

## METABOLISMO DE LOS ANTIGENOS DE SALMONELLA TYPHI ADMINISTRADOS POR VIA ORAL

Auramarina Villalobos de Roldán\*, Francisco Rodríguez C.\*\*,  
Fernando García T.\*\* y Jesús Kumate R.\*\*

### RESUMEN

Se realizó el estudio del metabolismo de los antígenos 9,12 de *Salmonella typhi* administrados por vía oral, para determinar si estos antígenos eran capaces de estimular el sistema inmune e inducir la producción de anticuerpos, y para saber si éstos tenían o no capacidad bactericida.

Se estudiaron 19 niños en edad escolar, a 8 de ellos se les administró una dosis única de la vacuna, a 4 se les dió doble dosis en una sola toma y los 7 restantes sirvieron como testigos.

En los 2 grupos que recibieron la vacuna, se pudo demostrar: 1.- Que el LPS 9,12 se eliminaba tanto por las heces como por la orina. La eliminación urinaria del antígeno indica su absorción a través del tracto digestivo, su paso a la circulación y posteriormente su eliminación renal. 2.- Que hubo buen estímulo del sistema inmunocompetente, como lo indicó el aumento en el título de anticuerpos séricos específicos contra *S. typhi*. 3.- Que estos anticuerpos séricos mostraron

\* Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

\*\* Laboratorio de Inmunoquímica, Hospital Infantil de México, México, D.F.

actividad bactericida, es decir, fueron capaces de lisar bacterias en presencia de complemento.

Faltaría demostrar si estos anticuerpos son protectores o no *in vivo*, y determinar si la profilaxis por vía oral ofrece probabilidades de alcanzar el nivel de inmunidad efectiva que se desea.

## INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es una grave enfermedad producida por *Salmonella typhi*. En ciertos países presenta características endémico-epidémicas relacionadas con el saneamiento ambiental, aprovisionamiento de agua potable, disposición de excretas, control efectivo de la calidad sanitaria de leches, refrescos, alimentos, particularmente aquellos que se consumen crudos o que están sujetos a un manejo inadecuado después de su cocción como los mariscos (24). Por esto, las medidas de saneamiento ambiental son las más efectivas y persistentes para lograr una disminución de la frecuencia con que se ven los casos de tifoidea; sin embargo, también se puede observar lo difícil que resulta el prevenir estos casos cuando la transmisión no se hace mediante estas vías. Por todo esto, se considera que la inmunización masiva podría tener un efecto más inmediato y en todo caso se obtendría, junto con los progresos en saneamiento, un efecto acumulativo (5).

En 1897 Wright (18), preparó una vacuna inactivada con calor a 60°C y preservada con fenol, la cual fue administrada por vía sub-cutánea en dos dosis con un intervalo de 8 a 14 días; estas dosis contenían 750 a 1000 millones de bacterias la primera y 1500 a 2000 millones la segunda. Con ella se logró obtener una disminución tanto de la morbilidad como de la mortalidad y se estimó que la inmunidad persistía por un mínimo de 3 años, observándose frecuentes reacciones post-vacunales.

Luego Pfeiffer y Kolle (21), prepararon una vacuna inactivada también por el calor, pero a 56°C y fenolada, con una concentración de bacterias ajustadas a 1500 millones y la cual fue aplicada en dos dosis a intervalos de 8 a 10 días. Esta vacuna fue probada en Africa, observándose como resultado una disminución significativa de la morbilidad y atenuación marcada de los síntomas en individuos vacunados que sufrieron la infección.

Desde entonces se han venido ensayando en varios países vacunas semejantes a las citadas o con ciertas modificaciones en cuanto a dosis, vía de administración, procedimiento para inactivarlas, etc; incluso extrayendo

fracciones de los bacilos con el fin de purificar más los antígenos protectores, obteniéndose resultados muy diversos (Tabla I).

**TABLA I**  
**TIPOS DE VACUNAS UTILIZADAS PARA INMUNIZACION**  
**EN FIEBRE TIFOIDEA**

Vacunas de células completas		Vacunas libres de células (extractos, fracciones químicas)	
Tipo	Presentación	Tipo	Presentación
Inactivada con acetona (16, 17, 31, 46)	Seca	Grasset (17, 32, 41) congelación descongelación	Adsorbida
Inactivada con calor y fenol (37, 48)	Líquida Liofilizada Adsorbida	Boivin (4, 43) Ácido tricloroacético	Adsorbida
Inactivada con formaldehído, y preservada con fenol (40)	Líquida Liofilizada Adsorbida	Topley-Raistrick (45) Tripsina	Adsorbida
Inactivada con alcohol (13)	Líquida Liofilizada Adsorbida	Westphal (47) fenol-agua	Adsorbida
Vacuna con Cromo	Líquida		

Tomado de Joo I: "Present Status and Perspectives of Vaccination against Typhoid Fever" Ref. 26.

Dado que existían numerosas opiniones contradictorias acerca de la efectividad de la vacuna tífica, se llegó a la necesidad de efectuar una evaluación completa y en gran escala de dicha vacuna. La Organización Mundial de la Salud se propuso llevar a cabo estudios de campo, los cuales se efectuaron en Yugoslavia entre 1960-1963 (49); en Guayana entre 1960-1967 (1, 2); en Polonia entre 1961-1964 (38, 39) y en la Unión Soviética entre 1962-1965 (20).

Las conclusiones de estas pruebas de campo fueron sintetizadas por Joo (26): 1.— La vacuna inactivada por acetona fue regularmente más potente que los otros tipos de preparaciones, aunque la vacuna inactivada con calor y fenol le siguió de cerca en cuanto a su valor protector. 2.— La

vacuna inactivada por alcohol fue menos potente que las anteriores. 3.— Las vacunas químicas (libres de células) fueron muy variables en cuanto a su poder protector. Las pruebas de campo realizadas en la Unión Soviética y Polonia demostraron que la de tipo Topley-Raistrick adsorbida fue la mas potente de ellas; pero esta potencia apenas alcanza a la de la vacuna inactivada con alcohol. La de tipo Grasset adsorbida fue menos inmunogénica. Las vacunas tipo Westphal adsorbidas fueron practicamente ineficaces. 4.— La duración de la protección puede calcularse cautelosamente entre 3 y 4 años después de la inmunización con las vacunas inactivadas con acetona y calor; 1 a 2 años en el caso de las vacunas inactivadas con alcohol; y 1 año para aquellas vacunas de fracciones libres de células. 5.— El grado de efectividad es de alrededor de 70-85% para las acetonzadas e inactivadas por fenol y calor; 60-70% para las alcoholizadas o las vacunas llamadas químicas. 6.— Ciertos resultados sugieren que aún una dosis de las vacunas acetonzadas y fenoladas confiere protección bastante aceptable, pero el grado de efectividad fue inferior y su duración mas corta que cuando se emplea el esquema de dos dosis. 7.— El uso de adyuvantes aparentemente no incrementa en forma apreciable la efectividad de la vacuna.

También es de importancia anotar el tamaño del inóculo en relación a la protección post-vacunal y así vemos que Hornick y col. (22-24) observaron que la vacuna no confiere protección cuando la DI (dosis infectante) es de  $10^6$  ( $DI_{100}$ ) ó  $10^7$  ( $DI_{50}$ ); pero si lo hace cuando la dosis es de  $10^5$  ( $DI_{25}$ ) bacterias. La dosis considerada más común en la infección natural es de  $10^5$  bacterias, aunque esto está en función de la virulencia de la cepa; cuando la cepa es de extraordinaria virulencia la protección conferida por la vacuna es menor, al grado de no impedir la infección.

También Hornick y col. (22-24) demostraron la intervención del antígeno VI en la virulencia de la cepa infectante.

Es también conveniente hacer mención de las otras vacunas orales contra enfermedades bacterianas. Este método no es nuevo, ya que fue propuesto hace más de 7 décadas, sin embargo sólo se ha utilizado en forma esporádica desde entonces y no tiene todavía un apoyo experimental tan sólido como el de las vacunas parenterales. El éxito obtenido con la vacuna antipoliomielítica viva ha sido indudablemente un poderoso estímulo para plantear de nuevo la cuestión de la vacuna oral contra las principales enfermedades bacterianas del intestino en el hombre: fiebres entéricas, shigelosis, cólera, etc. Por esto, es conveniente investigar más a fondo este método de inmunización, sobre todo porque en la actualidad, ninguna de las vacunas parenterales contra las infecciones bacterianas entéricas es plenamente satisfactoria, ya que estas vacunas tienen efectos colaterales

indeseables y sobre todo el costo de su empleo para inmunizar a la población más expuesta resulta excesivo. Mientras que los métodos de inmunización oral son menos costosos y representan una carga menos pesada para los servicios de salud pública. Por lo tanto, hay que determinar todavía si pueden ser por lo menos tan eficaces como las vacunas actualmente utilizadas, si producen una protección más duradera y si su administración es menos peligrosa, porque sería mayor la utilidad que se lograría al introducir los gérmenes por su vía habitual de entrada; más aún si tomamos en cuenta la importancia que se le da en la actualidad a la inmunidad local mediada por anticuerpos IgA secretores (9, 25, 27, 32, 33).

A pesar de que la fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica, su puerta de entrada es el intestino, por ello es de esperar que esa enfermedad, al igual que la poliomielitis, sea controlada por mecanismos inmunitarios que actúen a nivel intestinal o en los tejidos inmediatos.

Además, está plenamente comprobado que la inmunización por vía oral puede producir una buena respuesta de anticuerpos tanto de secreción como humorales, aún cuando las experiencias de Hornick y col. (22, 24), efectuadas en voluntarios humanos, contradicen a los autores que proclaman el éxito de las vacunas orales, ya que según ellos el valor protector de ésta fue muy bajo.

Mayores posibilidades parecen tener las vacunas orales elaboradas con bacilos vivos atenuados, como las cepas estreptomycinodependientes empleadas por Cvjetanovic y col. en 1970 (6).

Este trabajo trata de aportar un conocimiento más a la literatura acumulada en relación a la vacuna oral para la tifoidea. Sin embargo su finalidad no está enfocada a determinar la eficiencia y utilidad de la misma, sino más bien al estudio de la absorción y eliminación de los antígenos administrados y su capacidad para estimular al sistema inmunocompetente.

## MATERIAL Y METODOS

El material estuvo constituido por 19 niños, 10 del sexo masculino y 9 del sexo femenino, todos en edad escolar. Ninguno tenía antecedentes de fiebre tifoidea o vacunación para la misma, y todos tuvieron coprocultivo y reacciones febriles negativas antes del estudio.

A 8 de ellos se les administró una dosis única de la vacuna en estudio; a 4 se les dió doble dosis en una sola toma, y finalmente 7 de ellos sirvieron como testigos.

En el día cero del estudio se les tomó muestra de suero, orina y heces. A los del grupo que recibieron la vacuna se les tomó muestra diaria de orina y heces durante 8 días y al término de éstos se les tomó nueva muestra de suero.

La vacuna utilizada contenía, en una dosis, gérmenes muertos de *Salmonella typhi* cepa Ty2 Internacional con una carga aproximada de 5.68 mg de lipopolisacárido 9,12; cifra que fue determinada mediante la técnica de inhibición de inmunohemólisis (18, 20). Esta técnica consiste en tomar la muestra en estudio e incubarla en un primer tiempo a 37°C durante 30 minutos, con una dilución adecuada de antisuero homólogo; posteriormente se le agrega complemento de cobayo previamente titulado, más eritrocitos de carnero sensibilizados con LPS 9,12 y se incuba a 37°C durante 30 minutos; luego se centrifugan los tubos y se lee la densidad óptica del sobrenadante de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro Coleman Jr. a 550 mμ. Los resultados obtenidos se grafican sobre un papel semilogarítmico de próbitas. Un testigo "positivo" sirve para calcular el 100% de hemólisis y un testigo "negativo", es utilizado como "blanco". La hemólisis de cada tubo se calcula porcentualmente en relación al testigo "positivo".

Esta prueba se realizó utilizando como testigo positivo LPS comercial de *Salmonella typhi* 0901 (Difco), el cual se alcalinizó antes de su empleo con NaOH 0,25 N y se neutralizó con HCl 0,25 N de acuerdo a la técnica de Westphal (47).

En las muestras de suero se investigó la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos 9,12 mediante la técnica de fijación de superficie de Ruiz Castañeda (3, 19, 43). Este método consiste en utilizar tiras de papel filtro de calidad y tamaño adecuado, las cuales en su porción inferior poseen manchas secas del antígeno 9,12 de unos 3 a 4 milímetros de diámetro. La prueba se practica aplicando sobre las manchas los sueros en estudio, siendo requisito indispensable aplicar sobre una de las manchas un suero negativo que servirá como control. Una vez aplicados los sueros se suspenden las tiras de papel sobre una suspensión de NaCl al 8.5 por 1000 procurando que al sumergir el papel el nivel del líquido quede un poco por debajo de las manchas, de manera que al ascender por capilaridad, el líquido pase sobre las manchas arrastrando la mezcla de antígeno y suero negativo en forma tal que al llegar a la parte superior del papel deje una huella en forma de cometa. Por contraste, las manchas tratadas con suero positivo quedarán retenidas en proporción al contenido en anticuerpos. La huella que dejan las manchas tratadas con sueros positivos pueden ser, por comparación con el control, desde completa fijación hasta

proporciones que se calculan desde 100% hasta títulos de 75, 50, 25 y hasta 10%.

En las muestras de suero también se determinó la capacidad bactericida del mismo contra *S. typhi*, mediante la técnica de Fierrier y col. (14) la cual mide la acción bactericida del suero y demuestra que éste es un mecanismo de defensa contra infecciones causadas por gérmenes Gram negativos. En esta prueba se utilizó la cepa Ty2 Internacional, la cual se sembró en 50 ml de caldo soya tripticasa a 37°C durante 2-1/2 a 3 horas. Una vez que el crecimiento bacteriano se encontraba en fase logarítmica (2-1/2 a 3 horas) se centrifugó a 2600 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se decantó. Luego las bacterias fueron resuspendidas en 250 mCi de solución de  $Cr^{51}$ , en forma de cromato de sodio por 30 minutos y posteriormente se centrifuga a 4°C a 2600 rpm durante 10 minutos. El sedimento bacteriano fue resuspendido y lavado en 15 ml de amortiguador fosfato salino frío (PBS) 0,16 M pH 7,2, tantas veces como fue necesario, hasta que no más del 5% del total de radioactividad fue filtrable.

Las bacterias se resuspendieron en PBS pH 7,2 hasta obtener una concentración aproximada de  $10^8$  bacterias por ml. Una vez marcadas y diluidas las bacterias, se tomó 0,1 ml de éstas más 0,9 ml del suero en estudio, se mezcló la suspensión y se incubó en baño maría a 37°C durante 30 minutos. Concluida la incubación se tomaron alícuotas de 0,1 ml por duplicado, las cuales fueron puestas en una jeringa de 5 ml a la cual se le había incorporado un filtro Millipore de  $0,45 \mu$  (Millipore SXHA). Esta alícuota fue inmediatamente diluida con 2 ml de solución salina al 0,85% y forzado con el émbolo de la jeringa a pasar a través del filtro (El aire atrapado en la jeringa sirve como para empujar mejor la muestra a través del filtro).

La radioactividad total de la muestra fue determinada por el conteo por duplicado de 0,1 ml de la suspensión no filtrada al final del período de incubación.

Los controles de la especificidad de la liberación de  $Cr^{51}$  fueron: suero calentado a 56°C por 30 minutos y bacterias suspendidas en PBS. El porcentaje de liberación de  $Cr^{51}$  fue calculado así:

$$\% \text{ Liberación} = \frac{Cpm_{fTx} - Cpm_{PBStx}}{Cpm_{Un} - Cpm_{PBStx}} \times 100$$

$Cpm_{fTx}$ : cuentas por minuto del filtrado en el tiempo x.

$Cpm_{Un}$ : cuentas por minuto del suero no filtrado.

$Cpm_{PBS}$ : cuentas por minuto de PBS filtrado en el tiempo x.

La radioactividad fue determinada en un contador gamma automático (Nuclear Chicago, Chicago, Ill).

Cada muestra fue contada por duplicado y un total de 4 cuentas fueron usadas para calcular la ecuación anterior.

Como control interno de esta prueba se realizó una prueba bactericida mediante un método estándar que mide cambios en las unidades formadoras de colonias (14), donde la bacteria fue puesta en contacto con el suero y luego de incubar esta mezcla a 37°C durante 30 minutos, una alícuota de la misma fue obtenida y diluida en forma seriada en solución salina al 0,85%. Estas diluciones fueron sembradas por duplicado en placas de Petri en agar soya tripticasa y el conteo de colonias se hizo después de incubar durante la noche.

En el suero también se determinó complemento hemolítico según la técnica de Kent (28), ya que las dos pruebas anteriores requieren cifras de complemento dentro de límites normales.

En las muestras de orina se investigó la presencia de antígenos somáticos 9,12 de *S. typhi*, mediante la reacción de inhibición de inmunohemólisis (18, 20). Para este efecto una alícuota de orina de aproximadamente 10 ml fue calentada a 100°C durante una hora y centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos antes de su uso. Ninguna de las muestras de orina tuvo acción anticomplementaria, la cual fue medida mediante un sistema hemolítico utilizando complemento de cobayo diluido 1:100 y eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina.

La técnica de inhibición de inmunohemólisis fue capaz de detectar hasta 0,09  $\mu$ gr de LPS 9,12 en 0,15 ml de orina. Cantidades conocidas de LPS 9,12 en  $\mu$ gr permitieron trazar la curva de calibración contra la cual se interpolaron las cantidades 50% hemolíticas de complemento consumidas por el LPS eliminado en cada muestra de orina (Fig. 1).

A las muestras de heces se las practicó cultivo (7, 8, 10, 12) utilizando la siguiente metodología: las heces tomadas por hisopado rectal o por selección de material de la muestra recogida previamente en cajas para estudio de heces, fueron sembradas en los siguientes medios en placas de Petri: SSA, EMB, Mac-Conkey y BSA; luego el hisopo es introducido en un tubo con caldo selenito F. A partir de este caldo y después de 8 a 12 horas de incubación es realizado un repique a placas de SSA y Mac-Conkey. Todos los medios son incubados a 35-37°C durante 18 a 24 horas. Las placas de SSA y BSA fueron incubadas hasta 48 horas, con el fin de ver



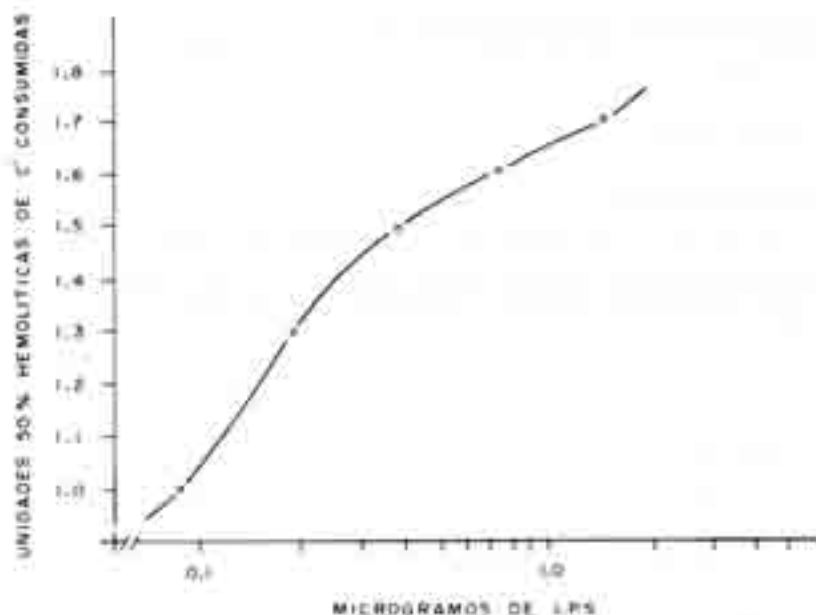


Fig. 1.— Prueba de inhibición de inmunohemólisis con diferentes cantidades de LPS 9,12 de *Salmonella typhi* (Difco).

si aparecían colonias con características compatibles con *Salmonella typhi* y de esa forma tener la certeza de que no hubo desarrollo de la misma.

La presencia de antígenos somáticos 9,12 se investigó mediante la reacción de inhibición de la hemoaglutinación (24). Antes de realizar la prueba, las muestras de heces fueron procesadas de la siguiente manera: 1 gr de materia fecal se disolvió en 20 ml de solución salina estéril al 0,85% y luego se filtró a través de gasa estéril; el filtrado se calentó a 100°C durante 1 hora, se dejó enfriar y finalmente se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante se repartió en alícuotas que se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso (21). En una serie de tubos se adicionaron 0,25 ml de la muestra de heces en diluciones crecientes al doble y 0,25 ml de antisuero 9,12 en dilución adecuada; los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se les adicionó 0,05 ml de una suspensión al 2% de eritrocitos de camero previamente sensibilizados con LPS 9,12, incubándose nuevamente a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos. Los tubos se centrifugaron y los resultados se leyeron golpeando suavemente el fondo de cada tubo y observando el fenómeno de aglutinación. El criterio para la lectura fue el siguiente: los tubos positivos fueron aquellos que quedaron con líquido turbio (rojizo) sin glóbulos aglutinados, y los negativos aquellos

donde se apreció una aglutinación completa (++++ ó ++++) con una capa sólida (grumo) de glóbulos rojos y un líquido sobrenadante claro.

## RESULTADOS

### Anticuerpos séricos.

En la figura 2 se encuentran los resultados de la determinación de anticuerpos séricos dirigidos contra *S. typhi*, los cuales fueron titulados según la técnica de fijación de superficie (a. 19, 43). Como puede obser-

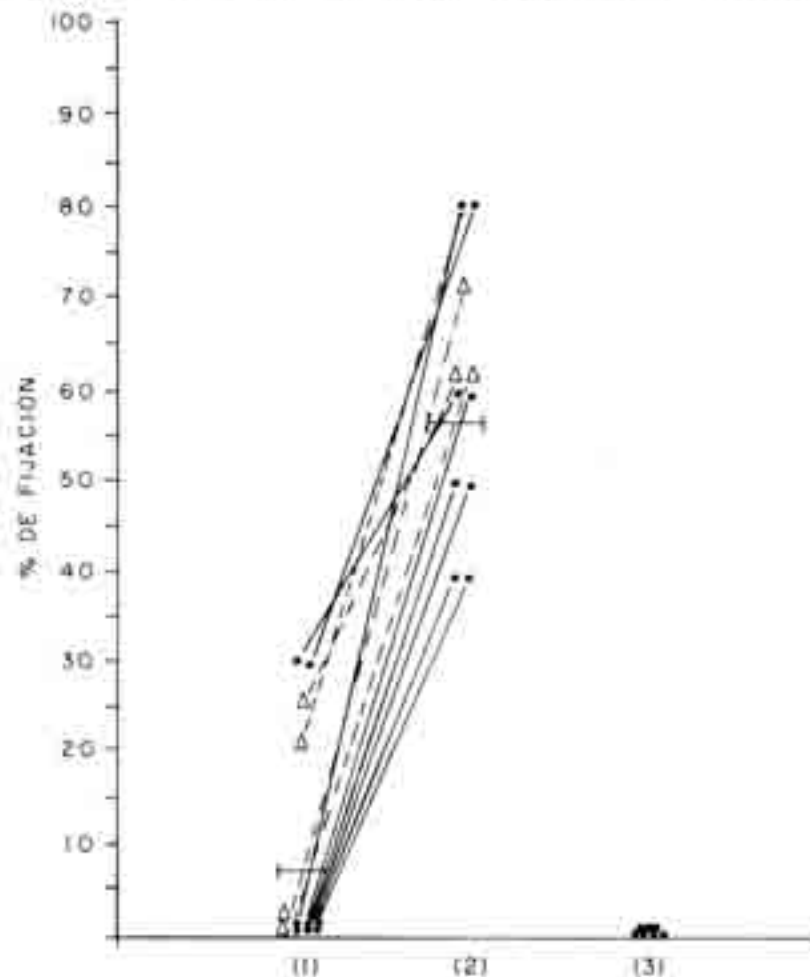


Fig. 2.— Vacuna oral de fiebre tifoidea y fijación de superficie. (1) Pre-vacunación. (2) Post-vacunación: 8 días. (3) Grupo Testigo. (●) — 1 cápsula. (△) — 2 cápsulas.

varse, después de la vacunación hubo una elevación significativa en los títulos de anticuerpos en ambos grupos.

#### Capacidad bactericida de los anticuerpos.

En la figura 3 se resumen los resultados de la prueba bactericida (14). Puede observarse que antes de la administración de la vacuna el porcentaje de liberación de  $Cr^{51}$  del grupo testigo es semejante a los valores del grupo en estudio. Sin embargo la capacidad bactericida del suero o sea su habili-

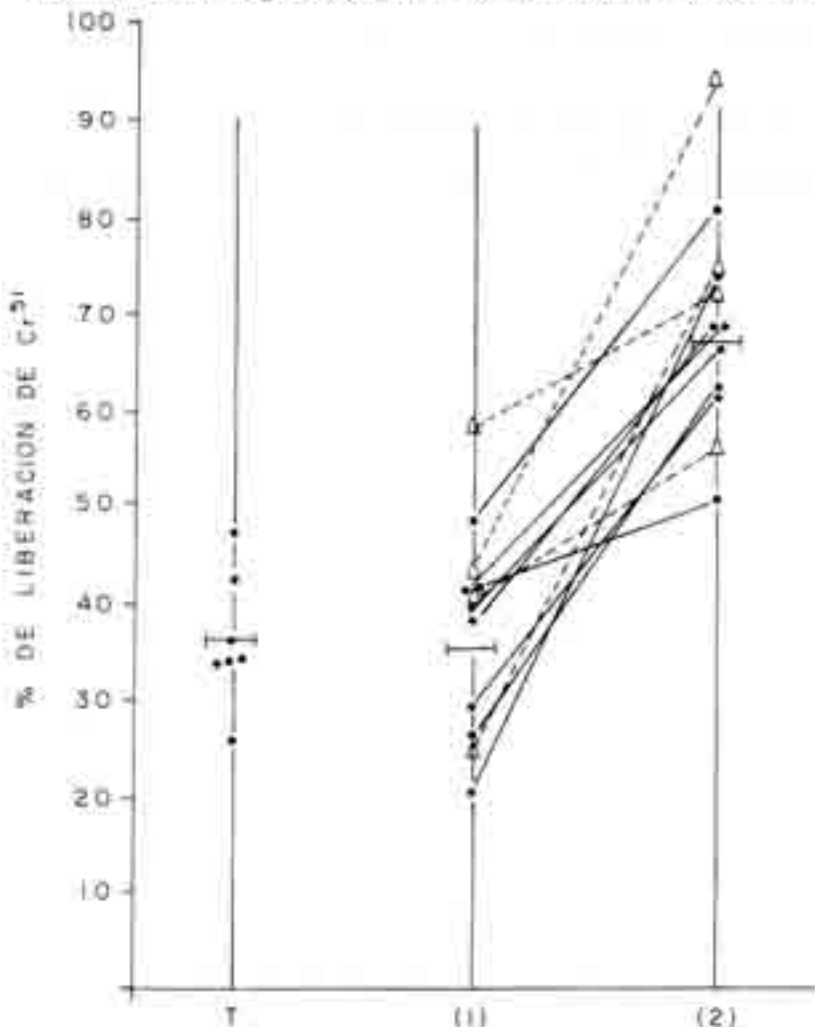


Fig. 3.- Vacuna oral de fiebre tifoidea y actividad bactericida del suero. T: Testigos. (1) Previa vacunación. (2) Post-vacunación: 8 días. (●) — 1 cápsula. (△) — 2 cápsulas.

dad para liberar el  $Cr^{51}$  previamente unido a las bacterias, aumentó significativamente después de la administración de la vacuna, en un 30-35% en ambos grupos.

Como control interno se practicó una prueba bactericida estandar (14), en la que se observó una disminución de 3 logs en la cuenta de colonias después de incubar las bacterias con el suero obtenido después de la administración de 1 y 2 dosis de vacuna, a 37°C durante 30 minutos.

#### Eliminación urinaria de los antígenos de la vacuna.

Mediante la reacción de inhibición de la inmunohemólisis (18, 20) se comprobó la eliminación urinaria de los antígenos 9,12 de *S. typhi*. En la figura 4 se presentan los valores obtenidos con esta prueba en cada una de las muestras de orina estudiadas. Las cantidades de LPS 9,12 eliminados por cada 0,15 ml de orina oscilaron entre 0 y 1,56  $\mu$ g.

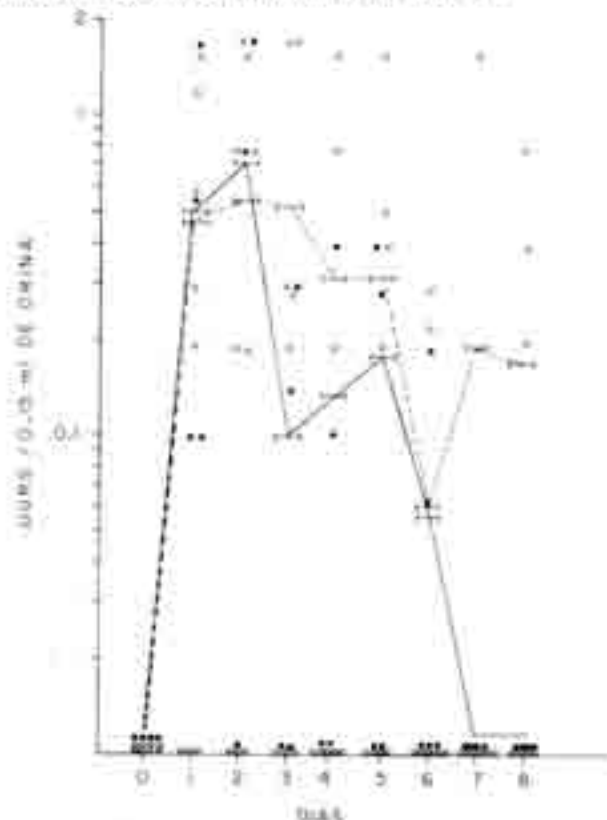


Fig. 4.— Eliminación de LPS 9,12 de *Salmonella typhi* por orina antes y después de vacunación oral. (○) ——— 1 cápsula. (●) ——— 2 cápsulas.

No hubo diferencia significativa en la eliminación urinaria de este LPS entre los 2 grupos que recibieron 1 y 2 dosis de la vacuna oral. Se observó eliminación de LPS 9,12 desde el primer día después de la vacunación y éste alcanzó su concentración máxima en la orina al segundo día, para disminuir notablemente entre el tercero y cuarto día. Al séptimo día ya no se detectó LPS en las muestras estudiadas, excepto en 3 casos que eliminaban una mínima cantidad.

#### Eliminación fecal de los antígenos de la vacuna.

En la figura 5 están representados los valores obtenidos mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (34) practicada con materia fecal. Los títulos variaron desde 1:128 hasta los resultados negativos que dieron algunas muestras en las cuales los antígenos de la *Salmonella* no alcanzaban la concentración necesaria para inhibir la hemoaglutinación.

Existió bastante paralelismo en la eliminación de LPS 9,12 por heces en ambos grupos, a pesar de que uno de ellos recibió el doble de la dosis de la vacuna oral. Se observó que el máximo de la eliminación estuvo entre el segundo y el tercer día, coincidiendo estos valores con los de la eliminación urinaria. La prueba se hizo prácticamente negativa a partir del sexto

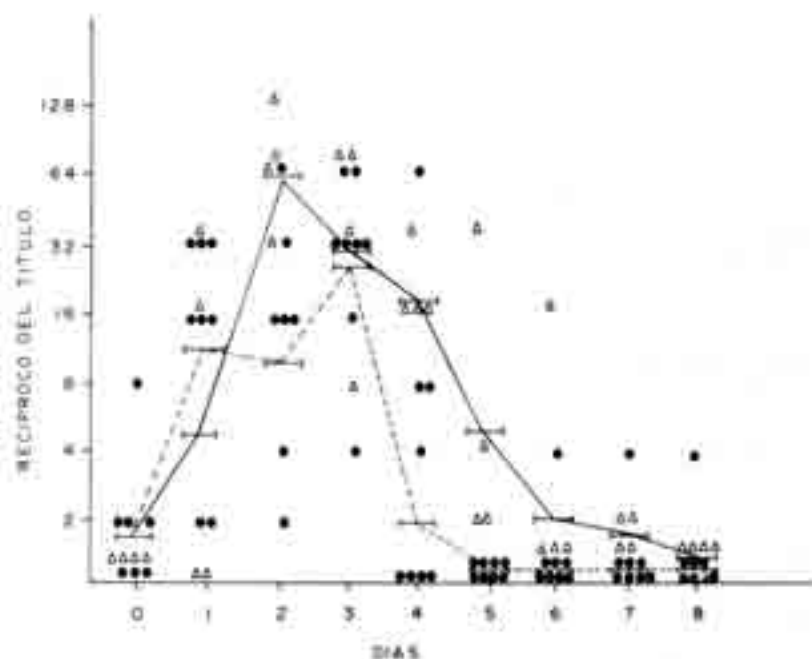


Fig. 5.— Eliminación fecal de LPS 9,12 de *Salmonella typhi* en niños antes y después de vacunación oral. (●) — 1 cápsula, (△) — 2 cápsulas.

día, a diferencia de los resultados que se obtuvieron al cuantificar la eliminación urinaria del mismo antígeno, ya que todavía entre el séptimo y el octavo día se podrán detectar trazas de LPS en la orina de algunos pacientes.

#### Complemento.

Antes de utilizar los sueros para las pruebas bactericidas, a todas las muestras se les determinó el título del complemento 50% hemolítico (28), el cual siempre estuvo dentro de límites normales.

#### Coprocultivo.

Los resultados del coprocultivo (7, 8, 10, 12) practicados a todas las muestras de heces, fueron negativos en todos los casos y no se observó crecimiento de *S. typhi* después de 24 horas de incubación.

### DISCUSION

El trabajo tuvo por objeto conocer el metabolismo de los antígenos 9,12 de *S. typhi* administrados por vía oral. Por otro lado, también se investigó si los antígenos administrados por vía oral eran capaces de estimular al sistema inmune e inducir la producción de anticuerpos y si éstos tenían o no capacidad bactericida.

Al administrar 1 y 2 dosis de la vacuna oral de *S. typhi* se pudo demostrar que el LPS 9,12 se eliminaba tanto con la materia fecal como por la orina. Esta eliminación fue cuantificada por medio de la reacción de inhibición de la inmunoheólisis (18, 30) y la reacción de inhibición de la hemoaglutinación (34), aplicada a varias muestras que se tomaron de cada caso en una forma seriada.

La presencia de LPS 9,12 en orina indica que este antígeno fue absorbido a través del tracto digestivo, que luego pasó a la circulación y que una parte importante de él fue finalmente eliminada por el riñón.

Además, hubo un buen estímulo para el sistema inmunocompetente como lo demostró el aumento en el título de anticuerpos séricos específicos contra *S. typhi*, lo cual se comprobó por la prueba de fijación de superficie (2, 19, 43). Los anticuerpos responsables de esta reacción son diferentes de los aglutinantes, ya que no existe correlación entre ambos (29); por esta razón no creímos conveniente realizar pruebas de aglutinación.

La elevación de los títulos de anticuerpos después de la administración de la vacuna probablemente no corresponde a un estímulo primario del

sistema inmunocompetente, ya que la fiebre tifoidea es una enfermedad endémica en México y los pacientes estudiados pertenecen a una condición socioeconómica baja que seguramente los había conducido a una experiencia inmune previa con la *S. typhi*. De ser así, la administración de la vacuna debió desencadenar una respuesta anamnésica y esto parece comprobarlo los títulos obtenidos pocos días después de administrar la dosis oral.

Mediante la prueba de Ferrer y col. (14) se demostró la capacidad bactericida de los anticuerpos séricos contra *S. typhi*. Sin embargo, no hubo relación entre los títulos séricos de anticuerpos y la capacidad de éstos para lisar bacterias en presencia de complemento. Mas aún, el suero de los pacientes del grupo testigo y el de los pacientes en estudio previa vacunación tuvo una actividad bactericida, que, medida en función de su capacidad para liberar  $Cr^{51}$  osciló entre 20 y 56%, a pesar de que los títulos de anticuerpos séricos fueron negativos en todos ellos excepto en 4. Esto nos conduce a suponer dos hechos: en primer lugar, el complemento puede ser activado colateralmente sin necesidad de que estén presentes anticuerpos anti-Salmonella y puede ser importante que trabajos futuros limiten la amplitud de esta lisis bacteriana que no depende de las IgM. Por otra parte, debe existir una competencia por los sitios activos de los anticuerpos entre la endotoxina de la pared celular de las bacterias y la endotoxina libre (LPS de la vacuna metabolizada), y es probable que una buena parte de los anticuerpos sintetizados y potencialmente bactericidas se encuentren presentes en forma de complejos y por lo tanto no capaces de reaccionar con los determinantes de la pared. Esto nos conduce a sostener que, además de los parámetros de eliminación urinaria y fecal, debe ser importante el cuantificar la cantidad de endotoxina libre y conjugada que circula en la sangre. Este tercer parámetro nos puede dar una visión más clara de la tasa de incorporación del LPS a los macrófagos del SRE, lo cual se podría correlacionar mejor con la intensidad de la respuesta humoral. Es necesario tener también en cuenta el método cualitativo utilizado para titular la presencia de anticuerpos séricos. Este no ofrece la sensibilidad de otras técnicas que probablemente si hubieran permitido detectar su actividad en las muestras que se tomaron antes de administrar la vacuna y en la de los testigos sanos.

Con este trabajo hemos demostrado que cuando se administran estos antígenos por vía oral, el intestino los absorbe y se produce una respuesta de anticuerpos séricos específicos, que tienen la capacidad de lisar bacterias en presencia de complemento. Faltaría demostrar si estos anticuerpos son protectores o no *in vivo*, así como también estudiar exhaustivamente lo referente al desarrollo en inmunidad celular, utilizando diferentes técnicas, ya que sabemos que la inmunidad de tipo celular juega un papel importante en la fiebre tifoidea. De esa manera podríamos determinar si

la profilaxis por vía oral ofrece probabilidades de alcanzar el nivel de inmunidad efectiva que se desea.

#### ABSTRACT

**Metabolism of *Salmonella typhi* antigens administered by the oral route.** Villalobos-Roldan A. (Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela), Rodríguez F., García-Tamayo F., Kumate J. *Invest Clin* 20(3): 127-146, 1979. - A study was made of the metabolism of antigens 9,12 from *Salmonella typhi* orally administered to determine whether these antigens were able to stimulate the immune system and induce the antibody production and to find out if they have bactericidal activity. Nineteen school children were studied: a single dose of vaccine was given to eight of them; a simultaneous double dose was given to four of them, and seven served as control. In the two groups that received the vaccine we could demonstrate: a- that LPS 9,12 was eliminated by feces and urine. The urinary elimination of the antigen indicates its absorption through the digestive tract, its entry in the circulation and later its renal elimination; b- there was a good stimulation of the immunocompetent system, as indicated by the increase in the specific seric antibody titre against *S. typhi*, c- and these seric antibodies showed bactericidal activity as they were able to lissate bacteria in presence of complement. We would have to demonstrate if these antibodies are or not in vivo protectors, and determine if oral prophylaxis offers probabilities of reaching the effective immunity level desired.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ASHCROFT M, MERRISON R, NICHOLSON C: Controlled field trial in Guiana school-children of heat-killed lyophilized typhoid vaccine. *Amer J Hyg* 79: 196-206, 1964.
- 2- ASHCROFT M, SINGH B, NICHOLSON C, BOLWANT S, RITCHIE J, SOPRYAN A, WILLIAMS F: A seven year field trial of two typhoid vaccines in Guiana. *Lancet* 2: 1056-1059, 1967.
- 3- BRANDAO C: Reacción de fijación de superficie como metodo diagnóstico de la fiebre tifoidea. Estudio comparativo de la reacción de Vidal. *Bol Med Hosp Inf (México)* 4: 413-420, 1972.
- 4- COLLINS F, MILNE M: Heat-labile antigens of *Salmonella enteritidis* II. *J Bacteriol* 92: 549-557, 1966.
- 5- CVJETANOVIC B, GRAB B, WEMURA K: Epidemiological model of typhoid fever and its use in the planning and evaluation of anti-



- typhoid immunization programmes. Documento WHO/ENT, 70: 12, 1969, Ginebra, Suiza.
- 6- CVJETANOVIC B, MEL M, FESENFELD O: Study of live typhoid vaccines in chimpanzees. Bull WHO 42: 499-507, 1970.
  - 7- DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH: Notes on identification of enterobacteriaceae. Enteric N° 2409276. Berkeley, California. Microbiology Laboratory.
  - 8- DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH: Scheme for isolation and partial identification of enteric pathogens. Enteric N° 49091161. Berkeley, California. Microbiology Laboratory.
  - 9- EDDIE D, ACHULKIND M, ROBBINS J: The isolation and biologic activities of purified secretory IgA and IgG anti-*Salmonella typhimurium* "O" antibodies from rabbit intestinal fluid and calostrum. J Immunology 106: 181-190, 1971.
  - 10- EDWARDS P, EWING W: Identification of enterobacteriaceae. 3th ed. Burgess Publ. Minneapolis, 1972, p. 362.
  - 11- EWING W: Differentiation of enterobacteriaceae by biochemical reactions. National Communicable Disease Center, Enteric Bacteriology Laboratories. Atlanta, Georgia, 1970.
  - 12- EWING W: Isolation and identification of Salmonella and Shigella. Center for Disease Control, Enteric Bacteriology Laboratories, 1972.
  - 13- FELIX A: A new type of typhoid and paratyphoid vaccine. Brit Med J 1: 391-395, 1941.
  - 14- FIERRER J, FINLEY F, BRAUDE A: Release of Cr<sup>51</sup> endotoxin from bacteria as an assay of serum bactericidal activity. J Immunology 112: 2184-2192, 1974.
  - 15- GIOVANARDDI A, MONACI V: Un nuovo tipo di vaccino antitifico sterilizzato con acetone. Boll Inst Sierot Milan 22: 420, 1943.
  - 16- GIOVANARDDI A: Apprezzamento dell'attività del vaccino antitifico all'acetone. Secondo Congresso Int. Standardizzazione Immunomicrobiologica. Roma, pp. 339-350, 1956.
  - 17- GRASSET E: L'endoanatoxine typho-paratyphique dans la prophylaxie des infections typhoidiques. Rev D'Immunol (Paris) 15: 1-19, 1951.

- 18- GRUNDBACHER F: Immuno-hemolysis a method for quantitation of the A antigen of human erythrocytes. *J Immunology* 93: 205-212, 1964.
- 19- GUTIERREZ T, BENAVIDES L, KUMATE J, RANGEL L: Encuesta inmunológica en la población infantil. I - Investigación de anticuerpos contra *S. typhosa* por medio de la reacción de fijación de superficie. *Bol Med Hosp Inf (Mexico)*. 19: 107-122, 1962.
- 20- HEJFEC L, SALMIN L, LATMAN M, KUZMINOVA M, VASILEVA A, LEVINA L, BENCIONAVA T, PAVLOVA E, ANTONOVA A: A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in USSR. *Bull WHO*: 34: 321-339, 1966.
- 21- HEREDIA DUARTE A, CARRILLO J, MOHS E: Investigación de antígenos somáticos 9,12 de Salmonella mediante la reacción de inhibición de la hemoaglutinación. *Rev Latinoamer Microbiol* 5: 189-205, 1963.
- 22- HORNICK R, WOODWARD T, MCCRUMB F, SNYDER M, DAWKINS A, BULKELEY J, DE LA MACORRA F, COROSSA F: Typhoid fever vaccine. Yes or no? *Med Clin N Amer* 51: 617-623, 1967.
- 23- HORNICK R, GREISMAN S, WOODWARD T, DUPONT H, DAWKINS A: Evaluation of typhoid fever: Pathogenesis control. I. *New Eng J Med* 283: 686-691, 1970.
- 24- HORNICK R, DUPONT H, DAWKINS A, SNYDER M, WOODWARD T: Evaluation of typhoid fever vaccine in man. *Sym Series Immunobiol Standard* 15: 143-150, 1971.
- 25- JOHSON J: The secretory immune system: a brief review. *J Infect Dis* 121: (Suppl) 115-117, 1970.
- 26- JOO I: Present status and perspectives of vaccination against typhoid fever. *Proc Int Conference on the Appl of vaccines against viral, rickettsial and bacterial disease of man*. Wash DC. WHO. Pub 226. pp. 329, 1970.
- 27- KELLER R, DWYER J: Neutralization of poliovirus by IgA copro-antibodies. *J Immunology* 101: 192-202, 1968.
- 28- KENT J, FIFE E: Precise standarization of reagents for complement fixation. *Amer J Trop Med Hyg* 12: 105-116, 1963.

- 29- KUMATE J, BENAVIDES L, HIKIMURA J, HERRERA L: Respuesta inmunológica en fiebre tifoidea. *Bol Med Hosp Inf (México)* 19: 17-23, 1962.
- 30- KUMATE J, CARRILLO J, HASHIMOTO B: Inmuno-hemólisis condicionada con antígenos de enterobacteriáceas. I- La inhibición de hemólisis como método para descubrir antígenos. *Bol Med Hosp Inf (México)* 24: 275-281, 1967.
- 31- LANDY M: Enhancement of the immunogenicity of typhoid vaccine by retention of the Vi antigen. *Amer J Hyg* 58: 148-164, 1962.
- 32- LOVREKOVICH I, RAUSS K: Schutzimpfung gegen abdominaltyphus durch die einmalige injektion eines neuen präzipitierten Impfstoffes. *Z Immun Forsch* 101: 194-210, 1942.
- 33- MESTECKY J, KULHAVY R, WRIGHT G, TOMANA M: Studies on human secretory immunoglobulin A. VI. Cyanogen bromide cleavage. *J Immunol* 113: 404-412, 1974.
- 34- NETER E, WESTPHAL O, LUDERITZ O, GORZYNSKI E: The bacterial hemagglutination test for demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. *Ann N.Y. Acad Sci* 66: 141-151, 1956.
- 35- OGRA P, KARZON D, RIGHTAND F, MAC GUILLIVRAY M: Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *New Eng J Med* 279: 893-900, 1968.
- 36- PEREZ MIRAVETE A, CABRERA R: Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. *Salud Pública de México* 15: 183-194, 1974.
- 37- PFEIFFER R, KOLLE W: Über die spezifische immunitäts reaktion der typhus basilien. *Hyg Infekt Kr* 21: 203-206, 1896.
- 38- POLISH TYPHOID COMMITTEE: Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field in Poland. *Bull. WHO* 32: 15-27, 1965.
- 39- POLISH TYPHOID COMMITTEE: Controlled field trial and laboratory studies on the effectiveness of typhoid vaccines in Poland. 1961-1964. *Bull WHO* 34: 211-222, 1966.
- 40- PONTECORVO M, SOPRANO D: Ricerche sperimentali sulla preparazione del vaccino antitifico TAB. *Riv Ist Sieroterap Tal* 31: 46-64, 1956.

- 41- RAUSS K: Vergleichende untersuchungen über den immunwert des präzipitenten typhus impfstoffes un der typhusvakzine. *Z Immun Forsch* 101: 211-224, 1942.
  - 42- RAUSS K, JOO I, RETHY L: Preparations, control, results and perspectives of the adsorbed typhoid vaccine. *Secondo Congresso Int di standardizzazione Immunomicrobiologica*. Roma, 367-370, 1956.
  - 43- RUIZ CASTAÑEDA M: Reacciones inmunológicas sobre papel filtro. Fijación en superficie. *Academia Nacional de Medicina. Primer Centenario. Tomo II*. pp. 199, 1964.
  - 44- THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. School of Medicine. Medical Microbiology. *Laboratory Manual*. pp. 3, 1961.
  - 45- TOPLEY W, RAISTRICK H, WILSON J, STANCEY M, CHALLNOR J, CLARK R: Immunising potency of antigenic components isolated from different strains of *Bact. typhosum*. *Lancet* 1: 252-260, 1937.
  - 46- WALTER REED ARMY MEDICAL INSTITUTE OF RESEARCH: Preparation of dried acetone inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines. *Bull WHO* 30: 635-640, 1964.
  - 47- WESTPHAL O, LUDERITZ O, BISTER F: Über die extraktion Von Bakterien mit phenolwasser. *Z Naturforschung* 76: 148-155, 1952.
  - 48- WRIGHT A, SEMPLE D: Remarks on vaccination againts typhoid fever. *Brit Med J. L.*: 256-258, 1897.
  - 49- YUGOSLAV TYPHOID COMMISSION: A controlled field trial of the efectiveness of acetone-dried and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. *Bull WHO* 30: 623-630, 1964.
-