agua destilada, esterilice a 121°C, 15 minutos.

Solución de bloqueo

Pese exactamente 5.0 g de leche descremada

Disuelva en 100 ml de solución reguladora de fosfatos (PBS) pH: 7.4

Nota: Debe prepararse el día de su utilización.

Solución reguladora de carbonatos pH: 9.5

Pese exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0 g.

Carbonato de sodio 2.8 g.

Disuelva en 500 ml de agua destilada

Ajuste el pH y afore a 1000 ml con agua destilada.

Solución reguladora de citratos pH: 5.6

Pese exactamente:

Acido cítrico 4.1 g.

Citrato de sodio 29.0 g.

Disuelva en 500 ml con agua destilada

Ajuste el pH y afore a 1000 ml con agua destilada.

Solución de lavado

Disuelva 1 ml de Tween 20 en 1000 ml de agua destilada.

Solución Reveladora

Pese exactamente 0.006 g. de ortofeniildiamina

Disuelva en 12 ml de solución reguladora de citratos pH: 5.6

Adicione 10 μ l de agua oxigenada, en el momento de su utilización

Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2.5 N.

Tome cuidadosamente 6.66 ml de ácido sulfúrico (98% de pureza, $d=1.84$) y transfiera a un matraz volumétrico de 100 ml con 50 ml de agua destilada, deje enfriar y afore a 100 ml.

5.3 Ensayo de Elisa para porinas y LPS de *S. typhi* 9,12 Vi:d

- El antígeno (porinas y LPS), se colocó a una concentración de 10 $\mu g/ml$ utilizando como diluyente solución reguladora de carbonatos: pH: 9.5 , colocándose 100 μl por pozo, y posteriormente se incubó a 37°C durante 1 hora, dejándose en refrigeración toda la noche.
- Se lavó sólo una vez con solución de lavado
- Posteriormente se colocaron 200 μl de solución de bloqueo a una concentración de 5%, incubar durante 2 horas a 37°C.
- De nuevo se lavó 2 veces mas con solución de lavado.
- Se colocó el primer anticuerpo (en este caso colocamos el suero a probar) a una concentración de 1:20, utilizando como diluyente solución de bloqueo, coloque 200 μl hasta obtener solo 100 μl en cada pozo, diluyendo hasta una concentración de 1:1280. Incubándose a 37°C durante 2.5 horas.
- Se lavó 4 veces con solución de lavado
- Se puso el segundo anticuerpo (en este caso colocamos anticuerpos de cabra anti IgG humano conjugado con peroxidasa y anti IgM humano e isotipos de IgG de ratón), a una concentración de 1:3000 para IgG e IgM y 1:1000 para los isotipos de IgG. Colocando 100 μl en cada pozo. Incubar a 37°C durante 1.5 horas.
- Posteriormente se lavó 6 veces con solución de lavado
- Se colocaron 100 μl /pozo a toda la placa de solución reveladora
- Incubándose en la oscuridad a durante 10 minutos a temperatura ambiente
- Se colocaron 10 μl /pozo a toda la placa de ácido sulfúrico 2.5 N
- Finalmente se leyó inmediatamente en el lector de Elisa a 492 nm.

5.4 Cuenta viable para *Salmonella typhi*

- Se tomó una asada de la bacteria congelada y sembrar en 5 ml de medio mínimo "A" complementado, incubándose a 37°C, 200rpm , durante 18 horas.
- Posteriormente se tomó 1 ml del inoculo, el cual se adicionó a 10 ml de medio mínimo "A"
- Se tomaron alícuotas cada 30 minutos y se leyeron a 540 nm, hasta tener una D.O. de 0.600.
- Se hicieron diluciones en serie a una concentración de 1:10, las cuales se realizaron tomando un mililitro del inoculo y se pasaron a 9 ml de medio mínimo "A", hasta tener una dilución de 10⁹.
- Se sembró 1 ml de cada dilución, en placas petri estériles las cuales deben contener medio soya tripticaseína (un volumen aproximado de 20 ml), suspender perfectamente en la placa, se realizó por duplicado para cada dilución incubándose a 37°C, durante 18 horas .
- Contándose el número de colonias por placa.

5.5 Ensayo de anticuerpos bactericidas

- Una dilución 10⁵ contenía aproximadamente 169 x 10⁶ U.F.C. / ml. a un tiempo cero.
- Los sueros a ensayar fueron de pacientes inmunizados con Ty21a por vía oral, los cuales se inactivaron a 36°C/30 minutos.
- Se utilizó un suero de paciente normal como fuente de complemento, a una concentración de 10% v/v, utilizando como diluyente PBS.
- Se tomaron 5 tubos cónicos, graduados estériles de 15 ml, los cuales contenían 1 ml de la dilución 10⁵ cada uno, se centrifugaron a 3500 rpm, 20°C, durante 30 minutos.

- Decantándose 900 μ l a cada tubo y se resuspendieron los 100 μ l restantes, los cuales se utilizaran para el ensayo, el cual se realizó por duplicado utilizándose 50 μ l para cada ensayo.
- Se colocaron 50 μ l de bacteria / pozo, a los cuales se les añadió: 25 μ l de suero inactivado utilizando diluciones de: 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 del suero inactivado, las cuales se les añadía 25 μ l de complemento, esto se realizó por duplicado. También se realizaron los siguientes dos ensayos: el primero se realizó utilizando 50 μ l de bacteria con 25 μ l de complemento y 25 μ l de PBS, y el último se colocaban 50 μ l de bacteria mas 25 μ l de suero y 25 de μ l de PBS(por duplicado paca cada ensayo).
- Se incubaron a 37°C durante 1 hora.
- Se plaquearón todas las diluciones, utilizando cajas petri estériles las cuales contenían medio soya tripticaseína, se dejaron gelar para posteriormente incubarias a 37°C durante 18 horas.
- Se contaron las colonias por placa.

VI. RESULTADOS

Cuadro número 1: Respuesta Inmune Humoral de Anticuerpos a Porinas y LPS de *Salmonella typhi*.

Paciente	Respuesta a porinas					Respuesta a LPS				
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM
Número 1: Día cero	*	*			**					**
7 Días	**	*			***					***
15 Días	**				***					**
21 días	**	*		***	***					***
Número 2: Día cero	*				***		*			**
7 Días					**					***
15 Días	*				*		**			**
21 Días					*		**			**
28 Días					*					**
Número 3: Día cero										*
7 Días		*			*					**
15 Días		*			*					*
Número 4: Día cero					**					***
7 Días					***					***
15 Días					**					**
21 Días					***					***
Número 5: Día cero					***					***
7 Días					**					**
15 Días					***					***
Número 6: Día cero					*					**
7 Días					**					*
15 Días		*			**					**
21 Días		*			***					**

RESULTADOS DEL ENSAYO DE ELISA PARA PORINAS Y LPS DE *Salmonella typhi* 9,12 Vi:d

IgG anti-porinas de *S. typhi*

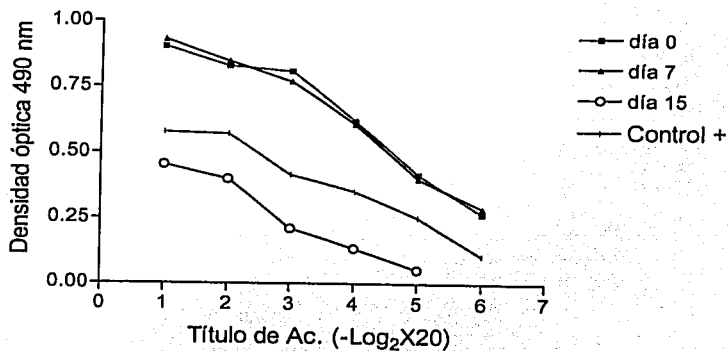


Figura 1:
Paciente número 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgG anti-porinas de *S. typhi*

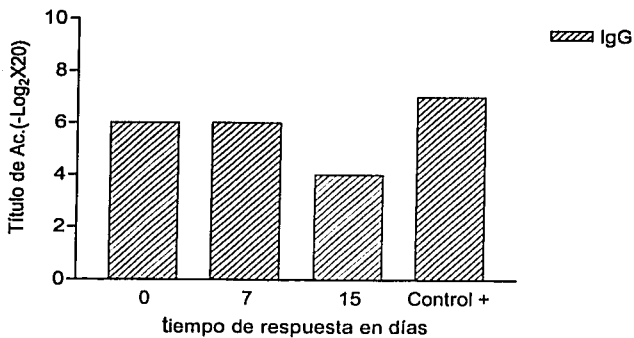


Figura 2:
Paciente número 1

IgG1 anti-Porinas de *S.typhi*.

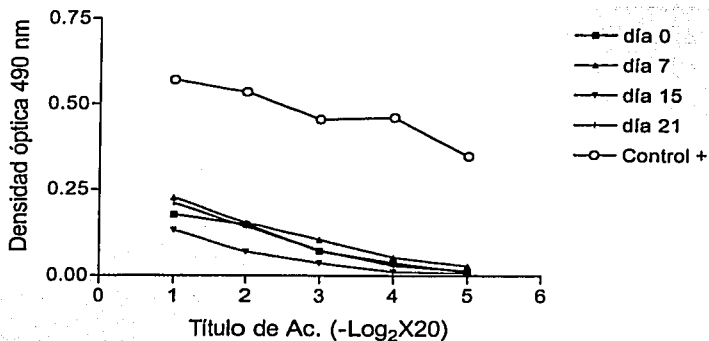


Figura 3:

Se muestran los títulos de IgG1 por fechas de los sueros del paciente 1.

Se utilizó como Control + un pool de sueros de pacientes con probable diagnóstico de Fiebre Tifoidea, para este suero las diluciones que se manejarán serán a partir de la dilución 1:640, obteniéndose altos títulos hasta la dilución 1:20480

Título de IgG1 anti-Porinas de *S. typhi*

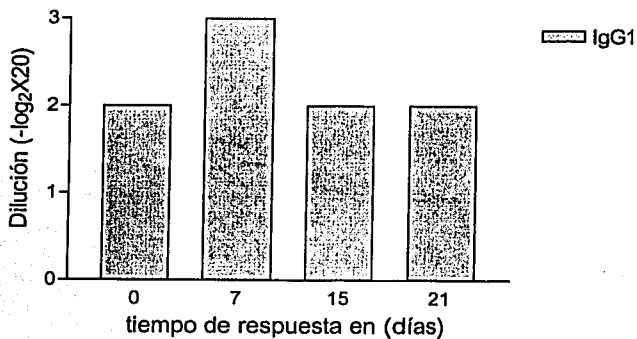


Figura 4:

Paciente número 1.

El punto 2: dilución 1:40

3: dilución 1:80

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG2 anti-Porinas de *S.typhi*.

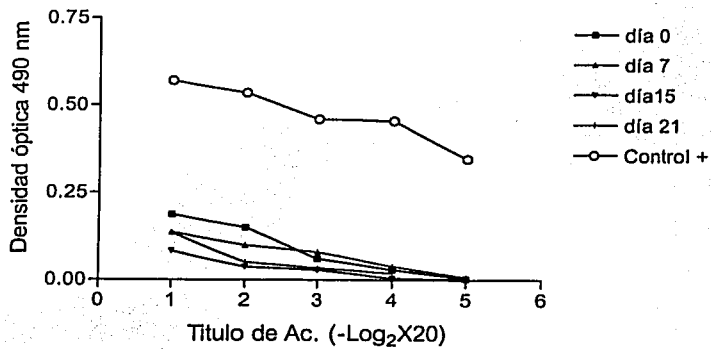


Figura 5:
Paciente número 1:

El control + para IgG se manejó a una dilución de 1:640.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgG2 anti-Porinas de *S.*
typhi

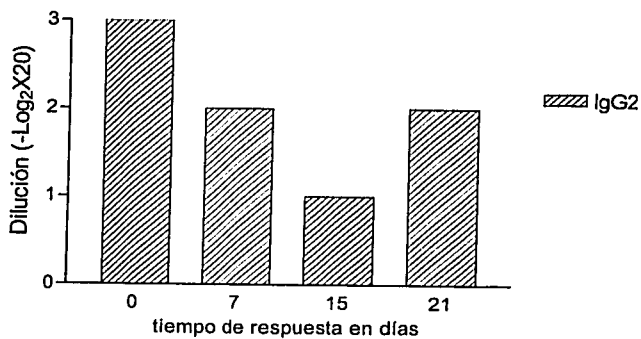


Figura 6:
Paciente número 1:

Punto 1: dil 1:20
2: dil:1:40
3: dil:1:80

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG4 anti-Porinas de *S.typhi*.

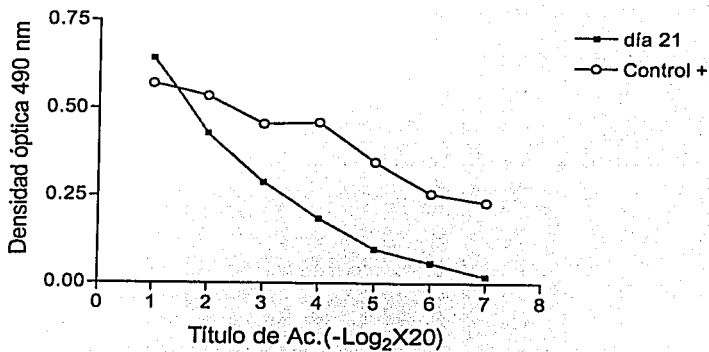


Figura 7:

Paciente número 1:

Títulos de IgG4, no se obtuvieron títulos de este isotipo en los sueros de las fechas anteriores.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgG4 anti-porinas de
S.typhi

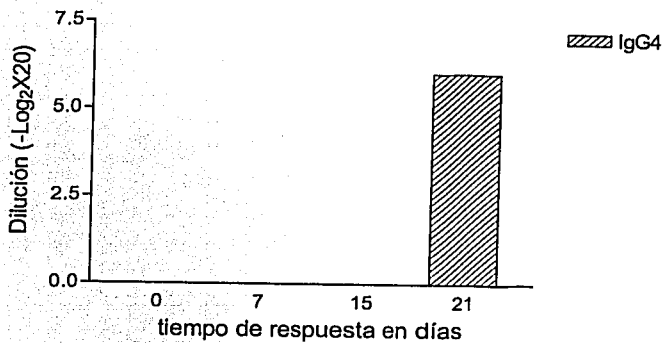


Figura 8:

Paciente 1.

Punto 6: dilución 1:320

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-Porinas de *S.typhi*.

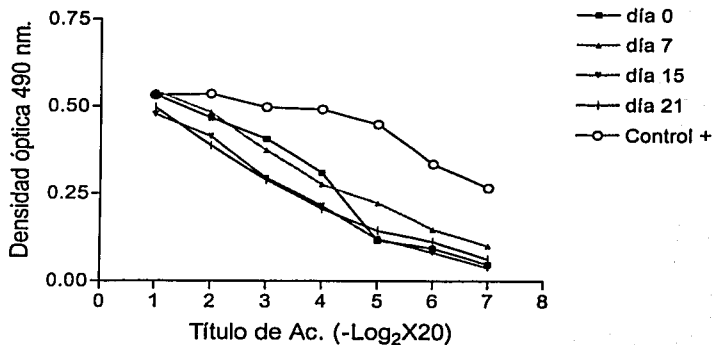


Figura 9:

Paciente número 1:

El control + se manejó a una dilución 1:10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-Porinas de *S.typhi*.

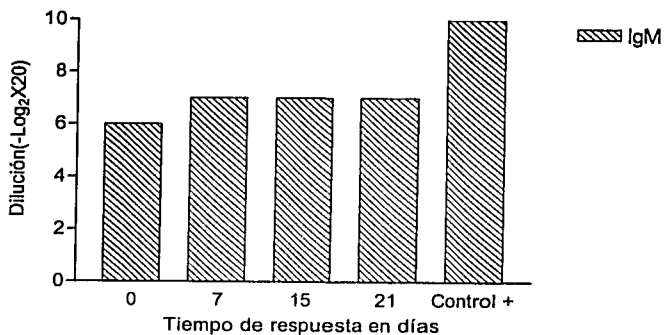


Figura 10:

Paciente número 1:

El punto número 6 significa: dilución 1: 320

número 7: dilución 1: 640

número 10: 1: 5120

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-LPS de *S.typhi*.

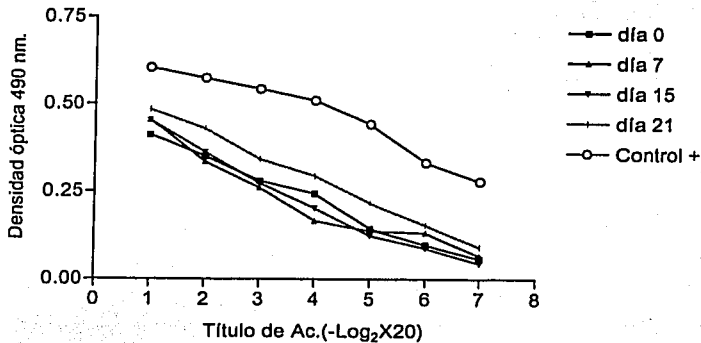


Figura 11:

Paciente número 1.

Se utilizó como control + un pool de sueros de pacientes con probable diagnóstico de Fiebre Tifoidea.

Las diluciones para el pool se comenzarán a trabajar a partir de la dilución 1:10, obteniéndose títulos en la dilución 1:5120.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-LPS
de *S.typhi*.

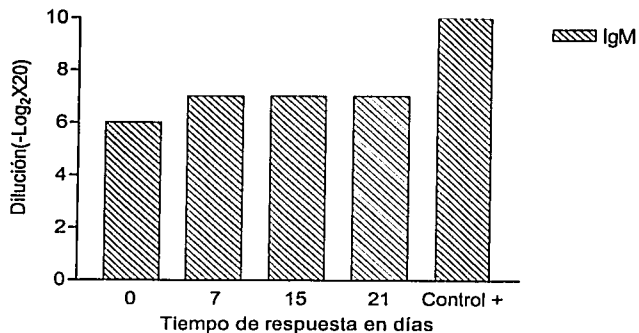


Figura 12:

Paciente número 1:

Se manejó el control + a una dilución de 1:10

El punto 6 significa: dilución 1:320

7 : dilución 1:640

10: dilución 1:5120

Se muestran las diluciones en las cuales
aún se encontrarán títulos mayores de 0,1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG anti-porinas de *S. typhi*

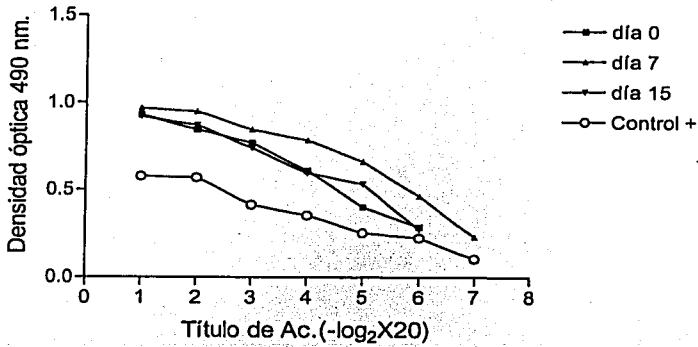


Figura 13:

Paciente número 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgG anti-porinas de *S. typhi*

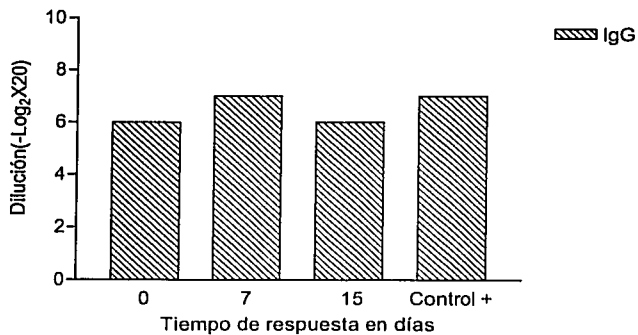


Figura 14:
Paciente número 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG1 anti-Porinas de *S.typhi*.

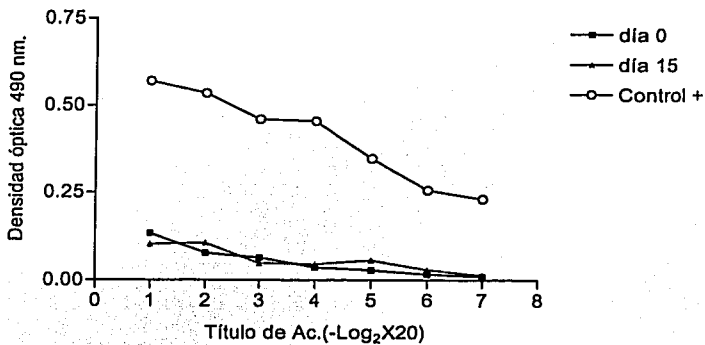


Figura 15:

Paciente número 2:

No se encontrarán títulos para las demás fechas de este isotipo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG2 anti-LPS de *S.typhi*.

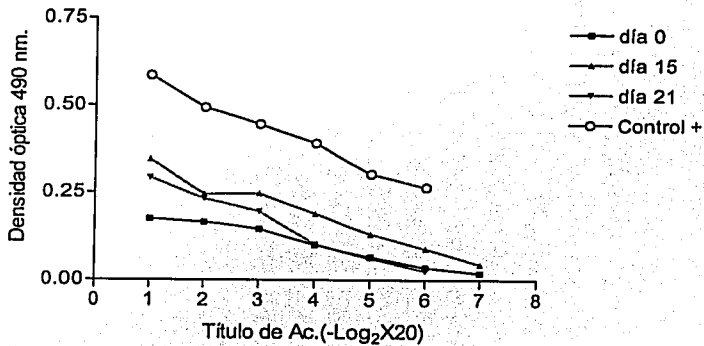


Figura 16:

Paciente número 2:

Para el día 7 y día 28 no se obtuvieron títulos del isotipo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-Porinas de *S. typhi*

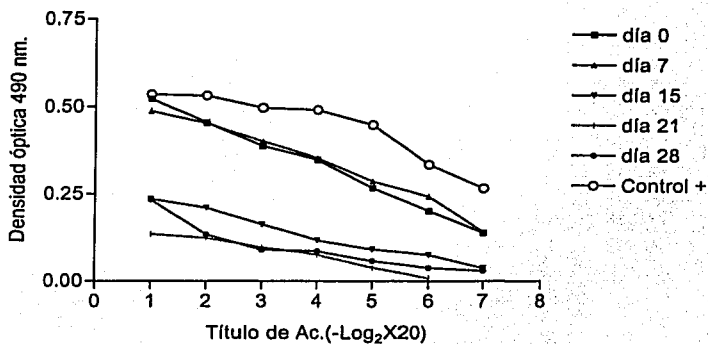


Figura 17:

Paciente número 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-Porinas de *S.typhi*.

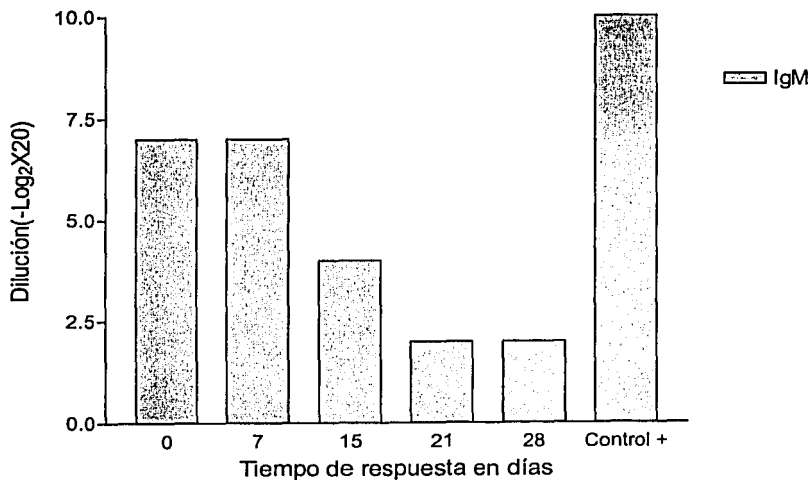


Figura 18:

Paciente número 2:

El punto 2 significa: dilución 1: 20

4 dilución 1:80

7 dilución 1: 640

10 dilución 1: 5120.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-LPS de *S.typhi*

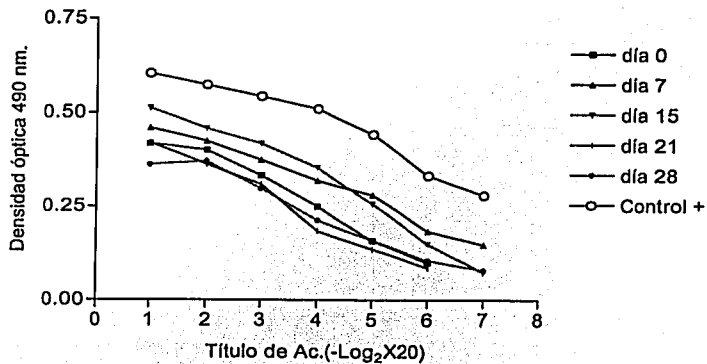


Figura 19:

Paciente número 2.

El control + se trabajó a una dilución 1:10.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-LPS
de *S.typhi*.

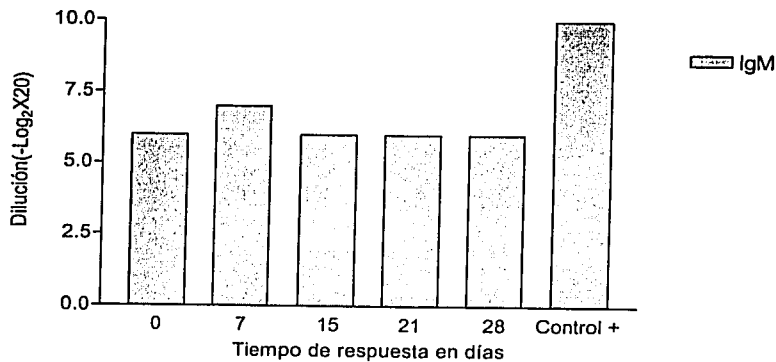


Figura 20:

Paciente número 2:

El control + se manejó a una dilución 1: 10

Los puntos significan : 6: dilución 1:320

7: dilución 1:640

10: dilución 1: 5120

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG anti-porinas de *S. typhi*

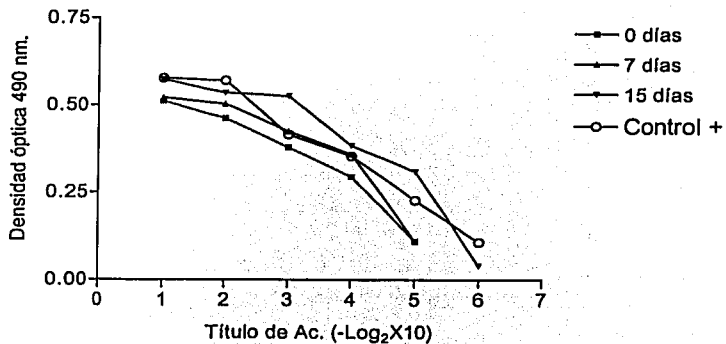


Figura 21:

Paciente número 3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgG anti-porinas de *S. typhi*

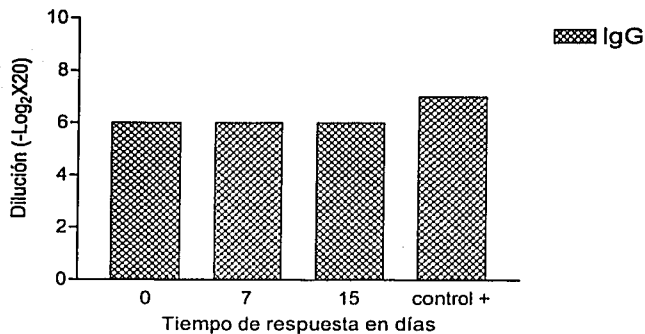


Figura 22:
Paciente número 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-Porinas de *S.typhi*.

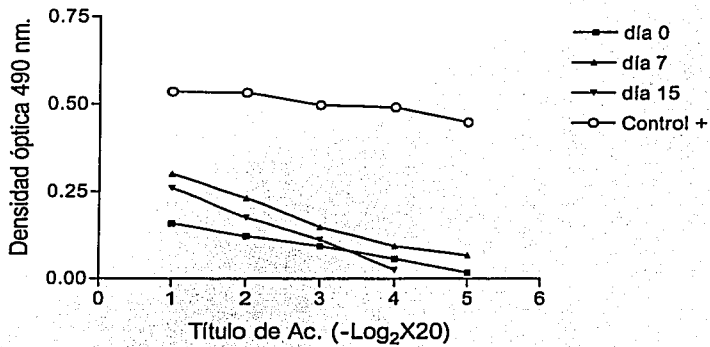


Figura 23:

Paciente número 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti - Porinas de
S.typhi.

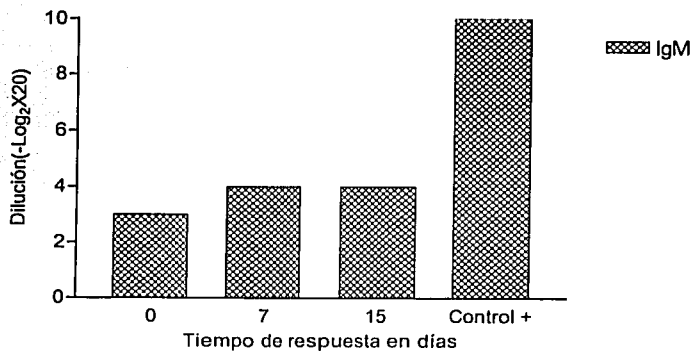


Figura 24:

Paciente número 3

El punto 3 significa: dil. 1:40

4 significa: dil. 1:80

10 significa: dil. 1:5120

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-LPS de *S.typhi*.

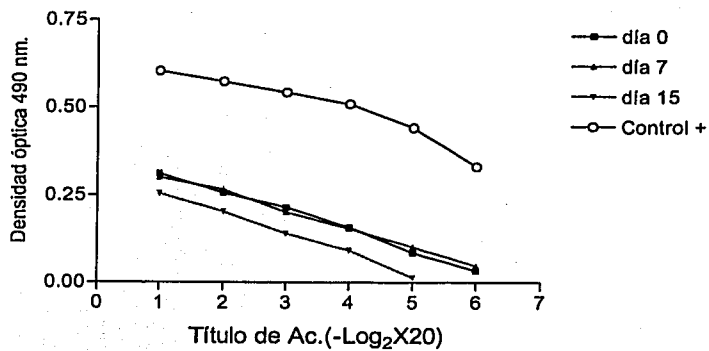


Figura 25:

Paciente número 3

El control + se manejó a una dilución 1:10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-LPS
de *S.typhi*.

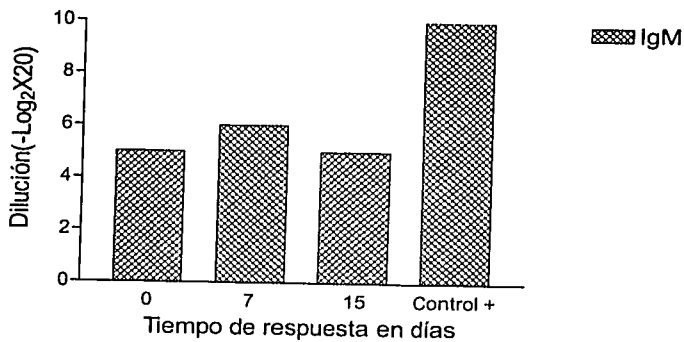


Figura 26:

Paciente número 3:

El control + se trabajó a una dilución de 1:10

El punto 5 significa: dilución 1: 160

6: dilución 1:320

10: dilución 1: 5120.

Se muestran las diluciones en las cuales
se encontrarán títulos mayores de 0.1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG anti-porinas de *S. typhi*

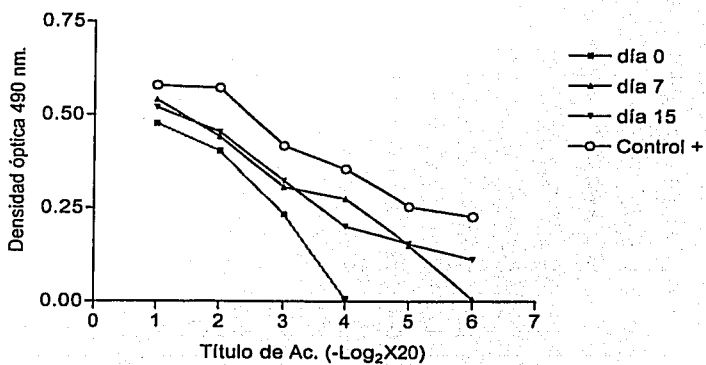


Figura 27:

Paciente número 4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALTA
PAGINA

66 |

IgM anti-Porinas de *S.typhi*.

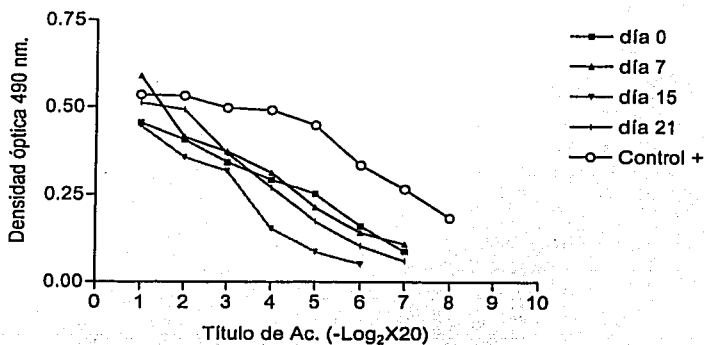


Figura 28:

Paciente número 4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-Porinas de
S.typhi.

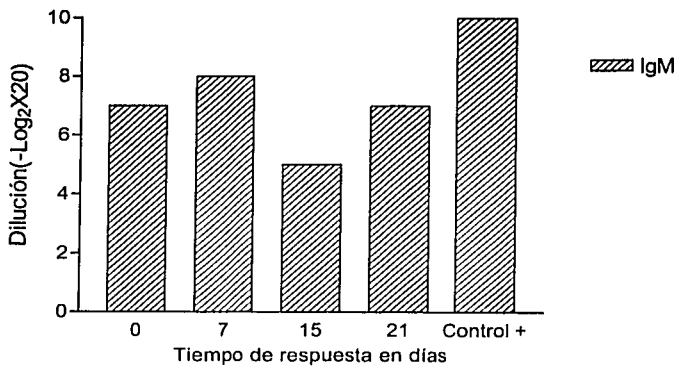


Figura 29:

Paciente número 4:

El número 5: dilución 1:160
número 7: dilución 1:640
número 8: dilución 1:1280
número 10: dilución 1:5120

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-LPS de *S.typhi*.

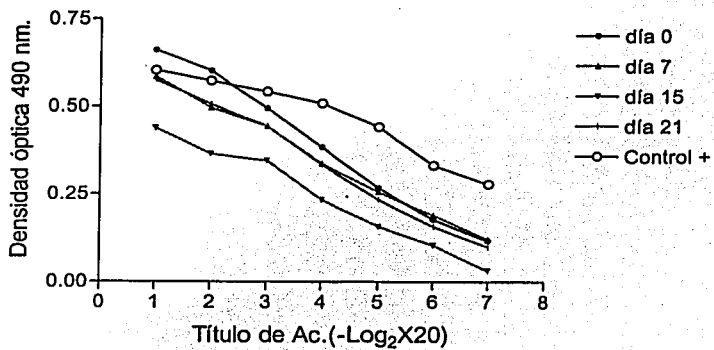


Figura 30:

Paciente número 4:

El control + se manejó a una dilución 1:10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-LPS
de *S.typhi*.

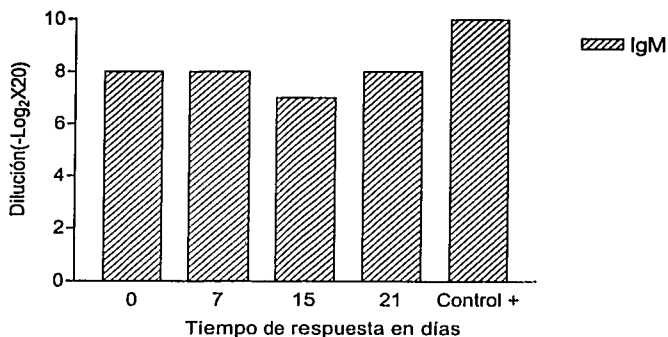


Figura 31:

Paciente número 4:

El control + se manejó a una dilución de 1:10

El punto 7, dilución 1:640

8: dilución 1: 1280

10: dilución 1:5120

Se muestran las diluciones en las cuales aún se mantiene un título mayor de 0.1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG anti-porinas de *S. typhi*

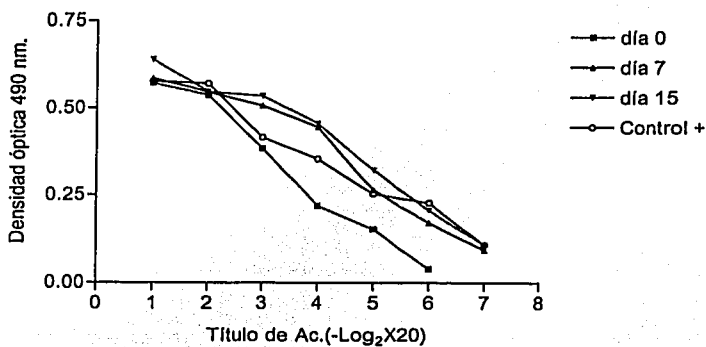


Figura 32:

Paciente 5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgG anti-porinas de *S. typhi*

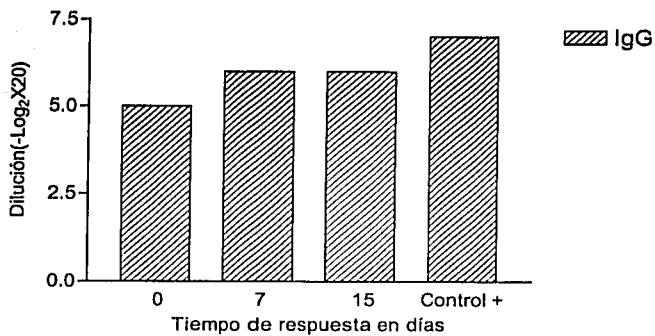


Figura 33:

Paciente 5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG1 anti-Porinas de *S.typhi*.

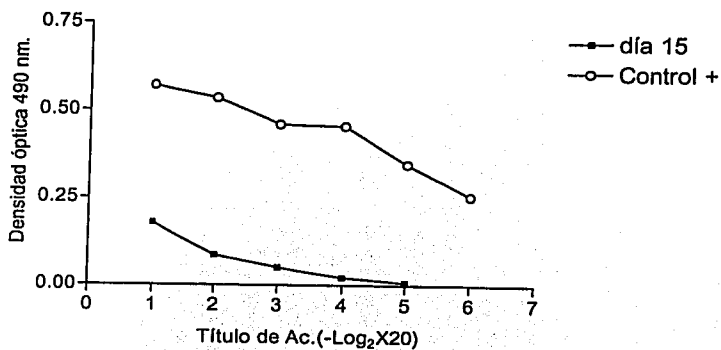


Figura 34:

Paciente número 5:

Para este isotipo no se encontrarán títulos para los sueros anteriores.

El control + se manejó a una dilución 1:640.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-Porinas de *S.typhi*.

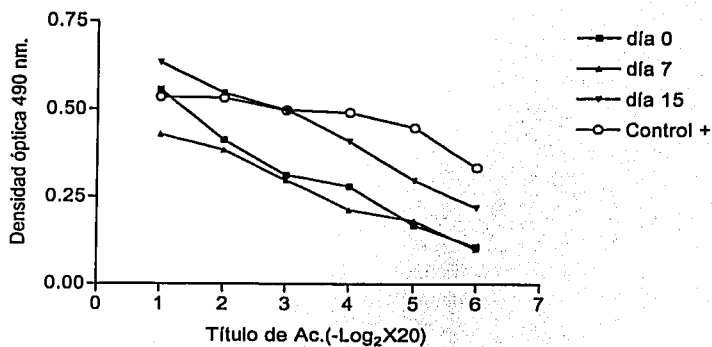


Figura 35:

Paciente número 5

El control se manejó a una dilución 1:10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-porinas de *S.typhi*

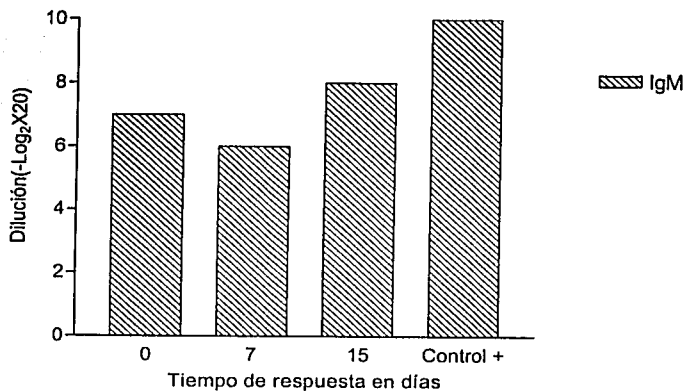


Figura 36:

Paciente 5:

El punto 6: dilución 1:320

7: dilución 1:640

8: dilución 1:1280

10: dilución 1:5120

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-LPS de *S.typhi*.

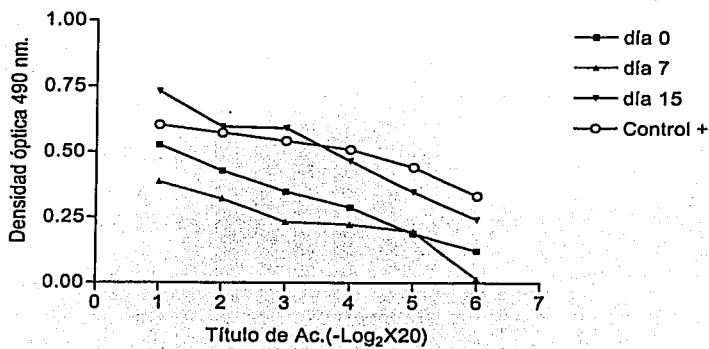


Figura 37:

Paciente número 5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-LPS de *S.typhi*.

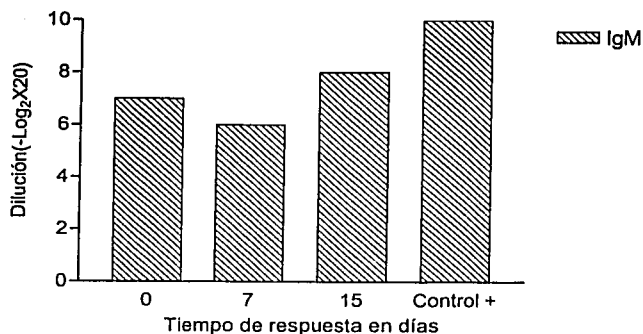


Figura 38.

Paciente número 5:

El control + se manejó a una dilución 1:10

El punto 6: dilución 1:320

7: dilución 1:640

8: dilución 1:1280

10: dilución 1: 5120

Se muestran las diluciones en las cuales
aún se encontrarán títulos mayores de 0.1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG anti-porinas de *S. typhi*

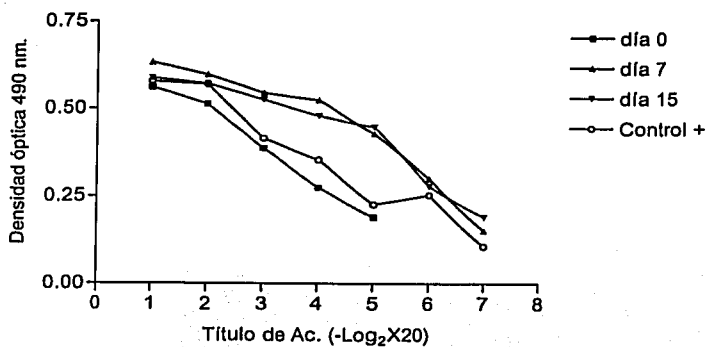


Figura 39:
Paciente 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgG anti-porinas de *S. typhi*

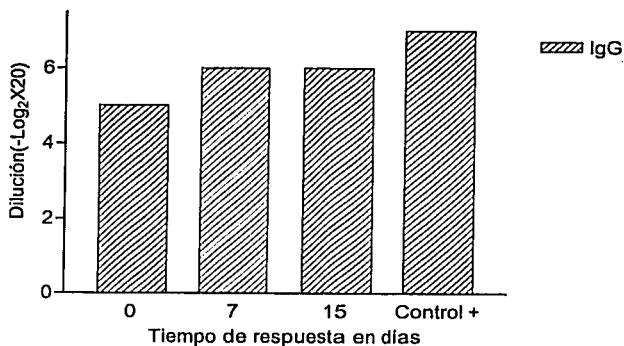


Figura 40:
Paciente 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-Porinas de *S.typhi*.

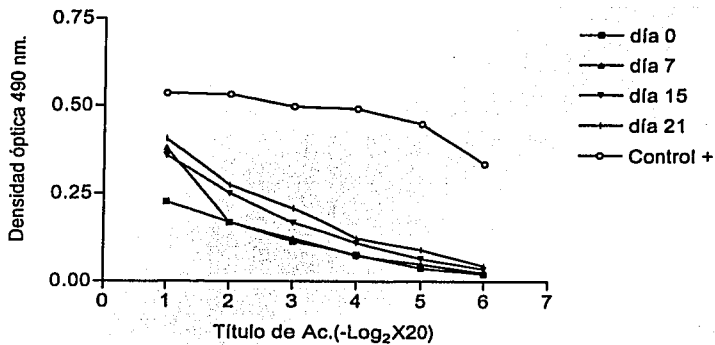


Figura 41:

Paciente número 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-porinas de
S.typhi.

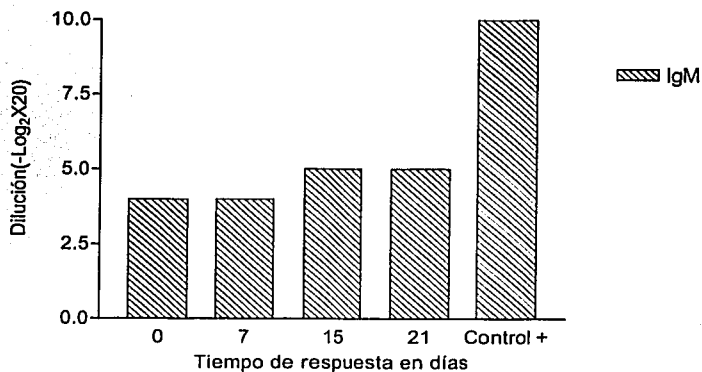


Figura 42:

Paciente número 6:

El punto 4: dilución 1:80

5: dilución 1:160

10: dilución 1:5120

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgM anti-LPS de *S.typhi*.

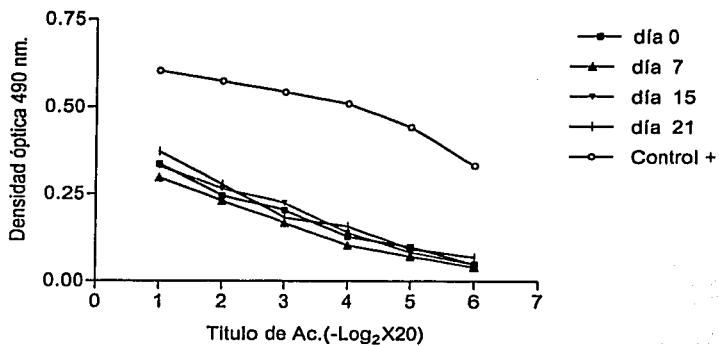


Figura 43:

Paciente número 6:

El control + se manejó a una dilución 1:10.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Título de IgM anti-LPS de *S.typhi*.

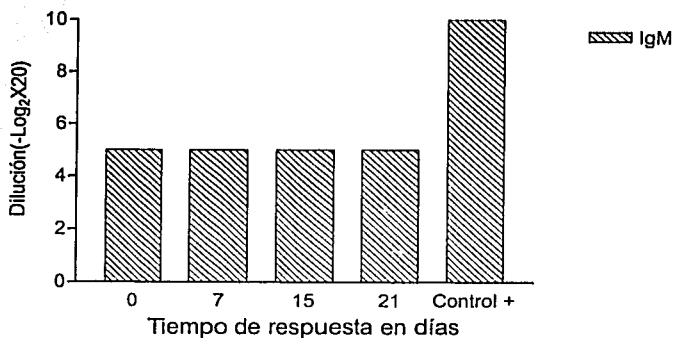


Figura 44:

Paciente número 6:

El control + se manejó a una dilución 1:10

El punto 5 significa: dilución 1:160

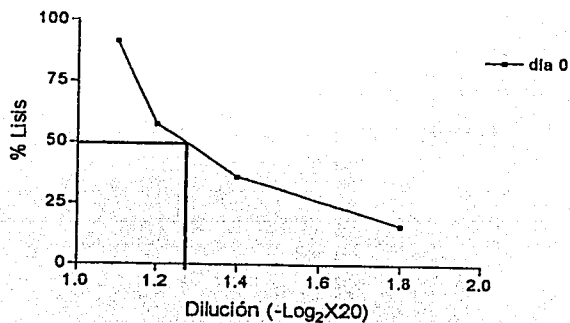
10 significa: dilución 1:5120

Se muestran las diluciones en las cuales
aún se encontraban títulos mayores de 0.1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS DE ANTICUERPOS BACTERICIDAS

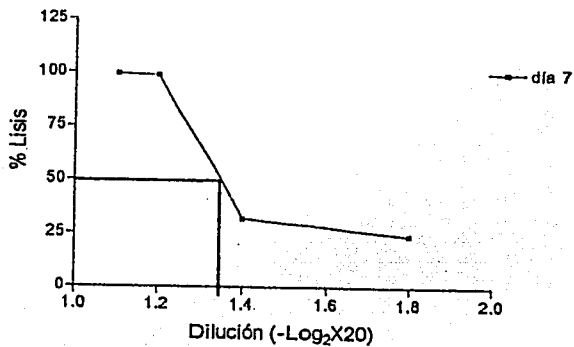
Respuesta Inmune Humoral de
Anticuerpos Bactericidas a *S. typhi*.



Suero número 1. Primera respuesta de anticuerpos bactericidas por aplicación de la vacunaTy21a por vía oral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

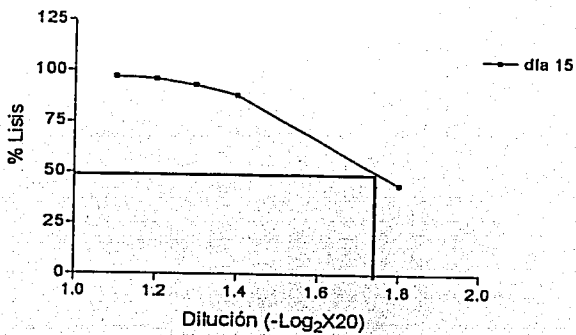
Respuesta Inmune Humoral de
Anticuerpos Bactericidas a *S. typhi*



Suero número 1: Segunda respuesta de anticuerpos bactericidas por aplicación de la vacuna Ty21a por via oral.

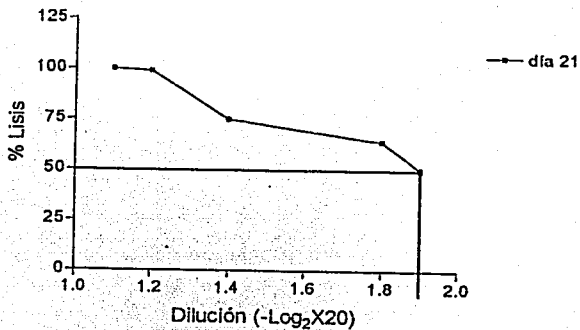
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Respuesta Inmune Humoral de Anticuerpos Bactericidas a *S.typhi*



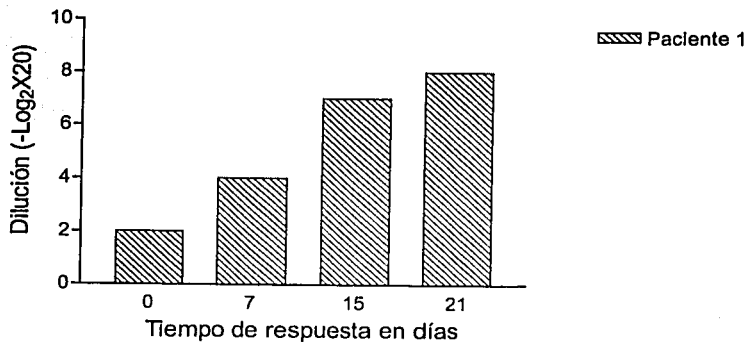
Suero número 1: Tercera respuesta de anticuerpos bactericidas por aplicación de la vacuna Ty21a por vía oral

Respuesta Inmune Humoral de
Anticuerpos Bactericidas a *S.*
typhi



Suero número 1: Cuarta respuesta de anticuerpos bactericidas por aplicación de la vacuna Ty21a por vía oral.

Respuesta Inmune Humoral de
Anticuerpos Bactericidas
S.typhi.



Paciente número 1:

Fecha: Día 0 - dilución 1:2
Día 7 - dilución 1:4
Día 15 - dilución 1:7
Día 21 - dilución 1:8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Debido a la alta incidencia de Fiebre Tifoidea en países en vías de desarrollo, resulta importante desarrollar una nueva vacuna contra la enfermedad. Las vacunas anti-tifoídicas elaboradas a base de *Salmonella typhi* muerta por calor o por acetona tienen un valor limitado, debido en parte a sus efectos colaterales causados por la endotoxina. La protección obtenida con estas vacunas es de corta duración. En un intento para obtener una mejor vacuna Germanier desarrolló la cepa de *S. typhi* Ty21a, la cual es deficiente en la enzima UDP-galactosa-4 epimerasa, esta vacuna se administra por vía oral y carece de efectos colaterales, sin embargo su efectividad varía del 19 al 92 %. Se cuenta además con la vacuna del polisacárido Vi, que esta permitida para niños de 2 años de edad o mas, la vacuna oral atenuada gal E mutante Ty21a es similarmemente efectiva, no esta permitida para usarse en niños menores de 6 años, requiere de una administración de 3 a 4 dosis y requiere de un almacenaje en frío.

En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral a porinas de *Salmonella typhi* en humanos vacunados con la vacuna oral de Germanier Ty21a para fiebre tifoidea. Se determinaron títulos e isotipos de anticuerpos anti-porinas y anti-LPS por el método de ELISA, también se determinó la inducción de anticuerpos bactericidas en un ensayo en placa utilizando la bacteria completa.

Al evaluar los sueros en el ensayo de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos IgA, IgM e isotipos de IgG anti-porinas y anti-LPS, el paciente en el que se detectaron los anticuerpos bactericidas presentó altos títulos de IgG1, IgG2 e IgM dirigidos a porinas y solo se detectaron títulos de IgM dirigidos a LPS, para los demás pacientes se detectaron bajos títulos de IgG2, e IgM dirigidos a porinas y LPS, cabe señalar que ya se encontraban títulos de anticuerpos previos a la inmunización con la vacuna de Germanier para fiebre tifoidea.

La vacuna causó ligero aumento en el título de anticuerpos anti-porinas y anti-LPS de *Salmonella typhi* detectados en los voluntarios, por lo que estos anticuerpos se consideran de reactividad cruzada. La presencia de anticuerpos IgG anti-porinas y anti-LPS antes de la vacunación sugiere que ya existía previo contacto en los vacunados con bacterias homólogas.

Los títulos de IgA dirigidos a porinas y LPS fueron muy bajos, esto era obvio de esperarse, ya que el ensayo se realizó en suero y aquí solo se encuentran este tipo de anticuerpos en mínima cantidad comparados con los que se encuentran en mucosas.

Solo se encontraron anticuerpos bactericidas en un paciente, observándose la lisis de la bacteria en el ensayo en placa, aunque cabe mencionar que la lisis de la bacteria se dio en el suero previo a la vacunación y siguió su aumento hasta el suero de los 21 días posteriores a la vacunación, donde se observaba un 50% de lisis a una dilución 1:8. Cabe señalar que el paciente con anticuerpos bactericidas solo fue el que presentó mayor título de anticuerpos comparado con los otros pacientes, aunque esto nos indica que el paciente con bactericidas presentó una respuesta secundaria y que ya tenía título de anticuerpos anti-porinas de *Salmonella typhi*, al observar que se encontraron anticuerpos anti IgGs. Por lo que las IgGs anti-porinas podrían ser los anticuerpos bactericidas del ensayo.

La ausencia de anticuerpos bactericidas inducidos por la vacuna Ty21a sugiere que los anticuerpos específicos a la vacuna detectados en el suero podrían participar en la inmunidad protectora inducida por la vacuna de otra manera.

Los resultados demuestran que las porinas de *Salmonella typhi* son blanco en la respuesta inmune humoral en pacientes y en este caso en los voluntarios

vacunados colocando a las porinas como inmunógenos contra fiebre tifoidea, por lo que esto sigue apoyando a las porinas de *Salmonella typhi* como un buen candidato a vacuna contra fiebre tifoidea.

VIII. CONCLUSIONES

- Se encontraron títulos de anticuerpos anti-porinas y títulos elevados de anticuerpos anti-LPS de *Salmonella typhi* en los voluntarios vacunados, estos resultados sugieren que las porinas son antígenos inmunogénicos en la vacuna de Germanier.
- La presencia de anticuerpos IgG anti-porinas y anti-LPS en los voluntarios antes de la vacunación sugiere que hubo previo contacto de los vacunados con bacterias homólogas.
- Se detectaron anticuerpos bactericidas únicamente en el voluntario que presentó el mayor título de anticuerpos anti-porinas y anti-LPS de *S. typhi*.
- Las IgGs anti-porinas podrían ser los anticuerpos bactericidas del ensayo, ya que en el suero del voluntario con bactericidas se encuentra un alto título de IgGs comparado con los otros pacientes, además de que las IgM no pueden ser los bactericidas ya que esta respuesta se da en todos los pacientes.

IX. PERSPECTIVA

Se propone continuar con el trabajo evaluando más muestras de pacientes vacunados con la vacuna de Germanier *Ty21a*, para evaluar la respuesta a las porinas de *S. typhi* y su reproducibilidad a las mismas, así como probarse con muestras de posibles enfermos y de personas sanas como probables acarreadores asintomáticos, para poder comparar la antigenicidad de las porinas de *Salmonella typhi*. También sería conveniente purificar anticuerpos específicos a porinas de los pacientes vacunados con *Ty21a* y evaluar su posible capacidad bactericida.

X. BIBLIOGRAFIA

1. ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H., POBER, Jordan S., Cellular and Molecular Immunology, 4a ed. W.B. Saunders Company, U.S.A., 2000. pp. 288-290.
2. ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H., POBER, Jordan S., Inmunología Celular y Molecular, 3a ed. Mc Graw Hill Interamericana, U.S.A. 1999. pp.4-70, 349-375.
3. AUDESIRK, Teresa, AUDESIRK Gerald, BIOLOGIA La vida en la Tierra, Prentice-Hall, Hispanoamericana, S.A., México, 1996. pp. 658-662.
4. ESCOBAR GUTIERREZ, Alejandro, GOMEZ VALDESPINO, José Luis, SEPÚLVEDA AMOR, Jaime, Vacunas, Ciencia y Salud, Secretaria de Salud, México, D.F., 1992. pp.317-332.
5. HOERICH, Paul D., JORDAN, M. Colin, RONALD, Allan R. Infection Diseases, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994. pp.747-752
6. MONTANO, L.M.C. Obtención de un anticuerpo anti-lípido A. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. Tesis UNAM. México, D.F. 1996. pp. 10.
7. PLOTKIN, Stanley A., WALTER, A., VACCINES, W.B. Saunders Company, U.S.A. 1999. pp.781-809.
8. ROJAS-ESPINOZA, Oscar., Inmunología (de memoria), Editorial Médica Panamericana, México, D.F., 1996. pp.111-120.

ARTICULOS CONSULTADOS

9. ACHARYA V.I., LOWE C.U., THAPA R, "Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*: A preliminary report" N Engl J Med. 1987;317:1101-04.
10. BLANCO F, ISIBASI A, GONZALEZ C. R, ORTIZ V, PANIAGUA J, ARREGUIN C, and KUMATE J. "Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*". Scand J Infect Dis. 1993;25:73-80.
11. ENGELS E.A, FALAGAS M.E, LAU J, BENNISH M.L. "Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity". B.M.J. 1998;316:110-16.
12. FELIX A., PITT R., "Virulence of *B. typhosus* and resistance to O antibody. J Pathol. 1934;38:409-20.
13. GARCIA J. A, PANIAGUA J, PELAYO R, ISIBASI A, KUMATE J. "Factores de virulencia de *Salmonella typhi* en relación al desarrollo de nuevas vacunas". Salud Pública de México. Enero 1992;34: 262-67.
14. GILMAN R. H, HORNICK R, WOODWARD W. E, DU PONT H. L, SNYDER M. J, LEVINE M. M and LIBONATI J. P. "Evaluation of a UDP- Glucose- 4 Epimeraseless mutant of *Salmonella typhi* as a live oral vaccine". J. Infect Dis. December 1977;136: 717-23.
15. GUERRANT R. L, KOSEK M. "Polysaccharide conjugate typhoid vaccine". N England J Med. April 2001;344: 1322-23.
16. KLUGMAN K., GILBERTENSON I.T., KORNHOFF H.J., "Protective activity of Vi polysaccharide vaccine against typhoid fever". Lancet. 1987;2:1165-69.

17. LEVINE M. M, FERRECCIO C, BLACK R. E, GERMANIER R, and The Chilean Typhoid Committee. "Large- scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric coated capsule formulation". Lancet. May 1987 : 1049-52
18. LEVINE M. M, FERRECCIO C, ABREGO P, SAN MARTÍN O, ORTIZ E, CRIZ S. "Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine". Vaccine. October 1999;17: 522-27.
19. PANIAGUA J., GARCIA JA., LOPEZ CR., GONZALEZ CR, ISIBASI A, KUMATE J. "Vacunas conjugadas contra infecciones bacterianas: fiebre tifoidea." Salud Publica. 1992;34: 268-73.
20. Robbins J, Robbins J. "Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide Vi antigen of *Salmonella typhi*". J Infect Dis. 1984;150: 436-49.
21. SIMANJUNTAK C. H, PALEÓLOGO F. P, PUNJABI N. H, DARMOWIGOTO R, WITHAM N. D, HOFFMAN S. L, "Oral immunization against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine". Lancet. October 1991;338: 1055-59.
22. TAKEUCHI A. "Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection: I. Penetrations into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*". Am J Pathol. 1967;50: 109-36.