

11261

3
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

"ANALISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA
FRACCIONES ANTIGENICAS DE Salmonella
typhimurium Y SU CORRELACION CON PROTECCION"

T E S I S

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS -INMUNOLOGIA-

Gloria Ma. Calderón Rodríguez.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO D.F. 1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	OBJETIVOS	27
IV.	MATERIAL Y METODOS	28
	1. Animales	28
	2. Bacterias	28
	3. Inmunización	29
	4. Obtención de suero y fluido intestinal	30
	5. Estudio de protección	31
	6. Obtención de antígenos de <i>S. typhimurium</i>	31
	7. Técnica del ensayo inmunoenzimático (ELISA)	32
	8. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	33
	9. Inmunoelectrotransferencia	35
	10. Determinación de pesos moleculares	36
	11. Analisis de frecuencia de reconocimiento	36
	12. Preparación del antígeno particulado	37
	13. Estimulación linfocitaria con partículas antigénicas	38
	14. Análisis Estadístico	39
V.	RESULTADOS	40
VI.	DISCUSION	63
VII.	BIBLIOGRAFIA	72

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue el determinar si existen diferencias en el reconocimiento antigénico a nivel celular como humoral contra las diferentes fracciones de un extracto proteico de *Salmonella typhimurium* debidas al esquema de inmunización y su correlación con protección en ratones Balb/c.

Para ello inmunizaron ratones Balb/c con *s. typhimurium* por vía oral con dos diferentes esquemas de inmunización: 3 dosis en días cosecutivos (30C) y 3 dosis con una semana de intervalo entre cada una de ellas (30S). Posteriormente se realizaron estudios de protección frente a un desafío con *s. typhimurium* virulenta 22 días después de la última inmunización, observándose que los animales mejor protegidos fueron los inmunizados con el esquema 30S.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-*s. typhimurium* se obtuvieron muestras de suero, fluido intestinal de los animales inmunizados así como de los sobrevivientes al desafío, utilizando para ello la técnica de ELISA. Los animales inmunizados con el esquema 30C presentaron mayores niveles de anticuerpos que los inmunizados con 3 dosis semanales, no encontrándose por lo tanto correlación entre los niveles de anticuerpos y la protección observada. Mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia se probaron las muestras tanto de sueros como fluidos intestinales en presencia del antígeno proteico y se analizó la frecuencia de reconocimiento para las diferentes fracciones. En general las bandas reconocidas a una alta frecuencia a nivel sérico fueron

diferentes a las reconocidas por los anticuerpos del fluido intestinal, a excepción de las bandas 10 y 40 cuyos pesos moleculares son de 88 y 32 kDa.

Para analizar la respuesta a nivel celular se obtuvieron células de bazo de los animales inmunizados 22 días después de la inmunización y de los animales protegidos y se estimularon *in vitro* en presencia del antígeno proteico particulado, para ambos se observó una buena estimulación con las fracciones 2,7,5 y 13 con pesos moleculares de 89=88, 79-76, 73-72 y 52-51 kDa. Cabe mencionar que la fracción 10 con un peso molecular de 88 kDa fué reconocida por anticuerpos anti-*S. typhimurium*, además de ser capaz de estimular la proliferación de células T *in vitro*.

INTRODUCCION

Las bacterias del género *Salmonella* abarcan especies que causan un amplio espectro de enfermedades en humanos y animales que incluyen fiebres entéricas, septicemias y gastroenteritis. Las especies mejor conocidas como patógenas son: *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* entre otras. El tipo de patología causada por estos organismos depende no solo de la especie bacteriana y sus serotipos, sino también de la especie infectada (31,27). Las características clínicas e histopatológicas de las entidades producidas varían ampliamente desde una gastroenteritis localizada, hasta la forma invasiva sistémica de la fiebre tifoidea en el ser humano (15).

La infección por *Salmonella* es adquirida por la ingestión oral del microorganismo; en el estómago vence la acidez gástrica, la cual es neutralizada por los alimentos y llega al intestino delgado donde se replica, es en este sitio donde penetra a la Mucosa Intestinal y de ahí se disemina a la lámina propia, placas de peyer y nódulos linfáticos mesentéricos; por último pasa a la circulación a través de los linfáticos y coloniza las células del sistema retículo endotelial de hígado, bazo y pulmones (15,19,54).

La fiebre tifoidea es la entidad patológica más grave causada por el género *Salmonella* y continua siendo un importante problema de

salud pública a nivel mundial. Hasta 1986, se habían reportado aproximadamente 12.5 millones de casos anuales en el mundo (excluyendo China) (30); en México la morbilidad anual es de aproximadamente 20 casos por cada 100 000 habs. (34).

En 1659 Thomas Wellis describió por primera vez los diferentes signos y síntomas de la fiebre tifoidea, pero no es sino hasta 1856 cuando William Budd con bases epidemiológicas, sugirió la transmisión de esta entidad a través de agua contaminada por heces humanas y otros fomites. Posteriormente Eberth en 1880 identificó por vez primera el bacilo de la tifoidea en ganglios mesentéricos y en el bazo de personas muertas por dicha enfermedad, de la misma forma en 1884 Gaffkey, cultivó y aisló a *Salmonella typhi* a partir del bazo de pacientes infectados. En 1896 Widal, Durham y Gruber individualmente describieron, la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes enfermos de Fiebre Tifoidea y su aplicación como prueba serológica para el diagnóstico de dicha enfermedad. Schetza en 1920 hizo un primer intento por clasificar este género; finalmente Kauffman y White en 1925 lo clasificaron en grupos dependiendo de los antígenos presentes en dicha bacteria. Recientemente Ewin (40), clasifica al género en tres especies y éstas son: *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*, el resto de las especies reconocidas por Kauffman y White se consideran como variedades o biotipos de la especie. Desde entonces se han realizado múltiples estudios con *Salmonella* para dilucidar su patogénesis, prevención y tratamiento.

VACUNAS

La primera inmunización experimental en conejos con *s. typhi* viva fué realizada en 1886 por Frankel y Simmons en 1887, posteriormente en 1887 Bauner y Pfeiffer la realizaron con ratones. La primera vacuna contra la fiebre tifoidea aplicada en humanos fué desarrollada en 1897 por Wright y Semple en Inglaterra y Pfeiffer y Kolle en Alemania, esta vacuna consistía en una preparación de salmonella muerta por calor; debido a que dicha vacuna había mostrado cierta eficacia, se utilizó durante la primera guerra mundial una vacuna para inmunizar rutinariamente a las tropas inglesas y norteamericanas la cual contenía *Salmonella paratyphi* A y B así como *s. typhi* muertas por calor y preservadas en fenol, esta vacuna fué llamada vacuna TAB; sin embargo aunque utilizada por mucho tiempo, se observó que producía efectos colaterales tanto a nivel local como sistémicos por lo que resultaba poco aceptable (31). En 1934 Felix y Pitt descubrieron el antígeno "Vi" y observaron que la *Salmonella* muerta por alcohol preservaba más este antígeno (35,36); una vacuna con organismos preservados en alcohol fué utilizada, sin embargo demostró ser menos eficaz que la vacuna con organismos muertos por calor.

En 1966 la Organización Mundial de la Salud auspició en Guyana, Polonia, Yugoslavia y la Unión Soviética una prueba de campo para probar la eficacia de dos tipos de vacunas administradas por vía

parenteral: la vacuna K, preparada por inactivación por acetona y la vacuna L inactivada por calor-fenol, ambas fueron preparadas con *S. typhi* Ty2 (5,50,113). La vacuna K confirió mejor protección sobre todo al administrarse en dos dosis, desafortunadamente los efectos colaterales presentados posteriormente a su administración hizo necesario la búsqueda de una vacuna administrada por vía oral.

En 1967 Reitman (114), introdujo una vacuna preparada a partir de una cepa de *S. typhi* dependiente de estreptomycinina cuya eficacia no pudo ser valorada por los resultados contradictorios producidos, sin embargo en los años 70 Germanier y col. (48) obtuvieron una vacuna a partir de una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa denominada Ty21a; esta vacuna fué seleccionada para ser utilizada en pruebas de campo en Alejandría, Egipto (141) y Santiago de Chile (82). La vacuna fué aplicada por vía oral en niños de edad escolar y la eficacia conferida fué de un 96% en un período de seguimiento de 36 meses en Alejandría, sin embargo en Chile únicamente se obtuvo una protección del 54% en 33 meses de seguimiento y del 67% a los 18 meses. Estas discrepancias se han atribuido a diferentes factores, ya que por ejemplo aunque en ambos lugares la administración fué por vía oral, en Egipto se acompañó de 1 gr. de NaHCO₃ en tres dosis durante una semana, en Chile se administró en cápsulas con capa entérica con intervalos de 2 a 21 días entre las 3 dosis; también se han enumerado otros factores como el fondo genético de la población y la prevalencia de la enfermedad que es más alta en Santiago (30).

Debido a que *S. typhi* solo es patógena para el hombre y el chimpancé, se ha recurrido al modelo experimental del ratón infectado con *S. typhimurium* para el estudio, tanto de los factores de virulencia de la bacteria, como para dilucidar el papel de los mecanismos de inmunidad en la protección contra la infección y el desarrollo de nuevas vacunas que puedan ser utilizadas posteriormente en el humano (43).

FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia de *S. typhimurium*, su genética y su papel como patógeno han sido ampliamente estudiados. Una condición claramente necesaria para causar infección en un hospedero en particular es la capacidad de crecimiento y sobrevivencia que presenta la bacteria en un medio ambiente dado; Por lo tanto la temperatura, el potencial de oxidación-reducción y la concentración de compuestos inorgánicos y metabolitos orgánicos necesarios como nutrientes para el patógeno, deben ser adecuados. Se considera que la temperatura de crecimiento no reviste un gran interés en relación con la patogenicidad de *S. typhimurium*, ya que esta bacteria es capaz de crecer a temperaturas tan altas como los 44°C; así mismo se ha visto que la obtención y metabolismo del hierro, son factores que controlan la multiplicación de algunas bacterias en los tejidos (125). *Salmonella*, utiliza los sideróforos como la enteroquelina y aerobactina, para la transferencia de hierro al interior de la célula, sin embargo de acuerdo a los estudios

realizados por Yancey en 1979 y Benjamin 1981 (10,145), se piensa que el hierro únicamente interviene en el control de la multiplicación de *S. typhimurium* en el fluido peritoneal y posiblemente en fluidos intersticiales, pero no es un factor que controle la multiplicación de *Salmonella* en las células fagocíticas del hígado y bazo. Por otro lado, Stocker en 1986 (125), en trabajos realizados con *E. coli* y *S. typhimurium*, observó que la obtención y metabolismo del hierro por cualquiera de los sistemas de sideróforos, depende de la función de un gen denominado tonB en *E. coli* y chr en *S. typhimurium*, se ha visto que la pérdida de la función de un gen chr en *Salmonella* solo produce una reducción limitada de la virulencia. Recientemente se ha observado que la privación de hierro en *Salmonella typhi* (37), induce la expresión de algunas proteínas de membrana externa así como de la enteroquelina, como un mecanismo de adaptación para contrarrestar el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria que produce la privación de hierro. Los requerimientos de aminoácidos, purinas o vitaminas para el crecimiento de muchas especies bacterianas son ampliamente conocidos; por ejemplo, mutantes dependientes de aminoácidos en *Salmonella* disminuyen su virulencia (125). Desde 1950 se ha observado que las mutaciones que afectan purinas y vitamina B1 causan disminución en la virulencia de *S. typhi* (7,8). Los requerimientos de P-aminobenzoato (pAB) en mutantes de *S. typhi* se han visto relacionados con la disminución en la virulencia; el pAB participa en la biosíntesis de compuestos aromáticos por intermedio del ácido chorísmico, además de ser

precursor del ácido fólico (125). Se ha observado en diferentes estudios (55,122,124) que, un bloqueo en la síntesis de ácido chorísmico por inserción de un transposón en el gen *aro-A* de *S. typhimurium* y *S. dublin*, produce una pérdida virtualmente completa de la capacidad para producir una infección sistémica en el ratón. Aunque se han utilizado varias mutantes auxótrofas para el desarrollo de posibles vacunas, podemos considerar que los diferentes efectos sobre la virulencia están dados principalmente en función de los requerimientos de la bacteria para su crecimiento.

La patogenicidad de muchas bacterias, depende de la producción de toxinas. Entre las endotoxinas más conocidas de las enterobacterias, se encuentra el Lipopolisacárido (LPS), cuyas características y participación en la patogénesis han sido muy estudiadas; el LPS está formado por un componente lipídico denominado lípido A, moléculas de polisacáridos compuestos de un "core" y cadenas laterales polisacarídicas denominadas Ag. "O". Se sabe por ejemplo que los efectos tóxicos del LPS dependen del componente conocido como lípido "A". El LPS participa de manera importante en la activación de la vía del complemento sérico, esta activación puede darse: por la llamada "Vía Alternativa" (unión directa a C3) o por la "Vía Clásica" (unión del lípido A del LPS a C1q) (14,98). Algunas bacterias han desarrollado varios mecanismos para escapar del efecto deletéreo del complemento; en el caso de *Salmonella* se ha visto que las cadenas laterales de polisacárido

recubren las moléculas activadoras (83,138). En estudios realizados con derivados isogénicos de *S. typhimurium*, se observó que los derivados carentes del polisacárido "O" no son virulentos, pueden ser fácilmente fagocitados y activan al complemento, por lo tanto, se considera a éste como un determinante de la virulencia en *Salmonella* (49). También se ha demostrado que el polisacárido "O" de *Salmonella* impide que el complejo enzimático final del complemento (complejo de ataque final a la membrana, MAC) se una a la membrana externa de la bacteria imposibilitando su lisis (63,64).

Otro factor de virulencia aún no muy estudiado es la producción de exotoxinas por las enterobacterias. *Salmonella* produce una enterotoxina termolábil similar a la toxina colérica (39), sin embargo Wallis en 1986 (142) no encontró correlación entre la enterotoxicidad *in vitro* de *S. typhimurium* y la capacidad para producir enfermedad *in vivo*. Se ha estudiado también el papel de las citotoxinas en la patogénesis de la infección por *Salmonella*, el cual no está del todo claro; O'Brien en 1982 (104) demostró la producción de citotoxinas en *S. typhimurium* y Ketyi en 1979 y Baloda en 1983 (9,69) en *S. enteritidis*. Se ha observado que estas citotoxinas, actúan inhibiendo principalmente la síntesis de proteínas (75); hasta ahora se cree que estas citotoxinas pueden tener un papel importante en la patogénesis, produciendo daño local a nivel de mucosa intestinal (116), también se ha demostrado que la cantidad de toxina producida por diferentes especies de *Salmonella* puede estar relacionada con su capacidad de producir daño a nivel local (6).

En un estudio reciente Reitmeyer y cols. (115) demostraron que la citotoxina de *S. Enteritidis*, es un componente de la membrana externa de la bacteria.

Los flagelos (Antígeno H) de *S. typhimurium* han sido caracterizados como otro factor de virulencia, los cuales confieren motilidad a la bacteria y adhesión a la célula hospedero. Numerosas investigaciones realizadas *in vitro*, han demostrado que los flagelos parecen ser ventajosos para la bacteria principalmente en los fenómenos de adherencia e invasión (21,53,133), sin embargo, el papel de los flagelos como factor de virulencia *in vivo* permanece menos claro. Carsiotis y Weinstein (21), utilizando cepas isogénicas de *S. typhimurium* Fla25 y motB, observaron *in vitro* su capacidad de sobrevivir en macrófagos y su virulencia en ratón; sus resultados mostraron que las cepas flageladas eran más virulentas para el ratón y tenían mayor capacidad de sobrevivir en macrófagos; sin embargo, también se observó que las cepas no flageladas eran igualmente eficientes en la colonización del tracto digestivo. Posteriormente Carsiotis (20), describió que adyacente a los genes flagelares (Flg) se encuentra un fragmento cromosómico denominado *mviS*, este gen se piensa que pudiera ser el responsable de la virulencia *in vivo*. Por otra parte, la motilidad parece ser irrelevante como factor de virulencia e invasividad (85), ya que por ejemplo, cepas móviles de *S. typhimurium* son inmovilizadas por la viscosidad del moco del epitelio gastrointestinal (92) tratándose de un microorganismo intracelular, la infección se disemina a través de los macrófagos infectados. Se puede considerar que los

flagelos y la motilidad tienen un papel importante en la capacidad de la bacteria para infectar monocapas celulares *in vitro* (85), pero no se pueden considerar factores de virulencia *per se* en la tifoidea murina. Recientemente Galán y Curtis III clonaron un grupo de genes denominados inv A, B, C y D los cuales están relacionados con la capacidad de la bacteria para colonizar tejido intestinal (44).

Debido a que *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo, es importante conocer los mecanismos por los cuales evade la acción microbicida de los macrófagos. Buchmeier y Heffron (16) observaron que *S. typhimurium* es capaz de inhibir la fusión fagolisosoma, lo cual depende de la viabilidad del microorganismo, al parecer la opsonización por suero normal y la presencia del LPS no intervienen en el fenómeno, se ha observado que la *Salmonella* se reproduce preferentemente en fagosomas no fusionados. La capacidad de la bacteria para sobrevivir en los macrófagos, está regulada genéticamente, aunque también depende de la procedencia de las células, ya que el crecimiento intracelular es mayor en macrófagos esplénicos que en macrófagos peritoneales (17). Por otro lado Fields y cols. (38) identificaron un gen de *Salmonella*, asociado a la virulencia y a la capacidad de supervivencia intracelular de esta bacteria; estos investigadores demostraron que este gen tiene un papel importante en la resistencia a defensinas (péptidos microbicidas que se encuentran en neutrófilos y macrófagos) y posiblemente a otros mecanismos microbicidas de los fagocitos.

RESPUESTA INMUNE

Los mecanismos de defensa desarrollados por el hospedero frente a *Salmonella*, han sido sujeto de los más variados estudios, sin embargo, no se conoce en su totalidad la participación de la respuesta inmune frente a la infección por dicha bacteria. Actualmente existe una amplia variedad de información en muchas ocasiones controvertida. Conforme se desarrolló el estudio de los principales mecanismos involucrados en la inmunología de las infecciones causadas por *Salmonella*, surgieron dos corrientes de pensamiento antagónico: Una de ellas planteó la hipótesis de que siendo *Salmonella* un patógeno facultativo intracelular, el hospedero debía desarrollar preponderantemente una respuesta inmune de tipo Celular. El otro grupo de investigadores planteó la posibilidad de que la inmunidad humoral pudiera ser la principalmente involucrada en la protección. Conforme se ha estudiado más la participación de la inmunidad frente a *Salmonella* se puede considerar actualmente, que tanto la respuesta inmune humoral como la celular son importantes, y que ambas intervienen en el desarrollo de una adecuada inmunidad del hospedero frente a este *microorganismo*.

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Numerosos autores han demostrado que la inmunidad humoral contribuye de manera importante a la defensa del hospedero frente a *Salmonella* (31). Hochadel y cols. (51) en estudios de transferencia pasiva de linfocitos T o B provenientes de animales inmunizados con la bacteria, encontraron que los últimos eran los más importantes para conferir resistencia contra el desafío con *S. typhimurium*, al menos en la etapa temprana de la infección. Se ha reportado que, las vacunas con *Salmonella* muerta producen preferentemente una respuesta de tipo humoral. Kenny y cols. (68) lograron inducir una respuesta protectora mediante la inoculación de la bacteria muerta y detectaron anticuerpos circulantes con capacidad bacteriolítica pocos días después de la inmunización. Numerosos trabajos muestran que vacunas hechas con diferentes cepas de *Salmonella* muerta o extractos proteicos de las mismas, administradas por vía parenteral, confieren protección al ratón frente a desafíos con el microorganismo viable virulento (4,26,73,120,127,135).

Nakoneczna y Hsu (100) encontraron que la protección conferida por el microorganismo atenuado viable, era el resultado de la suma sinérgica de los efectos protectores conferidos por la inmunidad celular así como por la inmunidad humoral; en cambio las características protectoras conferidas por el microorganismo muerto parecen deberse a los efectos de la inmunidad humoral; en este estudio se observó que aunque la vacuna obtenida de cepas muertas

era incapaz de producir una respuesta celular contra antígenos de *Salmonella*, ésta generaba una respuesta alta de anticuerpos, sin embargo estos títulos altos no correlacionaban con el grado de protección.

Robertsson y Lindberg (84,118) realizaron un estudio comparativo de inmunización por vía subcutánea con la bacteria muerta y de inmunización por vía oral con la bacteria atenuada en vacas, encontrando que la vacuna oral confería mayor protección; sin embargo en los animales inmunizados por vía subcutánea, desarrollaron títulos más altos de anticuerpos séricos de la clase IgG e IgM contra LPS homólogos y porinas por otro lado, en los animales inmunizados por vía oral, mostraron un incremento de la inmunidad celular el cual se correlacionó con mayores niveles de protección.

Los reportes acerca de las clases de inmunoglobulinas inducidas por diferentes condiciones de inmunización son escasos. Hohmann y cols. (52) encontraron que animales inmunizados con *S. typhimurium* por vía oral generaban niveles altos de anticuerpos principalmente de la clase IgA, tanto a nivel local como sistémico, dirigidos principalmente contra antígenos "O". Nakano y Saito (99) observaron que los anticuerpos anti-"O" no tienen un papel esencial en la protección en el modelo experimental. En estudios para examinar la especificidad y el isotipo de anticuerpos presentes en saliva y suero de ratones inmunizados por vía oral con varios antígenos de *Salmonella*, se observó que en saliva, la mayor parte de los anticuerpos que estaban dirigidos contra el antígeno "O" eran de la

clase IgA; los anticuerpos dirigidos contra el antígeno "H" eran IgA e IgG y para el antígeno "Vi" fueron solo de la clase IgG. En suero, el isotipo de las inmunoglobulinas producidas fue IgM (29). Por otro lado, se ha reportado un efecto bactericida a través de la actividad citotóxica de células T dependiente de anticuerpos, tanto en el humano como en el ratón (129,130). Nencioni y cols. (102) encontraron que en intestino los linfocitos T murinos son capaces de ejercer una actividad antibacteriana natural contra *S. typhimurium* y que la IgA secretora incrementa específica y significativamente dicha actividad, induciendo una acción antibacteriana en células provenientes del bazo, pero no del timo o de nódulos linfáticos periféricos; resultados similares se han obtenido con linfocitos de sangre periférica en humanos inmunizados con la vacuna viable Ty21a por vía oral (28). Estos datos sugieren que los mecanismos dependientes de anticuerpos pueden ser importantes en la defensa contra *Salmonella*, particularmente a nivel gastrointestinal.

Se sabe que tanto las características del antígeno como la dosis administrada, tienen un papel preponderante en la inducción de la respuesta inmune a nivel de mucosas (61,112,126). Varios reportes indican que la administración oral de *S. typhimurium* induce una respuesta inmune protectora frente a retos posteriores con la bacteria virulenta y ésta puede ser superior a la inducida por la administración parenteral (28,84,139). Srisart y cols. (123) encontraron títulos altos de anticuerpos de la clase IgA en ratones inmunizados oralmente con algunas cepas de *S. typhimurium* y estos mismos grupos de ratones resistieron el reto con una cepa

virulenta. No existió correlación entre la protección y la especificidad del antígeno somático "O" de la cepa utilizada para la inmunización y el desafío, y los anticuerpos IgA específicos detectados no fueron los responsables de la protección; no obstante los niveles de éstos se correlacionaron con la resistencia de los ratones a la infección con *Salmonella*.

RESPUESTA INMUNE CELULAR

La respuesta inmune celular producida en el curso de la infección por *Salmonella* ha sido ampliamente estudiada (31); Mackaness y cols. (89,90) en estudios realizados en ratones, buscaron aclarar la importancia de la inmunidad humoral y celular en la protección frente a *Salmonella* y encontraron que los ratones vacunados con bacterias muertas no se protegían contra una infección intravenosa con *Salmonella*, mientras que los animales que sobrevivieron a la infección con una cepa virulenta sí se protegían. El suero de estos animales no protegió a los ratones receptores contra un desafío intravenoso con la *Salmonella* virulenta a pesar de tener anticuerpos anti-O; sin embargo se encontró cierto grado de protección contra el desafío administrado por vía intraperitoneal cuando se utilizó el suero de animales vacunados con la bacteria muerta (89). Este grupo de investigadores cuestionó la validez del desafío intraperitoneal en el modelo de ratón, ya que esta ruta parecía potenciar la protección por las vacunas de microorganismos muertos, debido a un aumento de la fagocitosis en la cavidad peritoneal y

enmascaraba la inmunidad mediada por mecanismos antibacterianos del sistema retículo endotelial (22,23). Posteriormente Collins y Mackannes (88,24) demostraron que las vacunas vivas, pero no las muertas, inducen reacciones de hipersensibilidad cutánea retardada (HTR), la cual correlaciona con la inmunidad antibacteriana.

Se sabe que las vacunas preparadas con organismos vivos inducen primordialmente una respuesta de tipo celular (31). Se ha observado que la protección contra este microorganismo es solamente generada por vacunas que estimulan la capacidad antibacteriana en los tejidos y que pueden prevenir el crecimiento bacteriano en órganos del sistema retículo endotelial posterior al desafío con la bacteria virulenta, la protección conferida por las vacunas de organismos muertos por ejemplo, tienen una acción bactericida inicial, la cual atenúa el curso de la infección y por lo tanto da oportunidad al hospedero de desarrollar inmunidad antibacteriana en respuesta al desafío, al contrario de las vacunas de organismos vivos que generan una acción bactericida en tejidos. Ushiba y cols. (137) compararon la protección generada por vacunas muertas por calor, administradas por vía subcutánea y la protección inducida por la vacuna viva atenuada de una cepa rugosa de *Salmonella* carente de antígeno "O" y encontraron que la protección por la vacuna viva era del 77% mientras que con la vacuna muerta solo se obtuvo el 33% de protección en los animales estudiados. Por otro lado, se observó en la sangre, fluido peritoneal y bazo de ratones inmunizados con vacuna muerta y posteriormente desafiados, se reducía rápidamente el número de bacterias, sin embargo después de

2 días, la bacteria comenzaba nuevamente a multiplicarse en el bazo hasta causar la muerte de los animales. En contraste, los ratones que recibieron la vacuna viva no mostraron la disminución inicial de microorganismos en fluidos o bazo pero fueron capaces de prevenir la multiplicación subsecuente bacteriana en el bazo. Collins (25) demostró que para poder inducir una buena protección, se requiere que el crecimiento exponencial temprano de la bacteria en el sistema retículo endotelial sea suprimido durante la primera semana de la infección, llegando a una fase de aplanamiento o meseta y a un estado de portador por un tiempo variable.

Se ha visto que la respuesta celular es la más importante en la supresión del crecimiento bacteriano en las etapas tardías de la infección primaria por *Salmonella* para adquirir inmunidad post-infección; sin embargo los mecanismos responsables de la supresión del crecimiento exponencial inicial y la fase de meseta que ocurren al final de la primera semana de la infección, son esenciales para la sobrevivencia del hospedero (56). Se ha observado que las células T no tienen una participación importante en el establecimiento de la fase inicial de meseta, ya que varios datos apoyan que esta fase puede encontrarse en ratones carentes de células T y en ratones nu/nu (105). Collins y cols. y Hormaeche y cols. (25,57) observaron que estos animales son paradójicamente más resistentes a *Salmonella* y muestran un crecimiento bacteriano muy bajo en Sistema Retículo Endotelial durante la fase que precede a la meseta en comparación con ratones normales, esto se debe probablemente a una mayor activación basal de sus macrófagos.

Resultados similares han sido observados en infecciones por *Listeria* (117,67). Hormaeche y cols. (58) utilizando ratones irradiados observaron, que la eliminación de la fase de meseta puede ser reversible mediante una transferencia pasiva de células normales de Médula Osea y no requiere de la participación de células T; se cree que los mecanismos que controlan el establecimiento de esta etapa, son distintos a aquellos que regulan la eliminación bacteriana mediante células T. La respuesta dependiente de estas células, que confieren inmunidad frente a una reinfección, se desarrolla tardíamente después de la fase de meseta. Las células derivadas de médula ósea crean un medio ambiente poco favorable para el crecimiento bacteriano, así como los Leucocitos Polimorfonucleares, los cuales son importantes en la primera fase de resistencia a la infección por esta bacteria (67,56).

Por otra parte se piensa que los monocitos y macrófagos son un factor importante para el control del crecimiento bacteriano en el hospedero, diversos estudios realizados para observar la participación de estas células en la Inmunidad frente a *Salmonella* apoyan la importancia de la Inmunidad Celular (31,38,16,17). En experimentos realizados para observar la interacción de macrófagos frente a vacunas de organismos vivos o de organismos muertos, se observó que los macrófagos de ratones inmunizados con la bacteria viva, tenían una mayor actividad bactericida inicial y eran capaces de inhibir el crecimiento bacteriano intracelular subsecuente, mientras que los macrófagos de animales expuestos a la vacuna de

organismos muertos permitía la replicación intracelular de la bacteria (31).

La prueba de Hipersensibilidad Cutánea de tipo retardado (HTR), ha sido utilizada en varios trabajos para demostrar la correlación entre la Inmunidad Celular frente a la infección y la protección (88,24,70,71). Killar y Eisenstein (70,71) realizaron diversos estudios para medir la HTR en ratones infectados por *S. typhimurium* demostrando que: 1) Existen marcadas diferencias entre las cepas de ratón para presentar una respuesta de tipo HTR; 2) la capacidad para montar una respuesta de HTR está relacionada con la susceptibilidad innata o la resistencia del ratón a la infección por *Salmonella* virulenta; 3) la existencia de una respuesta anérgica, no está relacionada con los loci H-2 de histocompatibilidad; 4) la anergia no está relacionada con la presencia o ausencia de reactividad al LPS en las diferentes cepas del ratón; y no es causada por una sobrecarga de antígeno en cepas no reactivas y 5) una falta de respuesta HTR puede ocurrir simultáneamente con una inmunidad protectora, aún en cepas de ratones respondedores, si la dosis de inmunización es baja.

Se ha observado que las células T controlan las dos respuestas efectoras de la Inmunidad Celular frente a las infecciones bacterianas (respuestas de HTR y la capacidad para activar macrófagos sin embargo, aún no está claro si ambas funciones están mediadas por diferentes subclases de células T. Experimentos con células de fenotipo Lyt responsables de estas funciones han dado resultados contradictorios (45). Las células Lyt 1+2+ parecen ser

esenciales en la producción tanto de respuestas HTR como para conferir protección en infecciones por *Brucella abortus* (110). En ratones con tuberculosis, la HTR se ha encontrado asociada a células Lyt 1+2-, mientras que la protección se ha visto relacionada con células Lyt 1+2+ (106). En la Listeriosis (67), tanto las células Lyt 1+2- como las células Lyt 1-2+ parecen ser necesarias para la generación de ambas respuestas inmunológicas. En infecciones por el virus *Herpes simplex*, se ha observado que ambas repuestas son mediadas por células Lyt 1+2- (104).

George y cols. (45), en estudios realizados con ratones Balb/c inmunizados por vía intraperitoneal con *S. enteritidis* reportó que la respuesta HTR declina con el tiempo mientras que la eliminación de la bacteria en tejidos se incrementa; por lo tanto se piensa que esta dicotomía en la cinética de ambas repuestas está mediada por diferentes subclases de células, aunque existe la posibilidad que la misma subclase medie a ambas. En experimentos de transformación blastoide realizados con células de sangre periférica de bovinos estimulados con LPS, Polisacáridos de antígeno "O", Porinas y extractos crudos de *Salmonella*, Lindberg y cols. (84) demostraron que la actividad celular, tenía una especificidad por la cadena "O" del polisacárido. La respuesta HTR observada fué significativamente alta en animales inmunizados con la bacteria viva, al contrario de los animales inmunizados con la bacteria muerta, quienes no mostraron una respuesta de HTR (excepto a Porinas), ni presentaron protección al desafío con la bacteria virulenta. Por lo antes mencionado, se puede concluir que las respuestas de tipo HTR no

necesariamente son indicadores de la Respuesta Inmune protectora. Otros estudios han sugerido la importancia de la activación de Células Asesinas Naturales (NK) y la producción de gamma Interferón, debida a bacterias intracelulares facultativas, después de una infección bacteriana, (131,103,144). En experimentos realizados con *Shigella* y *Salmonella*, Klimpel y cols. (74), observaron *in vitro* que tanto las bacterias vivas como las bacterias muertas por calor inducían la producción de Interferón gamma y la activación de las células NK en cultivos de linfocitos de sangre periférica de humanos; estas respuestas no involucran al LPS. También se ha observado que las células NK (CD16+ y CD2+) que median la actividad citotóxica, son productoras de IFN el cual aumenta esta actividad.

ANTIGENOS

Se han probado varios antígenos en la búsqueda de una vacuna que confiera una buena protección y no presente efectos colaterales; algunos de ellos han sido probados experimentalmente, primero en el ratón y posteriormente en el humano; entre estos podríamos mencionar el antígeno somático "O", el LPS, el antígeno flagelar "H", el antígeno capsular "Vi" así como preparados proteícos crudos de la bacteria y proteínas de membrana externa como las Porinas. El LPS purificado es conocido como un pobre inmunógeno ya que induce una muy baja o ninguna protección (13,3), se ha observado sin embargo, que es capaz de inducir protección cuando se asocia a

otros componentes celulares de salmonella (98), por ejemplo, el LPS asociado al lípido "A" administrado a cepas de ratones C3H/HeJ susceptibles a la infección por *Salmonella*, pero hiporespondedores al LPS, confiere una protección significativa contra retos letales subsecuentes con *Salmonella* (72). El antígeno somático "O" que forma parte del LPS se ha utilizado también como un inmunógeno para conferir protección; Nakano y Saito (99) observaron que las cadenas laterales "O" son un importante factor de virulencia y se relacionan con la capacidad de la bacteria para resistir la fagocitosis, sin embargo los anticuerpos anti-"O" generados no juegan un papel esencial para conferir protección en el ratón. Svenson y cols. (127) utilizaron una serie de polisacáridos antígeno "O" específicos de varios serotipos de *Salmonella*, para la inmunización de conejos, unidos covalentemente a proteínas como acarreadores, los anticuerpos generados se transfirieron a ratones, los cuales se protegieron contra un reto posterior con *Salmonella*, la protección conferida fué serotipo específica, lo que enfatiza la importancia estructural y conformacional de estos antígenos y apoya la importancia de epítopes específicos para conferir una adecuada protección.

El antígeno "Vi" es un polisacárido capsular de *S. typhi*, compuesto de unidades repetidas de un homopolímero lineal de α -1-4,2 deoxi-2-N ácido acetil galacturónico. Se ha observado que las cepas de *Salmonella* "Vi" positivas son más virulentas que las "Vi" negativas, basándose en esto se preparó una vacuna con altas concentraciones de antígeno "Vi" (vacuna K) que demostró ser más efectiva que otras

con menor concentración de este antígeno, por ejemplo la vacuna L; Landy (30) realizó estudios con polisacárido "Vi", el cual no produjo una protección eficaz en ratones, se pensó que esta ineficacia se debía a la forma de extracción; posteriormente Robbins (119), purificó el polisacárido "Vi" por métodos no desnaturalizantes y logró una buena protección en ratones inmunizados con dicho antígeno frente a un reto letal de *s. typhi*. Tacket (30) realizó estudios en humanos con polisacárido "Vi" sin embargo éste, produjo reacciones colaterales posteriores a su administración por contaminación con LPS. Es importante hacer notar que aún utilizando cepas carentes de antígeno "Vi" se puede lograr una protección satisfactoria frente a desafíos con *s. typhi* (30). El LPS, el antígeno "O" y el antígeno "Vi" se consideran T-independientes, por lo que presentan desventajas para inducir una buena respuesta inmune celular para la producción de anticuerpos de alta afinidad y para favorecer la memoria Inmunológica (97,119) La inmunización con fracciones ribosomales también ha sido evaluada como una posible vacuna, Vanneman y col. (140) reportaron alta inmunogenicidad en vacunas ribosomales. Posteriormente Molinari y col. (96) y Smith y cols. (121) realizaron estudios para inducir protección en ratones, administrando este tipo de vacunas con resultados aparentemente satisfactorios, sin embargo Eisentein y Johnson (32,65) demostraron que la contaminación con LPS podría ser responsable, por lo menos en parte, de dicha protección; Misfeld y Johnson (95) reportaron que probablemente más, que las fracciones ribosomales, el LPS y las proteínas de la envoltura

celular son las responsables de la protección.

Kuusi y cols. (77) encontraron que preparaciones crudas de proteínas de Membrana Externa de una cepa rugosa de *S. typhimurium*, eran capaces de proteger al ratón contra el desafío con la cepa lisa homóloga. Este mismo efecto fué observado en experimentos de inmunización pasiva (76). Posteriormente, otros estudios (136) demostraron que las preparaciones de Porinas de *S. typhimurium* perdían su capacidad protectora cuando se eliminaron las cantidades mínimas de LPS contaminante, a pesar de que inducían la producción de títulos altos de anticuerpos. Isibasi y cols. (60) demostraron que las Porinas de *S. typhi* inducen una protección del 100% en ratones desafiados con 1000 DL₅₀ de la cepa homóloga.

Extractos proteícos obtenidos a partir de cepas rugosas de *Salmonella* mediante la extracción con urea, también han sido utilizados para conferir protección en el ratón (13,120); estas proteínas comprenden cerca de 30 diferentes polipéptidos libres de LPS provenientes de diferentes cepas de *Salmonella* y se constituyeron en fracciones solubles e insolubles; ambas fracciones indujeron una protección aceptable al probarse en ratones desafiados con *S. typhimurium*, de la misma forma que el extracto proteíco total.

Los estudios citados anteriormente indican que tanto la respuesta Inmune humoral como celular participan en la Protección contra *S. typhimurium*. Sin embargo, se ha estudiado la Respuesta Inmune contra un número reducido de antígenos y no se han identificado los principales componentes de la bacteria involucrados en inducir una respuesta protectora.

OBJETIVOS

Determinar si existen diferencias en el reconocimiento antigénico tanto a nivel Celular como Humoral contra fracciones de un extracto proteico de *S. typhimurium*, debidas al esquema de inmunización utilizado.

Identificar que fracciones antigénicas son las reconocidas a una alta frecuencia.

Determinar si la Respuesta Inmune Humoral contra las fracciones antigénicas del extracto proteico es similar a nivel Sérico e Intestinal.

Determinar si existe correlación entre la Protección y la Respuesta Inmune Celular y Humoral, contra las diferentes fracciones de *S. typhimurium* en ratones Balb/c.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c hembras y machos de 8 semanas de edad con un peso entre 18 y 22 g. provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina; se alojaron en cajas de plástico con astilla y agua estéril y Purina *ad libitum*.

BACTERIAS

Se utilizaron dos cepas de *S. typhimurium* serogrupo B, denominadas cepa F1 de baja virulencia para el ratón, DL_{50} mayor de 10^{11} por vía intragástrica (i.g.) y la cepa F3 virulenta para el ratón, DL_{50} de 2.5×10^3 bacterias. Ambas cepas fueron donadas por el doctor Leoncio Filloy, del Hospital Infantil de México y presentan las siguientes reacciones bioquímicas típicas de su género:

GLUCOSA	+	ROJO DE METILO	+
LACTOSA	-	VOGES PROSKAUER	-
SULFHIDRICO	+	GELATINA	-
INDOL	-	DESCARBOXILACION	
MOVILIDAD	+	DE LA LISINA	+
CITRATO	+	AMPICILINA	R (F3)
MALONATO	-	AMPICILINA	S (F1)
UREASA	-		

Las bacterias utilizadas tanto para la inmunización como para el desafío, fueron obtenidas a partir de una colonia de *S. typhimurium* F1 cultivadas en agar de soya tripticasa (AST) (Bioxón de México) y sembradas en un tubo con 10 ml de caldo de soya tripticasa (CST), (Bioxón de México) incubándose durante 18 hrs. a 37°C; de este cultivo se tomaron 0.5 ml y se sembró en 50 ml del mismo medio incubándose por 3 hrs. a 37°C en agitación a 150 rpm (American Rotator V). Posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 600 xg durante 20 min a 4°C, el paquete bacteriano fué resuspendido en solución salina isotónica (s.s.i.) estéril y se ajustó a 1×10^8 células en 0.2 ml por determinación de la densidad óptica (D.O.) a 560 nm. Para confirmar el número de bacterias incubadas se sembraron por duplicado diferentes diluciones de la suspensión bacteriana en cajas de Petri con medio de AST.

INMUNIZACION

Se formaron grupos de 15 ratones distribuidos en forma de "cola china" de acuerdo a su peso. Se inmunizaron con tres dosis de *S. typhimurium* F1 (1×10^8 bacterias vivas por dosis) por vía i.g. Las dosis fueron administradas en días consecutivos (grupo 30C) o con intervalos de una semana entre ellas (grupo 30S) y se incluyeron grupos de animales controles. La inmunización se realizó administrando *S. typhimurium* viva (F1) por vía i.g. mediante una cánula de plástico.

OBTENCION DE SUERO Y FLUIDO INTESTINAL

De los animales inmunizados con ambos esquemas 30C y 30S y de los animales controles se obtuvieron suero y fluido intestinal en dos tiempos diferentes: a los 22 y 52 días después de la última inmunización.

Obtención del Suero: Los animales previamente anestesiados con eter, fueron sangrados por punción del plexo retroorbital, la sangre se dejó coagular en un tubo de 12 X 75 mm, 30 min a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó a 250 xg por 10min a 4°C, se separó el suero del paquete celular y se depositó en tubos Eppendorf almacenándose a -20°C hasta su uso.

Obtención de Fluido Intestinal: Se sacrificaron los animales y se les extrajo el Intestino Delgado el cual se lavó con 2 ml de Solución Balanceada de Fosfatos (PBS) pH 7.2; las muestras se centrifugaron a 600 xg por 20 min a 4°C y se separó el sobrenadante, al cual se le agregaron 0.2 ml de solución inhibidora de tripsina (1 mg/ml), .02 ml de sal sódica del ácido etil diamino tetracético (EDTA) (Sigma Chemical Co.) 100 mM de acuerdo al método descrito por Elson y cols. (33). El sobrenadante nuevamente se centrifugó según las condiciones descritas, se transfirió a un tubo y se le agregó 0.02 ml de PMSF dejándose por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se le agregó 50µl de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma Chemical Co.) al 20%. Los fluidos así obtenidos fueron almacenados en viales a -20°C hasta su uso.

ESTUDIO DE PROTECCION

Se realizó con animales inmunizados con los esquemas 30C y 30S como se describió previamente, incluyéndose un grupo control; el desafío con *S. typhimurium* (F3) viva fué administrado 22 días después de concluida la inmunización. El inóculo fué obtenido de la forma descrita para F1 y la dosis administrada fué de 150 DL₅₀ . Los animales fueron observados durante los 30 días posteriores al desafío registrando el número de animales muertos. De los animales sobrevivientes al desafío con la bacteria virulenta se obtuvo el suero y fluído intestinal.

OBTENCION DE ANTIGENOS DE *S. typhimurium*.

Antígeno Proteico. Se obtuvo un extracto proteico crudo para ambas cepas de *Salmonella* (F1 y F3) mediante el método de Tato y cols. (132): Se sembró una colonia de *Salmonella* en 10 ml de C.S.T. y se incubó 24 hrs a 37°C, de este cultivo se transfirieron 3 ml a un medio con 300 ml de C.S.T. y se incubó 18 hrs. a 37°C, este medio se sembró en 6 l de C.S.T. incubándose durante 3 hrs. en agitación a 1500 rpm (American Rotator V) a 37°C; se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 7000 xg por 20 min a 4°C; el botón fué resuspendido en 300 ml de s.s.i. estéril, se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones; y el paquete bacteriano fué resuspendido en 30 ml de acetona fria deshidratada con cloruro de calcio anhidro (CaCl₂) el cual se mantuvo en agitación durante 10 min, esta suspensión se filtro con papel Whatman no. 2 y se lavó 2 veces más como se describió previamente. A continuación se agregó

cloroformo (30 ml) y se volvió a filtrar, el sedimento obtenido fué colocado de forma dispersa en una caja de Petri en un desecador al vacío por 48 hrs. El producto obtenido, se disolvió en 30 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH 7.2 conteniendo cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 0.012 M, Sacarosa 0.25 M, desoxicolato de sodio .4% y cloruro de potasio (KCl) 0.1 M (los reactivos antes mencionados son Merck de México); finalmente se agregó desoxirribonucleasa I (Sigma Chemical, St. Luis. Mo.) aproximadamente 20 μg por ml y se mantuvo en agitación a 37°C durante una hora en Baño María, posteriormente se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH 7.2 conteniendo KCl 0.1M, con cambios frecuentes durante 5 días. El material dializado se centrifugó a 14000 xg durante 15 min a 4°C, se desechó el sedimento, el sobrenadante se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 μm . y al filtrado se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (87) para posteriormente almacenarse a -20°C hasta su uso.

TECNICA DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA)

Se utilizó una modificación de la técnica descrita por Ortiz y cols. (107). Se recubrieron los pozos de las tiras de microtitulación (Immunolon II Dinotech Co.) con 50 μl de amortiguador de carbonatos 0.01 M a pH 9.6 conteniendo 30 $\mu g/ml$ del antígeno proteico ó 1 X 10⁸ células formadoras de colonias/ml de bacterias muertas por calor; las tiras se colocaron en un desecador al vacío a temperatura ambiente por 24 hrs. y fueron utilizadas en

los siguientes 60 días. Una vez acoplado el antígeno se procedió a rehidratar las tiras con PBS 0.02 M pH 7.2 conteniendo 0.5% de Tween 20 (Sigma Chemical) y 0.5% de BSA (PBS-BSA- Tween 20), se lavaron dos veces más con PBS-Tween 20 y posteriormente se incubaron durante 12 hrs. a 4°C con PBS más BSA al 3%. Las tiras se lavaron 2 veces con PBS-Tween 20 y se les agregó 0.05 ml de la dilución adecuada de suero o fluido intestinal sin diluir a cada pozo; se incubaron 1 hora a 25°C. Transcurrido este tiempo se lavaron los pozos como se describió anteriormente y se incubaron con anticuerpos peroxidados dirigidos contra la fracción Fc de IgG, IgA o IgM de ratón (Cappel Co.) para determinar el isotipo de los anticuerpos; finalizada la segunda incubación los pozos fueron nuevamente lavados y se les agregó .05 ml de sustrato (10 ml de amortiguador de citratos .1 M pH 4.5 conteniendo 10 mg de O-fenildiamina (Sigma Co.) y 0.004 ml de una solución al 30 % de H₂O₂, la reacción se detuvo 5 min después de agregado el sustrato con 0.2 ml de una solución 1 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y se leyó en un lector de ELISA (Dynatech Co.) a una D.O. de 490 nm. Todas las incubaciones se realizaron en agitación a 90 rpm. Las diluciones apropiadas de los sueros y de los conjugados se determinaron con anterioridad en el laboratorio.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Se realizó un corrimiento electroforético según la técnica de Laemmli (78) para los antígenos proteícos de *Salmonella typhimurium* (F1 y F3) bajo las siguientes condiciones: Se utilizó un gel concentra-

dor al 3.5%, el cual contenía acrilamida al 30%, N'N-bis-methylene-acrilamida (bis-acrilamida) al 0.8%, Tris-HCl 2 M pH 6.8 y SDS al 10% y un gel separador al 11%, con acrilamida al 30%, bis-acrilamida al 0.8%, Tris-HCl 2M pH 8.8 y SDS al 10%, ambos se polimerizaron con Persulfato de Amonio y Temed (Todos los reactivos utilizados son Bio-Rad Lab.). Las muestras de los antígenos se resuspendieron vol/vol en una mezcla de Tris-HCl 0.05 M pH 6.8, SDS al 10 %, glicerol al 10%, EDTA 0.001 mg, mercaptoetanol al 1% y azul de bromofenol; la concentración final de esta solución contenía 80 µg de antígeno. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares altos (Pharmacia, BA.) los cuales se resuspendieron y utilizaron de acuerdo a las especificaciones de la marca. El gel conteniendo las muestras del antígeno y de los marcadores de pesos moleculares fué colocado en un Cámara de Electroforesis (LKB Bromma, Co.) en presencia de un buffer de Tris 0.02 M, Glicina 0.152 M y SDS al .1%. El corrimiento se realizó a 16 mA para el gel concentrador y a 34 mA para el gel separador.

Tinción del Gel.

Nitrato de Plata. Concluida la electroforesis se procedió a fijar el gel en una solución con Etanol al 30% y Acido Acético al 10% por 12 hrs. Posteriormente se lavó con Etanol al 10%, 2x10 min seguido de 3 lavadas por 10 min con H₂O destilada; se tiñó en seguida con Nitrato de Plata al 0.1% por 30 min y se reveló con Carbonato de Sodio al 2.5% en Formaldehído al 0.02% por 5 a 10 min hasta que aparecieron las bandas, la reacción fué bloqueada con H₂O.

Azul de Coomassie. El gel se cubrió con una solución de Azul de

Coomassie al 0.25% en Metanol-Acido Acético y H₂O en una relación 5:1:% por 12 hrs. a temperatura ambiente. Se retiró posteriormente esta solución y se procedió a cubrir el gel con una solución de Ácido acético al 7% y Metanol al 5% a 50°C por una hora, hasta observar el patrón de corrimiento.

INMUNELECTROTRANSFERENCIA

Separados los antígenos (F1 y F3) por electroforesis según el método ya descrito, se procedió a transferir el gel a un filtro de papel de nitrocelulosa de 0.45 μ m, según el método de Towbin (134), para ello se utilizó una Cámara de Transferencia (Hoefer Scientific Instruments Co.), siguiendo la siguiente distribución: el papel de nitrocelulosa hacia el cátodo y el gel SDS-PAGE hacia el ánodo, ambos cubiertos por tela Scotch-brite 3M y papel filtro. La transferencia se realizó en presencia de un buffer de Tris-base 20 mM, Glicina 150 mM y Metanol al 16% a pH 8.3, por 1 hr. 30 min a 4°C a 1 amper.

Al término de la Transferencia, el filtro de papel de Nitrocelulosa fué teñido de manera reversible con Amido Negro (Bio-Rad Co.) al 0.01% y Acido Acético al 0.5% y desteñido con H₂O y PBS 0.1M pH 7.4, según la Técnica de Lamb y cols. (79). Las tiras de papel de Nitrocelulosa con el antígeno transferido se lavaron con una solución de Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM (TBS) y se bloquearon con una solución de leche descremada al 5%-TBS (TBSL) pH 7.4 por 12 hrs. Las tiras ya bloqueadas, se lavaron por 5 min con TBS y se incubaron con 1 ml de la dilución adecuada de las muestras de suero

y fluido intestinal (sin diluir) de los animales inmunizados y los controles durante 12 hrs. a 4°C. Posteriormente las tiras se lavaron dos veces durante 5 min con TBS y se incubaron nuevamente 12 hrs. a 4°C con 1 ml de anticuerpos peroxidados anti-IgG e IgA de ratón (Cappel Co.) diluidos en TBSL. Transcurrido este tiempo se lavaron las tiras 3 veces durante 10 min en TBS y 5 min en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 6.8 (TB) y posteriormente se revelaron durante un tiempo variable (5 min a 1 hora) con una solución de 4-Chloro-1-Naphtol (Sigma Chemical Co.) al 0.3%, Metanol vol/4vol en TB y 0.33 μ l de H₂O₂ al 30% por ml de la solución. La reacción fué bloqueada con H₂O.

DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES.

La deteminación de pesos moleculares, tanto para el corrimiento electroforético del antígeno como para las bandas reconocidas por Inmunolectrotransferencia, se realizó mediante el método de Weber y Osborn (143). En base a marcadores de peso molecular conocido, se calculó la distancia de migración de cada banda entre la distancia total de migración (Rf), posteriormente se graficó el logaritmo del peso molecular vs Rf, el valor del anti-logaritmo determinó el peso molecular de cada banda. Las distancias de las bandas problema fueron analizadas de la misma forma, mediante la prueba de Análisis de Regresión.

ANALISIS DE FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO. INMUNOGRAFICA.

Se analizó el porcentaje de las bandas reconocidas entre los grupos

30S y 30C de 22 y 52 días, así como de los los animales protegidos frente al desafío con la bacteria virulenta, mediante el método de Inmunoplot descrito por Larralde y cols. (81). Se graficó el el eje de las abscisas el porcentaje de reconocimiento de las bandas antigénicas para el grupo 30S y en el eje de las ordenadas el porcentaje de reconocimiento las bandas antigénicas para el grupo 30C.

PREPARACION DEL ANTIGENO PARTICULADO

Se procedió a realizar una electroforesis del antígeno de *S. typhimurium* F1 y su Transferencia a papel de Nitrocelulosa bajo las condiciones ya descritas. El papel de Nitrocelulosa con el antígeno ya transferido, se dividió en 24 fracciones, dos fracciones más se incluyeron como controles: una conteniendo el extracto proteico y otra de papel de nitrocelulosa sin proteínas; todas éstas fueron tratadas según el método descrito de Reconocimiento Antigénico en Fase Sólida, por Abou-Zeid y cols (2). Las fracciones divididas, fueron colocadas en viales de vidrio a las que se agregaron 250 μ l de Dimetil Sulfoxido DMSO (Sigma Chemical Co.) por cada 20 mm² de papel, la preparación se incubó 60 min. a temperatura ambiente para asegurar la disolución completa del papel y su esterilidad. Transcurrido este tiempo se procedió a precipitar el papel disuelto, agregando cada vial un volumen igual de solución amortiguadora de Carbonatos 0.05 M, pH 9.6 que el utilizado de DMSO. El precipitado obtenido se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 8000 xg durante 3 min; el botón obtenido fué lavado 3

veces en RPMI 1640 (Gibco, Co.) y resuspendido en el mismo medio (1 ml de medio por cada 250 μ l de DMSO o solución amortiguadora utilizada) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

ESTIMULACION LINFOCITARIA CON PARTICULAS ANTIGENICAS

Se extrajo el Bazo de los animales inmunizados con los esquemas 30S y 30C, 22 días después de la última inmunización, de los animales protegidos frente al desafío y de animales controles. Las células obtenidas fueron colocadas en Solución Salina Balanceada de Hanks (BSS) pH 7.4 en frío y se dejaron sedimentar por 10 min; posteriormente se centrifugaron 10 min a 250 xg; el botón obtenido fué resuspendido en la misma solución y se contaron las células utilizando el método de exclusión del Azul Tripiano. Posteriormente las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 (Gibco, Lab) conteniendo: Piruvato de Sodio 100mM al 1%, Aminoácidos no esenciales al 1%, Aminoácidos esenciales al 0.5%, L-Glutamina 200 mM al 1%, Penicilina-Estreptomicina al 1%, Suero Fetal Bovino al 10% y Hepes 25 mM al 1%, (todos los reactivos anteriores fueron Gibco Lab.) y se distribuyeron en una caja de cultivo de 96 pozos (Costar Co.) a una concentración de 10^5 células en .2 ml de medio, a cada pozo se le agregó 20 μ l de la suspensión de antígeno fraccionado y cada condición fué hecha por triplicado. Los cultivos celulares se incubaron por 7 días a 37°C con 5% de CO_2 en atmósfera húmeda (CO_2 Incubator, Napco Co.), los primeros 3 días permanecieron con una inclinación de 45° (para facilitar el

contacto celular con las partículas de antígeno) y los otros 4 días en forma horizontal; se añadió 0.1 μ Ci de Timidina Tritiada con una actividad específica de 6.7 Ci/mMol (3 H-Timidina) (NEN Research Prod.) por pozo, durante las últimas 16 hrs. de cultivo. Los cultivos fueron cosechados (Cell Harvester Brandel) en Filtros de Fibra de Vidrio (Whatman, 934-AH). La incorporación de 3 H-Timidina se midió en viales conteniendo líquido de centelleo, en un Contador (PLD TRI-CARB, Packard Instruments Co.). Los experimentos se realizaron en 2 ocasiones con un mezcla de células de 5 bazos provenientes de cinco ratones y cada fracción antigénica se probó por triplicado.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó el Análisis de Regresión para la determinación de pesos moleculares y Chi cuadrada y t de Student para el análisis de resultados.

RESULTADOS

Las pruebas bioquímicas realizadas con las cepas F1 y F3 de *s. typhimurium* concordaron en todo momento con las reacciones típicas del género y la cepa F3 conservó su capacidad de crecer en medios selectivos con Ampicilina.

ESTUDIOS DE PROTECCION

Los animales inmunizados con los esquemas 30S, 30C y controles se desafiaron por vía i.g. con 150 DL₅₀ de *s. typhimurium* F3, 22 días después de la última inmunización, y se registró el número de animales muertos durante los siguientes 30 días. Los datos mostraron, (tabla 1) en porciento de sobrevida, que los animales del grupo 30S tuvieron una mayor protección frente al desafío, que los animales del grupo 30C. En el grupo de controles no hubo sobrevivientes.

DETECCION DE ANTICUERPOS POR LA TECNICA DE ELISA.

Los niveles de anticuerpos detectados contra *s. typhimurium* y el antígeno proteico, se muestran en las tablas 2,3 y 4. Para los grupos 30C, 30S y controles se realizaron ensayos a los 22 días y a los 52 días después de la última inmunización; para los grupos inmunizados y posteriormente desafiados con la bacteria virulenta, la detección de anticuerpos se realizó con los animales sobrevivientes a dicho desafío. Las tablas muestran las diluciones utilizadas para cada muestra de suero, así como la media y la desviación estandar de 3 experimentos realizados por triplicado a

los cuales se les restó el valor del grupo control; para estimar las diferencias entre las muestras de los grupos 30C y 30S, se aplicó la prueba t de Student.

Como se puede observar (tablas 2,3, y 4) en todos los casos, los niveles de anticuerpos contra la *Salmonella* completa, fueron mayores que para el antígeno proteico. A los 22 y 52 días después de la última inmunización (tablas 2 y 3) los niveles de anticuerpos de los isotipos analizados, tanto en suero como en fluido intestinal, se encontraron significativamente más elevados, en el grupo de animales inmunizados con las dosis administradas en días consecutivos. En el caso de los animales protegidos (tabla 4), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos 30S y 30C para los anticuerpos IgG a nivel sérico, sin embargo en el caso de los anticuerpos IgA, las diferencias encontradas fueron significativas, ya que el grupo 30C mostró niveles más altos de estos anticuerpos. En el fluido intestinal se encontró que solo los animales del grupo 30C desarrollaron niveles de anticuerpos significativamente más elevados que el grupo 30S en presencia del antígeno proteico.

ELECTROFORESIS

El patrón de corrimiento electroforético mostrado por los antígenos de *S. typhimurium* F1 y F3 fué similar (fig. 1). Se identificaron aproximadamente 42 bandas, cuyos pesos moleculares oscilan entre 96 y 12 kDa.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

En las figuras 2, 3, 4 y 5 se muestra de manera representativa, el reconocimiento antigénico de muestras de Suero y Fluido Intestinal de los grupos 30S y 30C, obtenidas a los 22 y 52 días después de la última inmunización así como de los animales protegidos y de controles. Las muestras de suero se utilizaron a una dilución de 1:5 cuando se revelaron con anti-IgA y 1:10 cuando se utilizó anti-IgG. El fluido intestinal se probó de forma directa.

En general se observó un mayor reconocimiento de bandas por anticuerpos de la clase IgG que para anticuerpos IgA, tanto en suero en fluido intestinal, las bandas reconocidas por anticuerpos del fluido intestinal siempre fueron más tenues que las observadas en suero. En todos los casos se encontró un escaso reconocimiento por los sueros y fluidos de los animales normales. En la tabla 5, se muestra la lista completa de las bandas reconocidas por los Sueros y fluidos intestinales con sus respectivos pesos moleculares.

ANALISIS DE FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO.

Se determinó la frecuencia de reconocimiento para cada banda antigénica, tanto con el suero como con el fluido intestinal de cada uno de los animales incluidos en el estudio, los resultados se muestran en las fig. 6,7,8 y 9. Las inmunográficas se construyeron graficando en el eje de las x los valores de frecuencia expresados porcentualmente obtenidos en el grupo 30S; en el eje de las y se graficaron los valores correspondientes obtenidos en el grupo 30C.

Como puede observarse la ubicación de las bandas en la inmunográfica tiene un valor y significado diferente, las bandas ubicadas en el cuadrante superior derecho de la inmunográfica, son aquellos que se reconocen más frecuentemente por ambos grupos estudiados, aquellas bandas localizadas en el cuadrante inferior derecho son las reconocidas a una alta frecuencia por los animales del grupo 30S y escasamente por los animales del grupo 30C, por el contrario, aquellas ubicadas en el cuadrante superior izquierdo son las que están primordialmente reconocidas por anticuerpos del grupo 30C y por último, las bandas localizadas en el cuadrante inferior izquierdo son aquellas reconocidas por ambos grupos pero a frecuencias bajas. El porcentaje de reconocimiento de las bandas por anticuerpos IgG, de los grupos 30C y 30S y de los grupos de animales protegidos se muestra en la fig. 6. En los grupos de 22 días se observó una alta frecuencia de reconocimiento para 12 bandas, de las cuales 3 fueron reconocidas al 100%, (bandas 10, 13 y 40); algunas bandas fueron reconocidas a una alta frecuencia por los animales 30S y a baja frecuencia por 30C (bandas 24,34 y 42) o viceversa (bandas 19,21 y 47), ninguna banda fue reconocida a una frecuencia similar al porcentaje de protección obtenido en los animales inmunizados 30S y 30C; por otro lado se observó que algunas bandas fueron reconocidas a una baja frecuencia por ambos grupos. En los grupos probados a los 52 días, se incrementó el número de bandas reconocidas a una alta frecuencia (16 bandas) y solo las bandas 38 y 44 fueron reconocidas al 100%. En los grupos de animales protegidos, se observó un 100% de reconocimiento para

las siguientes bandas: 10,13,22,32,40,42,46, y 47. En la fig. 7 se muestra, el porcentaje de reconocimiento a nivel sérico entre los diferentes grupos por Anticuerpos IgA. En los grupos de 22 días, únicamente se observó un alto porcentaje de reconocimiento en ambos grupos para 5 bandas (ninguna banda se reconoció al 100%), las bandas 10,30 y 40 se reconocieron a una frecuencia similar a la protección observada en los grupos 30S y 30C. En los grupos probados a los 52 días, se reconocieron 5 bandas a una alta frecuencia, ninguna alcanza el 100% de reconocimiento. En los grupos de animales protegidos se reconocieron al 100% las bandas 10 y 40 y 12 bandas más a una alta frecuencia. En Fluído Intestinal (fig. 8), la frecuencia de reconocimiento por anticuerpos IgG a los 22 días después de la inmunización fué muy bajo para todas las bandas, sin embargo, el grupo 30S reconoció a una mayor frecuencia del 50% las bandas, 13,14,46,39 y 41. Para los grupos probados a los 52 días se observó un incremento en el reconocimiento, ya que 8 bandas fueron reconocidas a una alta frecuencia por ambos grupos (ninguna al 100%). En los animales protegidos se encontró un reconocimiento del 100% para las bandas 10,11,13,40,44,46 y 47. En el caso de los anticuerpos IgA (fig. 9) en los grupos 30C se encontró que tanto los grupos de 22 como de 52 días reconocieron a una baja frecuencia todas las bandas del antígeno utilizado. Los animales inmunizados con dosis semanales reconocieron las bandas 14,11 y 10 a una frecuencia mayor del 50%, también en este caso se observó que a los 22 días la banda 10 fué reconocida a una frecuencia similar al porcentaje de protección para los grupos 30S

y 30C. En los animales protegidos, la banda 10 fué reconocida a un 95% y 14 bandas más a frecuencias elevadas.

PRUEBAS DE ESTIMULACION LINFOCITARIA.

Los Linfocitos provenientes de Bazo, de los animales inmunizados con los esquemas 30C y 30S, obtenidos 22 días después de la última inmunización, así como de los animales protegidos frente al desafío con la bacteria virulenta y de animales controles, se cultivaron en presencia de diferentes fracciones antigénicas. Se utilizaron 24 fracciones con las diferentes bandas del antígeno proteico y como controles el extracto antigénico total y el papel de nitrocelulosa particulado. Los índices de estimulación para cada una de las fracciones se obtuvieron como el cociente de las cuentas por minuto (c.p.m.) de cada muestra entre las c.p.m. de la muestra control (papel de nitrocelulosa particulado), se consideró positivo un índice de estimulación mayor de 2.5. Los índices de estimulación para los grupos 30S, 30C y controles probados a los 22 días se muestran en la Tabla 6. Como se puede observar también en este caso existen diferencias en la respuesta a las diferentes fracciones dependiendo del esquema de inmunización utilizado: Los animales del grupo 30C respondieron a las fracciones 1,9, y 12, los del grupo 30S a las fracciones 2,17,23 y 24 comparando ambos grupos con los controles normales ($p < 0.05$) sin embargo ambos grupos (30C y 30S) responden a las fracciones 7,5,8,10 y 13 ($p < 0.05$) contra el normal. A pesar de que en algunos casos el índice de estimulación fué mayor en los animales 30S, sólo con la fracción 8

se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) cuando se comparó con el grupo 30C. Cuando se utilizó el antígeno completo se encontró una estimulación positiva en todos los grupos estudiados, sin mostrar ninguna diferencia entre ellos.

En los grupos de animales protegidos (tabla 7) los índices de estimulación encontrados en general fueron más bajos que en los animales inmunizados y probados a los 22 días después de la última inmunización y solo se encontró una respuesta positiva en los dos grupos (30C y 30S) frente a las fracciones 2,7,5 y 13 ($p < 0.05$) con respecto al grupo control.

TABLA 1
ESTUDIOS DE PROTECCION EN RATONES BALB/C
INMUNIZADOS CON S. typhimurium

Esquema de inmunización*	vivos/total	% Sobrevida [■]
3OS	15/20	75
3OC	9/20	45
C	0/20	0

* Se administraron 150 DL50 de *S. typhimurium* (F3) después de la última inmunización.

■ 3OS vs N, 3OC vs N, 3OS vs 3OC $p < 0.05$
 por Chi cuadrada

TABLA 2
DETECCION DE ANTICUERPOS (22 DIAS)

SUERO	Salmonella COMPLETA					
	SUERO			FLUIDO INTESTINAL		
	IgG 1:1000	IgA 1: 50	IgM 1: 50	IgG	IgA	IgM
3OS	1.86 ± 02	0.27 ± 005	0.37 ± 05	0.99 ± 06	0.38 ± 06	0
3OC	2.36 ± 12	0.87 ± 040	0.46 ± 09	1.47 ± 03	1.60 ± 27	0

SUERO	ANTIGENO PROTEICO					
	SUERO			FLUIDO INTESTINAL		
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
3OS	0.68 ± 05	0.17 ± 06	0.15 ± 02	0.78 ± 05	0.18 ± 04	0
3OC	1.25 ± 02	0.34 ± 01	0.23 ± 06	1.13 ± 04	0.45 ± 27	0

DETECTADOS POR ELISA. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO LA MEDIA DE LA LECTURA DE DO A 490 nm DS

- p < 0.05
- P < 0.0001
- no significativo

**TABLA 3
DETECCION DE ANTICUERPOS (52 DIAS)**

Salmonella COMPLETA						
SUERO	SUERO			FLUIDO INTESTINAL		
	IgG 1:1000	IgA 1: 50	IgM 1: 50	IgG	IgA	IgM
3OS	1.50±.04	0.21±.01	0.05±.01	0.75±.04	0.32±.05	0
3OC	1.92±.09.	0.57±.01.	0.07±.03.	1.70±.08.	0.38±.06.	0
ANTIGENO PROTEICO						
SUERO	SUERO			FLUIDO INTESTINAL		
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
3OS	0.63±.05	0.23±.01	0	0.46±.03	0.20±.06	0
3OC	0.66±.01.	0.37±.07.	0.06±.04.	0.84±.09.	0.42±.05.	0

DETECTADOS POR ELISA. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO LA MEDIA DE LA LECTURA DE DO A 490 nm DS

- p< 0.05
- P< 0.0001
- no significativo

TABLA 4
DETECCION DE ANTICUERPOS (PROTECCION)

Salmonella COMPLETA						
SUERO				FLUIDO INTESTINAL		
	IgG 1:1000	IgA 1: 50	IgM 1: 50	IgG	IgA	IgM
3OS	3	0.65±02	0.20±01	3	0.92±01	0
3OC	3 •	1.54±02•	0.25±05•	3•	0.89±05•	0

ANTIGENO PROTEICO						
SUERO				FLUIDO INTESTINAL		
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
3OS	2.75±01	0.49±05	0	2.2±11	0.27±01	0
3OC	2.64±.11•	1.29±03•	0	2.71±.05•	0.45±.09•	0

DETECTADOS POR ELISA. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO LA MEDIA DE LA LECTURA DE DO A 490 nm DS

- p< 0.05
- P< 0.0001
- no significativo

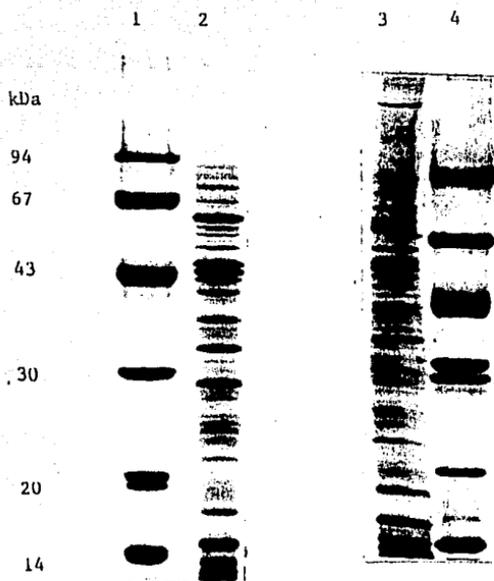


Fig. 1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS, de los antígenos Proteicos F1 y F3 (carriles 2 y 3), teñidos con azul de coomasie. En los carriles 1 y 4, pesos moleculares de Fosforilasa b (94 kDa); BSA (67 kDa); Ovalbumina (43 kDa); Anhidran Carbonica (30 kDa); Inhibidor de Tripsina (20 kDa) y Lactalbúmina (14 kDa). Carril 2 F1 y carril 3 F3.

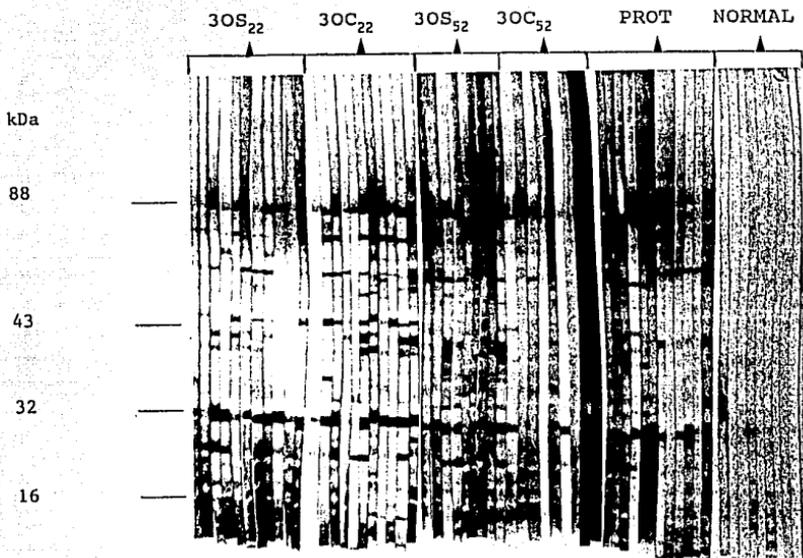


Fig. 2. Reactividad de anticuerpos IgG de sueros de ratones Balb/c contra antígeno proteico de *S. typhimurium*.

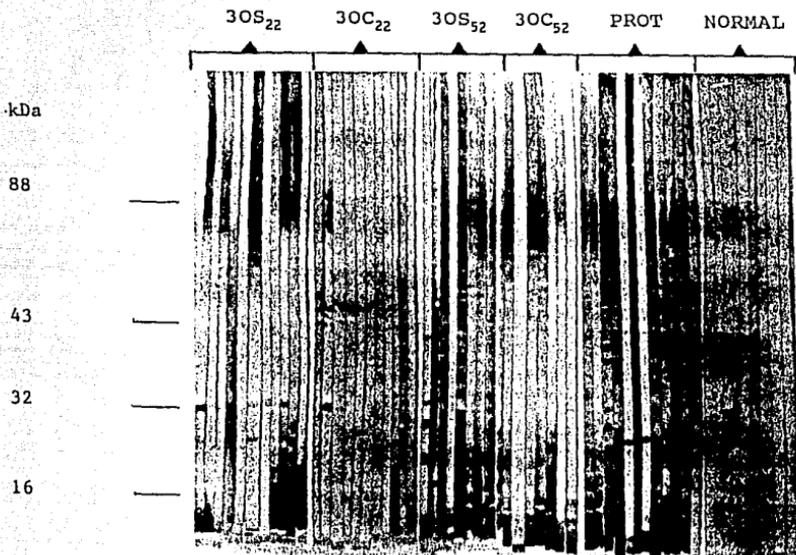


Fig. 3 . Reactividad de anticuerpos Ig G de fluidos intestinales de ratones Balb/c contra antígeno proteico de *S. typhimurium*.

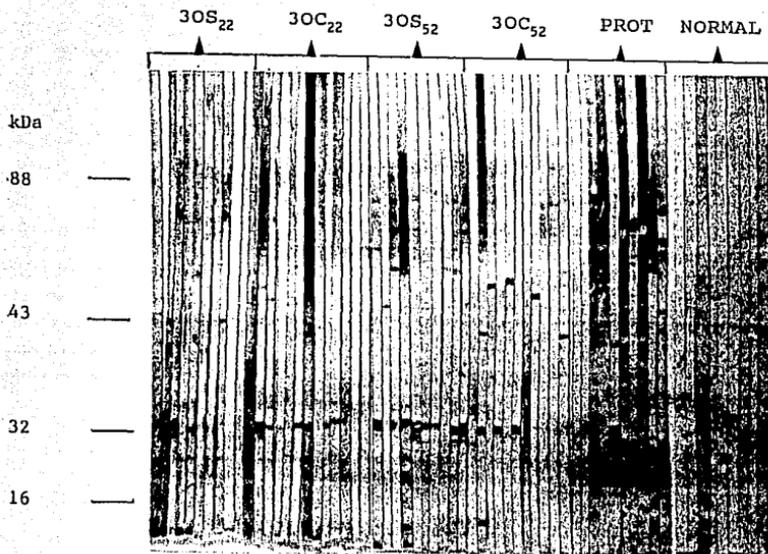


Fig. 4. Reactividad de anticuerpos IgA de sueros de ratones Balb/c contra antígeno proteico de *S. typhimurium*.

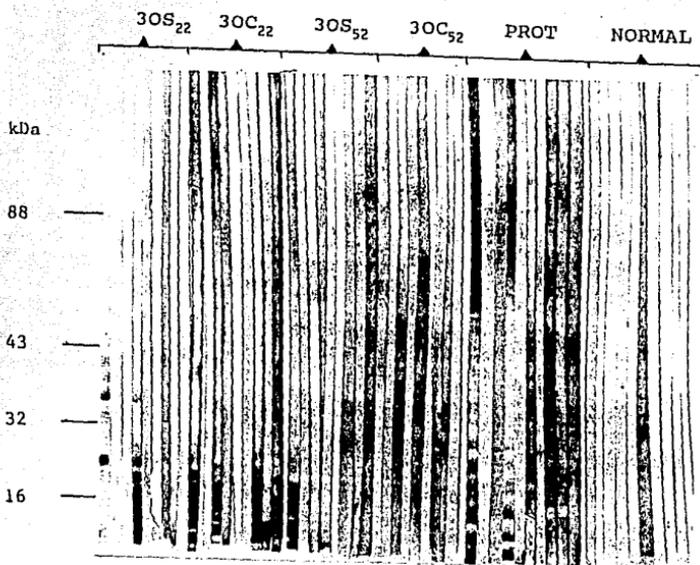


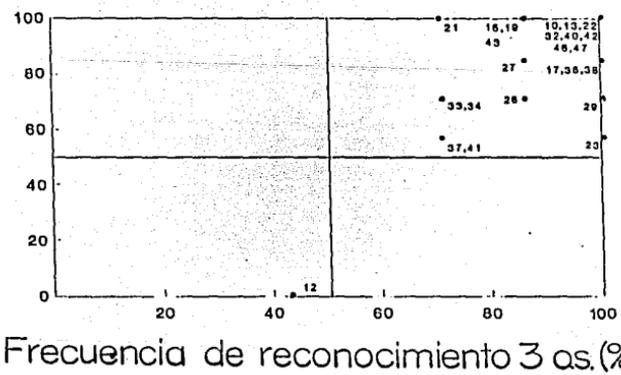
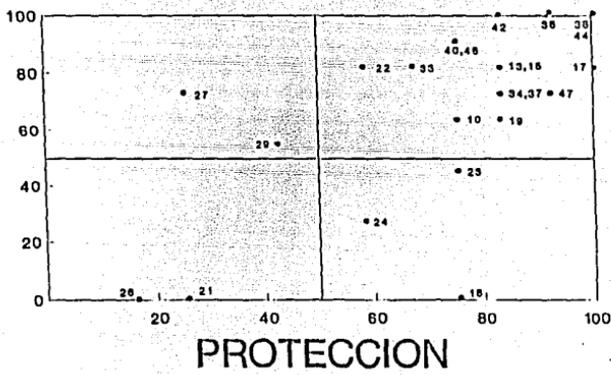
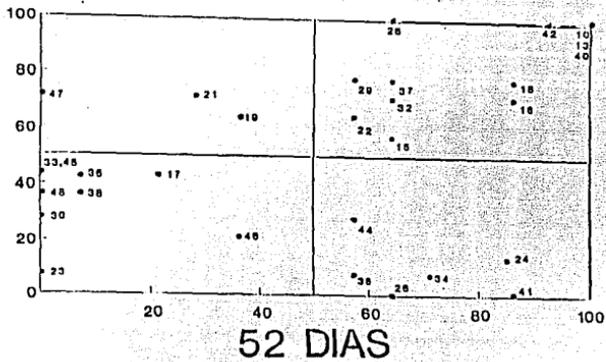
Fig. 5. Reactividad de anticuerpos Ig A de flúidos intestinales de ratones Balb/c contra antígeno proteico de *S. typhimurium*.

TABLA 5
PATRON DE BANDAS RECONOCIDO

BANDA NUMERO	PESO MOLECULAR KD	BANDA NUMERO	PESO MOLECULAR KD
1	113	25	53
2	110	26	51
3	107	27	50
4	105	28	48
5	102	29	46
6	100	30	45
7	96	31	44
8	93	32	43
9	90	33	41
10	88	34	39
11	86	35	38
12	82	36	37
13	77	37	36
14	75	38	35
15	73	39	34
16	70	40	32
17	68	41	28
18	65	42	26
19	64	43	25
20	62	44	24
21	60	45	20
22	58	46	16
23	56	47	14
24	55	48	12

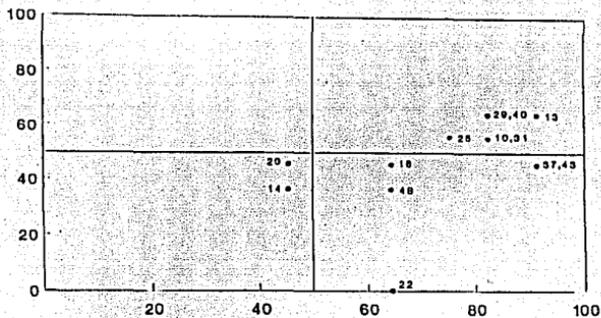
IgG SUERO 22 DIAS

Frecuencia de reconocimiento 3 oc. (%)

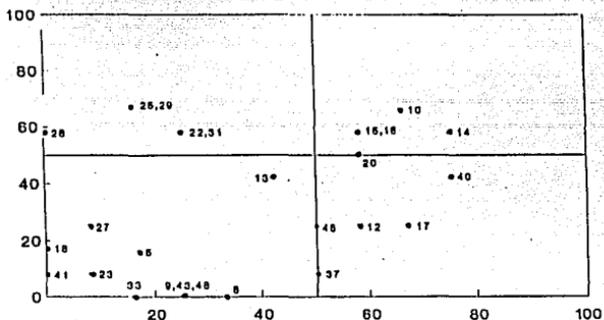


IgA SUERO 22 DIAS

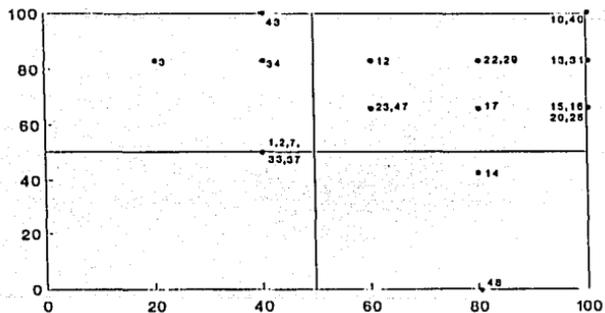
Frecuencia de reconocimiento 3 ac. (%)



52 DIAS



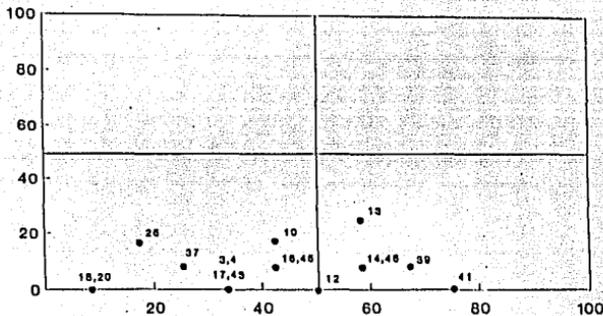
PROTECCION



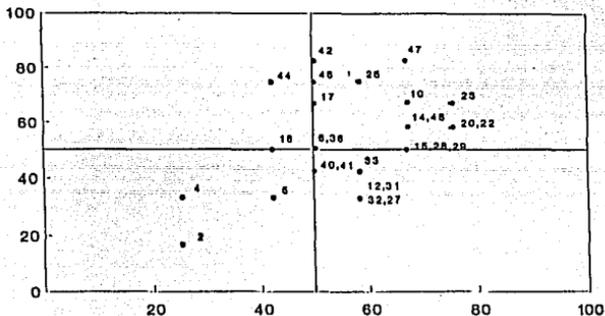
Frecuencia de reconocimiento 3 ac. (%)

IgG FLUIDO 22 DIAS

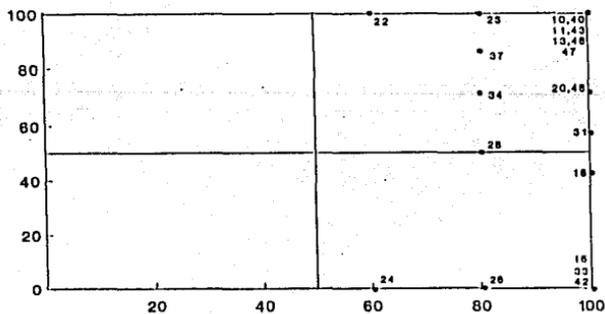
Frecuencia de reconocimiento 3 o.c. (%)



52 DIAS



PROTECCION

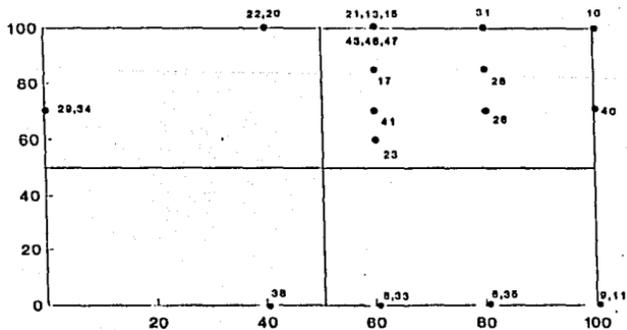
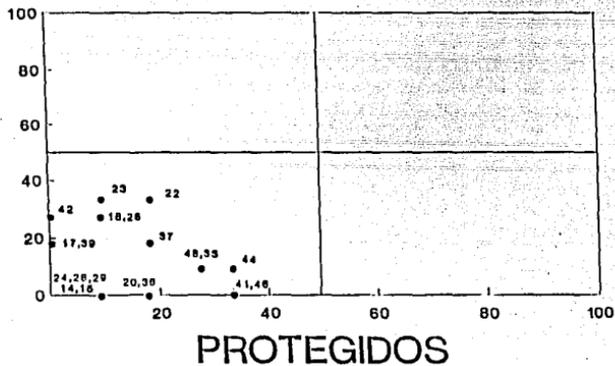
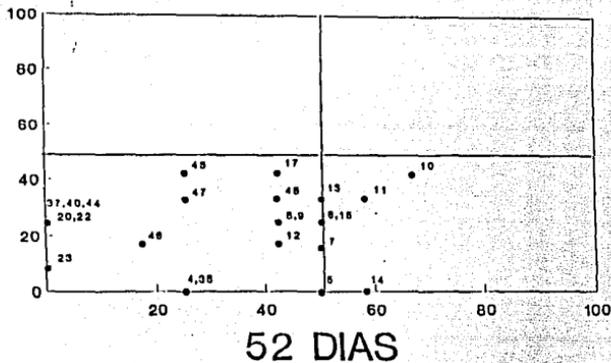


Frecuencia de reconocimiento 3 as. (%)

FIGURA 9

IgA FLUIDO 22 DIAS

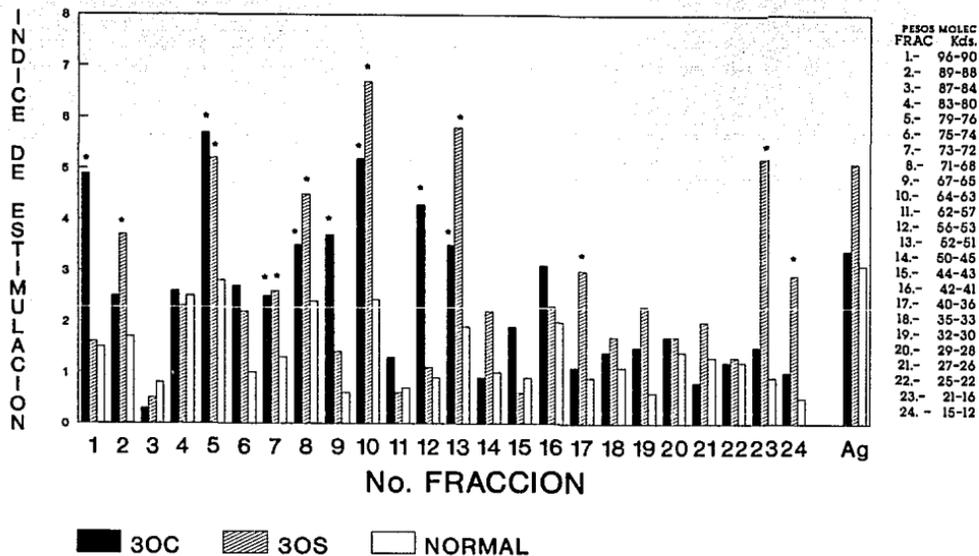
Frecuencia de reconocimiento 3 oc. (%)



Frecuencia de reconocimiento 3 oc. (%)

TABLA 6

22 DIAS



*p<0.05 por t de student vs. normal.

PROTECCION

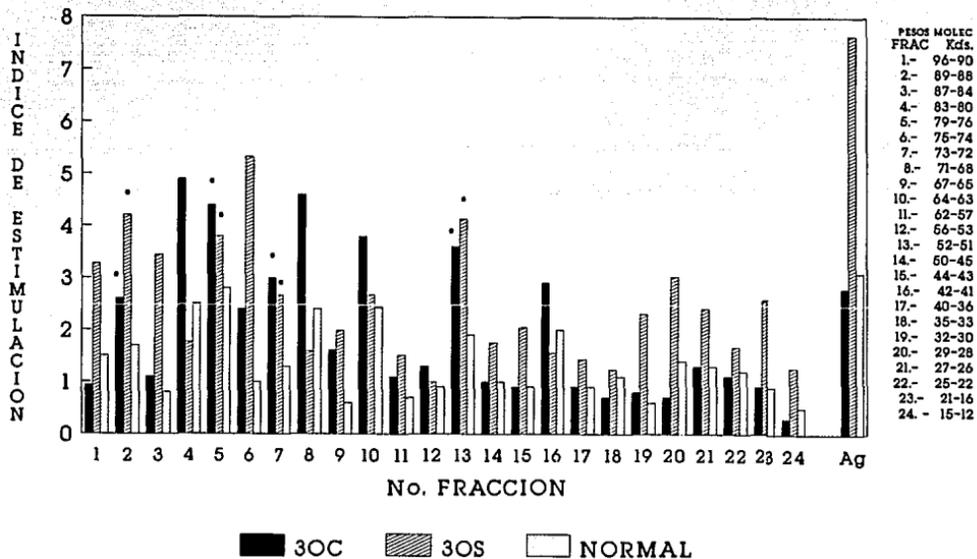


TABLA 7

*p(0.05 por t de student vs. normal

DISCUSION

El desarrollo de vacunas eficaces contra virus, bacterias y parásitos es uno de los retos más importantes en el campo de la Inmunología de nuestros tiempos. La meta principal de todo tipo de vacunación es la de inducir una inmunidad específica, con el objeto de prevenir la invasión de patógenos a un organismo y en su caso eliminar al parásito de los tejidos del hospedero induciendo simultaneamente inmunidad de larga duración (Memoria Inmunológica). Una gran variedad de agentes infecciosos o sus productos han sido utilizados como vacunas, en el caso de las bacterias, podemos citar que se han utilizado por ejemplo bacterias vivas atenuadas como la vacuna BCG de *Mycobacterium tuberculosis*, y la de *Bordetella pertussis*; otros se han preparado con antígenos purificados como en el caso del Toxoide tetánico y el diftérico o de antígenos con polisacáridos, por ejemplo la vacuna contra el Pneumococo y *Haemophilus influenza*. Por otro lado los avances tecnológicos han permitido la preparación péptidos sintetizados por ingeniería genética las cuales aún se encuentran en etapa de experimentación.

El éxito de la inmunización depende de varios factores y es importante tener en cuenta principalmente: El esquema de inmunización utilizado, la vía de administración, la dosis de antígeno administrado así como variables inherentes al sujeto o al modelo experimental.

En el presente trabajo se seleccionó la vía oral para la inmunización con *Salmonella*, ya que en otros sistemas se ha demostrado su eficacia (47,118,123,141), por considerarse "la vía natural de entrada" de la bacteria al organismo (19). Así mismo los intervalos de tiempo entre las dosis utilizadas en este estudio, se escogieron en base a los datos obtenidos en la literatura de ensayos para probar la eficacia de algunas vacunas (45,141). Por ejemplo el esquema de inmunización en días consecutivos parece inducir niveles altos de IgA en otros modelos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que en el modelo murino utilizado, el intervalo entre las dosis afecta considerablemente tanto la protección al desafío con la bacteria virulenta, como la respuesta inmune generada. La protección observada en los animales inmunizados y desafiados con *Salmonella*, fué mejor en los animales inmunizados con el esquema 30S, comparativamente a lo ocurrido en los animales inmunizados en días consecutivos, esta respuesta no se correlacionó con los niveles de anticuerpos detectados por ELISA frente a la *Salmonella* o al antígeno proteico. Por el contrario los animales con mayores niveles de anticuerpos, fueron los inmunizados con el esquema 30C que demostró conferir menor protección. Estos resultados concuerdan con varios reportes que muestran que no hay una buena correlación entre los títulos de anticuerpos y la protección observada (25,47,84,91). En la mayoría de estos estudios se midió la respuesta inmune contra los antígenos O y H. Por otro lado Kuusi y cols.(77) encontraron que no existe una buena correlación entre los títulos de anticuerpos contra LPS y Porinas

y la capacidad de inducir protección pasiva por sueros de animales inmunizados con éstas; por lo que sugirieron que probablemente los anticuerpos protectores podrían estar dirigidos contra epítopes conformacionales. El análisis de los resultados obtenidos sugiere que los niveles de anticuerpos encontrados tanto en el compartimiento sistémico como local, no se correlacionan con la capacidad de resistencia frente a desafíos letales con el microorganismo viable, de hecho el grupo inmunizado con el esquema 30C desarrolló mayores niveles de anticuerpos tanto de la clase IgG e IgA sin embargo el porcentaje de sobrevivencia en este grupo fué significativamente más bajo que en el grupo inmunizado con 3 dosis orales semanales. En otros modelos se ha observado una aparente correlación entre títulos de anticuerpos de la clase IgA (locales y sistémicos) y la capacidad de eliminación del microorganismo, sin embargo los autores mencionan que tales títulos de anticuerpos (IgG e IgM) no mostraron una correlación consistente con protección. Por otro lado, se menciona que la relación entre la actividad de IgA anti-LPS y la protección observada en su estudio no parece ser real, ya que su modelo los anticuerpos IgA encontrados no reaccionan con la cepa utilizada en el desafío (123). Cabe hacer notar que en el sistema utilizado en este trabajo, los niveles de anticuerpos anti-*Salmonella* encontrados utilizando como antígeno a la bacteria completa siempre fueron mayores que los niveles obtenidos cuando se utilizó el antígeno proteico; lo cual podría deberse a diferencias en la población de anticuerpos detectados ya que la concentración de LPS en ambos sistemas es considerablemente

diferente (62,96)

Se han hecho numerosos intentos (74,116,117) para establecer contra que componentes bacterianos, está dirigida la Respuesta Inmune en la infección por *Salmonella*. Algunos estudios (1,18,84) han demostrado que los componentes proteicos bacterianos son buenos inmunógenos, tal es el caso de las proteínas de superficie de *Brucella*, *Pasteurella*, *Pseudomona* y *Neisseira*, las cuales han demostrado ser eficaces para conferir protección; así mismo varios estudios con *Salmonella* varios estudios (42,60,76,96) han señalado la importancia de proteínas de Membrana Externa, Porinas y fracciones proteicas subcelulares en la Respuesta Inmune frente a la infección; sin embargo aún no han sido identificados los componentes proteicos de estos extractos, que pudieran estar involucrados en la protección. Por lo tanto se considero importante el uso de un antígeno proteico, para poder evaluar hacia que componentes de éste se dirigían tanto la respuesta humoral y celular en los animales inmunizados ya que se sabe que ambas respuestas son importantes (31).

El método de Inmunolectrotransferencia (134) utilizado, revela la reacción de anticuerpos específicos con antígenos separados por electroforesis, y ha sido ampliamente utilizado para estudiar los antígenos implicados en una vasta cantidad de patologías; por lo que se consideró de utilidad, para identificar las fracciones antigénicas contra las cuales existe mayor inmunoreactividad tanto en sueros como en fluidos intestinales, de los animales inmunizados. Mediante esta técnica y con el análisis de frecuencia

de reconocimiento antigénico se encontró que: 1) los antígenos reconocidos a mayor frecuencia a nivel sérico son diferentes a los reconocidos a nivel intestinal. Los anticuerpos IgG detectados a los 22 días después de la última inmunización reconocen fracciones diferentes de las reconocidas por anticuerpos intestinales a frecuencias mayores del 50%, a excepción de la banda 41 la cual fué reconocida a una alta frecuencia tanto por suero como por fluido intestinal. 2) El esquema de inmunización afecta considerablemente la frecuencia con la cual son reconocidas las diferentes fracciones antigénicas del extracto proteico, así algunas fracciones son reconocidas solamente por los animales inmunizados con intervalos de 1 semana por ejemplo las bandas 42 y 26 detectados con IgG sérica a los 22 días postinmunización, mientras que otras solo son reconocidas por los animales inmunizados con el esquema 30C (banda 47 para IgG sérica a los 22 días); y c) la frecuencia de reconocimiento para las fracciones antigénicas cambia, dependiendo del tiempo transcurrido entre la inmunización y la toma de las muestras; d) el reconocimiento de antígenos a nivel intestinal fue más pobre en general que a nivel sistémico. Existen reportes de que las condiciones de crecimiento de las bacterias pueden afectar considerablemente la expresión de proteínas de membrana, Fernández-Beros y Cols. (37) reportaron que *S. typhimurium* crecida en medios con bajas cantidades de hierro (similar a las condiciones encontradas en intestino), expresan proteínas membranales que no están presentes en membranas obtenidas de bacterias crecidas en medios de cultivo normales; además la expresión de otras proteínas

de membrana en algunos casos, no existe o se vé considerablemente disminuida; e) en el caso de anticuerpos séricos de clase IgA se observó una frecuencia similar de reconocimiento a las bandas 10 y 31 y el porciento de protección obtenida, lo cual hace atractivo su aislamiento, purificación, y analisis posterior por pruebas cuantitativas, por el contrario esto no se observó para anticuerpos de la clase IgG, sin embargo ya que la técnica utilizada no es cuantitativa es imposible descartar la utilidad de otras fracciones antigénicas reconocidas por los animales inmunizados con los esquemas 30S y 30C.

f) el análisis de frecuencia nos permitió identificar aquellas bandas reconocidas al 100% por los animales protegidos, puede ser probable, que algunas de éstas, estén involucradas en la protección y sería por lo tanto importante su aislamiento y purificación, para estudios posteriores. Las bandas más atractivas en este sentido serían la banda 10 de 88kDa, que fué reconocida al 100% por todas las muestras de los animales protegidos, la banda 40 de 32 kDa, reconocida al 100% por anticuerpos IgG e IgA e IgG en fluido intestinal, y las bandas 13, 46 y 47 de 77, 16 y 14 kDa respectivamente, reconocidas al 100% por anticuerpos de la clase IgG tanto en suero como en fluidos y las bandas 22,32 y 42 reconocidas al 100% por anticuerpos IgG séricos. Las muestras analizadas a los 52 días, fueron incluidas para poder descartar que la frecuencia de reconocimiento al 100% en los animales protegidos, no se debió simplemente a cambios de reconocimiento por el tiempo transcurrido después de la inmunización.

Cabe mencionar que en el presente estudio, no se detectaron anticuerpos dirigidos contra antígenos conformacionales que pudieran ser importantes en protección (11,109,134), tanto por las técnicas utilizadas para la obtención del antígeno, como por el fraccionamiento de éste en geles de SDS-PAGE; por otro lado creemos que los anticuerpos detectados, están dirigidos principalmente contra los componentes proteicos de las fracciones, ya que a pesar de que el antígeno utilizado tiene una contaminación del 6% de LPS, el reconocimiento a las principales fracciones no cambió cuando se utilizaron sueros adsorbidos con LPS (41).

Debido a que la Respuesta Inmune Celular juega un papel muy importante contra los microorganismos intracelulares (91) y en el caso de *S. typhimurium* se ha reportado una mejor correlación entre la inmunidad celular y la protección contra esta bacteria (31,89), se consideró importante determinar que fracciones antigénicas eran capaces de estimular los linfocitos de los animales inmunizados. Se ha reportado que los linfocitos T parecen reconocer fracciones lineales de las moléculas proteicas (11), por lo tanto la técnica de estimulación de linfocitos por antígenos particulados (antígeno de fase sólida) (146,2), ha sido de gran utilidad para la búsqueda de antígenos que puedan ser importantes a nivel de la Respuesta Inmune Celular, en infecciones producidas por el Virus de la Influenza, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*. (59,79,80). Los resultados obtenidos mostraron también en este caso, que algunas fracciones antigénicas estimularon los linfocitos de los animales inmunizados en días consecutivos exclusivamente

(fracciones 1,9 y 12), mientras que otras estimularon preferentemente los linfocitos provenientes de animales inmunizados con el esquema 30S (fracciones 2,17,23 y 24). Dentro de las fracciones capaces de estimular los linfocitos provenientes de los animales inmunizados con los esquemas 30S y 30C, se observó en general una mayor estimulación en el grupo 30S, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas, esto obedece probablemente al número reducido de observaciones. Las únicas fracciones que fueron capaces de estimular los linfocitos de los animales protegidos, independientemente del esquema de inmunización utilizado fueron las fracciones 2,7 y 13, con pesos moleculares entre 89-88 kDa, 73-72 kDa, y 52-51 kDa.

Las fracciones antigénicas reconocidas a nivel celular no fueron las mismas que las reconocidas a nivel humoral excepto la fracción 2, en la cual está incluida la bada 10, reconocida a nivel humoral. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en otros sistemas (59), Mendez-Samperio y cols. (94) encontraron que los patrones de reconocimiento por anticuerpos y proliferación de células T, en individuos infectados con *M. leprae*, no se sobreponen a nivel individual, sugiriendo la participación de otras funciones de la célula T diferentes a la de ayuda.

Se ha estudiado poco la participación de antígenos de *Salmonella* en la Respuesta Inmune Celular. Svenson y cols. (123) utilizando un antígeno de polisacárido "O" unido a una proteína acarreadora O-PS, observó una buena correlación entre la respuesta a dicho antígeno y la protección obtenida en el modelo murino, medida por

la técnica de Transformación Blando. Sin embargo, utilizando un antígeno similar en humanos no se encontraron diferencias entre la respuesta de individuos que habían presentado la infección y aquellos sin antecedentes de Fiebre Tifoidea o vacunación (30). Se ha reportado que las Porinas de *Salmonella*, son capaces de inducir una buena Respuesta Inmune Celular (76,60,108), sin embargo Lindberg y cols. (84), no encontraron correlación satisfactoria con la protección observada en dichos estudios. En el presente estudio no se encontró una buena estimulación con las fracciones antigénicas, cuyos pesos moleculares corresponderían a Porinas; esto podría deberse a que con la técnica utilizada, puede haber pérdida de la actividad antigénica de algunos antígenos (79) o a la presencia de inhibidores no específicos de la proliferación de células T que presentan una migración similar a las fracciones proteicas (64).

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abe C.H., Shionoya Y., Hirao K., Okada K., Homma J.Y. 1975. Common protective antigen (OEP) of *Pseudomona aeruginosa*. Jap.J.Exp.Med. 45:355-359.
- 2.- Abou-Zeid C., Filley E., Steele J., Rook G.A. 1987. A simple new method for using antigens separated by polyacrilamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes *in vitro* after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. J.Immunol.Methods.98:5-10.
- 3.- Angerman C.R., Eisenstein T.K. 1978. Comparative efficacy and toxicity of ribosomal vaccine, acetone-killed cells, lipopolysaccharide and live cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 19:575-582.
- 4.- Angerman C.R., Eisenstein T.K. 1980. Correlation and magnitude of protection against *Salmonella* infection afforded by various vaccines with antibody titers. Infect. Immun. 27:435-443.
- 5.- Ashcroft M.T., Morrison R., Nicholson C.C. 1964. Controlled field trial in British Guiana schoolchildren of heat-killed phenolized and acetone-killed lyophilized typhoid vaccines. Am. J. Hyg. 79:196-206.
- 6.- Ashkenazi S. Cleary T., Murray B., Wanger A., Pickerin L. 1988. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. Infect. Immun. 56:3089-3094.
- 7.- Bacon G.A., Burrows T.W., Yates M. 1950 a and b. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the induction and isolation of mutants. Br.J.Exp.Pathol. 31:703-713.
- 8.- Bacon G.A., Burrows T.W., Yates M. 1951. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the loss of virulence of certain mutants. Br.J.Exp.Pathol. 32:85-96.
- 9.- Baloda S.B., Faris A., Krovacek K., Wadstrom T. 1983. Cytotoxic enterotoxins and cytotoxic factors produced by *S. enteritidis* and *S. typhimurium*. Toxicon 21:785-790.
- 10.- Benjamin W.H., Turnbough C.L., Posey B.J. 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the iron gathering siderophore, enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. Infect. Immun. 50:392-397.
- 11.- Benjamin D.C. 1984. The antigenic structure of proteins, a reappraisal. Ann.Rev.Immunol. 2:67-101.

- 12.- Bhatnagar N., Müller W., Schlecht S. 1982. Proteins from *Salmonella* R-mutants mediating protection against *Salmonella typhimurium* infection in mice I. Preparation of proteins free from Lipopolisaccharide using various chromatographic methods. Zbl.Bakt.Hyg. A253:88-101.
- 13.- Bhatnagar N. Schlecht S. 1985. Proteins from *Salmonella* R-mutants mediating protection against *Salmonella typhimurium* infection in mice. III. Separation and Purification of soluble proteins and their use as vaccines and as precipitating antigens. Zbl.Bakt.Hyg. A260:448-458.
- 14.- Björnson A.B., Björnson H.S. 1977. Activation of complement by opportunist pathogens and chemotypes of *Salmonella minnesota*. Infect. Immun. 16:748-755.
- 15.- Braude A., Davis Ch., Fierer J. 1988. Infectología. Ed. Médica Panamericana. pp.675-685.
- 16.- Buchmeier N., Heffron F. 1991. Inhibition of Macrophage Phagosome-Lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 59:2232-2238.
- 17.- Buchmeier N., Heffron F. 1989. Intracellular survival of Wild-type *Salmonella typhimurium* and Macrophage-sensitive mutants in diverse populations of Macrophages. Infect. Immun. 57:1-7.
- 18.- Buchanan T.M., Pearce W.A., Schoolnik G.K., Arko R.J. 1977. Protection against infection with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. J.Infect.Dis. 136:S132-S137.
- 19.- Carter P.B., Collins F.M. 1974. The route of enteric infection in normal mice. J. Exp. Med. 139:1189-1203.
- 20.- Carsiotis M., Stocker B.A.D., Weinstein D.L., O'Brien A.D. 1989. A *Salmonella typhimurium* virulence gene linked to flg. Infect. Immun. 57:3276-3280.
- 21.- Carsiotis M., Weinstein D., Karch H., Holder I.A., O'Brien A.D. 1984. Flagella of *Salmonella typhimurium* are a virulence factor in infected C57BL/6J mice. Infect. Immun. 46:814-818.
- 22.- Collins F.M. 1969. Effect of specific Immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in non-vaccinated mice challenged by various routes. J. Bacteriol. 97:667-675.
- 23.- Collins F.M. 1969. Effect of specific Immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice preimmunized with living or Ethyl alcohol-killed vaccines. J.Bacteriol. 97:676-683.

- 24.- Collins F.M., Mackaness G.B. 1968. Delayed hypersensitivity and Arthus reactivity in relation to host resistance in **Salmonella**-infected mice. J. Immunol. 101:830-845.
- 25.- Collins F.M. 1974. Vaccines and cell mediated Immunity. Bact. Revs. 38:371-402.
- 26.- Chau P.Y., Tsang R.S.W., Lam S.K., Rowley D. 1981. Antibody response to the lipopolysaccharide and protein antigens of **Salmonella typhi** during typhoid infection. Clin.Exp.Immunol. 46:515-520.
- 27.- Davis E., Dulbeco R. 1980. Microbiology. 3rd Edition. Harper and Row published inc. pp.646-672.
- 28.- D'Amelio R., Tagliabue A., Nencioni L., Di Addario A., Villa L., Matricardi P. 1988. Comparative analysis of Immunological Response to oral (Ty21a) and Parenteral (TAB) Typhoid vaccines. Infect. Immun. 56:2731-2735.
- 29.- Ebersole M.T., Molinari J.L. 1980. Correlation of the duration and magnitude of protection against **Salmonella** infections afforded by various vaccines with antibody titers. Infect. Immun. 27:435-443.
- 30.- Edelman R., Levine M. 1986. Summary of an International Workshop on Typhoid fever. Rev.Infect.Dis. 8:329-349.
- 31.- Eisenstein T., Sultzer B.M. 1983. Immunity to **Salmonella typhimurium**. Adv.Exp.Biol.Med. 162:261-296.
- 32.- Eisenstein T.K. 1975. Evidence for O-antigen as the antigenic determinants in "Ribosomal" vaccines prepared from **Salmonella**. Infect. Immun. 12:364-377.
- 33.- Elson C.O., Calding W., Lefkowitz J. 1984. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. J.Immunol.Methods. 67:101-108.
- 34.- Epidemiología. Boletín Mensual. 1990. Información estadística de enfermedades transmisibles. Sistema Nacional de Salud. 5:1-15.
- 35.- Felix A., Pitt R.M. 1934. A new antigen of **B. typhosus**: its relation to virulence and to active and passive immunization. Lancet ii:186-191
- 36.- Felix A., Pitt R.M. 1951. The pathogenic and immunogenic activities of **Salmonella typhi** in relation to its antigen constituents. J. Hyg. 49:92-110.
- 37.- Fernández-Beros M.E., González C., McIntosh M., Cabello F.C. 1989. Immune response to the iron deprivation-induced proteins of **Salmonella typhi** in Typhoid Fever. Infect. Immun. 57:1271-1275.

- 38.- Fields P., Groisman E.A., Heffron F. 1989. A **Salmonella** locus that controls resistant to microbicidal proteins from Phagocytic Cells. *Science* 243:1059-1062.
- 39.- Finkelstein R.A., Marchlewicz R.J., McDonald R.J. 1983. Isolation and characterization of cholera-related enterotoxin from **S. typhimurium**. *FEMS Microbiol.Lett.* 17:239-241.
- 40.- Freeman B.A. 1984. *Burrows Textbook of Microbiology* 22nd Edition. *Sunders Company.* pp. 525-543.
- 41.- Fick R., Naegel G., Reynold H. 1980. Use of **Pseudomona aeruginosa** LPS immunoabsorbents to separate high potency, mono specific antibodies. *J.Immun.Meth.* 38:103-116.
- 42.- Foulaki K., Gruber W., Schlecht S. 1989. Isolation and Immunological characterization of a 55-kilodalton surface protein from **Salmonella typhimurium**. *Infect.Immun.* 57:1399-1404.
- 43.- Gaines S.A., Sprinz A. Tully J. 1968. Studies on infection and immunity in experimental Typhoid Fever. VII. The distribution of **Salmonella typhi** in chimpanzee tissue following oral challenge and the relationship between the numbers of bacilli and morphological lesions. *J. Infect.Dis.* 118:293-306.
- 44.- Galán J.E., Curtis III R. 1990. Expression of **Salmonella typhimurium** genes required for invasion is regulated by changes in DNA Supercoiling. *Infect. Immun.* 58:1879-1885.
- 45.- George A., Rath S., Kamat R.S. 1986. Differential regulation of effector response of cell mediated immunity in experimental Salmonellosis. *Clin.Exp.Immunol.* 63:327-333.
- 46.- Germanier R., Furer E. 1971. Immunity in experimental Salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of galE mutants of **S. typhimurium**. *Infect. Immun.* 4:663-673.
- 47.- Germanier R. 1972. Immunity in experimental Salmonellosis. III. Comparative Immunization with viable and heat-inactivated cells of **Salmonella typhimurium** vaccination with viable cells of an avirulent **Salmonella typhimurium** galE mutant provides mice with solid specific immunity against subsequent infection with virulent smooth strain. *Infect. Immun.* 5:792-797.
- 48.- Germanier R., Furer E. 1975. Isolation and characterization of **Salmonella typhi** galE mutant Ty21a; a candidate strain for a live typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 141:553-558.
- 49.- Grossman N. Leive L. 1984. Complement activation via the alternative pathway by purified **Salmonella** lipopolisaccharide is affected by its structure but not its O-antigen length. *J. Immunol.* 132:376-385.

50.- Hefjec L.B., Salmin L.V., Lehtman M.Z. 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the U.R.S.S. Bull WHO. 34: 321-329.

51.- Hochadel J.F., Kenneth F.K. 1977. Protective effects of passively transferred Immune T or B lymphocytes in mice infected with **Salmonella typhimurium**. J. Infect. Dis. 135:813-823.

52.- Hohmann A., Schmidt G., Rowley D. 1979. Intestinal and Serum antibody responses in mice after oral immunization with **Salmonella**, **Escherichia coli** and **Salmonella-Escherichia coli** hybrid strains. Infect. Immun. 25:27-33.

53.- Hohmann A., Schmidt G., Rowley D. 1978. Intestinal colonization and virulence of **Salmonella** in mice. Infec. Immun. 22:763-770

54.- Hornick R.B., Greisman S.E., Woodward T.E., Dupont H.L., Dawkins A.T., Snyder M.J. 1970. Typhoid fever:pathogenesis and Immunological control. N.Engl.J.Med. 283:686-691.

55.- Hoiseth S.K., Stocker B.A.D. 1981. Aromatic-dependent **Salmonella typhimurium** are non-virulent and effective as live vaccines. Nature 291:238-239.

56.- Hormaeche C.E., Mastroeni P., Arena A., Uddin J., Joysey H.S. 1990. T cells do not mediate the initial suppression of a **Salmonella** infection in the R.E.S. Immunol. 70:247-250.

57.- Hormaeche C.E., Maskell D.J., Harrington K.A., Joysey H., Brock J. 1983. Mechanisms of Natural resistance to mouse typhoid. Bull.Eur. Physiopath.Resp. 19:37-42

58.- Hormaeche C.E. 1979 b. The Natural resistance of radiation chimaeras to **Salmonella typhimurium** C5. Immunol. 37:329

59.- Hurwitz J.L., Heber-Katz E., Hackett C.J., Gerhard W. 1984. Characterization of the murine TH response to influenza virus haemagglutinin:evidence for three major specificities. J.Immunol. 133:3371-3377.

60.- Isibasi A., Ortiz V., Vargas M., Paniagua J., González C., Moreno J., Kumate J. 1988. Protection against **Salmonella typhi** infection in mice after immunization with Outer Membrane Proteins isolated from **Salmonella typhi** 9,12,d,Vi. Infect. Immun. 56:2953-2959.

61.- Ivanoff B., Andre C., Fontages R., Jourdan G. 1982. Secondary Immune Response to oral and nasal rough mutant strains of **Salmonella typhimurium**. Ann. Immunol. 133:61-70.

62.- Jirillo E., Kiyono H., Michalek S.M., McGee J.R. 1984. Murine Immune Response to **Salmonella** lipopolysaccharide: oral administration of whole bacteria to C3H/HeJ mice induces secondary anti-LPS responses, especially of the IgA isotype. J.Immunol. 132:1702-1710.

63.- Joiner K.A., Hammer C.H., Brown E.J., Frank M.M. 1982-b. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. II. C8 and C9 release C5b67 from the surface of **Salmonella minnesota** S218 because the terminal complex does not insert into the bacterial outer membrane. J.Exp.Med. 155:809-819.

64.- Joiner K.A., Schmetz M.A., Goldman R.C., Leive L. 1984. Mechanism of bacterial resistance to complement mediated killing: insert C5b-9 correlates with killing for **Escherichia coli** O111B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. Infect. Immun. 45:113-117.

65.- Johnson W. 1973. Ribosomal vaccines. II. Specificity of the Immune Response to ribosomal ribonucleic acid and protein isolate from **Salmonella typhimurium**. Infect. Immun. 8:395-400.

66.- Kaplan G., Ghandi R., Weistein D., Lovis W., Patarroyo M.E., Breman P.J., Cohn Z. 1987. **Mycobacterium leprae** antigen induces suppression of T cell proliferation in vitro. J. Immunol. 138:3028-3035.

67.- Kauffmann S.H.E., Hug E., Muller I. 1985. Effective protection against **Listeria monocytogenes** and Delayed-type Hypersensitivity to **Listeria** antigens depend on co-operation between specific L3T4+ and Lyt2+ T cells. Infect. Immun. 48:263-266.

68.- Kenny K., Herzberg M. 1967. Early antibody response in mice to either infection or immunization with **Salmonella typhimurium**. J. Bacteriol. 93:773-778.

69.- Ketyi I., Pacsa S., Emody L., Verteryi A., Kocsis B., Kuch B. 1979. **Shigella dysenteriae** 1-like cytotoxic enterotoxins produced by **Salmonella** strains. Acta Microbiol.Acad.Sci.H. 26:217-223.

70.- Killar L.M., Eisenstein T.K. 1984. Differences in Delayed-Type Hypersensitivity responses in various mouse strains in the C3H lineage infected with **Salmonella typhimurium**, strain SL3235. J. Immunol. 133:1190-1196.

71.- Killar L.M., Eisenstein T.K. 1986. Delayed-Type Hypersensitivity and Immunity to **Salmonella typhimurium**. Infect. Immun. 52:504-508.

72.- Killion J.W., Morrison D.C. 1986. Protection of C3H/HEJ mice from lethal *Salmonella typhimurium* LT2 infection by immunization with Lipopolysaccharide-Lipid A- Associated Protein complexes. *Infect. Immun.* 54:1-8.

73.- Kita E., Nishi K., Emoto M., Kashiba S. 1987. Analysis of immunity to infection with *Salmonella typhimurium* in outbred mice. Requirement of antibody to Non-O antigen for protection in mice that are not protected by the RNA-rich vaccine. *Immunol.* 61:535-541.

74.- Klimpel G., Niesel D.W., Asuncion M., Klimpel K.D. 1988. Natural Killer Cell activation and Interferon production by peripheral blood Lymphocytes after exposure to bacteria. *Infect. Immun.* 56:1436-1441.

75.- Koo F.S., Peterson J.W., Houston C.W., Molina N.C. 1984. Pathogenesis of experimental Salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect. Immun.* 43:93-100.

76.- Kuusi N., Nurminen M., Saxén H., Valtonen M., Makela H. 1979. Immunization with Major Outer Membranes Proteins in experimental Salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25:857-862.

77.- Kuusi N., Nurminen M., Saxén H., Makela H. 1981. Immunization with Major Outer Membrane Protein (Porins) preparations in experimental murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.

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

79.- Lamb J.R., O'Hehir R., Young D. 1988. The use of nitrocellulose immunoblots for the analysis of antigen recognition by T lymphocytes. *J. Immunol. Methods.* 110:1-10.

80.- Lamb J.R., Young D.B. 1987. A novel approach to the identification of T-cell epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* using human T-lymphocyte clones. *Immunol.* 60:1-5.

81.- Larralde C., Montoya R.M., Sciutto E., Diaz M.L., Govezensky T., Coltorti E. 1989. Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from Neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 40:282-290.

82.- Levine M.M., Black R.E., Ferrecio C., Clements M.L., Lanata J., Rooney J., Germanier R. and Chilean Typhoid Committe. 1986. The efficacy of attenuated *Salmonella typhi* oral vaccine strain Ty21A evaluated in controlled field trials. *Develop. of Vaccines and Drugs against Diarrhea.* 11th Nobel Conf. Stockholm, Sweden. *Studenlitteratur.* pp.90-101.

- 83.- Liang-Takasaki C.J., Grossman N., Leive L. 1982. Phagocytosis of bacteria by macrophages: changing the carbohydrate of Lipopolysaccharide alters interaction with complement and macrophages. *J. Immunol.* 128:1229-1235.
- 84.- Lindberg A., Robertsson J.A. 1983. *Salmonella typhimurium* infection in calves: Cell mediated and Humoral Immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. *Infect. Immun.* 41:751-757.
- 85.- Lockman H.A., Curtis III R. 1990. *Salmonella typhimurium* mutants lacking flagella or motility remain virulent in Balb/c mice. *Infect. Immun.* 58:137-143.
- 86.- López-Merino A., Asselineau J., Serre A., Roux J., Bascolul S., Lacave C. 1976. Immunization by an insoluble fraction extracted from *Brucella mellitensis*: Immunological and chemical characterization of the active substances. *Infect. Immun.* 13:311-321.
- 87.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Rondall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol-Reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
- 88.- Mackaness G.B. 1964. The Immunological basis of acquired Cellular resistance. *J. Exp. Med.* 120:105-.
89. Mackaness G.B., Blanden R.V., Collins F.M. 1966. Host-Parasite relations in mouse typhoid. *J. Exp. Med.* 124:573-583.
- 90.- Mackaness G.B. 1971. Cellular Immunity. *Ann. Inst. Pasteur.* 120;428-437.
- 91.- Mackaness G.B. 1971. Resistance to intracellular infect. *Dis.* 123;439-445.
- 92.- McCormick B.A., Stocker B.A.D., Laux D.C., Cohen P.S. 1988. Roles of motility, chemotaxis and penetration through and growth in Intestinal mucus in the hability of an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* to colonize the large intestine of Streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 56:2209-2217.
- 93.- Metcalf E., O'Brien A.D. 1981. Characterization of murine antibody response to *Salmonella typhimurium* by a class-specific solid-phase Radioimmunoassay. *Infect.Immun.* 3:33-41.
94. Méndez Samperio P, Lanib J, Bothanley G, Stanley P. 1989. Molecular study of the T cell repertoire in family contacts an patients with leprosy. *J. Of Immunology.* 142:3599-3604.

- 95.- Misfeld M.L., Johnson W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fractions from **Salmonella typhimurium**. Infect. Immun. 8:395-400.
- 96.- Molinari J.L., Gavilanes M., Tato P. 1976. Vacuna ribosomal obtenida de **Salmonella typhimurium** probada contra el desafío del microorganismo virulento, administrado por vía bucal. Arch. Invest. Med. 7:127-135.
- 97.- Morrison D.C., Ryan J.L. 1979. Bacterial Endotoxins and Host Immune Response. Adv. Immunol. 28:294-438.
- 98.- Morrison D.C., Kline L.F. 1977. Activation of the Classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharide (LPS). J. Immunol. 118:362-368.
- 99.- Nakano P.T., Saito H.U. 1972. Comparative immunogenicity of heat killed and living oral **Salmonella** vaccines. Infect. Immun. 6:451-458.
- 100.- Nakoneczna I., Hsu H.S. 1983. Histopatological study of protective immunity against murine **Salmonella** induced by killed vaccine. Infect. Immun. 39:423-430.
- 101- Nash A.A., Gell P.G.H. 1983. Membrane phenotype of murine effector and suppressor T cells involved in Delayed Hypersensitivity and protective immunity to **Herpes simplex** virus. Cell. Immunol. 75:348.
- 102.- Nencioni L., Villa L., Boraschi D., Berti B., Tagliabue A. 1983. Natural and Antibody-dependent cell-mediated activity against **Salmonella typhimurium** by peripheral and Intestinal lymphoid cells in mice. J. Immunol. 130:903-907.
- 103.- Niesel D.W., Hess C.B., Cho Y.J., Klimpel K.D., Klimpel G.R. 1986. Natural and recombinant Interferons inhibit epithelial cell invasion by **Shigella** spp. Infect. Immun. 52:828-833.
- 104.- O'Brien A.D., La Veck G.D., Thompson M.R., Formal S.B. Production of **Shigella dysenteriae** type1-like cytotoxin by **Escherichia coli**. J. Infect. Dis. 146:763-769.
- 105.- O'Brien A.D., Metcalf E.S. 1982. Control of early **Salmonella typhimurium** growth in innately **Salmonella** resistant mice does not require functional T lymphocytes. J. Immunol. 129:1349-1351.
- 106.- Orme I.M., Collins F.M. 1984. Adoptive protection of the **Mycobacterium tuberculosis** infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer Delayed Type Hypersensitivity to tuberculin. Cell Immunol. 84:113-

- 107.- Ortiz-Ortiz L., Ximenez C., Mendoza F., Michalak C., Melendro E.I., Oliva A. 1986. *Entamoeba histolytica*: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody. Exp. Parasitol. 61:390-397.
- 108.- Ortiz V, Isibasi A, García-Ortigoza E, Kumate J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J.Clin. Microb. 27: 1640-1645.
- 109.- Paul W.E. 1984. Antigen-antibody interaction. Fundamental Immunology. Raven Press. pp.595-644.
- 110.- Pavlov H., Hogarth M., McKenzie I.F.C., Cheers C. 1982. In vivo and In vitro effects of monoclonal antibody to Ly antigens on Immunity to infection. Cell Immunol. 71:127-138.
- 111.- Persson M.A., Ekwall E., Hammarström L., Lindberg A., Smith C.I. 1986. Immunoglobulin G (IgG) and IgA subclass pattern of human antibodies to *Shigella flexneri* and *Salmonella* serogroup B and D lipopolisaccharide O antigen. Infect. Immun. 52:834-839.
- 112.- Pierce N.F. 1981. The role of antigen form and function in the primary and secondary Intestinal Immune Response to cholera toxin and toxoid in rats. J. Exp. Med. 195-206.
- 113.- Polish Typhoid Committee. 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. Bull. WHO. 32:15-27.
- 114.- Reitman M. 1967. Infectivity and antigenicity of Streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. J. Infect. Dis. 117:101-107.
- 115.- Reitmeyer J.C., Peterson J.W., Wilson K.J. 1986. *Salmonella* cytotoxin: a component of bacterial outer membrane. Microb.Pathog. 1:503-510.
- 116.- Rennels M.B., Levine M.M. 1986. Classical bacterial diarrhea: perspectives and update-*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Pediatr.Infect. Dis. 5:591-5100.
- 117.- Roberts E.C., Demartini J.C., Orme I.M. 1987. Passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection is independent of mononuclear cell granuloma formation. Infect. Immun. 55:3215-3218.
- 118.- Robertsson J.A., Lindberg A., Hoiseth S., Stocker B.A.D. 1983. *Salmonella typhimurium* infection in Calves: Protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. Infect. Immun. 41:742-750.
- 119.- Robbins J.D., Robbins J.B. 1984. Reexamination of the

protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of **Salmonella typhi**. J.Infect.Dis. 150:436-449.

120.- Schlecht S., Bhatnagar N. 1985. Proteins from **Salmonella R-mutants** mediating protection against **Salmonella typhimurium** infection mice. II. Protection tests performed with proteins free from lipopolysaccharide. Zbl.Bakt.Hyg. A259:367-377.

121.- Smith R.A., Bigley N.J. 1972. Ribonucleic acid-proteins fractions of virulent **Salmonella typhimurium** as protective immunogens. Infect. Immun. 6:377-383.

122.- Smith B.P. Reina-Guerra M., Hoiseth S.K., Stocker B.A.D. 1983. Safety and efficacy of aromatic-dependent **Salmonella typhimurium** as live vaccine for calves. Am.J. Vet. Res. 45:59-66.

123.- Srisart P., Reynolds B.L., Rowley D. 1985. The correlation between Serum IgA antibody levels and resistance to infection with **Salmonella typhimurium** after oral immunization with various **Salmonellae**. Aus.J.Exp.Biol.Med.Sci. 63:177-182.

124.- Stocker B.A.D., Hoiseth S.K., Smith B.P. 1983. Aromatic dependent **Salmonella** s.p. as live vaccine, in mice and calves. Dev. Biol.Stand. 53:47-62.

125.- Stocker B.A.D., Makälä P.H. 1986. Genetic Determination of bacterial virulence with special reference to **Salmonella**. Curr.Top. Microbiol.Immunol. 124:149-172.

126.- Svennerholm A.M., Langes S., Holmgren J. 1980. Intestinal Immune Response to cholera toxin: dependence on route and dosage of antigen for priming and boosting. Infect. Immun. 30:337-347.

127.- Svenson S.B., Lindberg A.A. 1981. Artificial **Salmonella** vaccines. **Salmonella typhimurium** O-antigen-specific oligosaccharide protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. Infect. Immun. 32:490-496.

128.- Svenson S.B., Nurminen M., Lindberg A.A. 1979. Artificial **Salmonella** vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with **Salmonella typhimurium**. Infect. Immun. 25:863-872.

129.- Tagliabue A., Nencioni L., Villa L., Kerent D.F., Lowell G.H., Boraschi D. 1983. Antibody-dependent cell mediated antibacterial activity of intestinal lymphocytes with secretory IgA. Nature. 306:184-186.

- 130.- Tagliabue A., Villa L., De Magistris M.T., Romano M., Silvestri S., Boraschi D., Nencioni L. 1986. IgA-driven T cell-mediated anti-bacterial immunity in man after live oral Ty21a vaccine. *J. Immunol.* 137:1504-1510.
- 131.- Tarkkanen J., Saksela E., Lanier L. 1986. Bacterial activation of human Natural Killer cells. Characteristics of the activation process and identification of the effector cell. *J. Immunol.* 137:2428-2433.
- 132.- Tato P., Flisser A., Gavilanes M., Molinari J.L. 1979. Immunogenic complexes obtained from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* Ty21a by the bacterial acetone powder method. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur).* 130A:47-60.
- 133.- Tomita T., Kanegasaki S. 1982. Enhanced phagocytic response of macrophages to bacteria by physical impact caused by bacterial motility or centrifugation. *Infect. Immun.* 38:865-870.
- 134.- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 76:4350-4354.
- 135.- Tsang R.S.W., Lui S.W.L., Chau P.Y. 1983. Antigenic analysis of Barber's protein antigen prepared from *Salmonella typhi* and demonstration of Protein specific antibodies in Sera of Typhoid patients. *Zbl.Bakt.Hyg.* A254:244-252.
- 136.- Udhayakumar V., Mulhukkanippan V.R. 1987. Protective Immunity induced by Outer Membrane Proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55:816-821.
- 137.- Ushiba D.F., Saito T.A., Nakano M., Sugiyama T. 1959. Studies on experimental typhoid; bacterial multiplication and host cell response after infection with *Salmonella enteritidis* in mice immunized with live and killed vaccines. *Jap.J.Microbiol.* 3:231-242.
- 138.- Valtonen M.V. 1977. Role of phagocytosis in mouse virulence of *Salmonella typhimurium* recombinants with O-antigen 6,7 or 4, R. *Infect. Immun.* 18:574-578.
- 139.- Van Der Heijden P.J., Bianchi T.J., Bokhout M.D., Scholten J.W., Stok W. 1989. Quantification of antigen-specific antibody-secreting cells in the small intestine and other lymphoid organs of mice after oral booster immunization. *Immunol.* 66:404-409.
- 140.- Vanneman M.R., Bigley N.J., Berry L.J. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1:574-582.

141.- Wahdan M.H., Sérié C., Cerisier Y., Sallam S., Germanier R. 1982. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: Three-year results. J.Infect. Dis. 145:292-296.

142.- Wallis T.S., Starkey W.G., Stephen J., Osborn M.P. 1986. Enterotoxin production by *S. typhimurium* strains of different virulence. J. Med. Microbiol. 21:19-23.

143.- Weber K., Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244:4406-4412.

144.- Williams D.M., Schachter J., Grubbs B. 1987. Role of Natural Killer cells in infection with the mouse pneumonitis agent (murine *Chlamydia tracomatis*). Infect. Immun. 55:223-226.

145.- Yancey R.J., Breeding S.A.L., Lankford C.E. 1979. Enterochelin (enterobactin); virulence factor for *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 24:174-180.

146.- Young D.B., Lamb J.R. 1986. T lymphocytes respond to solid-phase antigen: a novel approach to the molecular analysis of cellular Immunity. Immunology 59:167-171.