

88

FACULTAD DE QUIMICA

**Poder Bactericida de Sueros Hiperinmunes a
Salmonella Typhi**

191

T E S I S

Que para obtener el título de :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

MARICEL DEL CARMEN GIRONES VICTORIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS: Tesi
ADQ. 1976 194
FECHA MT
PROC. MT



QUINICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE:	MAGDA. N. ACOSTA SEGURA
VOCAL:	OSCAR AMOR DODERO
SECRETARIO:	SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE:	ERNESTINA BALLESTEROS
2do. SUPLENTE:	SOCORRO CAO ROMERO

SUSTENTANTE: MARICEL DEL CARMEN GIRONES VICTORIA

ASESOR DEL TEMA: SALVADOR MARTIN SOSA

SUPERVISOR TECNICO: VIRGINIA VAZQUEZ ALVARADO

ESTA TESIS SE LLEVO A CABO EN EL
LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA DEL
HOSPITAL DEL NIÑO DE LA INSTITUCION
MEXICANA DE ASISTENCIA A LA NIÑEZ

) I.M.A.N.)

A mi padre:

Sr. Antonio Gironés P.

Símbolo de honestidad,

rectitud y bondad

Base de mi vida.

A mi madre:

Sra. Yolanda V. de Gironés

Madre, amiga y compañera,

sinónimo de cariño, com-

prensión, ternura . Guía

de mi camino.

A mis hermanos:

Juan A. Gironés y Rosita S. de Gironés

José M. Noriega y Rosita G. de Noriega

Jaime Gironés.

Por la comprensión y confianza

que siempre me han mostrado

A mis adorables "arañitas"

Rosita, Ana, José, Erika,

Iliana.

A la Dra. Virginia Vázquez A.

Con todo el cariño que se tiene
a una verdadera amiga.
Gracias por su confianza y sabios
consejos.

Al Dr. Salvador Martín Sosa

Con respeto y agradecimiento por
su valiosa cooperación en el
desarrollo de este trabajo.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
CAPITULO I GENERALIDADES	5
CAPITULO II MATERIAL Y METODOS	25
CAPITULO III RESULTADOS	37
CAPITULO IV DISCUSION	54
RESUMEN	63
BIBLIOGRAFIA	65

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

Por largo tiempo ha sido preocupación de muchos expertos la preparación de una vacuna contra la tifoidea que proporcione protección adecuada para reducir la diseminación del agente causal y la enfermedad. La magnitud de esa protección está condicionada al tipo de vacuna utilizada, a la vía de administración y a los niveles de anticuerpos humorales en el momento de la vacunación principalmente.

Las primeras vacunas contra la tifoidea fueron preparadas por inactivación térmica de los microorganismos. Después fue utilizada extensamente la vacuna fenolizada, la cual produce respuesta de anticuerpos a los antígenos "O" y "H" pero no al antígeno Vi. En 1953, Landy (1) empleó el método de inactivación por medio de acetona y encontró índices protectores superiores en comparación con productos inactivados por fenol o por calor. Más recientemente otros investigadores han probado en humanos vacunas con bacterias vivas - estreptomicina resistentes, las cuales confieren cierto grado de protección, y constituyen, desde ciertos puntos de vista, un enfoque muy atractivo para lograr la inmunización efectiva y duradera contra Salmonella typhi. (2).

Por otra parte, desde hace casi 100 años se sabe que algunas bacterias Gram negativas pueden ser inactivadas, en presencia de pequeñísimas cantidades de anticuerpos específicos, al agregárseles complemento, pero el proceso es muy complejo y no existe aún explicación clara y completa del mismo. Esa acción bactericida es condicionada por diversos

factores, de los cuales uno de los más importantes parece ser la heterogeneidad de los anticuerpos respecto de clase y de avidez para fijar el complemento; se sabe que las interacciones entre proteínas y anticuerpos de diferentes especies pueden producir fijación y consumo de complemento (3) La importancia de la heterogeneidad de clase ha sido demostrada por Daguiard y Edsall (4) recientemente, quienes aislaron anticuerpos IgG e IgM contra *S. typhi* 0 901, por absorción y elución con antígeno "O" bacteriano; sobre bases molares, los anticuerpos de clase IgM fueron 100 veces más activos que los de clase IgG en cuanto a poder bactericida dependiente de complemento.

Si bien es cierto que el mecanismo y las complicaciones inmunológicas de la acción bactericida complemento - dependiente no son bien conocidas aún, parece evidente que juega un papel importante en la defensa del huésped.

Resulta del mayor interés, por consiguiente, tratar de esclarecer ese papel, y desde un punto de vista esencialmente práctico tratar de evaluar la magnitud y trascendencia de la acción bactericida resultante de la aplicación de un producto inmunogénico. En el caso de la tifoidea, problema de salud pública, en nuestro país, no ha menguado el interés internacional por desarrollar una vacuna MEJOR - que las existentes, ya que éstas no han resultado suficientemente satisfactorias.

Este trabajo representa un esfuerzo orientado a la preparación de una vacuna más eficaz contra Salmonella typhi, a partir de una cepa autóctona epidémica. Los datos que han sido obtenidos en las pruebas de poder bactericida deberán ser correlacionados, a través, de otros estudios - con la misma cepa, con su capacidad inductora de anticuerpos específicos, anti-Vi principalmente, y las pruebas de campo seguidas de un período prolongado de observación epidemiológica (¿ 3 años? ¿ 5 años o más?) serán las que definan la verdadera utilidad inmunizante de la cepa estudiada.

CAPITULO I

G E N E R A L I D A D E S

GENERALIDADES.

Fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea es un padecimiento que se conoce desde la antigüedad. Hipócrates y otros médicos romanos de su época mencionan una enfermedad cuya sintomatología coincide con la de la fiebre tifoidea (5).

No fué hasta 1659 cuando - aún sin llegar a una diferenciación completa con otros procesos febriles - Thomas Willis la describió y en 1813 Bretonneau logró explicar los cambios histológicos de este padecimiento, al cual denominó con el nombre de "dothienteritis". Por sus características fué confundido con el tifo, por lo cual se le denominó "tifoidea". Hasta 1837 Gerhard logró hacer por primera vez una diferenciación entre ellos y fué Bartlett en - 1842 el que logró diferenciarlo completamente (5).

Tratando de encontrar el agente etiológico que ocasionaba la enfermedad, Budd - en 1856 - lo definió como - una enfermedad que es producida por la ingesta de alimentos y agua contaminados, ya sea directamente con las heces de - un enfermo o bien por las manos de las personas que atendían dichos enfermos. Una segunda teoría establecía que se debía a la dispersión del agente en el aire (5).

En 1863 Morston estableció el diagnóstico diferencial entre fiebre tifoidea y fiebre de Malta o Brucelosis, y no fué sino hasta 1880 cuando Eberth logró descubrir el -- agente etiológico de la fiebre tifoidea, al cual denominó -

Eberthella typhosa siendo ésto un avance crucial para el diagnóstico (5).

Gaffky, en 1884, logró el cultivo de E. typhosa y le cambió el nombre a Salmonella typhi, haciendo hincapié - sobre la teoría de Budd acerca de que la enfermedad proviene de alimentos y agua contaminados y descartando la posibilidad de adquirirla por medio de dispersión en el aire (5).

Habiendo podido cultivar Salmonella typhi, Widal logra a través de experimentos, describir un procedimiento de laboratorio que lleva su nombre y que consiste en una aglutinación. Este método es de gran utilidad en la actualidad, para el diagnóstico de la fiebre tifoidea, sobre todo - en los casos en que los cultivos son negativos (5).

Fueron Pfeiffer y Kolle los que realizaron la primera inoculación profiláctica en 1896 mediante la administración de gérmenes muertos; siguiéndolos Wright y Semple en 1897'

Sintomatología.

El período de incubación de la fiebre tifoidea es de 8 a 14 días. Los síntomas generales del padecimiento son: calosfríos, cefalea, anorexia, en algunos casos epistaxis, vómito, dolor abdominal y constipación o diarrea. La duración del padecimiento varía, siendo generalmente de 4 a 5 semanas.

Durante la primera semana de la enfermedad hay elevación de la temperatura, que puede alcanzar hasta 39 y -

40° C, la lengua se pone saburral y blanca, el abdomen está distendido y doloroso, además de que se presenta cefalea y - constipación. En esta primera semana puede aparecer crecimiento del bazo, y en los niños aparecen manchas rojas en la piel.

En la segunda semana la fiebre persiste alta, el pulso y la respiración se aceleran, hay cefalea y sopor, aparece diarrea y en algunos casos puede presentarse la muerte por - complicaciones intestinales como perforación o hemorragias. La temperatura tiende a bajar el 14o. día.

Durante la tercera semana el pulso persiste acelerado, la temperatura presenta remisiones matutinas, hay pérdida de peso y debilidad; pueden aparecer complicaciones pulmonares, debilidad cardíaca, delirio y temblores musculares.

A partir de la cuarta semana se presenta la convalescencia durante la cual, la temperatura se va normalizando poco a poco, se suspende la diarrea y el enfermo recupera el - apetito.

En casos graves, a partir de la quinta semana se acentúan los síntomas de la tercera semana y aparecen, a veces, - problemas circulatorios y otras complicaciones que ponen en - peligro la vida del enfermo. Las recaídas pueden presentarse durante la quinta y sexta semana.

Las complicaciones están relacionadas con las toxinas y con la postración y entre las más frecuentes tenemos: bronconeumonía, trombosis venosa, neuritis periférica, signos me-

níngenos (no causado por problema meningítico) y anemia hemolítica. En relación al aparato digestivo se puede presentar perforación intestinal, hemorragias y colangitis aguda.

Diagnóstico.

Deberá basarse primeramente en la presencia de datos clínicos obtenidos durante la exploración e interrogatorio - del paciente, corroborados por los datos de laboratorio, como son:

- a) Leucopenia y neutrofilia relativa, no siempre constantes,
- b) El aislamiento de la *Salmonella* a partir de una muestra de sangre circulante es el método más preciso en el diagnóstico bacteriológico y tiene una mayor probabilidad de cultivos positivos (80-90%) durante la primera semana (6).
- c) Reacción de Widal que pone de manifiesto la presencia de aglutininas específicas para antígeno somático y flagelar.

También se puede realizar el coprocultivo como método diagnóstico pero no, es de certeza en lo que a infección aguda se refiere, pues se pueden obtener resultados positivos en casos de portadores sanos. La mayor positividad a *Salmonella typhi* en heces (25 % de los casos) se observa después de la - segunda semana de evolución (6).

Salmonella typhi puede ser encontrada en cultivo de orina cuando el paciente presenta cierto tipo de septicemia y el germen se ha localizado en el riñón (6).

Otros métodos complementarios para el diagnóstico de fiebre tifoidea son el cultivo de médula ósea y el cultivo -

del coágulo en una muestra de sangre total estéril (6).

Reacción de Widal.

También conocida como reacción de aglutinación en tubo, es de gran valor para el diagnóstico de la fiebre tifoidea, ya que la demostración de un título elevado de aglutininas específicas es aceptado como evidencia definitiva de una infección por Salmonella typhi. La reacción se lleva a cabo con diluciones seriadas (múltiplos de 2) del suero problema y partes iguales de los antígenos "O" y "H" de la salmonella.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- 1.- "O" alto (1:160 o más) y "H" bajo sugieren que hay infección activa en ese momento.
- 2.- "O" bajo y "H" alto (1:160 o más) sugieren una infección o vacunación en el pasado.

Así pues las aglutininas "O" parecen ser más significativas, ya que en algunos casos no se detectan las aglutininas "H". Por otro lado, las aglutininas "O" son de mayor valor diagnóstico porque desaparecen más rápidamente que las aglutininas "H" mediante pruebas seriadas y como resultado de una vacunación. La presencia de fracciones antigénicas somáticas ("O") en distintas especies de salmonellas amplía el rango de la prueba para la detección inicial de la infección puesto que el reactivo puede detectar anticuerpos en otros tipos de salmonelosis.

Las aglutininas Vi no son necesarias para el diagnóstico de la fiebre tifoidea, ya que rara vez aparecen en la san

gre de pacientes en ausencia de aglutininas "O" y "H"; sin embargo, un título alto contra el antígeno Vi sugiere estado de portador (7).

Fijación de Superficie.

Considerando las dificultades que diversos autores han señalado sobre la interpretación de la reacción de Widal y lo inseguro de los resultados obtenidos con el uso de los llamados antígenos rápidos; Ruiz Castañeda (8) desarrolló un nuevo método llamado "fijación de superficie" que a una gran rapidez de ejecución se agrega la notable especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo.

La prueba de fijación de superficie se hace sobre un tipo especial de papel filtro cuya característica principal es la de absorber por capilaridad ascendente a velocidad tal que una tira de 5 pulgadas se moje en su totalidad en 15 a 20 minutos.

La designación de "fijación de superficie" significa lo que ocurre cuando se produce una reacción antígeno-anticuerpo al aplicar sobre la mancha de antígeno un suero que contenga los anticuerpos correspondientes. Si sobre la mancha se aplica suero normal, al poner en contacto con la solución salina, y ascender ésta por capilaridad, el antígeno correrá a la parte superior del papel; si la mancha se trata con suero que contenga los anticuerpos correspondientes, la mancha quedará fija al papel en el sitio de impresión, o se

desplazará distancias inversamente proporcionales al contenido de anticuerpos en el suero. La prueba se debe llevar a cabo usando siempre un control negativo (suero normal).

Según Ruiz Castañeda, la prueba con 100% de fijación sólo ocurre con sueros de conejos inmunizados con *S. typhi* y en enfermos de todas edades con tifoidea confirmada. El 75% de fijación ocurre en pocas ocasiones en adultos aparentemente libres de salmonellosis, pero es un dato que debe hacer sospechar tifoidea en enfermos de todas edades. En cambio un 50% de fijación sólo puede ser tomada en cuenta como indicación de posible infección en menores de 14 años. Títulos menores de 50% han sido observados en enfermos de tifoidea menores de 5 años y títulos de 25% sólo deben considerarse con la debida reserva en menores de 3 años.

Tratamiento.

La historia del tratamiento de la fiebre tifoidea se puede dividir en dos etapas: la época preantibiótica y la de los antibióticos.

En la etapa preantibiótica el tratamiento estaba basado en una dieta adecuada, hidroterapia, antipiréticos y el uso de vacunas y sueros.

La era de los antibióticos se inicia en 1948 que es cuando se publican los primeros trabajos sobre el uso del - Cloranfenicol, este medicamento es muy útil para cortar drásticamente la duración de la fiebre que es de 3 a 5 días como promedio. Además disminuye el estado de Toxemia y, por lo -

consiguiente, la morbilidad y la mortalidad.

Para el mismo año (1948) se emplean otros medicamentos que quedan colocados en la era post-cloranfenicol como son: Aureomicina, Terramicina, Acromicinas, Penicilina en grandes dosis, Sulfonamidas, Estreptomicina, Polimixina, Sinematin B que se emplearon en enfermedades agudas y portadores sanos, pero el éxito fue limitado (6).

En 1951 Woodward y cols. y Smandel y cols. publican recortes sobre el uso de cortisona y de cortisona combinada con cloranfenicol para el tratamiento de la fiebre tifoidea y observan que esta asociación de medicamentos tiene mayor rapidéz de acción que el cloranfenicol solo; pero las complicaciones y recaídas se siguen presentando y se puede incrementar el peligro con la asociación de éstos por lo cual se abandona el uso de la asociación de fármacos (6).

En Africa desde 1971 se trató de encontrar otros medicamentos que fueran útiles como el Trimethopirin (Bactrim) y el Sulphamethoxasole (Septrim) (9).

Durante el año de 1972 en México aparece una cepa resistente al Cloranfenicol por lo cual el tratamiento se cambia a ampicilina y anoxicilina (10). La resistencia de Salmonella typhi a cloranfenicol había sido descrita ya por Auber tin desde 1952 (11).

Respuesta humoral.

Un ataque de fiebre tifoidea confiere generalmente cierta inmunidad. La recuperación de la enfermedad está aso

ciada a la aparición de aglutininas en sangre y de anticuerpos bactericidas para Salmonella typhi. Estos anticuerpos alcanzan niveles apreciables durante la primera y segunda semana del padecimiento, al mismo tiempo que Salmonella typhi desaparece de la circulación; sin embargo los anticuerpos pueden presentarse durante la fase aguda del padecimiento (6).

En la prueba de aglutinación del suero los anticuerpos están incrementados de la tercera a la quinta semana de que se inicia el padecimiento (6).

La respuesta inmune humoral a Salmonella typhi ha sido ampliamente estudiada en forma experimental y en forma natural. Los estudios en humanos son incompletos y hasta contradictorios (12).

En forma experimental se ha establecido que en animales existe una marcada predominancia de los anticuerpos 19S (IgM) para el antígeno somático y valores bajos de anticuerpos 7S (IgG) resistentes al mercapto-etanol (12).

En reciente trabajo, Chernokhvstova (13) demostró la presencia de anticuerpos que reaccionan con el antígeno somático en el suero tanto de individuos normales como de individuos previamente inmunizados y en individuos en estadios avanzados de la enfermedad.

Los anticuerpos presentes en la población y los vacunados pertenecen a inmunoglobulinas IgM y en individuos con tifoidea son IgG e IgM. En portadores no se detecta IgM; los anticuerpos IgG (7S) están presentes en pacientes con enferme

dad clínica. IgA humoral aparece en el suero de portadores y de enfermos de tifoidea (13).

La presencia de anticuerpos de diferente clase se puede explicar por el distinto estímulo antigénico de que se trate; el método más eficiente de estimulación antigénica es la enfermedad natural, debido a la más o menos prolongada bacteremia, a diferencia de la vacunación que no produce bacteremia. En portadores se piensa que los anticuerpos 19S han desaparecido en parte y los niveles de dichos anticuerpos son suficientes para prevenir la aparición de la enfermedad pero insuficientes para eliminar al microorganismo patógeno (13).

Poder bactericida del suero.

El efecto protector de la sangre ha sido observado durante mucho tiempo por diferentes investigadores. Así, - Von Behring en 1889 describió una sustancia presente en el suero de varios animales que actúa contra bacilos aerobios formadores de esporas; a este factor lo designó con el nombre de Betalisina para distinguirlo de la alfa lisina o anticuerpos verdaderos que asociados al complemento producen lisis de las bacterias gram negativas. Se diferencian además por el hecho de que las betalisinas carecen de especificidad.

Myrvick y colaboradores (14) encontraron actividad bactericida a Bacillus subtilis en sueros normales de diferentes especies animales; el suero de rata y de conejo tienen cantidades apreciables de bactericidina activa contra dicho microorganismo. En humanos, el 50% de los individuos estudiados poseía 2 unidades por ml de bactericidina, y el otro 50% contenía cantidades menores; en fase aguda de infección la cantidad de bactericidina fue mayor. Los glóbulos blancos, en especial polimorfonucleares y monocitos, no constituyen la fuente de bactericidina según los experimentos de estos autores.

El mismo autor refiere que en conejos normales, - - Mackie, Finkelstein y Van Rooyen encontraron una bactericidina no específica que actúa especialmente contra bacilos Gram positivos, que Tillet demostró una bactericidina en suero hu

mano altamente activa contra estreptococo beta-hemolítico y que otros autores descubrieron otras bactericidinas específicas para Staphylococcus aureus.

En la misma publicación se describe (por Wulf), una sustancia no específica termoestable, bactericida para algunas cepas de Neisseria meningitidis. En el suero de diferentes especies de mamíferos han sido detectadas también bactericidinas a muchos bacilos Gram negativos, principalmente a las mutantes rugosas de la familia Enterobacteriaceae. Este efecto bactericida que depende del complemento, puede ser inhibido por la presencia de un suero hiperinmune dirigido al quimiotipo, que está involucrado este anticuerpo contra el polisacárido de la pared celular (15). El papel del complemento no es el mismo que en la inmunohemólisis sino depende del sistema properdina.

Ya que la mayoría de las células bacterianas pueden ser destruidas por anticuerpos en presencia del complemento, se cree que la acción letal se explica por una estructura celular común y básica como es la membrana protoplasmática. La resistencia absoluta o relativa encontradas en algunas bacterias es debida en ambos casos a carecer de desarrollo o a bloquear el acceso del componente final letal a esta estructura básica y sensible. Si el complejo antígeno-anticuerpo sigue la secuencia de activación del complemento y la pared celular permite la penetración del componente letal hasta la membrana protoplasmática, se produce la muerte celular.

Esto se afirma de acuerdo al hallazgo general de que colonias de organismos Gram negativos rugosos son sensibles a pesar de que la cepa original sea lisa y resistente (3).

Existe la evidencia de que el huésped puede modificar fenotípicamente cepas lisas virulentas, de tal manera - que son convertidas en cepas sensibles a factores del suero que puedan reaccionar con antígenos de cepas rugosas. Chedid y colaboradores (16) encontraron en suero normal de ratón un efecto bactericida que ha sido generalmente atribuido a anticuerpos naturales del tipo "Q", pero estos autores señalan como responsables a un factor del suero que reacciona con ciertos antígenos de cepas rugosas expuestos posiblemente por enzimas que destruyen las cadenas laterales de las - cepas lisas modificando así la constitución de la pared celular.

En 1953 fué descrito por Adler que la bacteria puede ser sensibilizada pasivamente por antígenos, y que anticuerpos específicos contra estos antígenos inactivaban a la bacteria en presencia de complemento.

Rowley y Turner poco tiempo después encontraron que la sensibilidad de estos organismos cubiertos era inversamente proporcional al tamaño del antígeno empleado para cubrir. Esto indujo a proponer que un factor importante y determinante de esta sensibilidad de la bacteria era la pared celular, que afecta la distancia de la membrana protoplasmática a la cual el complemento es activado (3).

Reynolds y Rowley (17) han encontrado "in vitro" que el sistema antígeno-anticuerpo-complemento es bactericida en presencia de soluciones que parecen eliminar algunos componentes de la pared celular. Ejemplo de estas soluciones son: el amortiguador de TRIS que tiene propiedades quelantes, el etanol amina y el veronal, que también tiene propiedades quelantes, y por consiguiente el efecto de estas sustancias desaparece cuando se les añade Ca^{++} o Mg^{++} a una concentración 0.002 Moles/lit.

El efecto bactericida del suero normal e inmune a bacterias Gram negativas es generalmente mediado por una activación del sistema complemento. En el caso del suero normal, en la reacción bactericida (según Pillemer) están involucrados otros mecanismos como es el de la properdina, sustancia que junto con otros factores del suero denominados A y B activa el sistema complemento sin la presencia de anticuerpos específicos Wedgwood, sin embargo, considera que es absolutamente necesaria la presencia de anticuerpos (15).

El poder bactericida del suero hiperinmune se pone de manifiesto mediante sensibilización pasiva con un sistema heterólogo (suero albúmina bovina - Anti suero albúmina bovina) y complemento, y el resultado es el mismo que Muechel (18) ha descrito debido a la aparición de "agujeros" en la membrana bacteriana por un efecto secundario de la fijación del complemento al antígeno-anticuerpo.

Reynolds (19) ha clarificado la manera en la cual los polisacáridos de cepas lisas resisten los efectos del anticuer

po-complemento, y el mecanismo del tratamiento con TRIS las hace sensibles por medio de un cambio en la configuración física del lipopolisacárido y de una eliminación de éste lo - cual permite a las moléculas activadas de complemento, penetrar al interior de la membrana protoplasmática. Evidencias recientes sugieren que la fracción lípida endotóxica del polisacárido puede activar el sistema complemento (3).

Se ha pensado que el efecto bactericida del suero normal sobre bacterias Gram negativas se explica por un mecanismo diferente al del suero inmune involucrando un consumo de los seis componentes terminales del complemento, esto es, desde C_3 al C_9 , y una disminución mínima de los tres componentes primeros (C_1 , C_4 y C_2). No se sabe todavía con seguridad si - esta activación del complemento involucra anticuerpos y componentes iniciales activos del complemento, ya que en experimentos previos se ha encontrado evidencia de un factor termolábil (56°C durante 30 min) en suero humano normal involucrado en la reacción bactericida (15).

Ya que el lipopolisacárido (in vitro) está fijado a los fosfolípidos de la pared celular, se ha propuesto que los lipopolisacáridos y fosfolípidos pueden formar una doble capa de una mezcla que integra la membrana bacteriana con la porción polisacárida del lipopolisacárido como la estructura más externa. El daño a esta membrana se requiere probablemente - para el efecto bactericida del suero, pero no se sabe con claridad si ese daño produce la muerte celular o solamente permite el acceso, a constituyentes más profundos de la pared celu

lar, de sustancias del suero, potencialmente nocivas como la lisozima (15).

Como se ha mencionado anteriormente, el suero normal de varias especies animales de mamíferos es bactericida a muchas bacterias Gram negativas, especialmente a las mutantes rugosas de la familia Enterobacteriaceae. Esta propiedad puede ser eliminada mediante sueros inmunes de Salmonella preparados en conejos. Pero este efecto antibactericida está restringido a mutantes homólogas, a mutantes cuya estructura de lipopolisacárido sea similar o igual a la de la pared celular, o a mutantes que pertenecen al mismo quimiotipo (20).

Los experimentos de Normann (20) han mostrado que la actividad antibactericida tiene características de IgG, ya - que obtuvo un alto título después de inmunización por un pe-
ríodo largo, localizó la actividad en el pico específico de IgG al separarla por cromatografía en celulosa-DEAE, demostró identidad con IgG por inmunolectroforesis y coincidencia con el coeficiente de sedimentación (Sw 20) 6.65 de la IgG de co-
nejo. Por otra parte no pudo demostrar actividad antibacteriicida en la fracción IgM.

La diseminación de la fiebre tifoidea puede ser con-
dicionada por la naturaleza del medio en que vive el hombre; cuando el medio es desfavorable el método empleado generalmen
te para el control de dicha enfermedad es la vacunación. Se ha demostrado en algunos países que las vacunas bacterianas inactivadas ofrecen una significativa protección y que las va

cunas inactivadas por acetona son más protectoras que las vacunas inactivadas por el calor-fenol. Sin embargo, se presentan en algunos casos reacciones adversas con ambos tipos de vacunas debido a la presencia de endotoxinas o de otras sustancias tóxicas.

No se ha podido identificar el componente que sea utilizado como la sustancia protectora de la inmunidad humana en fiebre tifoidea (21).

Ya se ha descrito que el antígeno Vi de Salmonella typhi tiene un papel importante en la protección del humano, se ha estudiado el efecto de dicho antígeno obtenido en distintas formas, y se ha encontrado que el antígeno Vi aislado por precipitación por CETAVLON (bromuro de hexadecil-timetilamonio) es 8 veces más potente, en animales, que el preparado a partir de *Citrobacter*. En este mismo trabajo se demostró que los anticuerpos anti Vi poseen actividad bactericida contra varias especies de Salmonella typhosa. El papel de estos anticuerpos bactericidas en la tifoidea no está claro aún (21).

En un estudio comparativo Wong y colaboradores, demostraron que el antígeno Vi-Ty2 es nueve veces más potente que una vacuna de células completas inactivadas por acetona, en pruebas de protección al ratón (21).

Felix y Pitt relacionaron el incremento de virulencia (en animales) producido por el antígeno Vi con su papel como envoltura antigénica que protege al antígeno "O" de sus anticuerpos específicos; de esta manera interferiría con la acti-

vidad bactericida del suero (22). También se ha pensado que el antígeno Vi podría inhibir la fagocitosis (22).

Wahdan y colaboradores (24) investigaron la importancia del anticuerpo "H", usando una vacuna tifosa preparada con una mutante inmóvil de Salmonella typhi Ty2 y encontraron que aunque la vacuna estimulaba altos títulos de anticuerpos "O" y "Vi", los datos de morbilidad obtenidos no indicaban que la vacuna protegiera contra tifoidea. Estos resultados sostienen la tesis de que los anticuerpos "H" juegan un papel importante en la protección del humano.

En experimentos hechos con vacuna monovalente inactivada por acetona-secado y vacuna polivalente acuosa (tifosoparatifosa) se encontró que la efectividad de la vacuna, independientemente de la que se empleara, no dependía de la producción de altos niveles de anticuerpos "O" y/o "Vi", y que esta respuesta podrá depender de:

- 1.- que las aglutininas "H" jueguen un papel importante en la protección.
- 2.- de factores del suero no identificados aún o bien
- 3.- de mecanismos de defensa del huésped (25).

Tapa y colaboradores (26) emplearon en humanos la vacuna inactivada por acetona-secado obtenida por el método modificado de Landy, y encontraron que dos dosis de esta vacuna daban inmunidad a fiebre tifoidea por un período prolongado (5 años aproximadamente) y que una sola dosis aunque daba también cierta inmunidad era en menor grado y que las personas -

expuestas a una sola dosis eran más susceptibles a recaídas.

CAPITULO II

M A T E R I A L Y M E T O D O S

MATERIAL Y METODOS

La cepa de Salmonella typhi 4795 H denominada St1 uti lizada en este trabajo fué aislada de hemocultivo en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital del Niño de la Institución Mexicana de Asistencia a la Niñez (IMAN), de un paciente con diagnóstico de fiebre tifoidea.

Material

Tubos de ensaye de 140x160 con tapón de algodón estériles.

Tubos de ensaye de 13x100 con tapón de algodón estériles.

Tubos de ensaye de 17x150 con tapón de rosca estériles.

Cajas de Petri de 10x100 mm estériles desechables.

Matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón estériles

Matraz Erlenmeyer de 50 ml con tapón de algodón estériles.

Probeta de 100 ml con tapón de algodón estéril.

Matraz aforado de 1 000 ml.

Matraz aforado de 2 000 ml.

Pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml estériles.

Pipetas Pasteur estériles.

Frasco ampula con tapón de hule estériles.

Mechero.

Asas de siembra.

Gradillas.

Palillos de dientes estériles.

Baño maría 37°C.

Baño maría 50°C.

Baño de hielo.

Microscopio estereoscópico.

Congelador REVCO a - 70°C.

Congelador NIETO a -25°C.

Centrífuga refrigerada CHRIST modelo II KS.

Medios de cultivo y reactivos.

GELOSA-SANGRE HUMANA.

Se usó Agar-Tripticasa-Soya (BBL), cuya fórmula es:

Peptona tripticasa	15.00 g
Peptona Fitona	5.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Agar	15.00 g
Agua destiladac.b.p.	1000 ml

El pH final debe ser ± 7.3 . Se esteriliza durante 15 min. a 15 libras de presión (121°C). Se deja enfriar a 50°C y se le añade 5% de sangre humana desfibrinada estéril, se mezcla muy bien y se vierte en cajas Petri estériles, a razón de 10 ml por caja aproximadamente.

CALDO-TRIPTICASA-SOYA

Peptona tripticasa	5.00 g
Peptona Fitona	5.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Agar	15.00 g
Agua destiladac.b.p.	1 000 ml

El pH final debe ser de ± 7.3 . Se ponen alicuotas de 10 ml en tubos de ensaye con tapón de rosa y se esteriliza durante 15 min. a 15 libras de presión (121°C). Guardar en refrigerador.

SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO 0.3Moles/litro.

Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).... 44.106 g

Agua destiladac.b.p.... 1 000 ml

Se guarda en refrigerador en frasco color ámbar.

SOLUCION CLORURO DE MAGNESIO 1 Moles/litro.

Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ... 203.31 g

Agua destilada c.b.p. ... 1 000 ml

Se guarda en refrigerador en frasco color ámbar.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE DEXTROSA-GELATINA-VERONAL.

Solución I: Cloruro de sodio 85.00 g

Dietil-barbiturato de sodio . 3.25 g

Agua destilada fría .. c.b.p. 1 000 ml

Disolver el cloruro de sodio y el dietil-barbiturato de sodio en el agua destilada fría, mezclar bien hasta disolución total.

Solución II: Acido dietil-barbitúrico 5.75 g

Gelatina 2.00 g

Agua destilada caliente 900 ml

Suspender el ácido dietil barbitúrico con 900 ml de agua destilada caliente y disolver completamente; añadir la gelatina y mezclar hasta disolución total. Mezclar ambas soluciones y dejar enfriar. Agregar 5 ml de solución de cloruro de magnesio 1 Moles/lt y 5 ml de solución de cloruro de calcio 0.3 Moles/lt y aforar a 2000 ml con agua destilada fría. Esterilizar 15 min. a 15 libras de presión (121°C). Guardar en refrigerador en frasco color ámbar.

Para ser utilizada esta solución amortiguadora se diluye con agua destilada estéril 1:5, y el pH final debe ser de 7.5.

Preparación de Salmonella typhosa deshidratada.

La cepa H 4795 - procedió como se dijo anteriormente - de un aislamiento de un hemocultivo tomado de un niño con cuadro clínico de fiebre tifoidea. Una vez comprobada su identidad y pureza se sembró en caldo tripticasa para obtener un inóculo grande, después de incubarse a 37°C. Se inocularon con ella, botellas de Roux que contenían agar-tripticasoja y fueron incubadas 18 hs a 37°C. El crecimiento de cada botella de Roux fué cosechado agregando 10 ml de agua destilada; se mezclaron las cosechas individuales y se inactivaron las bacterias, según el método de Landy (1).

Esta suspensión fué centrifugada en una centrífuga Universal modelo UV a 3 000 rpm durante una hora, se lavó con acetona (fría siempre) el sedimento y se resuspendió de nuevo en acetona, dejando esta suspensión a 37°C durante 24 hs. Pasado este tiempo, la suspensión fué centrifugada al mismo tiempo y a la misma velocidad y el sobrenadante se eliminó obteniéndose un precipitado bacteriano al que se le volvió a agregar acetona. Después de centrifugar de la misma manera, el sedimento se resuspendió en 100 ml de acetona y se mezcló con agitador magnético para obtener un material homogéneo. Se distribuyeron alícuotas de 0.5 ml con ayuda de jeringa automática y se fueron vaciando en frascos de 60 ml

de capacidad, estériles, los cuales fueron colocados en un gabinete de flujo laminar estéril para eliminar totalmente la acetona.

Al momento de utilizarse, el residuo seco se diluyó con 50 ml de solución salina isotónica y 0.01% de timerosal, conteniendo cada frasco 7 mg de polvo seco que correspondía a una determinación de proteína de 3.90 mg. Ya que se inyectaron en cada dosis 0.5 ml de la suspensión diluída haciendo los cálculos aritméticos adecuados este volumen corresponde a 0.039 mg de proteína.

Obtención de sueros inmunes.

Los sueros inmunes utilizados en el presente trabajo se obtuvieron mediante la inoculación de la vacuna a 8 conejos de raza Nueva Zelanda albinos, de 3.5 Kg. de peso cada uno, 7 machos y una hembra.

Los conejos fueron alimentados con purina-conejina y la vigilancia y supervisión de los mismos estuvieron a cargo del personal del Bioterio del Hospital del Niño IMAN. Cada uno de los animales se les dió un número como método de identificación (del 1 al 9) y se le extrajeron 10 ml de sangre antes de inocularlos por primera vez. El esquema de vacunación empleado fue establecido en forma totalmente arbitraria. En cada una de las inyecciones especificadas en dicho esquema se emplearon 0.5 ml del antígeno Salmonella typhi.

El número de vacunaciones para cada uno de los conejos fue de cuatro en total. La primera inyección fue administrada

por vía intraperitoneal, las otras 3 por vía endovenosa; el lapso de tiempo comprendido entre las tres primeras inyecciones fué de tres días, y las muestras de sangre para titulación de anticuerpos fueron obtenidas 7, 14, 21 y 28 días después de la tercera inoculación. La cuarta o sea la última vacunación fué aplicada a los 35 días de la primera, y todavía se obtuvo una sexta muestra de sangre a los 30 días de esta última inmunización.

Las muestras obtenidas se colocaron en tubos estériles con tapón de rosca, y se dejaron reposar hasta la separación total del suero. Una vez separados se tomaron con pipeta Pasteur estéril y se pasaron a tubos de 13 x 100 mm estériles con tapón de hule; la centrifugación se hizo en frío en una centrífuga refrigerada marca CHRIST. El suero obtenido se volvió a separar y a centrifugar por segunda vez en las mismas condiciones para eliminar cualquier resto de eritrocitos. Una vez terminada la segunda centrifugación, se procedió a pasar los sueros con pipetas Pasteur estériles a tubos de 13 x 100 mm estériles con tapón de hule y previamente etiquetados. Se guardaron a -20°C.

El número total de muestras de sangre obtenidas para cada animal fué de seis, excepto en los conejos 2, 3 y 7 que fallecieron después de la inyección de refuerzo por causas ajenas a la vacunación.

Obtención de complemento.

La fuente de complemento empleada fué suero de cobayo.

Los animales fueron sangrados por punción cardíaca, recogiendo las muestras en tubos con tapón de rosca estériles; se colocaron inmediatamente en baño de hielo y se dejaron reposar hasta separación del suero. Se centrifugaron a 2000 rps durante 10 min. en centrífuga refrigerada. Los sueros se recogieron con pipeta Pasteur estéril y mezclaron en un solo tubo con tapón de rosca estéril y centrifugándose en iguales condiciones por segunda vez. Se tomaron alícuotas de 1 ml con pipeta estéril y se colocaron en frasquitos con tapón de hule, también estériles. Se guardaron a -70°C .

Para esta prueba y todas las subsecuentes se utilizó dextrosa-gelatina-veronal como diluyente, exclusivamente.

Cuenta bacteriana.

La cepa de Salmonella typhi H 4795, se sembró en gela-sangre y se incubó a 37°C durante 24 hs; de una de las colonias aisladas obtenidas se sembró una en caldo nutritivo y se incubó a 37°C por 24 hs.

De la suspensión bacteriana se hicieron diluciones de múltiplo serie de 10 a partir de 10^{-1} hasta 10^{-10} ; cada dilución se hizo en un volumen de 1 ml y se sembró 0.1 ml de esta suspensión en agar-tripticosa-soya, incubándose a 37°C durante 48 hs.

Después de ese tiempo se contó el número de colonias presentes mediante la ayuda de un microscopio esteresocópico con aumento de 8X. Para la prueba bactericida se consideró adecuada aquella dilución que desarrollaba entre 30 y 300 co

lonias por caja Petri (esto es, la dilución que presentaba una concentración bacteriana de no más de 3000 col/ml).

Titulación de complemento.

El complemento fué titulado de la manera siguiente: a una serie de 4 tubos conteniendo 0.2 ml de las diluciones del suero de cuy (en múltiplos de 2) y expresados como la re cíproca de la dilución comenzando de 1:10 hasta 1:80 y se les añadió 0.2 ml de un suero hiperinmune de conejo anti-an tígeno somático inactivado y diluído 1:10; 0.2 ml de suspen sión bacteriana conteniendo aproximadamente de 2 a 3×10^3 - colonias/0.1 ml llevando a 1 ml con el diluyente. Los tubos control fueron 4 tubos que contienen lo mismo que los anteriores excepto el suero hiperinmune; el control de la suspen sión bacteriana consistió en 0.2 ml de la dilución de bacterias más 0.8 ml del diluyente. El control del complemento - consistió en 0.2 ml de complemento diluído 1:10 más 0.8 ml - del diluyente.

Se incubaron los tubos a 37°C durante 1 h en baño de agua; después de la incubación se tomaron alícuotas de 0.1 ml de cada dilución y se sembró en agar-tripticosa-soya; incubando a 37°C por 48 hs. La cuenta de microorganismos vivos se - hizo con ayuda de microscopio esteresocópico utilizando el au mento 8X.

El título adecuado de complemento será la dilución que dé el 50% de muerte bacteriana, cuando se compara con el corres pondiente tubo control, esto es, el que no contiene suero hiperper

inmune. Además de que los controles de suspensión bacteriana no difieran más del 15% de los tubos control y el control de complemento no muestre desarrollo bacteriano.

Poder antimicrobiano.

A una serie de tubos conteniendo 0.2 ml de las diluciones variable de 1:10 hasta 1:5 120 expresadas como el recíproco de la dilución de sueros de conejos (en múltiplos de - dos) se les añadieron 0.2 ml de complemento diluído a una dilución determinada como ya se explicó, 0.2 ml de suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente de $2 \text{ a } 3 \times 10^3$ colonias/0.1 ml y llevando a 1 ml con el diluyente. Los tubos control contienen lo mismo que los anteriores excepto el complemento.

El control de suspensión bacteriana consistió en 0.2 ml de dilución de trabajo más 0.8 ml del diluyente; el control de complemento y suspensión bacteriana consistió en 0.2 ml de la dilución de trabajo de la suspensión bacteriana, 0.2 ml de complemento diluído al título óptimo y 0.6 ml de diluyente.

Todos los tubos se incubaron a 37°C por 1 h en baño de agua; pasado el período de incubación se tomaron alícuotas de 0.1 ml de cada dilución y se adicionaron a agar-tripticase-soya, incubándose a 37°C durante 48 hs.

Las cuentas de colonias se efectuó empleando un microscopio esteresocópico con aumento 8X .

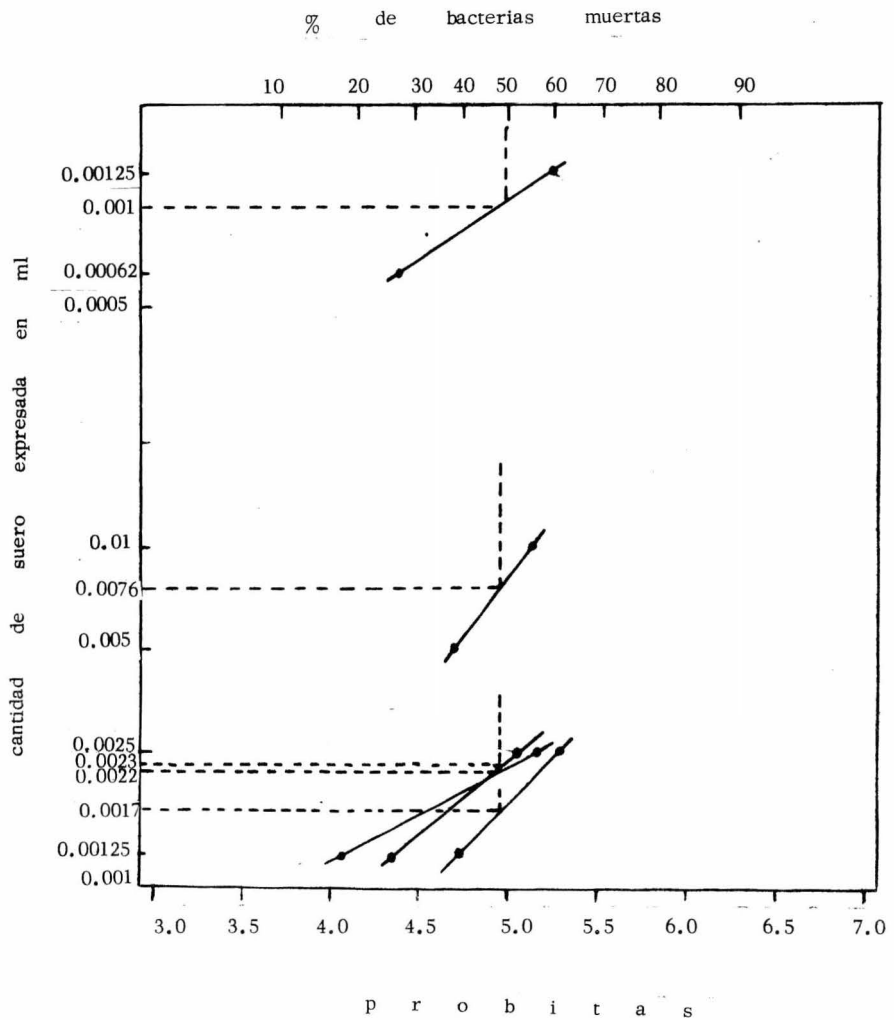
Unidades 50% bactericidas. (UB 50%)

El porciento de bacterias muertas se obtiene al relacionar los resultados de las cuentas bacterianas de los tubos

de prueba (diluciones del suero más complemento más dilución de bacterias) con los resultados del tubo control (diluciones del suero más dilución de bacterias); los porcentajes se graficaron en papel de unidades de probabilidades contra el logaritmo de cantidad de suero (expresada en ml) contenida en la muestra y los puntos obtenidos se unieron dando una línea recta. El punto donde se intersecta ésta con el 50% se extrapoló a las ordenadas "cantidad de suero", obteniéndose así la unidad que producía el 50% de acción bactericida; estas unidades se expresan por ml. de suero haciendo la proporción (27).

GRAFICA 1

DETERMINACION DE LA UNIDAD 50% BACTERICIDA EN SUERO DE CONEJOS



CAPITULO III

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

Los resultados obtenidos al determinar el poder bactericida de los sueros de conejos inmunizados con la vacuna St_1 están concentrados en el cuadro 1. Se expresa como el recíproco de la dilución que mostró poder bactericida cercano al 50%.

En el conejo marcado como 4 el día cero o sea el que corresponde al suero de preinmunización no mostró poder bactericida; a partir del día 7 la dilución cercana que muestra el 50% de poder bactericida fué de 1:10, aumentando gradualmente, así el día 14 la dilución fué de 1:40; el día 21 fué de 1:80 siendo ésta la máxima dilución alcanzada; en el día 28 y 59 la dilución que mostró el 50% de poder bactericida fué menor, siendo en ambos casos de 1:40.

Tomando en consideración los porcentajes obtenidos cercanos al 50% de poder bactericida que corresponden a las diluciones se encuentran en el cuadro 2.

En el conejo 4 la muestra de preinmunización (día cero) no presentó ningún valor; en el día 7 el porcentaje de bacterias que no crecieron fué de 56%, aumentando el día 14 a 57%; el día 21 a 60%, en el día 28 fué de 62% y el día 59 el porcentaje disminuyó a 53%. La representación gráfica de diluciones y porcentajes cercanos al 50% de poder bactericida correspondientes a las muestras del conejo 4 están en la gráfica 2.

Las gráficas que representan los niveles de unidades

CUADRO No. 1

DILUCIONES DEL SUERO DE CONEJO EXPRESADAS COMO RECÍPROCAS
QUE MUESTRAN PODER BACTERICIDA CERCANO AL 50%

CONEJO	DIAS POST VACUNACION					
	0	7	14	21	28	59
4	-	10	40	80	40	40
5	-	20	40	160	40	20
6	10	-	-	10	20	10
8	-	-	160	-	-	160

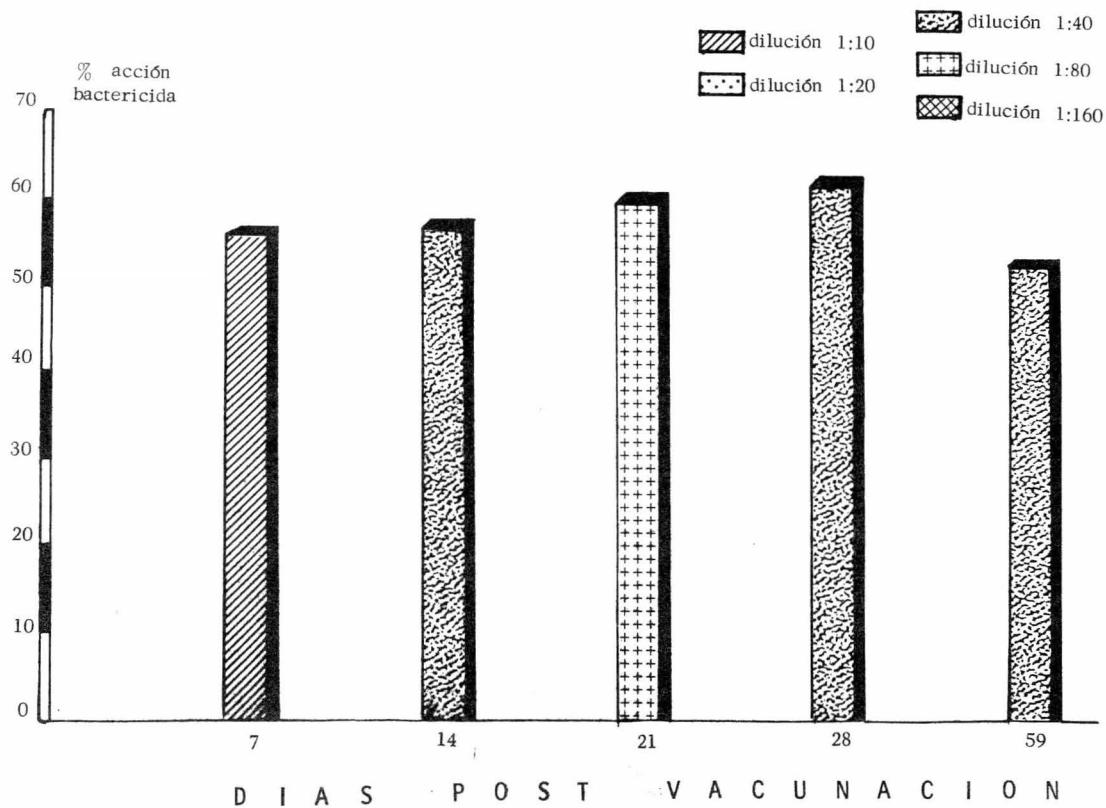
CUADRO No. 2

PORCENTAJES QUE MUESTRAN EL PODER BACTERICIDA CERCANO
AL 50%

CONEJO	DIAS POST VACUNACION					
	0	7	14	21	28	59
4	-	56%	57%	60%	62%	53%
5	-	49%	50%	24%	50%	24%
6	68%	-	-	34%	56%	62%
8	-	-	72%	-	-	56%

GRAFICA 2

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA ACCION BACTERICIDA Y LAS DILUCIONES
DEL SUERO DEL CONEJO 4 EN RELACION AL DIA POST VACUNACION



50% bactericidas tienen escalas de diferente valor así la gráfica 3 y 5 están a una escala que va de 0 a 1 200 unidades, - la gráfica 7 va de 0 a 300 y la gráfica 9 va de 0 a 2 700.

Los datos expresados en unidades 50% bactericidas según el método empleado por Takane (27) fué explicado anteriormente en el capítulo de material y métodos, los datos se encuentran en el cuadro 3.

En la muestra de preinmunización o día cero el suero del conejo 4 no tuvo poder bactericida; en el día 7 se determinó un número de unidades 50% bactericidas de 131 U/ml; el día 14 aumentaron a 450 U/ml y se alcanzó el día máximo el - día donde hubo 1 000 U/ml; a partir del día 28 las unidades 50% bactericidas disminuyeron siendo de 588 U/ml y el día 59 de 434 U/ml.

La representación gráfica de datos de unidades 50% bactericidas correspondientes al conejo 4 están en la gráfica 3.

Los resultados obtenidos en las muestras del conejo marcado como 5 indicaron que en relación a diluciones cercanas al 50% de poder bactericida el día cero o preinmunización tampoco presentó poder bactericida; a partir del día 7 la primera dilución cercana fué de 1:20, aumentando paulatinamente, así, el día 14 fué de 1:40 alcanzando la máxima dilución el - día 21, esto es 1:160; el día 28 la dilución cercana al 50% de poder bactericida disminuyó a 1:40 y el día 59 bajó a 1:20. Estos datos están representados en el cuadro 1.

Los porcentajes correspondientes a estas diluciones en el día cero no se observó ningún valor; en el día 7 el poder bactericida fué de 49%; en el día 14 de 50%; en el día 21 de 24%; en el día 28 de 50% y en el día 59 de 24% (cuadro 2).

Los resultados de diluciones y porcentajes cercanos al 50% de poder bactericida correspondientes al conejo 5 están expresados en la gráfica 4.

La gráfica 5 muestra la representación de los datos del conejo 5 indicados como unidades 50% bactericidas, dichos datos están concentrados en el cuadro 3. En el suero de preinmunización no se detectó ninguna unidad; en el día 7 aparecieron 166 U/ml; se observó un aumento en las dos siguientes muestras siendo en el día 14 de 400 U/ml y en el día 21 de 1 250 U/ml, la representación de estos valores se observan en la gráfica 5; en el día 28 y 59 los valores de unidades 50% bactericidas fueron de 400 U/ml en el 28 y de 125 U/ml en el día 59.

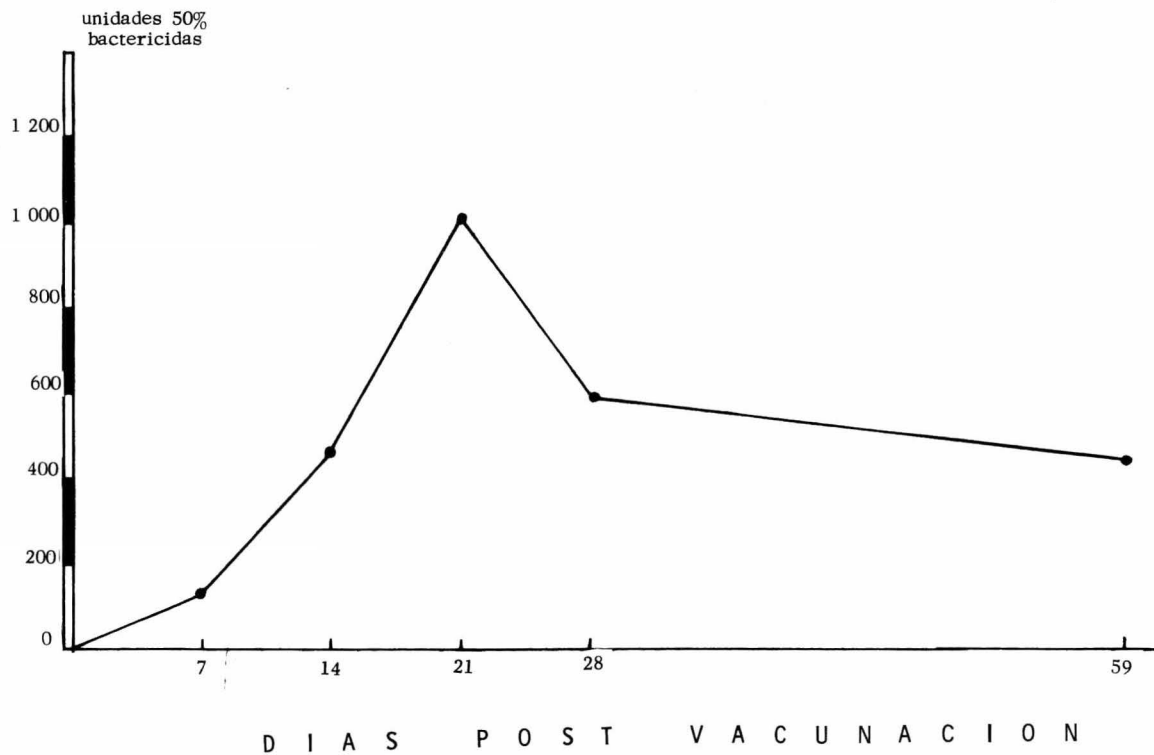
En el conejo marcado como 6 los datos de diluciones cercanos al 50% de poder bactericida fueron en el día cero o suero de preinmunización de 1:10 expresado como la recíproca de la dilución; en el día 7 y 14 no apareció ningún valor, en el día 21 se volvió a obtener dilución cercana al 50% de poder bactericida siendo de 1:10 aumentando a 1:20 el día 28 siendo éste el valor más alto obtenido en dilución; el día 59 la dilución bajó de 1:10.

CUADRO No. 3

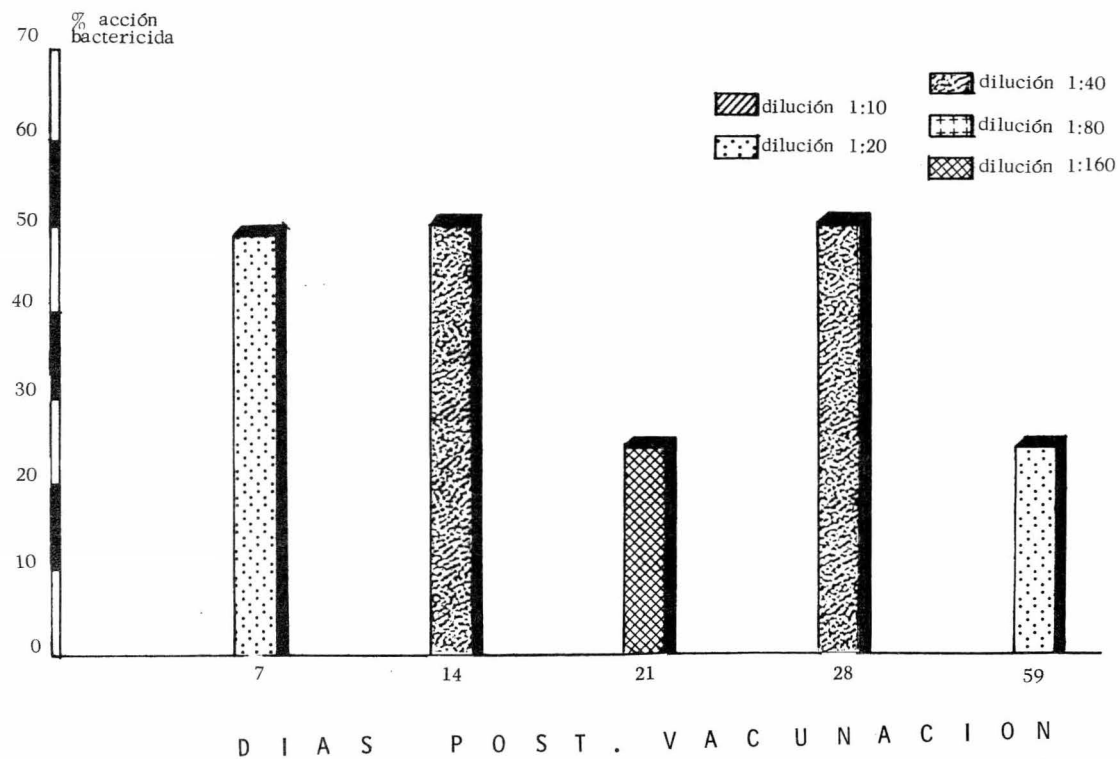
UNIDADES 50% BACTERICIDAS

CONEJO	DIAS POST VACUNACION					
	0	7	14	21	28	59
4	-	131	454	1 000	588	434
5	-	166	400	1 250	400	125
6	111	-	-	90	285	116
8	-	-	2 564	-	-	1896

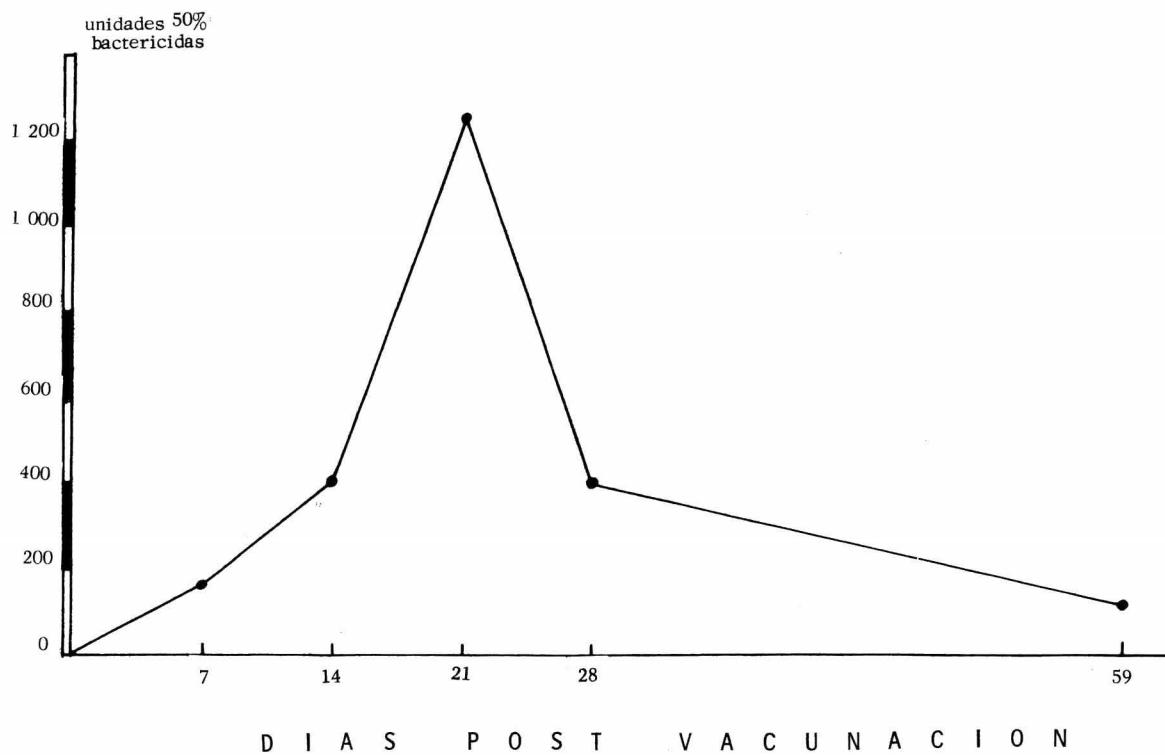
GRAFICA 3
DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 4
CONFORME A LOS DIAS POST VACUNACION



GRAFICA 4
DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA ACCION BACTERICIDA Y LAS DILUCIONES
DEL SUERO DEL CONEJO 5 EN RELACION AL DIA POST VACUNACION



GRAFICA 5
DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 5
CONFORME A LOS DIAS POST VACUNACION



El valor porcentual en el día cero fué de 68% siendo éste el porcentaje más alto de las muestras de suero correspondientes al conejo 5; en los días 7 y 14 no hubo ningún valor; el día 21 reapareció el porcentaje cercano al 50% de poder bactericida siendo de 34%; el día 28 aumentó a 56% y el día 59 a 62%.

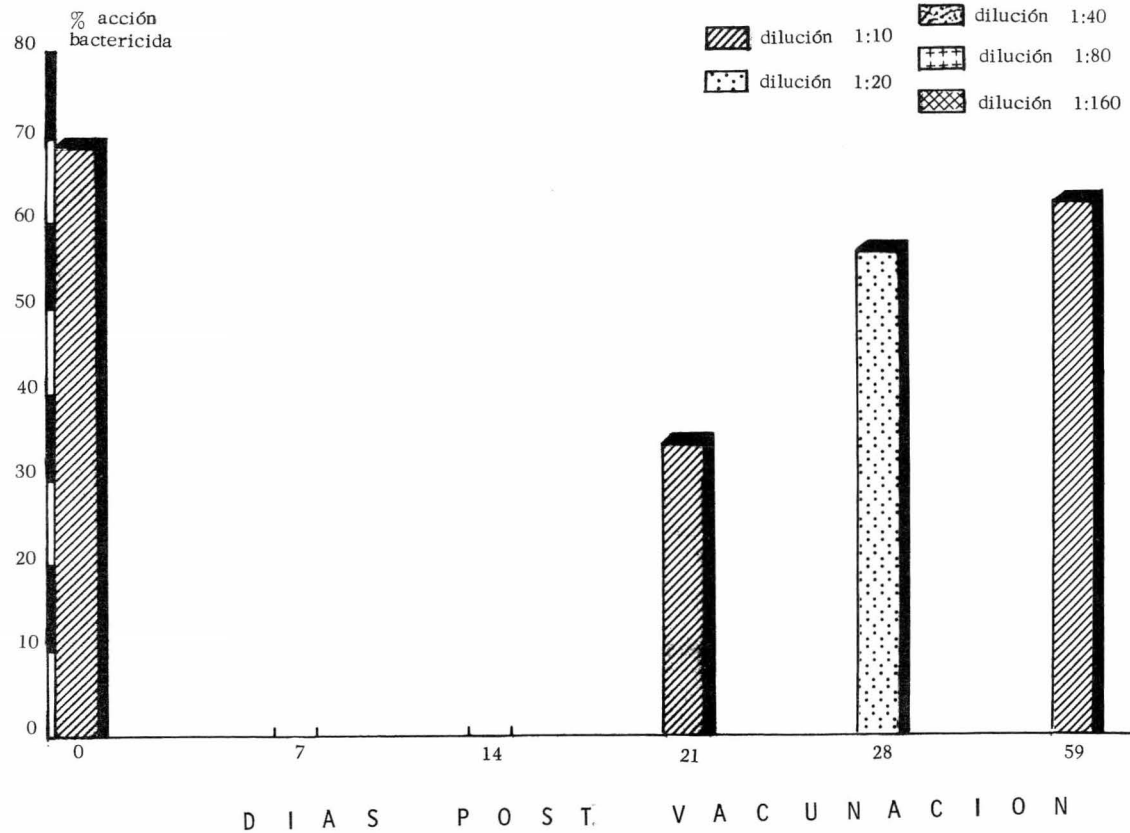
Los datos están concentrados en el cuadro 2 y correspondiente a la gráfica 6. Los datos de dilución y porcentajes cercanos al 50% de poder bactericida del conejo 6.

Los datos de unidades 50% bactericidas (cuadro 3) expresados gráficamente en la gráfica 7 muestran que el día cero o preinmunización las unidades fueron 111 U/ml; desapareciendo los valores el día 7 y el día 14; en el día 21 de 94 U/ml; el día 28 de 285 U/ml que fué el valor más alto obtenido de unidades 50% bactericidas en el conejo 6; en el día 59 las unidades bajaron a 125 U/ml.

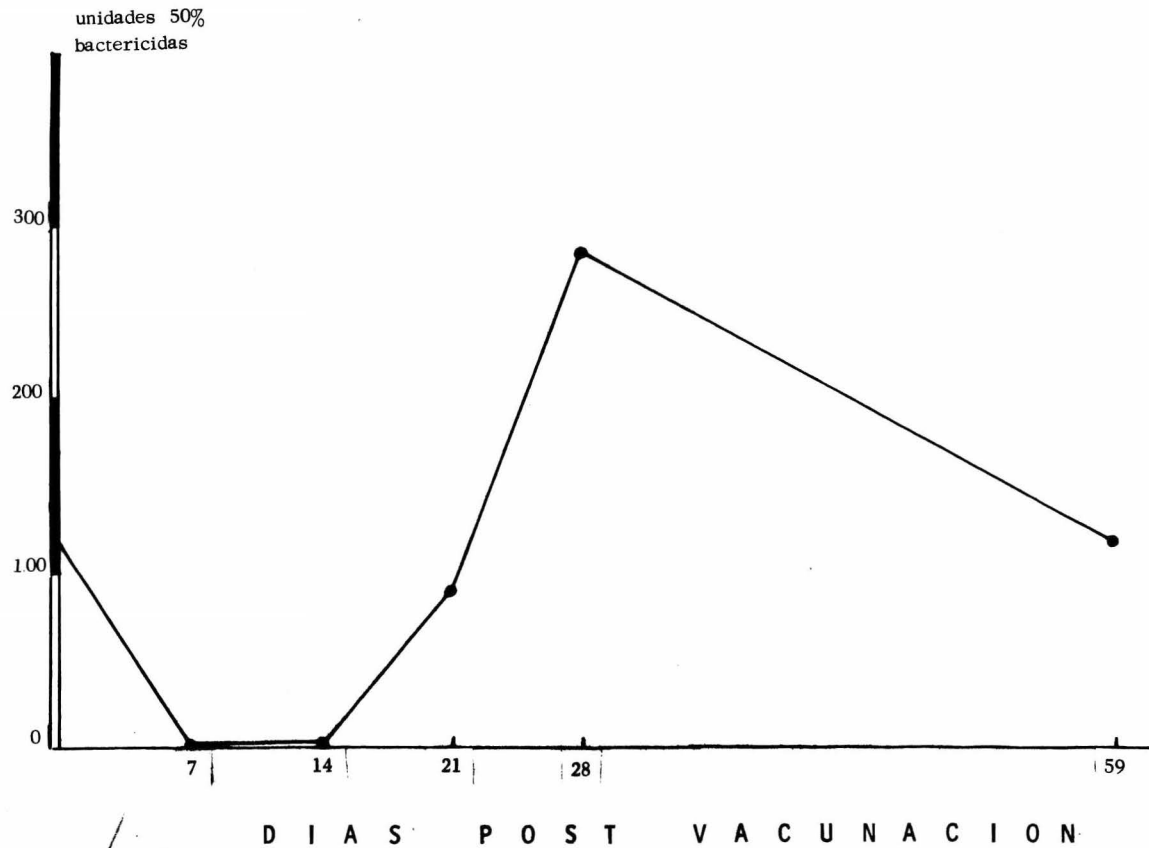
Los datos correspondientes a las muestras del conejo 8 no mostraron en el día cero y el día 7 poder bactericida, en el día 14 la dilución cercana al 50% de poder bactericida fué de 1:160; el día 21 y 28 desaparecen los valores; el día 59 se volvió a obtener dilución siendo de 1:160. En este caso se puede decir que ambas muestras obtuvieron el más alto valor de dilución cercana al 50% de poder bactericida ya que ambas son iguales (día 14 y 59).

Los resultados porcentuales (cuadro 2) no demostraron valores el día cero y el día 7; el día 14 fué de 72% siendo

GRAFICA 6
DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA ACCION BACTERICIDA Y LAS DILUCIONES
DEL SUERO DEL CONEJO 6 EN RELACION AL DIA POST VACUNACION



GRAFICA 7
DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 6
CONFORME A LOS DIAS POST VACUNACION



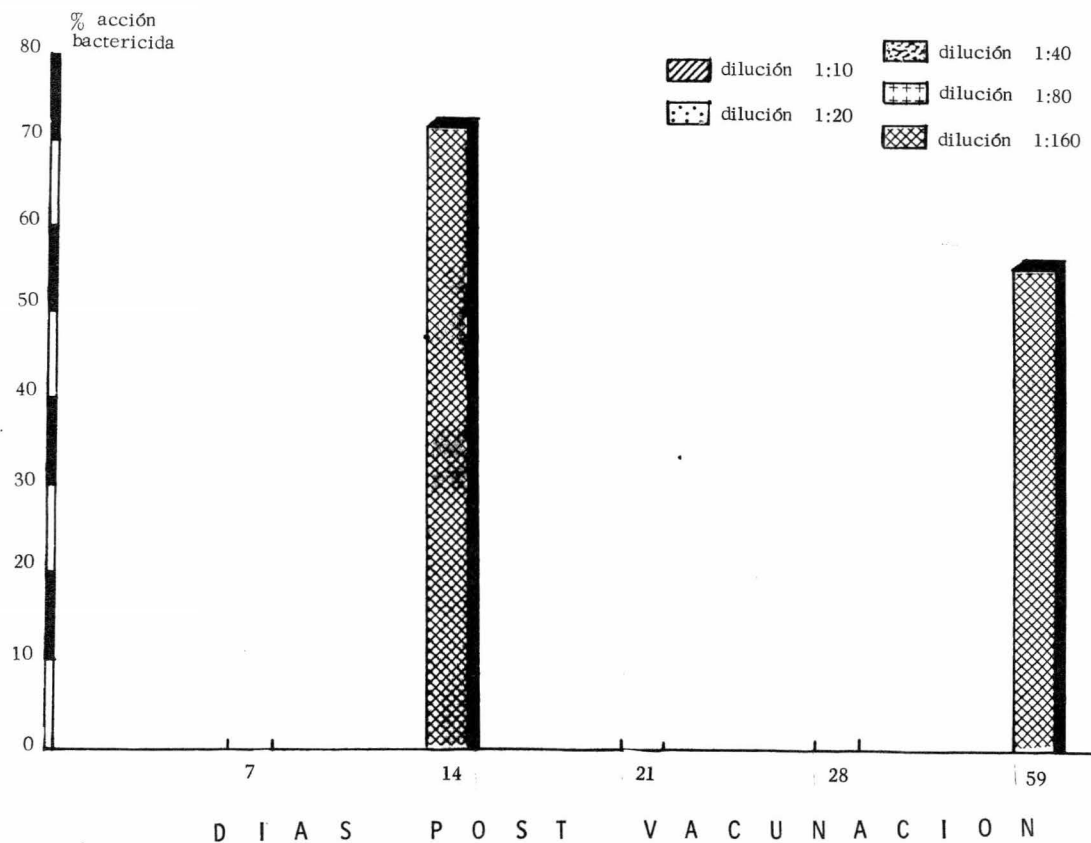
éste el mayor porcentaje alcanzado; el día 21 y el día 28 no apareció ningún valor porcentual y el día 59 fué de 56%.

La gráfica 8 corresponde a los datos obtenidos en el conejo 8 expresados como dilución y porcentajes cercano al 50% de poder bactericida.

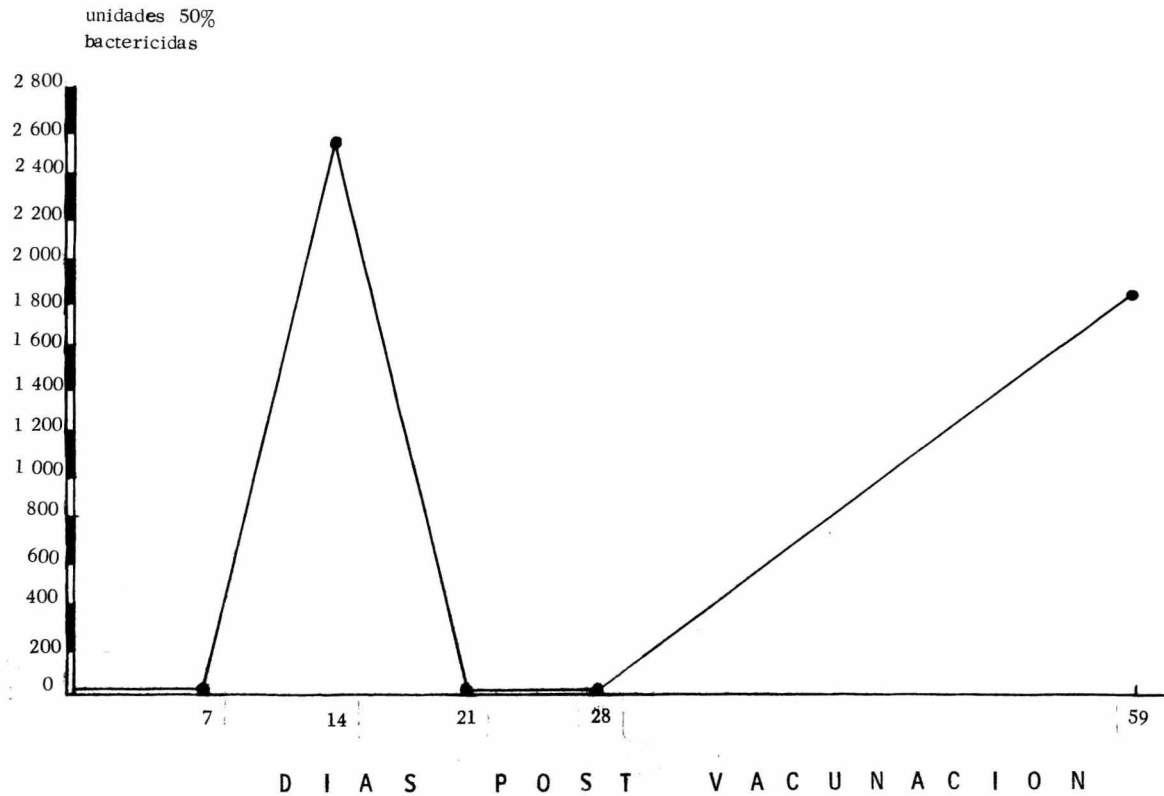
No hubo unidades 50% bactericidas en las muestras del conejo 8 correspondientes a día cero y día 7, pero el día 14 las unidades bactericidas fueron de 2 564 U/ml; en el día 21 y 28 no se observó poder bactericida y en el día 59 de 1 896 U/ ml. La gráfica 9 representa estos datos, concentrados en el cuadro 3.

GRAFICA 8

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA ACCION BACTERICIDA Y LAS DILUCIONES
DEL SUERO DEL CONEJO 8 EN RELACION AL DIA POST VACUNACION



GRAFICA 9.
DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 8
CONFORME A LOS DIAS POST VACUNACION



CAPITULO IV

D I S C U S I O N

DISCUSION

Los resultados obtenidos aparentemente demostraron un poder bactericida semejante, pero si se consideran las deluciones utilizadas, se observa variabilidad. Con el objeto de comparar de una manera más uniforme los resultados, se utilizó la unidad 50% bactericida que es la misma empleada en la determinación de complemento, puesto que se trata del mismo principio o sea, determinar el volumen de un suero que es capaz de destruir el 50% de las células presentes.

Utilizando este sistema, el suero del conejo 4 mostró su mayor actividad el día 21 post-vacunación (gráfica No. 3). En el suero del conejo 5 se observó el mayor poder bactericida también en el día 21 post-vacunación (gráfica No. 5). Por otra parte, los conejos 6 y 8 difieren considerablemente de los conejos 4 y 5. El suero del conejo 6 mostró su mayor concentración de sustancias bactericidas 28 días post-vacunación siendo que éste fué el único animal que presentó sustancias bactericidas (111 UB 50%) antes de la administración del antígeno. Quizá este retraso en alcanzar el valor máximo bactericida se deba a eliminación del antígeno o a formación de complejos inmunes que no actúen antigénicamente como Salmonella typhi.

El conejo 8 presentó su nivel bactericida más alto en el día 14 post vacunación disminuyendo ese nivel para el día 21, cuando no hubo poder bactericida. No se considera que esta ausencia de poder bactericida pueda ser un error en la de-

terminación ya que 7 días después (día 28) persiste el valor de cero. Sin embargo, en este animal el poder bactericida, en el día 59 es casi de la misma magnitud que el del día 14. Se piensa que esta respuesta tardía sea individual, o quizá se deba a que estén presentes anticuerpos de una avidéz mayor para las bacterias, que las destruyan o bien debido a un fenómeno de prozona según Norman (20). Este fenómeno de prozona ha sido observado por este anterior (20) cuando los títulos de anticuerpos son elevados, esto sucede en el caso - del conejo 8 como lo demuestran los resultados de Salazar - (28) quien empleando los mismos sueros del presente estudio investigó la presencia de aglutininas somáticos y flagelares, así en el día 14 hay un valor de 2 564 UB 50% y sin embargo la recíproca del título de la aglutinación es 8 veces menor que en el día 7 no sucediendo ésto en los conejos 4 y 5 y ni en el 6 ya que no disminuye sino que se eleva. La relación existente entre este fenómeno y la presencia de anticuerpos resistentes a sustancias reductoras no es posible hacerla ya que se trabajó únicamente con sueros no tratados.

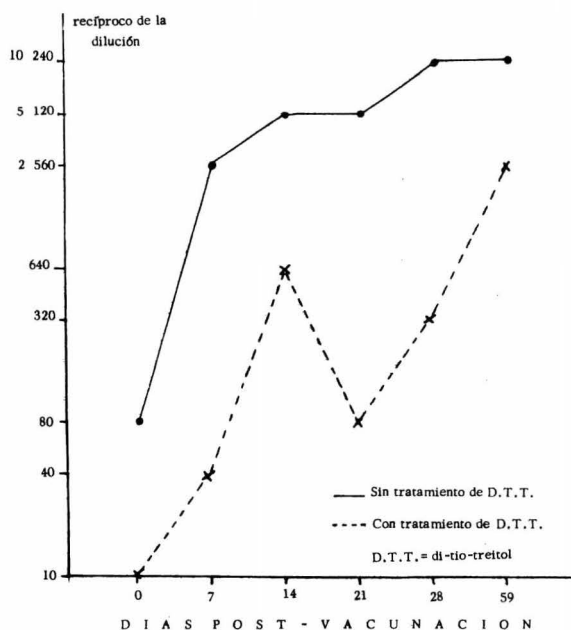
Esta ausencia de poder bactericida no incapacita al conejo 8 que en el día 59 post vacunación alcance un valor de 1 896 UB 50%. También hay que considerar que quizá se trate de anticuerpos dirigidos a un antígeno específico ya que se observan anticuerpos al antígeno 9 de Salmonella typhi que son de menor poder bactericida (4). Este mecanismo probable

mente es importante para obtener una mayor elevación de sustancias bactericidas en el suero de un animal inmunizado. - También podría pensarse en anticuerpos de actividades biológicas diferentes, como lo señala Schulkind y colaboradores - (29), en la respuesta secundaria en animales inmunizados con bacterias vivas a una concentración de 10^{10} , siendo mucho más efectivos como protectores estos anticuerpos en la respuesta secundaria.

El comportamiento del conejo 6 en los días 7 y 14 se debe posiblemente a una inhibición de síntesis de anticuerpos bactericidas o sustancias bactericidas, como ha sido demostrado previamente por Schulkind (29). Otra posibilidad podría ser que los anticuerpos presentes en el suero del mismo conejo (Salazar (28)) tuvieran un efecto inhibidor de la sección bactericida como ha sido demostrado por Norman (30). Se piensa que esto último sea factible ya que Salazar encontró disminución de los anticuerpos resistentes al ditiotreitol (D.T.T.) hacia el día 21 pero no en los conejos 4 y 5 que no presentan inhibición del poder bactericida. Norman no señala este efecto en sueros hiperinmunes sino sólo en sueros normales. Por último, también podría pensarse en la presencia de un inhibidor que afectara únicamente la respuesta bactericida sin tener efecto en la síntesis humoral.

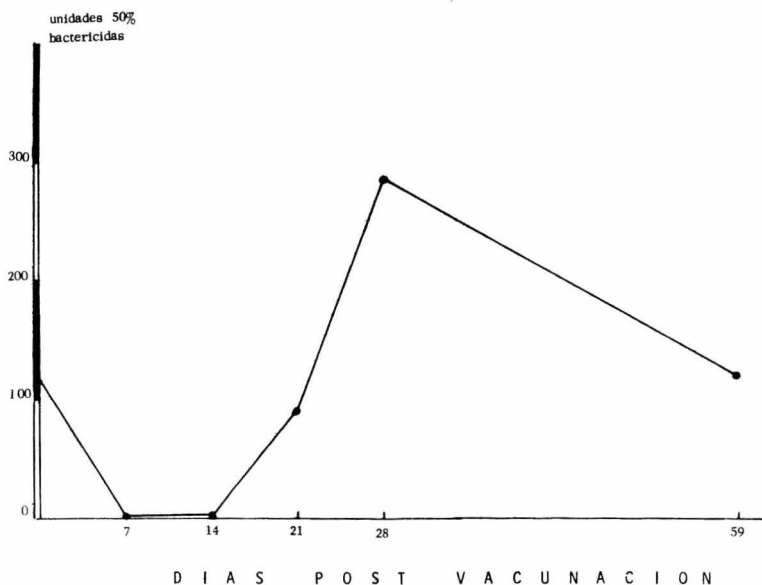
Los resultados de Salazar muestran curvas muy semejantes en los conejos 4 y 5. Si se relacionan los títulos de anticuerpos no susceptibles a sustancias reductoras (probablemen

TITULOS DE LA AGLUTINACION SOMATICA DEL SUERO
DEL CONEJO 6 EXPRESADOS COMO LA RECIPROCA DE
LA DILUCION CONFORME A LOS DIFERENTES DIAS -
POST - VACUNACION.



Tomadas de Salazar (1976).

GRAFICA 7
DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 6
CONFORME A LOS DIAS POST VACUNACION



te pertenecientes a la clase 7S) y los del presente estudio, se puede suponer que el poder bactericida sea debido a anticuerpos de la clase 19S y no de la clase 7S, es decir, anticuerpos susceptibles a sustancias reductoras, con gran actividad bactericida. Se sugiere la conveniencia de efectuar un estudio con sueros tratados con ditiotreitól (D.T.T.) para determinar si el poder bactericida de esos anticuerpos o sustancias presentes en el suero son capaces de resistir la acción del agente reductor.

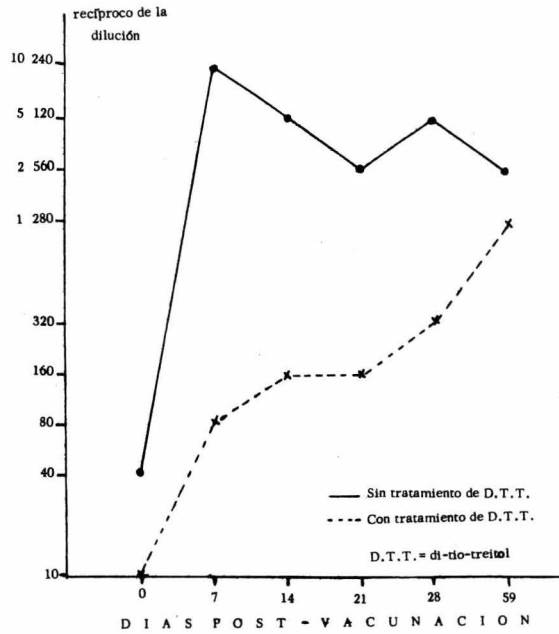
Quizá en los conejos 4, 6 y 8 (antes de la vacunación) según los datos de Salazar (28) la presencia de anticuerpos susceptibles a sustancias reductoras parecen no tener poder bactericida excepto en el caso del conejo 6. Esto no se refiere al conejo 5 ya que en éste no hubo anticuerpos aglutinantes.

También podría pensarse que la inhibición del poder bactericida (conejo 6 y 8) es debida a la ausencia de anticuerpos a un determinado receptor bacteriano por competencia en la síntesis de ellos (31).

Es importante dilucidar en cada uno de esos animales cuál de los dos mecanismos de acción del complemento está involucrado. El clásico de reacción de los 11 componentes del complemento o el del camino alterno (15).

O si mediante la sensibilización pasiva en conejos inmunizados del mismo modo se demuestra una inhibición del poder bactericida y tratar de relacionar ésta a una especifi

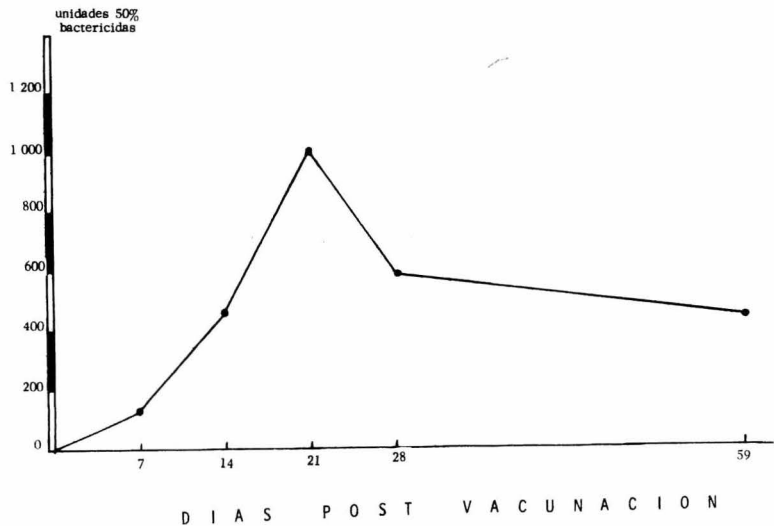
TITULOS DE LA AGLUTINACION SOMATICA DEL SUERO
DEL CONEJO 4 EXPRESADOS COMO LA RECIPROCA DE
LA DILUCION CONFORME A LOS DIFERENTES DIAS -
POST - VACUNACION.



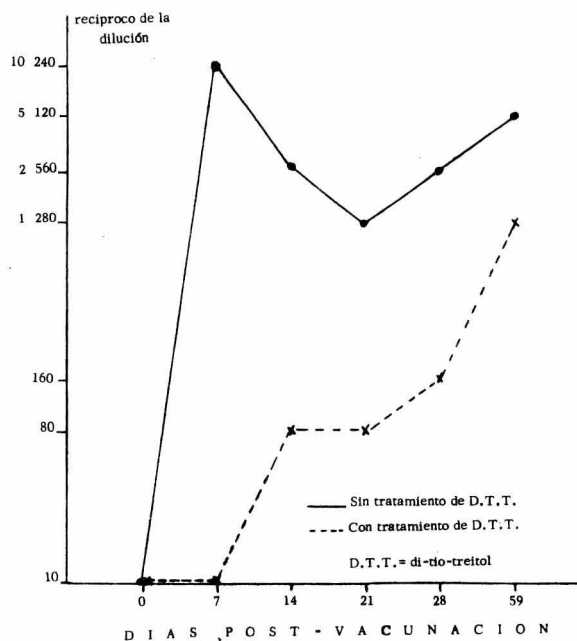
Tomadas de Salazar (1976).

GRÁFICA 3

DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 4
CONFORME A LOS DIAS POST VACUNACION



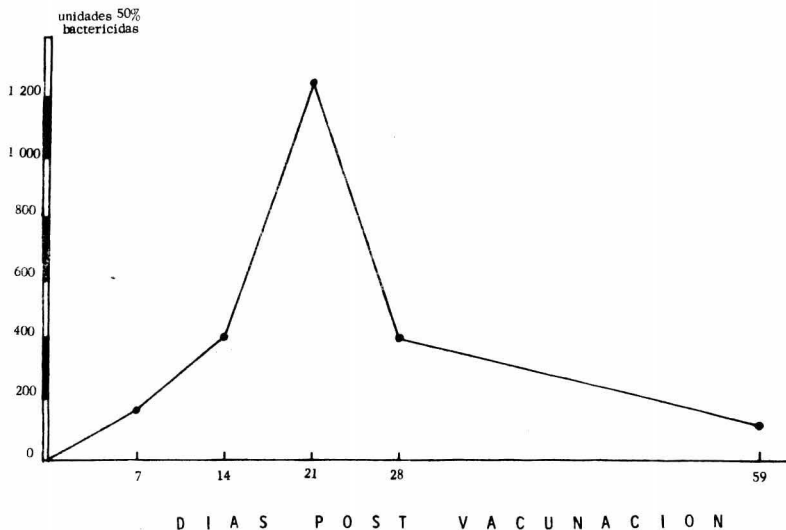
TITULOS DE LA AGLUTINACION SOMATICA DEL SUERO
DEL CONEJO 5 EXPRESADOS COMO LA RECIPROCA DE
LA DILUCION CONFORME A LOS DIFERENTES DIAS -
POST - VACUNACION.



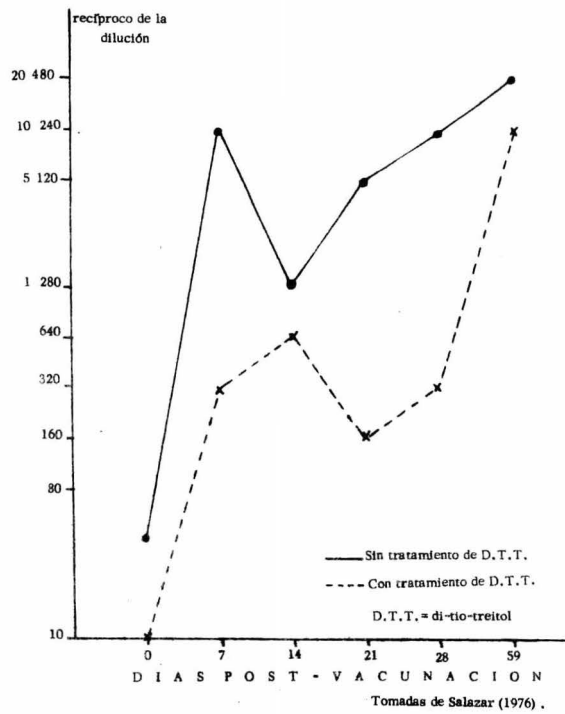
Tomadas de Salazar (1976).

GRAFICA 5

DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 5
CONFORME A LOS DIAS POST VACUNACION

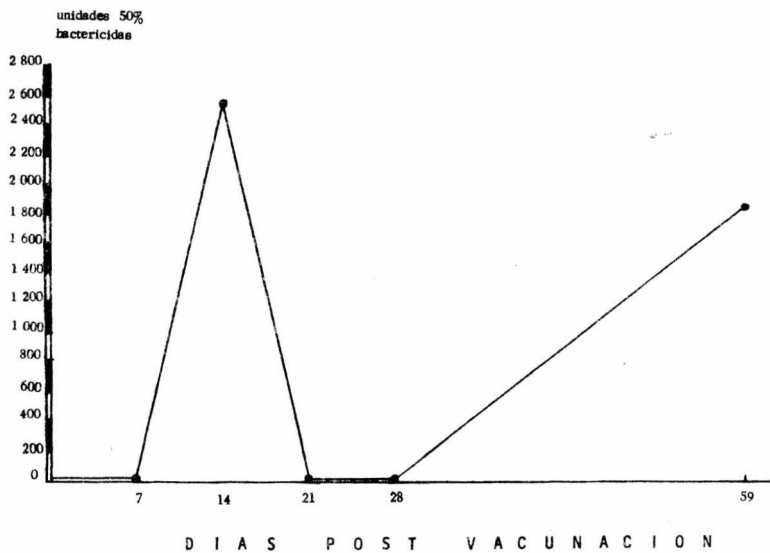


TÍTULOS DE LA AGLUTINACIÓN SOMÁTICA DEL SUERO
DEL CONEJO 8 EXPRESADOS COMO LA RECÍPROCA DE
LA DILUCIÓN CONFORME A LOS DÍFERENTES DÍAS -
POST - VACUNACIÓN .



GRAFICA 9 .

DISTRIBUCIÓN DE LAS UNIDADES 50% BACTERICIDAS EN EL SUERO DEL CONEJO 8
CONFORME A LOS DÍAS POST VACUNACIÓN



cidad determinada. Así como también determinar la relación que pudiera encontrarse entre respuesta inmune de ribosomas - que contengan determinantes antigénicos y que fueran capaces de producir sustancias bactericidas durante la inmunización (33).

Por último, este estudio debería complementarse con la administración después de la inmunización y a diferentes intervalos de dosis orales y parenterales de Salmonella typhi viva a animales susceptibles a este agente, para determinar si esos anticuerpos bactericidas son realmente protectores. Una alternativa sería tratar de determinar, en ratones o en conejos, si las bacterias administradas sobreviven en animales control y en animales inmunizados con este antígeno.

Este trabajo está dirigido a determinar si la vacuna de Salmonella typhi preparada en la forma que se indicó anteriormente es capaz de producir la aparición de "poder bactericida" en el suero de conejos inoculados con ella. Consideramos de importancia tratar de definir el papel que juegan estas sustancias bactericidas en la defensa contra los microorganismos patógenos, puesto que hasta ahora sólo se conoce su efectividad "in vitro".

RESUMEN

Se determinó el poder bactericida en los sueros de conejos inmunizados con vacuna preparada a partir de una cepa epidémica autóctona de Salmonella typhi expresándolo como unidades bactericidas 50% (UB 50%).

Después de graficar el número de unidades bactericidas, dos de los conejos (4 y 5) presentaron curvas muy semejantes que alcanzaron su valor máximo 21 días después de la tercera vacunación.

El conejo 6 difirió de éstos en que presentó su valor máximo 7 días después que los conejos 4 y 5 debido probablemente a la presencia de sustancias bactericidas antes de la inmunización. Se propone para este retraso una serie de eventos.

El conejo 8 presentó una respuesta diferente en la que se aprecia un fenómeno de prozona según Normann (20) - que se piensa da como resultado la producción de títulos más elevados de sustancias bactericidas.

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

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Landy, M.: Enhancement of the immunogenicity of typhoid vaccine by retention of the Vi antigens. Am. J. Hyg - 58: 148-152, 1953.
- 2.- DuPont, H.L., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P., and Woodward, T.E.: IMMunity in typhoid fever: Evaluation of live streptomycin-dependent vaccine. Antimicrob. Ag. Chemother. 236-239, 1970.
- 3.- Rowley, D.: Antibacterial action of antibody and complement. J. Infec. Dis. 128: 170-175, 1973.
- 4.- Daguiillard, F. and Edsall, G.: The agglutinating and bactericidal activity of IgM and IgG antibodies to the 9 and 12 factors of Salmonella typhi 0 901. J. Immunol. 100: 1112-1120, 1968.
- 5.- Gil Mercado, J.: Respuesta inmune secretora en fiebre tifoidea. Tesis Post grado en Pediatría. I.M.A.N. 1971-1974.
- 6.- Dubos, R. and Hirsh, J.G.: Bacterial and mycotic infection of man. 3a. Ed. Lippincott Company. Philadelphia Toronto 614-634, 1965.
- 7.- Jawets, E., Melnick, J.L., Adelder, E.A.: "Manual de Microbiología Médica" 4a. Ed. El Manual Moderno. México 235, 1970.
- 8.- Ruiz Castañeda, M.: "Pruebas emergentes de laboratorio" Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México. 13-24, 1970.

- 9.- Scragg, J.N., Rubidge, J.: Trimethopirin and sulphamethoxazole in typhoid fever in children. Brit. Med. J. 3: 738-741, 1971.
- 10.- Gómez Barreto, N.: Evolución de la eficiencia terapéutica de la Amoxicilina y Gentamicina en pacientes con fiebre tifoidea. Tesis de Post grado en Pediatría. 1973.
- 11.- Overtuf, G.: Antibiotic resistance in typhoid fever. New. Eng. J. Med. 289: 463-469, 1973.
- 12.- Vázquez, V. Studies on immune response in rabbits and mice to lipopolisacharides of Salmonella typhosa. Ph.D. Dissertation. 1965.
- 13.- Chernokvostova, E.: Study on the production on IgG, IgA and IgM antibodies to somatic antigens of Salmonella typhi in humans. Clin. Exp. Immunol. 4: 407-421, 1969.
- 14.- Myrvick, Q.N., and Weiser, R.: Studies on antibacterial factors in mamalian tissues and fluids. J. Immunol. 74: 9-16, 1954.
- 15.- Normann, B., Stendall, O., Tagesson, Ch. and Edebo, L.: Characteristics of the inhibition by rabbit immune serum of the bactericidal effect of cattle normal serum on Salmonella typhimurium 395 MRO. Acta Path. Microbiol. Scand. 80: 891-899, 1972.
- 16.- Chedid, L., Parant, M., Parant, F., and Boyer, F. : A proposed mechanism for natural immunity to enterobacterial pathogenes. J. IMMunol. 100: 292-301, 1968.
- 17.- Reynolds, B.L., and Rowley, D.: Sensitization of comple

- ment resistant bacterial strains. Nature 221: 1259-1261, 1969.
- 18.- Rowley, D. and Turner, K.J.: Passive sensitization of *Salmonella adelaide* to the bactericidal action of antibody and complement. Nature. 217: 657-658, 1968.
- 19.- Reynolds, B.L., Pruul, H.: Sensitization of complement resistant smooth gram negative bacterial strains. Infect. Immun. 4: 764-771, 1971.
- 20.- Normann, B.L.: Inhibition by rabbit anticardial IgG of the bactericidal effect on *Salmonella typhimurium* 395 Scand. 80: 140-148, 1972.
- 21.- Wong, K.H., Feeley, J., Northrup, R.S. and Forlines, M.E.: Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever. Infect. Immun. 2: 348-353, 1974.
- 22.- Felix, A. and Pitt, R.M.: The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigens constituents. J. Hyg. 42: 92-110, 1915.
- 23.- Hofnick, R.B., Greisman, S.E., Woodward, T.E. Dupont, H.L., Dawkins, A.T. and Snyder, M.J.: Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. New. Eng. J. Med. 283: 686-691, 1970.
- 24.- Wahdan, M.H., Sippel, J.E., Mikhail, I.A., Rahka, A.E., Anderson, E.S., Sparks, H.A. and Cvjetanovic, B.: Controlled field trial of a typhoid vaccine prepared with a nonmotile mutant of *Salmonella typhi* Ty2. Bull. World Health Organ. 52: 69-73, 1975.

- 25.- Edwards, E.A., Johnson, D.P., Pierce, W.E. and Peckinpugh, R.O.: Reactions and serologic response to monovalent acetone-inactivated typhoid vaccine and heat-killed TAB when given by jet injection. Bull. World Health Organ. 51:501-505, 1974.
- 26.- Tapa, S. and Cvetanovic, B.: Controlled field trial on the effectiveness of one and two doses of acetone-inactivated and dried typhoid vaccine. Bull. World Health Organ. 52: 75-80, 1975.
- 27.- Takane, W.J. Dr.: Factores humorales inmunitarios inespecíficos del suero y estado nutricional: Bétalisina y Muramidasa. Tesis Pediátrica. Hospital Infantil de México. 1966-1969.
- 28.- Salazar, Hernández, M.: Respuesta inmune a Salmonella typhi en conejos, detectada por aglutininas sensibles al ditiotreitól D.T.T. Tesis Universidad Motolinia. 1976. U.N.A.M.
- 29.- Schulkind, M.L., Kathryn, K., Herzberg, M. and Robbins, J.B.: The specific secondary biological activities of rabbit IgM and IgG ant-Salmonella typhimurium "O" antibodies isolated during the development of the immune response. Immunology. 23: 159-170, 1972.
- 30.- Normann, B., Schenstrom, O. and Edebo, L.: The antibacterial effect of rabbit antiserum on the killing of a smooth strain of Salmonella enteritidis by cattle normal serum. Acta. Path. Microbiol.Scand. 81:203-206, 1973.

- 31.- Reynolds, B.L. Rother, U.A. and Rother, K.O.: Interaction of complement components with a serum-resistant strain of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 11:944-948, 1975.
- 32.- Molinari, J.L. and Lascardi, C.: Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with fractions of *Salmonella typhimurium*. *Rev. Lat.Amer. Microbiol.* 16: 189-197, 1974.