

Aportaciones mexicanas en vacunas

JESUS RUMATE*

I. INTRODUCCION

México ha participado muy señaladamente en la aplicación temprana y en el desarrollo inicial de vacunas y sueros necesarios para prevenir o resolver problemas importantes en la salud pública del país.

Joseph Flores, médicos sancristobalense practicó la variolación en la Nueva España y en la metrópoli en las últimas décadas del siglo XVIII.

Nuestro país fue visitado en el periplo de Francisco Javier de Balmis en 1804;¹ la vaccinia (vacuna antivariolosa) fue transmitida de brazo a brazo de niños expósitos españoles y en el viaje transpacífico a Filipinas y Macao, la vacuna fue llevada y conservada en los brazos de niños mexicanos. El nombre y la hazaña de Balmis se recuerda en estatuas, calles y premios de certámenes científicos. El desarrollo de la vacuna antivariolosa "animalizada" data de la segunda mitad del siglo XIX.

El desarrollo científico de las vacunas, iniciado por Pasteur en 1880, condujo a la aplicación de la vacuna antirrábica en julio de 1885. Eduardo Licé-

aga obtuvo la cepa de virus fijo durante una visita a París y la vacuna pastorigiana fue aplicada por primera vez en México en 1888. Miguel Otero, en San Luis Potosí obtuvo, de una cepa autóctona de virus rábico, la correspondiente cepa fija y la administró en 1890.

La posibilidad de producir vacunas y sueros se debió a la existencia de infraestructura material y administrativa del sector salud en los inicios del presente siglo, i.e.: el Instituto Patológico Nacional y después el Instituto Nacional de Higiene, así como el interés y la preparación técnica de médicos como Manuel Toussaint, Angel Gaviño, Ignacio Alvarado y Miguel Otero.²

La revolución de 1910 y su continuación hasta 1929, casi detuvieron completamente la continuidad de los trabajos sobre vacunas y sueros. A finales de las década de los veinte, un microbiólogo suizo, Herman Mooser, llega al país para trabajar en el Hospital Americano; se interesa por el tifo, concita el interés de un joven investigador mexicano: Maximiliano Ruíz Castañeda. La asociación con Hans Zinsser, profesor de Microbiología en la Universidad de Harvard, lleva al descubrimiento de la naturaleza del tifo mexicano.³

Durante la estancia de Ruíz Castañeda en Harvard, en los años treinta, mantuvo su interés por el tifo, y a principios de la década siguiente había de-

*Académico titular. Subsecretario de Servicios de Salud.

Presentado en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el 27 de mayo de 1987.

sarrollado en México un vacuna bivalente del tifo (exantemático y murino) que fue aplicada en Polonia y Rusia durante la II Guerra Mundial. El descubrimiento del efecto del DDT sobre los piojos, hizo innecesaria la vacunación antitifo. La potencia inmunogénica de la vacuna Ruiz-Castañeda, obtenida de pulmón murino, fue superior y más barata que la desarrollada por Dyer en embriones de pollo.⁴

En la década de los cuarentas se estableció el laboratorio del BCG, se produjo la vacuna para administrar por vía bucal y se inició la aplicación en recién nacidos y lactantes menores. En ese tiempo, a pesar del descubrimiento de Avery, no había conocimiento de la genética microbiana y no se practicaba la inyección intradérmica. La tecnología del lote de siembra, la liofilización y el control de potencia (viabilidad) de la vacuna tuvieron que esperar a las siguientes décadas.

Los años cincuentas fueron decisivos para la poliomiélitis: el cultivo de virus en tejidos o monocapas celulares desarrollado por Enders, Weller y Robbins en 1955,⁵ abrió el camino, tanto para la obtención de virus en cantidades suficientes para campañas nacionales de vacunación con cepas de virus inactivados (vacuna Salk), así como para disponer de cepas atenuadas, al través de pases en cultivos sucesivos (vacunas Sabin, Cox y Koprowski entre otras). En nuestro país se produjeron ambas, la tipo Salk desde 1957 y la Sabin se probó en estudios de campo al final de la década.

En los años 1960, Campillo y col.⁶ demostraron la inmunogenicidad de la vacuna Cox en recién nacidos vacunados durante su estancia en el servicio de maternidad y encontraron que los títulos de anticuerpos anti-poliovirus en las madres, deprimían la respuesta primaria de los neonatos, pero no interferían con la respuesta anamnésica, cuatro meses después.

En 1962, Sabin, Alvarez-Amézquita y Ramos-Alvarez⁷ realizaron el llamado estudio Toluca, ciudad en la que demostraron la posibilidad y utilidad de vacunar, en pocos días, a la casi totalidad de la población pediátrica en riesgo.

La vacunación antipoliomielitis, hasta 1986 se realizó con los inmunógenos producidos en México, según la técnica Sabin. La dosificación era de 5×10^5 U.F.P. para el tipo 1, 1×10^5 en el tipo 2 y 3×10^5 para el tipo 3; la población a cubrir eran los lactantes y preescolares menores no vacunados. La aplicación se realizaba en dos lapsos semanales durante los meses de enero y marzo.

A partir de 1986, la estrategia de los "Días Nacionales de Vacunación" requirió aumentar el contenido del serotipo 1 a 1×10^6 y la población objeto de cobertura fueron todos los niños menores de cinco años. La producción local de vacuna resultó insuficiente y fue menester importarla; se espera que

para 1988, por lo menos la vacuna utilizada en uno de los días y la aplicada en fase permanente, sean de origen nacional y que, al término del lapso 1986-1990 y después en la etapa de mantenimiento, se satisfaga totalmente la demanda nacional. La vacuna antipoliomielitis producida en México, satisface los requerimientos de calidad de la OMS y es exportada a varios países de los Américas.

En 1958, Fuenzalida, Palacios y Borgoño en Chile desarrollaron la vacuna antirrábica a partir de cerebro de ratón lactante, una mejoría respecto a la tipo Semple producida en la médula espinal de conejo. Los accidentes neurológicos son menos frecuentes con esta vacuna aunque son igualmente graves cuando sí se presentan.

La producción del Instituto Nacional de Virología, satisface la demanda nacional que debe atender alrededor de 110 000 personas agredidas cada año. Las necesidades de vacuna antirrábica canina (seis millones de dosis anuales), se satisfacen con la producción de la Gerencia de Biológicos y Reactivos de la SSA y la empresa paraestatal PRONABIVE (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios). La vacuna antirrábica obtenida de células diploides no ha sido posible producirla en nuestro país y a pesar de sus ventajas comparativas con la vacuna Fuenzalida, su costo la hace inasequible en la situación actual. Se explora, por recomendación de la OMS, la posibilidad de producción en células Vero.

En materia de suero hiperinmune, se dispone únicamente del obtenido en caballos, con los inconvenientes asociados a la enfermedad del suero y otras formas de hipersensibilización. Existe la posibilidad de obtener la globulina gamma hiperinmune de donadores vacunados; la modificación a la Ley General de Salud que prohíbe la comercialización de la sangre y alienta la donación voluntaria, así como la racionalización del uso de paquete globular que economiza plasma, puede facilitar la obtención de la globulina gamma hiperinmune, si se logra la colaboración de voluntarios, i.e.: estudiantes de veterinaria, ejército y personas vacunadas.

La contribución mexicana contemporánea más importante, es la adaptación de la cepa Edmonston-Zagreb del virus del sarampión en células diploides.⁸ La vacuna así producida carece de los efectos sensibilizantes asociados con las proteínas del huevo de gallina y lo que resultó ser novedoso: su inmunogenicidad, que permite la seroconversión de lactantes hasta de seis meses de edad.

Los trabajos de Sabin, Flores-Aréchiga y Fernández de Castro demostraron que la administración por aerosol o por vía subcutánea, consigue la seroconversión en lactantes de seis y nueve meses, respectivamente. Las repercusiones de dichas capacidades son de gran importancia para la salud pública en los países del Tercer Mundo, donde el sarampión

es causa importante de mortalidad en el primer año de la vida.

Se encuentra en marcha en México, D.F., un estudio comparativo de las vacunas Edmonston-Zagreb (cepas mexicana y yugoeslava) y de la Schwarz de Mérieux; la planeación comprende 1 200 niños lactantes de seis y nueve meses de edad, que recibirán dosis variables de las vacunas producidas en células diploides y en los que se juzgará la seroconversión mediante dos pruebas serológicas. La vía de administración será subcutánea. El protocolo es interinstitucional de la S.S.A. y el CDC norteamericano.

México es uno de los nueve países del mundo que puede producir las seis vacunas del Programa Ampliado de Inmunizaciones, i. e.: DPT poliomielitis, sarampión y BCG, amén de la vacuna TAB y antirrábicos para humanos y animales domésticos.

En la actualidad se trabaja, entre otras vacunas, en:

- I. Vacuna acelular de *Bordetella pertussis*.
- II. Vacuna anti-adhesinas de *E. coli* enterotoxigénicas,
- III. Vacunas anti *Entamoeba histolytica*,
- IV. Vacunas con porinas de *Salmonella typhi* y
- V. Clonación de genes de proteínas de la membrana externa de *S. typhi* y *S. typhimurium*.

Referencias

1. FERNANDEZ DEL CASTILLO F: *Los viajes de Don Francisco Xavier de Balmis*. 2a. ed. México, Sociedad Médica Hispano Mexicana, 1985.
2. GARZA RAMOS J: *Producción de biológicos y reactivos*. En: *La salud en México. Testimonio 1987*. México, SSA, 1987.
3. RUIZ CASTAÑEDA M: *Active immunization against epidemic typhus by means of vaccine prepared from endemic typhus*. Brit J Exp Path, 1941; 22:167.
4. COX HR: *Rocky Mountain spotted fever. Protective value for guinea pigs of vaccine prepared from rickettsiae cultivated in embryonic chick tissue culture origin*. Pub Health Rep, 1939; 54: 1070.
5. ENDERS JF; WELLER TH; RIBBINS FC: *Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues*. Science, 1949; 109: 85.
6. CAMPILLO SAINZ C; ORNELAS HERNANDEZ A; De Mucha Macías J; Nava SE: *Immunization of newborn children with living oral trivalent poliovirus vaccine*. J Bact, 1962; 84: 446.
7. SABIN AB; RAMOS-ALVAREZ M; ALVAREZ-AMEZQUITA J; PELON W; MICHAELS RH y col: *Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses*. JAMA, 1960; 173: 1521.
8. SABIN A; FLORES ARÉCHIGA A; FERNANDEZ DE CASTRO J; MADDEN DL; SHEKARCHI I y col: *Successful immunization of children with and without maternal antibody to aerosolized measles vaccine*. JAMA, 1983; 249: 2651.

II. LA CEPA EDMONSTON-ZAGREB DEL SARAMPION

JAIME SEPULVEDA-AMOR*
JOSE LUIS VALDESPINO*
JULIO DE MUCHA**
JOSE LUIS DIAZ-ORTEGA

Aspectos históricos

Si el sarampión es una enfermedad viral cuyo único reservorio es el hombre, y que además requiere una concentración poblacional de 300 000 o más habitantes para mantenerse en circulación continua, entonces: ¿Cómo y cuándo es que apareció en la raza humana?

Para dar respuesta a lo anterior, hay que recordar que el virus del sarampión es miembro de la familia *Paramyxovirus* género *Morbillivirus*, a los que también pertenece el virus del moquillo canino. Es muy posible que éste último haya sido el origen del virus del sarampión, mediante una adaptación del virus en animales domesticados para convertirse en patógeno humano. Tan son parecidos estos dos virus en su estructura, que la vacuna del sarampión previene el moquillo en perros.

Como enfermedad endémica, el sarampión probablemente no existió hasta que se alcanzó la masa poblacional crítica, en las culturas mesopotámicas, hacia el año 2 500 antes de Cristo.¹ La primera descripción clínica del sarampión la realizó el médico persa Rhazés, en el siglo IX de nuestra era; una pormenorización de las características del exantema fue publicada por Sydenham en 1700;^{2,3} en 1846, Panum dio a conocer, en su obra clásica, la epidemia de las Islas Faroe, en donde concluyó que el sarampión tiene un período de incubación de 14 días y que la enfermedad confiere inmunidad vitalicia.

El sarampión fue traído a la Nueva España por los conquistadores, y se registraron varias epidemias graves en el siglo XVI. En 1804, el Real Protomedicato editó normas terapéuticas para este mal.⁴

En cuanto a la historia de la vacuna contra el sarampión, existen algunos hechos sobresalientes: en 1911, Goldberger y Anderson lograron transmitir el virus del sarampión a monos, con lo cual e tuvo un modelo animal; en 1954, Enders y Peebles consiguieron aislar y cultivar en células renales humanas el virus del sarampión, a partir de un niño enfermo de 13 años, de nombre David Edmonston.

* Dirección General de Epidemiología.

** Instituto Nacional de Virología. Secretaría de Salud.

Dichos autores obtuvieron, mediante pases sucesivos, en células renales y amnióticas humanas una variable ligeramente atenuada, llamada cepa Edmonston. Algunos años más tarde, Katz y Enders consiguieron atenuar un poco más esta cepa, al través de pases en fibroblastos de embrión de pollo (cepas Edmonston A y B), de donde derivan las cepas vacunales empleadas en el hemisferio occidental hoy en día.^{5,6}

En un principio, se intentó el empleo de vacunas con virus muertos, pero se observó que la inmunidad conferida era muy transitoria. Más tarde, e aplicaron vacunas con cepas atenuadas junto con gamma globulina humana, con el propósito de mitigar los efectos secundarios a la vacunación.

Otros científicos intentaron obtener nuevas cepas con una atenuación mayor del virus vacunal, al través de numerosos pases en fibroblastos de embrión de pollo (Schwarz) o utilizando otros sustratos, como células renales de perro (Moraten) o células diploides humanas (Edmonston-Zagreb).⁶ (Cuadro I).

Hace poco más de una década, se consiguió la cepa yugoslava para su producción en México, utilizando para ello células diploides humanas tipo MAC-5. Esta cepa fue la utilizada en México por Sabin, Flores Aréchiga y Fernández de Castro, en forma de aerosol.

Producción de la vacuna E-Z en México

Semilla celular. La vacuna se elabora en células diploides humanas MRC-5, las que fueron recibidas en el Instituto Nacional de Virología (INV) en febrero de 1975, por cortesía del Dr. P. Jacobs del Medical Research Council de Londres. Ese material

se encontraba en el pase No. 8 y se practicaron pases adicionales, hasta el P-18 para obtener la semilla celular secundaria.

Semilla de trabajo de virus Edmonston-Zagreb. La semilla original se obtuvo en septiembre de 1975 y fue gentilmente proporcionada por el Dr. Ikic del Instituto de Inmunología de Zagreb, Yugoslavia. La semilla original fue inoculada en células diploides humanas MRC-5 que se encontraban en P-28. El virus resultante fue cosechado, mezclado y clarificado, efectuando pruebas de control de calidad como si se tratara de un lote de vacuna, e incluyendo la prueba de neurovirulencia.

Para el sistema de producción se sigue el denominado "Sistema de lote de semilla", que consiste en cultivar una suficiente población de células MRC-5; los cultivos del sustrato celular son incubados a 36°C de manera estacionaria. Al llegar al pase 27 se inocula la semilla de virus de trabajo, calculando una multiplicidad de infección de .05 (una partícula viral por cada 20 células). Después de obtener las cosechas de la réplica viral, se lleva al cabo una mezcla de las mismas, para posteriormente ser clarificada la suspensión viral. Durante todas las etapas que comprende el proceso, se toman muestras destinadas al control de calidad, que consiste en investigar la posible existencia de contaminación por virus adventicios, bacterias, hongos o por *Mycoplasma*. Además se realizan el análisis cariológico, las pruebas de oncogenicidad y se determina la cantidad de virus producida.

La vacuna se somete a un proceso de liofilización con la adición previa de un estabilizador cuya fórmula está basada en proteínas, azúcar y fosfatos.

Después de una etapa de investigación y desarrollo tecnológico, que abarcó tres años de labo-

Cuadro I

Procesos de atenuación de las cepas Edmonston (A y B). Edmonston Zagreb y Schwarz

Sistemas empleados	CEPAS			
	Edmonston A	Edmonston B	Edmonston Zagreb	Schwarz
Células renales humanas	24*	24	24	24
Células amnióticas humanas	28	28	28	28
Embrión de pollo (vía intraamniótica)	6	6	6	6
Fibroblastos de embrión de pollo	13	13	13	14
Embrión de pollo (vía intraamniótica)	—	6	6	—
Fibroblastos de embrión de pollo	1	—	—	77.85
Células diploides	—	—	19**	—

*Números de pases en el sistema correspondiente.

** A nivel de los pases 9, 11 y 13 se purificó la cepa por selección de placca en Agar.

FUENTE: Salud Púb (Méx.), 1972: 21:271.

res, se inició en 1978 la producción regular de la vacuna en el Instituto Nacional de Virología.

Epidemiología del sarampión

El sarampión es, seguramente, la más contagiosa de las enfermedades transmisibles, bastando tan sólo unos minutos de exposición a un enfermo para que los susceptibles la adquieran. La vía de entrada es principalmente conjuntival y respiratoria. No existe más reservorio natural que el hombre, y la infección natural concede inmunidad permanente a los sobrevivientes.

El patrón epidemiológico del sarampión y las consecuencias de esta enfermedad son muy distintos en los países industrializados que en aquellos en desarrollo: la proporción de los casos en menores de un año, así como la mortalidad asociada, es mucho mayor para estos últimos. Ello obedece en gran medida al estado nutrición de los niños. La estrecha asociación entre la desnutrición y niveles altos de mortalidad por sarampión ha sido bien documentada por Puffer y Serrano.⁸ La tasa de letalidad en países del tercer mundo es de 2 por ciento y los niños menores de un año son los que se encuentran en mayor riesgo de muerte.³ En cuanto a la distinta distribución por edades de los casos en los países según nivel de desarrollo, la explicación se encuentra en los niveles y la duración de los anticuerpos maternos en el niño. Es decir, existe una relación directamente proporcional entre ingreso *per cápita* y duración de la inmunidad pasiva por anticuerpos maternos.

En la figura 1 se observan los niveles y tendencias de la morbilidad y mortalidad por sarampión en México en el período de 1961 a 1986. Se aprecia en general un curso similar y descendente para ambos

indicadores de salud. La curva de morbilidad describe un importante descenso en el año 1973, hasta 1975, asociado a las campañas de vacunación. Las exacerbaciones periódicas a partir de 1976 coinciden con las fases de menor actividad en los programas de vacunación específica.

Por lo que se refiere a la mortalidad, se observa que en términos absolutos la mayoría de las defunciones se presentan principalmente en el grupo de niños de 1 a 4 años de edad, (Fig. 2).

Por ser las diarreas y las neumonías complicaciones frecuentes del sarampión, el efecto benéfico de esa vacuna redundaría también en una menor mortalidad por estos padecimientos.

Sarampión en menores de 12 meses

El sarampión en menores de 12 meses representa un problema de salud pública de primera magnitud en países subdesarrollados. Se considera que en África el sarampión es probablemente la principal causa de muerte asociada a neumonías y diarreas en menores de un año; en América Latina, el porcentaje de casos de sarampión nates de los 12 meses de edad varía de 15 a 30 por ciento y del total de muertes por esta causa, entre 20 y 40 por ciento ocurren en población infantil. Así, resulta claro que la mayor letalidad por sarampión en países subdesarrollados se presenta antes de los 12 meses de edad.⁹

Los diferentes estudios de inmunidad pasiva natural reflejan la declinación de los anticuerpos maternos conforme transcurren los meses; a los seis meses de edad, una proporción importante de los niños en nuestros países son susceptibles al sarampión. Algunos autores han explicado el descenso más acelerado de los anticuerpos maternos por fac-

CASOS DE SARAMPION EN RELACION CON LAS DOSIS DE VACUNA APLICADAS EN LA REPUBLICA MEXICANA. 1965 - 1986.

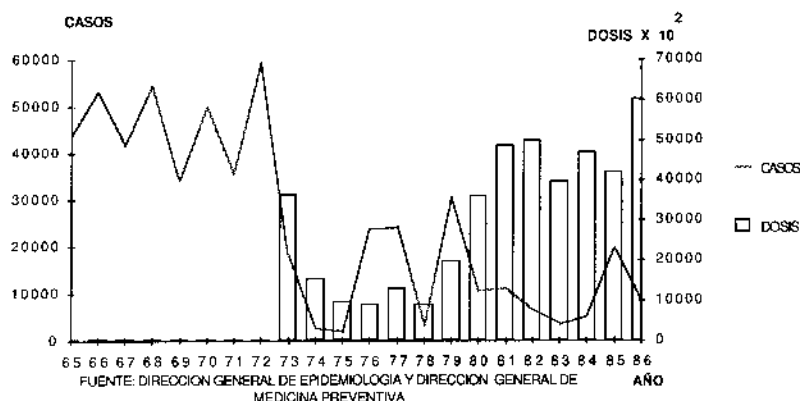
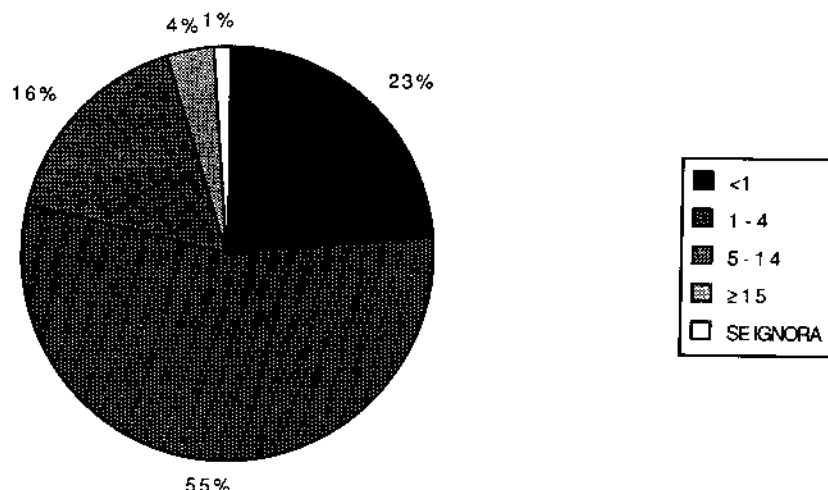


Figura 1

DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA MORTALIDAD POR GRUPO DE EDAD, EN LA REPUBLICA MEXICANA. 1978-1982.



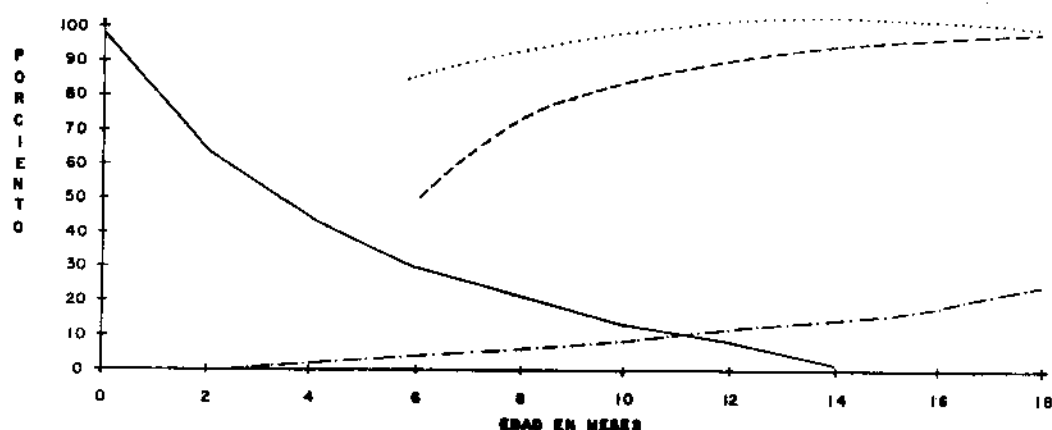
FUENTE: DIRECCION GRAL. DE ESTADISTICA, SPP Y DGE, SSA.

Figura 2

tores nutricios e inclusive genéticos; otros autores, sin embargo, explican la presencia de sarampión antes del año de edad en países subdesarrollados como el resultado de la circulación temprana y abundante del virus del sarampión salvaje.⁹⁻¹¹ Así las cosas, la

única alternativa para evitar las muertes por sarampión en menores de un año en los países en desarrollo es encontrar vacunas que tengan una respuesta inmunológica eficaz a pesar de los anticuerpos maternos (Fig. 3).

MODELO TEORICO DE LA INMUNIDAD NATURAL PASIVA. TASAS DE INFECCION Y EFICACIA DE LAS VACUNAS ANTISARAMPION.



— SEROPOSITIVIDAD POR ANTICUERPOS MATERNOS	- - - PORCENTAJE DE CASOS DE SARAMPION POR EDAD	... SEROCONVERSION A LAS VACUNAS TRADICIONALES	- · - · - EFICACIA ESPERADA DE NUEVAS VACUNAS
--	---	--	---

Figura 3

Los estudios de seroconversión de vacunas antisarampionosas en el mundo han revelado en general frecuencias de seroconversión inferiores a 65 por ciento en menores de siete meses. El trabajo de Sabin y cols., publicado en 1983 y efectuados en Nuevo León, mostró resultados muy prometedores, al aplicarse la vacuna Edmonston Zagreb en menores de seis meses, puesto que se encontraron tasas de seroconversión de 90 por ciento en 39 niños en quienes se aplicó la vacuna EZ mexicana por aerosol, al compararse con tasas de seroconversión de 30 por ciento con cepa Schwarz.⁷

En 1984, Sabin publicó resultados de la utilización de vacuna EZ mexicana aplicada por vía subcutánea a dosis de 5 000 PFU (unidades formadoras de placa) y en la cual encontró seroconversión de 100 por ciento en diez niños de seis meses estudiados con las técnicas de ELISA y neutralización en placa.¹² Trabajos realizados por la Dirección General de Epidemiología con vacuna Schwarz en niños de Oaxaca y Guanajuato, mostraron tasas de seroconversión inferiores a 75 por ciento en menores de diez meses.¹³ Fernández de Castro y col. publicaron los resultados de aplicación de vacuna EZM por vía subcutánea y en aerosol y Schwarz sólo por vía subcutánea. Se encontraron tasas de seroconversión mayores de 95 por ciento en niños de seis a nueve meses de edad, vacunados con la vacuna EZM por vía subcutánea.¹⁴ Beck, del Instituto Zagreb de Yugoslavia, ha empleado la vacuna EYZ por vía intranasal y subcutánea, encontrando frecuencias de seropositividad superiores a 90 por ciento 42 días después de la aplicación de la vacuna por vía subcutánea o intranasal en niños de cuatro a seis meses.¹⁵

Los logros obtenidos con la vacuna Edmonston Zagreb, particularmente en Yugoslavia, se pueden atribuir, por un lado a la cepa vacunal, y por otro, a la alta potencia de las vacunas utilizadas. Whittle ha descrito que al aumentar la potencia de la vacuna EZ, se obtienen mejores tasas de seroconversión y medias geométricas de los títulos de anticuerpos.¹⁶

En resumen, los estudios previos han mostrado que la vacuna antisarampionosa cultivada en células diploides humanas y producida a partir de la cepa Edmonston Zagreb, ha mostrado mejor inmunogenicidad que otras cepas vacunales incluyendo la Schwarz. Estos mismos estudios han señalado la posibilidad de que esta vacuna sea inmunógena a pesar de los anticuerpos maternos en menores de 12 meses. Al mismo tiempo los estudios sobre reacciones agudas adversas, son acordes con la hipótesis de que la cepa Edmonston Zagreb produce menos reacciones indeseables.

Está en proceso un estudio cuyos objetivos son comparar la inmunogenicidad de la vacuna antisarampionosa Edmonston Zagreb (producida en México y en Yugoslavia) con la Schwarz, aplicadas con tres potencias diferentes a niños de seis y nueve meses de la ciudad de México, y comparar las reacciones adversas agudas de las vacunas Edmonston Zagreb y Schwarz.

En nuestro estudio, la unidad de investigación está constituida por 1 800 niños de seis meses (más menos dos semanas), que son habitantes de tres delegaciones del Distrito Federal, clínicamente sanos, sin antecedentes de vacunación antisarampionosa o de enfermedad, y que cumplen con ciertos criterios de selección. En todos los casos, se cuenta con una carta de consentimiento aceptando participar en el estudio firmada por los padres (Fig. 4). El diseño es prospectivo: se seguirá a los niños que se les aplique la vacuna a los seis meses de edad durante 16 semanas, y en los que se vacunen a los nueve meses de edad habrá un seguimiento serológico desde los seis meses, es decir, tres meses antes de la aplicación de la vacuna, hasta los 12 meses y medio. Es un diseño doble ciego, en el cual ni los padres de los niños, ni las enfermeras que efectuarán el seguimiento clínico, ni el personal de laboratorio que analizará las técnicas serológicas, sabrán qué vacuna o dosis les fue suministrado. La selección de los niños para cada uno de los grupos se efectuará en forma aleatoria.

Las vacunas utilizadas en la investigación son: 1) Edmonston Zagreb cultivada en células diploides humanas MRC-5, producida en el Instituto Nacional de Virología de la Secretaría de Salud, con dos dosis diferentes, una de 3.7 y otra de 4.7 más menos 0.25 logaritmo de la dosis infectante de cultivo de tejido 50 por cada dosis (0.5 ml.); esta TCID₅₀ corresponde aproximadamente a 5 000 y 50 000 partículas virales. 2) Edmonston Zagreb cultivada en células diploides humanas WI-38, producida en el Instituto Zagreb de Yugoslavia, con dosis de 4.7 y 5.7 log. TCI₅₀/0.5 ml. 3) Schwarz cultivada en fibroblastos de embrión de pollo, producida por un laboratorio comercial francés, a las dosis de 3.7, 4.7 y 5.7 TCID₅₀.

La toma de muestras serológicas en todos los casos será antes de la vacunación, siete semanas después y 18 semanas posteriormente. Se utilizarán como técnicas serológicas la inhibición de la hemaglutinación (IH), y otras más sensibles, como la inmunoenzimática de ELISA y la de neutralización en placa descrita por Albrecht, la cual es la técnica más sensible para la determinación de anticuerpos

ESTUDIO DE SEROCONVERSION Y REACCIONES
CLINICAS ADVERSAS A LA VACUNA
ANTISARAMPION EN NIÑOS DE
6 Y 9 MESES DE EDAD

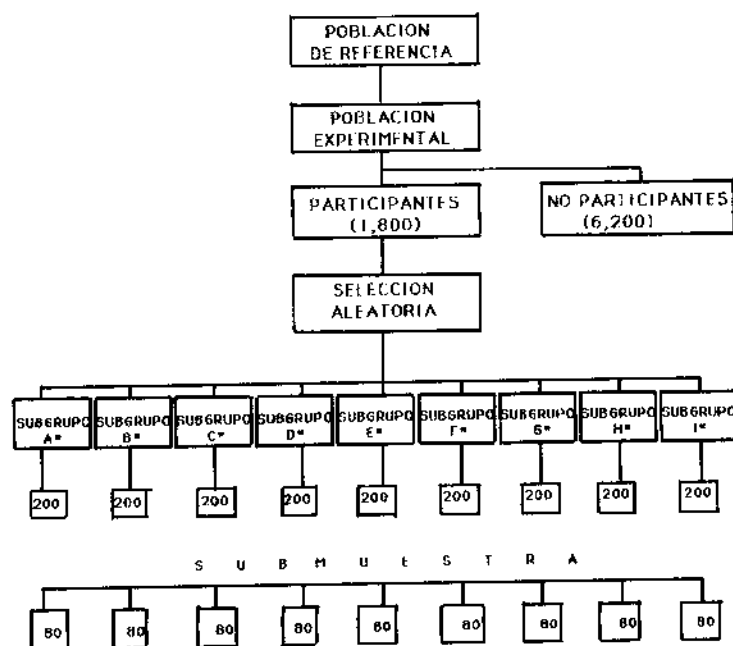


Figura 4

contra sarampión. Los criterios para medir la respuesta inmunológica serán: seroconversión y medias geométricas.

Para evaluar reacciones clínicas adversas se visitará cada tercer día, entre el quinto al vigésimo primer día, a una submuestra de los niños vacunados. La evaluación incluirá la medición de temperatura y la exploración de reacciones adversas como: exantema, enantema, rinitis y otras.

Sin triunfalismos prematuros, es de prever que los resultados de esta investigación esclarecerán dudas no resueltas, y de tenerse éxito en la seroconversión temprana, contribuirán a evitar muertes innecesarias y a elevar la calidad de la vida en los receptores de la vacuna.

Referencias

- FRASER KB; MARTIN SJ: *Measles virus and its biology*. London, Academic Press Inc., 1978. p. 1.
- CARRADA BRAVO T.; VELAZQUEZ G: *El impacto del sarampión en México*. Salud Pùb. (Méx.), 1980; 22:359.
- ASSAD F: *El sarampión: Resumen de la situación mundial*. En: OPS: *Simposio internacional sobre inmunización contra el sarampión*. Pub Cient. No. 477, 1985. p. 81.
- BUSTAMANTE ME: *Epidemiología de la tosferina y el sarampión*. México, Monografía No. 3 del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.
- KUMATE J: *Inmunidad, inmunización, vacunas*, 2a. ed. México, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 1979. p. 105.
- DE MUCHA J: *Vacuna contra el sarampión*. Salud Pùb (Méx.), 1979; 21:271.
- SABIN AB; FLORES ARECHIGA A; FERNANDEZ DE CASTRO J; MADEEN DL; SHEKARCHI I; ALBRECHT P: *Successful immunization of children with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine*. JAMA 1983; 249:2651.
- PUFFER RR; SERRANO CV: *Mortalidad en la niñez*. OPS. Pub. Cient. No. 262, 1973. p. 132.
- BORGOÑO JM: *Situación actual del sarampión en América Latina*. En: OPS: *Simposio internacional sobre inmunización contra el sarampión*. Pub. Cient. 477, 1985. p. 35.
- VALDESPINO GJL; ZARATE AML; DOMINGUEZ BE; SOLACHE AG; DIAZ OJL: *Inmunidad natural pasiva antisarampión en lactantes de la ciudad de México*. Salud Pùb (Méx.), 1985; 27:524.
- Organización Panamericana de la Salud: *Indice de conversión sérica y títulos de anticuerpos inducidos por la vacuna antisarampión en niños latinoamericanos, de seis a doce meses de edad*. Bol Of Sanit Panam 1983; 94:224.
- SABIN AB; FLORES ARECHIGA A; FERNANDEZ DE CASTRO J; SEVER JL; MADDEEN DL; SHEKARCHI I; ALBRECHT P: *Successful immunization of children with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine*. II. JAMA. 1984; 251: 2363.

13. DIAZ OJL; ZARATE AML; VALDESPINO GJL; CARDENAS AVN; RUIZ MC: *Seroconversión a la vacuna antitoserina en niños de 8 a 18 meses de edad*. Bol Méd Hosp Infant (Méx.), 1986; 43:526.
14. FERNANDEZ DE CASTRO J; VALDESPINO GJL; DIAZ OJL; ZARATE AML: *Diploid cell measles vaccine* (Carta al Ed.) JAMA, 1986; 256:714.
15. VLATKOVIC R; SMERDEL S; GVOJIC B; MANHALTER T; BECK M; WEISZ-MALECEK R; DELIMAR N: *Intranasal administration of chick embryo fibroblast Edmonston Zagreb measles vaccine*. Lancet, 1985; i:520.
16. WHITTLE H; ROWLAND MGM; MANN GF; LAMB WH; LEWIS RA: *Immunization of 4-6 month old Gambian infants with Edmonston Zagreb measles vaccine*. Lancet, 1984; i:834.

III. VACUNA ANTITOSFERINA ACELULAR AVANCES EN LA DETOXIFICACION.

J. ADOLFO GARCIA-SAINZ*
JUVENCIO RUIZ-PUENTE
JAIME JIMENEZ-PAREDES
ARTURO RUIZ-ARRIAGA

La *Bordetella pertussis* es un bacilo pequeño Gram negativo que fue aislado y caracterizado como agente causal de la tosferina en 1906 por Bordet y Gengou. Este bacilo fue conocido por muchos años como el bacilo de Bordet-Gengou y posteriormente, como *Haemophilus pertussis*; pero fue en 1952 cuando Moreno-López agrupó a tres bacilos serológicamente relacionados (*B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*), en un género al que denominó *Bordetella* en honor de Bordet.

Antes del advenimiento de la vacunación masiva, la tosferina era una de las causas más importantes de mortalidad infantil en todo el mundo. El éxito de Pasteur, al desarrollar vacunas contra algunas enfermedades virales y bacterianas, inspiró a muchos investigadores a buscar una posible vacuna contra la tosferina. Desafortunadamente la *Bordetella pertussis* no es un germen fácil de cultivar y los esfuerzos de muchos investigadores fracasaron. En 1933 Sauer y en 1939 Kendrick y Eldering comunicaron los primeros éxitos en la producción de una vacuna.

* Académico numerario. Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Los demás autores. Instituto Nacional de Higiene, Secretaría de Salud. Este trabajo fue apoyado para su realización por un donativo del CONACYT (BCCBBNA 021425).

En los años cincuenta en los países desarrollados, y para los sesentas en los subdesarrollados, se inician las campañas de vacunación masiva. A consecuencia de ésta y del mejoramiento de las condiciones sociales de la población, en prácticamente la totalidad del mundo ha disminuido la incidencia de tosferina.¹ En nuestro país, en los años cincuenta, la tasa de morbilidad era de aproximadamente 100 por cada 100 000 habitantes; para los ochentas, la tasa de morbilidad ha disminuido a entre 2 y 3 por cada 100 000 habitantes.² Sin embargo, la tosferina no ha sido eliminada: en 1981, la Dirección General de Epidemiología informó 1 346 defunciones por tosferina, con una tasa de mortalidad de 2.9 por 100 000 habitantes.² Resulta evidente que el esfuerzo por lograr la vacunación del total de la población infantil mexicana debe continuar e incluso reforzarse.

La vacuna en uso en nuestro país y en general en todo el mundo (excepto Japón, ver más adelante), consiste en una suspensión de *Bordetella pertussis* muerta por calentamiento; esta suspensión es generalmente asociada a los toxoides diftérico y tetánico para la formulación del DPT. La vacuna que se usa en México es fabricada en el Instituto Nacional de Higiene, con tecnología en gran parte desarrollada en el mismo Instituto y de acuerdo con las normas que la Organización Mundial de la Salud ha establecido.

Aunque la vacuna actual es indiscutiblemente una herramienta de enorme valor para la prevención de la enfermedad, existe un interés mundial por obtener una vacuna mejorada. Las razones para tratar de mejorar la vacuna son fundamentalmente dos: 1) al tratarse de una suspensión de gérmenes, contiene miles de antígenos de los cuales sólo unos cuantos son importantes para inducir la protección inmunológica; 2) la vacuna no está exenta de reacciones colaterales indeseables: un porcentaje elevado las presenta menores, como fiebre o irritabilidad, pero se han comunicado reacciones más graves, como convulsiones, taquicardia paroxística y daño cerebral permanente en un número,afortunadamente muy pequeño, de pacientes. Esto último ha ocasionado que algunos países con baja incidencia de tosferina interrumpieran sus campañas de vacunación masiva, con resultados lamentables por la aparición de epidemias.^{3,4}

Durante los últimos años se ha desarrollado una gran labor de investigación, con el fin de determinar cuáles son los antígenos inductores de protección contra el germen. Existe amplia evidencia de que por lo menos dos antígenos —la toxina pertussis y la hemaglutinina fibrosa— son importantes para inducir protección.⁵⁻⁷ Algunos grupos consideran que otros antígenos también son importantes como son los aglutinógenos³ y la adenilato ciclasa extracitoplásmica.⁸

La toxina pertussis es una exotoxina de naturaleza protéica, con un peso molecular aproximado de 119 KDa.⁹ Está formada por seis subunidades; una de ellas, el protómero A, es la parte catalíticamente activa de la toxina; las otras cinco, constituyen el oligómero B, que sirve para que la toxina se fije a las células que ataca.⁹ La toxina tarda en penetrar al interior de las células aproximadamente dos a tres horas; una vez en el interior de ellas, cataliza la ADP-ribosilación de dos proteínas membranales, llamadas "Ni" y "No", utilizando el NAD de la célula.^{9,13} Estas proteínas "Ni" y "No" son importantísimas para las células, pues acoplan a los receptores para hormonas, neurotransmisores y autacoides, con sus efectores membranales, tales como la adenilato ciclase,^{9,13} o algunos canales iónicos.^{14,15} La ADP-ribosilación que causa la toxina altera dramáticamente su función conduciendo a serias alteraciones celulares (véase^{9,12} para revisiones sobre estos aspectos). A la toxina pertussis también se le ha conocido con otros nombres como son: factor promotor de la leucocitosis, factor promotor de la linfocitosis, factor de toxicidad tardía, factor sensibilizante a la histamina, proteína activadora de los islotes pancreáticos, entre otros. Estos nombres básicamente describen los efectos que produce; inicialmente se pensó que se trataba de diferente toxinas, pero Muñoz¹ logró demostrar que todas estas actividades se encontraban en una sola molécula: la toxina pertussis. Esta toxina muy probablemente está involucrada en la patogenia de la enfermedad y en algunas de las reacciones adversas que produce la vacuna.

Pudiera pensarse que es indeseable que esta toxina esté presente en una vacuna. Sin embargo, existe suficiente evidencia para pensar que es el principal antígeno protector.^{5,7} Se ha demostrado que esta toxina inactivada es capaz de proteger contra el desafío por *Bordetella pertussis*.

La hemaglutinina fibrosa es una proteína oligomérica de muy alto peso molecular que ha sido caracterizada recientemente;¹⁶ uno de los grandes problemas para su caracterización ha sido la presencia de múltiples fragmentos y agregados con actividad de hemaglutinina. Esta proteína carece de actividad tóxica, es poco capaz de inducir protección activa por sí misma, pero amplifica la acción protectora de la toxina pertussis. Por otro lado, se ha sugerido que esta proteína es parte de la fimbria o pili de la superficie de la bacteria y que es muy importante su acción antigénica pues evita la colonización.^{6,7,17}

Los aglutinógenos están definidos operacionalmente como antígenos de la superficie bacteriana; los anticuerpos antiaglutinógenos son capaces de aglutinar a las bacterias.³ Algunos de estos antígenos han sido caracterizados molecularmente y se piensa que participan en la inducción de protección.³ Por otro lado, la *Bordetella pertussis* produce

una adenilato ciclase extracitoplásmica capaz de invadir algunas células y de alterarles su funcionamiento;⁸ se ha propuesto que pudiera ser importante en la patogenia de la enfermedad e incluso como antígeno protector.⁸

Durante la segunda mitad de los años setenta, Japón desarrolló una vacuna de tipo acelular que contiene exclusivamente dos antígenos: la toxina pertussis y la hemaglutina fibrosa.⁴ Esta vacuna se ha aplicado a la población del Japón desde 1981; en 1984 se dieron a conocer los primeros resultados, que han sido alentadores en el sentido de que la nueva vacuna induce una buena protección (similar a la de la vacuna tradicional), pero que produce una mucho menor incidencia de reacciones colaterales indeseables.^{4,18,19}

Nuestro grupo ha logrado producir un extracto acelular capaz de inducir protección en el ratón.²⁰ Se obtiene con tecnología muy simple y a bajo costo; este extracto ha podido ser parcialmente caracterizado,²¹ y contiene toxina pertussis, hemaglutinina fibrosa y otros componentes aún no caracterizados.^{20,21} En el presente trabajo se presenta el avance logrado en la detoxificación del producto.

Material y métodos

El procedimiento para la obtención y detoxificación del producto se encuentra indicado en la figura 5. Se utilizó *Bordetella pertussis*, cepa 509, en estos estudios. Esta cepa ha sido preferida por las siguientes razones: crece con relativa facilidad, produce consistentemente una cantidad razonable de toxina pertussis y forma parte de la vacuna actual. La *Bordetella* fue cultivada en medio Stainer líquido por aproximadamente 48 horas (hasta que el medio alcanzó un pH de 8.2). El producto es concentrado por precipitación ácida con ácido cítrico;²² El precipitado se resuspende en aproximadamente la décima parte del volumen original y se le ajusta el pH a 7. Las bacterias son eliminadas por centrifugación y el sobrenadante es utilizado como fuente del extracto acelular. Para la detoxificación, se agrega el o los reactivos con los que se realiza este proceso y posteriormente se realiza una precipitación con sulfato de amonio, con el fin de concentrar el producto. El precipitado es colectado por centrifugación, se resuspende en solución isotónica y se dializa exhaustivamente (24 horas con varios cambios). Este producto es el extracto acelular que se sujeta a las pruebas que a continuación se describen.

La potencia protectora se estudió usando la prueba estándar de desafío intracerebral desarrollada por Kendrick y colaboradores.²³ En esta prueba los ratones de la cepa INH Swiss Webster Stock N:NIH (SW) son retados con 300 a 500 veces la LD50 de *B. pertussis* (cepa 18323) 14 días después de

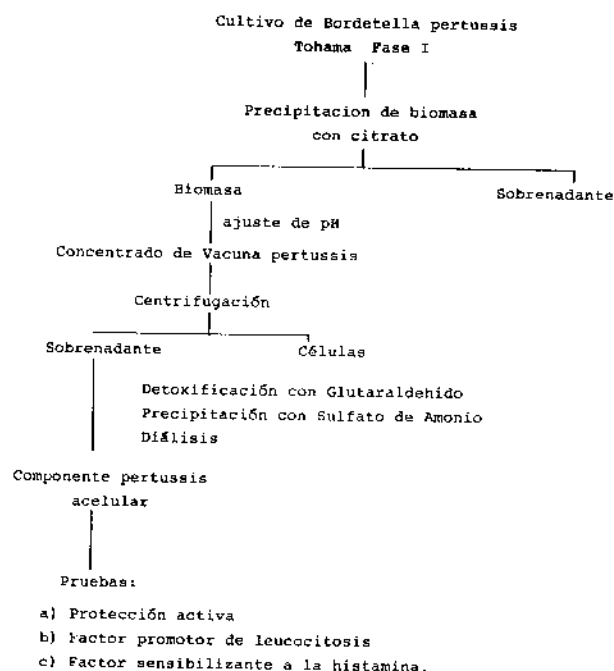


FIG. 5. Procedimiento para la preparación del extracto acelu-lar antipertussis.

la administración intraperitoneal de una sola dosis del extracto acelu-lar.

La leucocitosis fue determinada en una muestra de sangre obtenida cinco días después de la administración del extracto acelu-lar. Este período de observación fue escogido por que generalmente el quinto día se observa la máxima leucocitosis²⁰, datos no publicados).

La actividad de sensibilización a la histamina se estudió de la siguiente manera: cinco días después de la administración del extracto acelu-lar, los animales fueron inyectados con 0.1 mg/kg de bífosfato de histamina y la mortalidad se registró a las 24 horas. La toxicidad del producto fue determinada por el método de Pittman y Cox.²⁴

Resultados y discusión

Como puede apreciarse en la figura 6, la administración de dosis relativamente bajas del extracto acelu-lar induce, en una forma dependiente de la dosis, una protección activa en el ratón. En estas condiciones, la dosis que protege a 50 por ciento de los ratones (DE_{50}) fue de 3.7 μ g por ratón. Esta DE_{50} es muy similar a la observada en otros estudios;^{20,21} lo que habla de la reproducibilidad del efecto. Es importante que se observe que el máximo de protección se observa con 10 μ g y que si se aumenta la dosis, paulatinamente se va perdiendo la protección, al aparecer claras muestras de toxicidad. Dosis de 50 μ g o más llegan a causar la muerte de algunos

animales antes del desafío. Esta situación se presenta también con la vacuna tradicional y constituye el principal problema de los productores de vacuna pertussis en todo el mundo. Como puede apreciarse, el margen entre protección y toxicidad es relativamente estrecho.

Se intentaron varios métodos de detoxificación que han sido sugeridos por diversos autores, tales como el tratamiento térmico (tradicional para la detoxificación de la vacuna contra la tosferina), la formalina^{4,19} y el agua oxigenada,¹⁹ entre otros. En todos los casos, lo que se observó es que al abatirse la toxicidad se pierde la potencia protectora. Vale la pena mencionar que en una reunión reciente en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, se trató de obtener información de los productores japoneses respecto al proceso de detoxificación; estos procesos son desarrollados por cada una de las compañías farmacéuticas productoras de las vacunas y como era de esperarse, los representantes fueron bastante crípticos.¹⁹

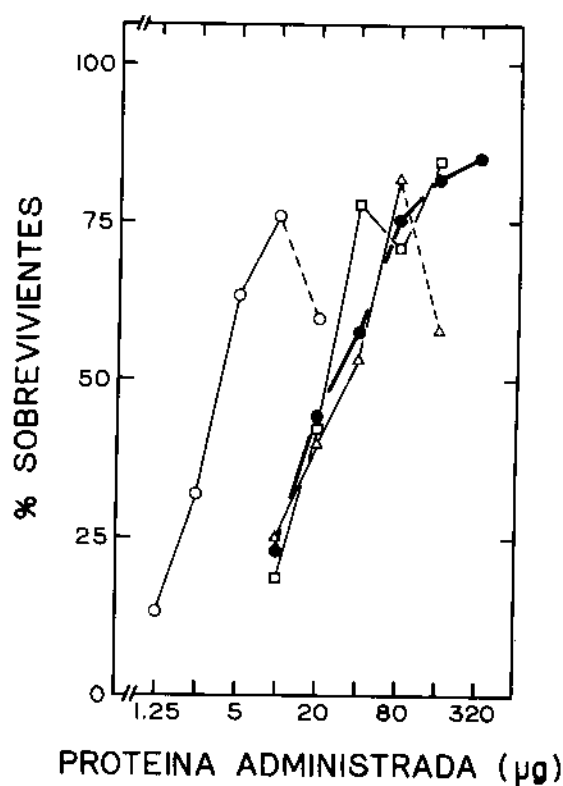


FIG. 6. Protección activa en el ratón inducida por el extracto acelu-lar anti-pertussis. Los animales fueron inyectados con las dosis indicadas del extracto acelu-lar no detoxificado (0) o detoxificado con glutaraldehído 0.1 por ciento (2 hs) (Δ); glutaraldehído 0.1 por ciento (24 hs) (□) o glutaraldehído 0.5 por ciento (1, línea gruesa).

Posteriormente, se intentó el tratamiento con glutaraldehído,⁵ observándose resultados razonables. Como puede apreciarse en la figura 6, el tratamiento con glutaraldehído al 0.1 por ciento durante dos horas ocasiona un desplazamiento hacia la derecha de la dosis respuesta, observándose ahora una DE_{50} de aproximadamente 35 μ g, es decir, una pérdida de potencia de aproximadamente diez veces. El máximo de protección se observa ahora a 80 μ g; sin embargo, si se aumenta la dosis por encima de este valor, vuelven a aparecer signos de toxicidad (véase la línea punteada de la figura 6). Si se aumenta el tiempo de exposición al glutaraldehído a 24 horas, ya no hay mayor pérdida de potencia, observándose una DE_{50} de 25 μ g, obteniéndose el máximo de protección entre 40 y 80 μ g; es interesante que ya con este tratamiento el máximo de protección se mantiene por un margen mayor, sin que disminuya por la toxicidad. Al aumentarse la concentración de glutaraldehído a 0.5 por ciento se observó que la DE_{50} fue de aproximadamente 30 μ g y que el máximo de protección se mantiene constante hasta la dosis más alta probada (320 μ g), sin que aparezcan datos de toxicidad.

Los resultados fueron aún más claros cuando se valoró la leucocitosis inducida por la preparación acelular; estos resultados se presentan en la figura 7. Como puede apreciarse, el extracto acelular no detoxificado produce una marcada leucocitosis en los animales, en forma dependiente de la dosis. No se trató de llegar al máximo de leucocitosis por dos razones: 1) se deseaba mantener una estricta comparación con los datos de potencia protectora (Fig. 6); 2) a concentraciones más altas, la toxicidad de la preparación mataba algunos animales. El tratamiento con 0.1 por ciento de glutaraldehído provoca un desplazamiento paralelo de la dosis respuesta con un corrimiento hacia la derecha aproximado de seis a diez veces con respecto al no detoxificado. Es interesante mencionar aquí que se observó una leucocitosis de 50 000 mm^3 a las concentraciones en que se obtuvo una máxima protección (compárense las figuras 6 y 7) y que leucocitosis mayores se asociaron siempre a toxicidad claramente observable en los animales. El dato más importante de este estudio fue observar que cuando se trata el extracto con glutaraldehído al 0.5 por ciento ya no se observa leucocitosis (Fig. 7), aunque claramente la preparación es capaz de inducir protección (véase la figura 6).

Se estudió el efecto sensibilizante a la histamina de las preparaciones (Cuadro II). Tanto la preparación no tratada con glutaraldehído como las tratadas con 0.1 por ciento del entrecruzador inducen clara y marcadamente una sensibilización a la histamina. Por el contrario, no se observó efecto sensibilizante al autacoide cuando el extracto fue detoxificado con glutaraldehído al 0.5 por ciento.

Se mencionarán algunos otros resultados preliminares: el extracto detoxificado con glutaraldehído al 0.5 por ciento es capaz de pasar la prueba de toxicidad de Pittman y Cox,²⁴ y carece de actividad dermonecrótica.

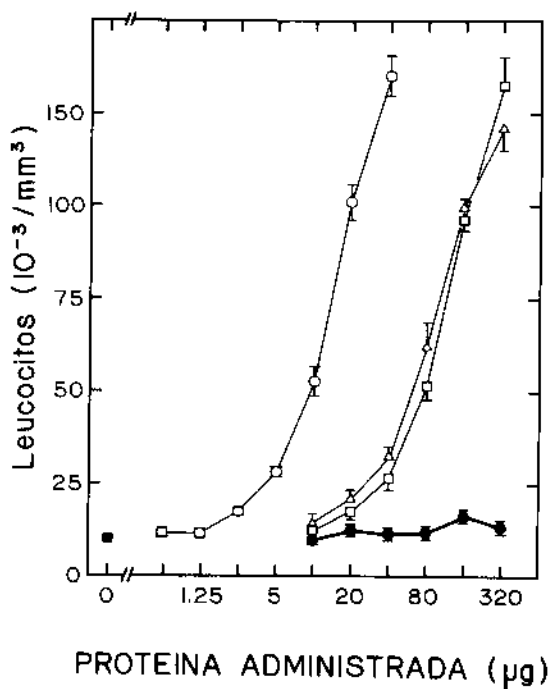


FIG. 7. Inducción de leucocitosis por el extracto acelular antipertussis. Los animales fueron inyectados con las dosis indicadas del extracto acelular no detoxificado ($\odot$) o detoxificado con glutaraldehído 0.1 por ciento (2 hs) (Δ); glutaraldehído 0.1 por ciento (24 hs) ($\square$) o glutaraldehído 0.5 por ciento (—, línea gruesa).

Estos resultados sugieren la posibilidad de obtener la detoxificación total de la preparación acelular conservando su actividad protectora. Debe mencionarse, sin embargo, que si se produce una disminución en potencia; esta disminución, en nuestra opinión, es de importancia menor si se toman en cuenta los beneficios de una detoxificación total.

Consideramos que esta preparación acelular, aún en fase de laboratorio, resulta un candidato atractivo para la formulación de una potencial vacuna acelular de uso masivo. Nuestro grupo continúa trabajando en esta línea con el fin de tener un mayor control del producto al cuantificar directamente por lo menos dos de los componentes: toxina pertussis y hemaglutinina fibrosa, la magnitud de la respuesta inmunológica del animal tratado y el efecto del extracto acelular en la colonización del epitelio respiratorio por *Bordetella pertussis*.

Actividad de factor sensibilizante a la histamina del componente pertussis acelular

Proteína administrada histamina proteína	Relación muertos/total después del reto con Glutaraldehído			
	0	0.1% (2 hrs)	0.1% (24 hrs)	0.5% (2 hrs)
0	0/10	—	—	—
0.63	1/10	—	—	—
1.25	5/10	—	—	—
2.5	7/10	—	—	—
5	6/10	—	—	—
10	5/10	8/10	7/10	0/10
20	—	8/10	6/10	0/10
40	—	8/10	6/10	0/10
80	—	8/10	7/10	0/10
160	—	9/10	9/10	0/10
320	—	8/10	8/10	0/10

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a los doctores Antonio Peña (Instituto de Fisiología Celular) y Juan Garza (Gerencia General Biológicos y Reactivos) por su apoyo para la realización de estos estudios. Se agradece a la Sra. Guadalupe Ramírez su excelente ayuda secretarial.

Referencias

- MUÑOZ JJ; BERGMAN RK: Bordetella pertussis. *Immunological and other biological activities*. New York, Marcel Dekker, Inc, 1977.
- Dirección General de Epidemiología, 1985.
- ROBINSON A; IRONS LI; ASHWORTH LAE: *Pertussis vaccine: present status and future prospects*. Vaccine, 1985; 3:11.
- SATO Y; KIMURA M; FUKUMI H: *Development of a pertussis component vaccine in Japan*. Lancet, 1984; 1:122.
- MUÑOZ JJ; ARAI H; BERGMAN RK; SADOWSKI PL: *Biological activities of crystalline pertussigen from Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1981; 33:820.
- ROBINSON A; IRONS LI: *Synergistic effect of Bordetella pertussis lymphocytosis-promoting factor on protective activities of isolated Bordetella antigen in mice*. Infect Immun, 1983; 40:523.
- SATO H; SATO Y: *Bordetella pertussis infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in a intracerebral or aerosol challenge system*. Infect Immun 1984; 46:415.
- WEISS AA; HEWLETT EL; MYERS GA; FALKOW S: *Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of Bordetella pertussis*. Infect Dis, 1984; 150:219.
- SEKURA RD; MOSS J; VAUGHAN M (Eds.) *Pertussis toxin*. Orlando, Academic Press Int; 1985.
- UI M: *Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase*. Trends Pharm Sci, 1984; 5:277.
- GARCIA-SAINZ JA: *Bordetella pertussis toxin and adenylate cyclase*. Trends Pharma Sci, 1983; 4:289.
- GARCIA-SAINZ JA: *La toxina pertussis un arma para la profilaxis contra la tosferina y para estudiar los mecanismos de acción de algunas hormonas*. Ciencia, 1985; 36:97.
- MALBON CC; RAPIEJKO PJ; GARCIA-SAINZ JA: *Pertussis toxin catalyzes the ADP-ribosylation of two distinct peptides, 40-KDa and 41 KDa in rat fat cell membranes*. FEBS Lett, 1984; 176:301.
- SPIEGEL AM; GIERSECHIK P; LEVINE MA; DOWNS RW JR: *Clinical implications of guanine nucleotide-binding proteins as receptor effector couplers*. 1985; 312:26.
- PFÄFFINGER PJ; MARTIN JM; HUNTER DD; NATHANSON NM; HILLE B: *GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel*. Nature, 1985; 317:536.
- VAN DER LAN B; COWELL JL; BURSTYN DG; MANCLARK CR; CHRAMBACH A: *Characterization of the filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis by gel electrophoresis*. Mol Cell Biochem, 1986; 70:31.
- SATO Y; IZUMIYA K; ODA MA; SATO H: *Biological significance of Bordetella pertussis fimbriae or hemagglutinin: a possible role of the fimbriae or hemagglutinin for pathogenesis and antibacterial immunity*. En: Manclark CR; Hill JC (eds.) *International Symposium on Pertussis*. Department of Health, Education and Welfare Publication, No. 79-1830, Washington, US Government Printing Office, 1979. p. 51.
- US Department of Health and Human Services (PHS): *Pertussis and pertussis vaccines in Japan*. 1986.
- MANCLARK CR: *Workshop on acellular pertussis vaccines*. Washington, US Public Health Service, 1986.
- GARCIA-SAINZ JA; RUIZ-PUENTE J; JIMENEZ-PAREDES J; GONZALEZ-PACHECO M; VILLALVA-

POSADA H: *Comparative biological activities of whole cell pertussis vaccine and a ne acellular preparation*. Vaccine, 1985; 3:23.

21. GARCIA-SAINZ JA; RUIZ-PUENTE J; JUAREZ-AYALA J; JIMENEZ-PAREDES J; QUIROGA I; HERNANDEZ-PUGA, A.; VILLAVA-POSADA, H. *Vacuna antitosferina acelular: Avances en su desarrollo*. En: Garza Ramo, J. (ed.) *Avances en el Uso de Vacunas 1985-1985*. México, Intersistemas, 1986. p. 116.
22. MORA-AYALA TA; RODRIGUEZ H: *Concentración de vacuna pertussis con ácido cítrico*. Salud Publ (Méx.), 1981; 23:585.
23. KENDRICK PL; ELDERING G; DIXON MK; MISNER J: *Mouse protection test in the study of pertussis vaccine: a comparative series using the intracerebral route for challenge*. Am J Pub Health, 1947; 37:803.
24. PITTMAN, M; COX, BC: *Pertussis vaccine testing for freedom from toxicity*. Appl Microbiol, 1965; 1:447.

El de Tanimoto, en el Hospital General del Centro Médico Nacional, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El de Arroyo, Tsutsumi y Martínez-Palomo, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. El de Ortiz-Ortiz, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El de Kumate e Isibasi, en el Hospital Infantil de México y en la División de Inmunología de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social.

IV. AMIBIASIS

GONZALO GUTIERREZ*

La necesidad y la posibilidad de desarrollar una vacuna contra la amibiasis fueron establecidas con toda claridad por Bernardo Sepúlveda desde 1971.¹ Para demostrarlo, formuló y llevó a cabo un activo y extenso programa de trabajo. Además de las contribuciones científicas que él mismo hizo en estos aspectos, logró interesar en ello a diversos grupos de investigadores del Instituto Mexicano del Seguro Social, el Instituto Politécnico Nacional, la Universidad Nacional Autónoma de México y la Secretaría de Salud. Todos ellos han hecho numerosas aportaciones para el mejor conocimiento de *Entamoeba histolytica*, así como de la epidemiología, la patología y la inmunología de la amibiasis, necesarias para el desarrollo de una posible vacuna contra esta enfermedad. Pero los grupos que directamente han trabajado en la búsqueda y preparación de un inmunógeno, ya sea bajo la dirección del Maestro Bernardo Sepúlveda cuando él aún no nos dejaba, o en forma independiente, han sido los siguientes:

He querido mencionarlos, en primer lugar por un elemental sentido de justicia y como un reconocimiento a su labor. Pero además, porque de los trabajos por ellos publicados y de los de Bernardo Sepúlveda, he obtenido la mayor parte de la información utilizada en esta comunicación, ya que mi experiencia en amibiasis se limita al campo de la epidemiología y de la clínica. Es más, considerando mis condiciones actuales de trabajo y utilizando términos deportivos, diría que soy un clínico fuera de "forma", aficionado a la epidemiología.

En este trabajo comentaré algunos puntos que considero de interés, relacionados con los siguientes temas:

La amibiasis como problema de salud

Métodos de prevención

Bases inmunológicas de la posible vacuna

Los inmunógenos y los modelos experimentales

Los problemas por resolver y las tareas por realizar

La amibiasis como problema de salud

El estudio de la frecuencia, extensión y distribución de la amibiasis en el mundo, ha sido preocupación de muchos investigadores. Desde el clásico trabajo de Stoll, "Este mundo agusanado", publicado en 1947,² una copiosa literatura se ha producido al respecto. Una de las revisiones más recientes de este tema es la de Walsh, publicada en Archivos de Investigación Médica en 1986.³ Según esta autora y con base a los estudios epidemiológicos publicados, se estima que durante 1984 acontecieron en todo el planeta, 500 millones de infecciones por *E. histolytica*, entre 40 y 50 millones de casos de colitis amibiana y de absceso hepático y fallecieron entre 40 y 110 000 enfermos de amibiasis (Cuadro III).

*Académico titular. Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Subjefatura de Investigación. Jefatura de Servicios de Enseñanza e Investigación. Instituto Mexicano del Seguro Social. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Cuadro III

Prevalencia e incidencia de amibiasis en el mundo
1984

Continente	Infecciones	Enfermedad (Colitis y absceso)	Muertes
Norte y Sudamérica	95 000 000	10 000 000	10-30 000
Asia	300 000 000	20-30 000 000	20-50 000
Africa	85 000 000	10 000 000	10-30 000
Europa	20 000 000	100 000	

FUENTE: Walsh JA. Arch Invest Méd (Méx) 1986; 17 (Supl): 385- 389.

Los datos anteriores colocan a la amibiasis como la tercera causa de muerte entre las enfermedades parasitarias, superada únicamente por el paludismo y la esquistosomiasis. Sin embargo, los cálculos realizados tienen un margen considerable de error y así lo reconoce la misma autora. Ello es debido a diversos factores, empezando por que hay áreas y países que no notifican la enfermedad y otras que lo hacen en exceso. Por otra parte, los estudios epidemiológicos frecuentemente adolecen de fallas, entre las cuales cabe mencionar las siguientes:⁴

Deficiencias en los sistemas de registro de casos y de defunciones.

Encuestas realizadas en muestras de población no representativas y no comparables.

Utilización de técnicas de laboratorio con sensibilidad diversa.

Errores diagnósticos frecuentes por mala capacitación del personal de laboratorio o por mal criterio clínico.

Información insuficiente sobre la patogenicidad de las cepas prevalentes.

En este último aspecto, los estudios de Sargeant han abierto una nueva perspectiva en el estudio de la epidemiología de la amibiasis, al demostrar que no todas las cepas de *E. histolytica* son capaces de producir enfermedad y que ello se puede determinar mediante el estudio de su patrón enzimático electroforético o zimodemo.⁵

En México, la literatura sobre el tema también es numerosa. Los estudios sobre la frecuencia de la infección y de la enfermedad y los seroepidemiológicos, a pesar de que adolecen de los defectos antes comentados, permiten tener una idea sobre la magnitud del problema. Así por ejemplo, aunque la frecuencia comunicada de portadores varía de cero a 55.5 por ciento,⁴ según la población estudiada y el método y las técnicas utilizadas, tomando como base los datos de las

encuestas más confiables, la mayoría de los autores piensan que la probable frecuencia real sea de aproximadamente el 20 por ciento, lo que arrojaría una cifra de 16 millones de portadores, para la población actual. Pero desconocemos la verdadera importancia epidemiológica de esta enorme cifra, ya que no sabemos cuál es la frecuencia relativa de cepas patógenas y no patógenas, pues aunque Sargeant y Kumate han demostrado que en México existen cuando menos once zimodemos, cinco patógenos y seis no patógenos,^{6,7} las muestras estudiadas no permiten todavía hacer extrapolaciones a la población general.

En relación con la enfermedad amibiana, se sabe que la forma más frecuente es la intestinal. También aquí los estudios realizados revelan frecuencias relativas variables, que van desde el 0.8 por ciento en casos de diarrea aguda en población abierta,⁸ hasta 14 por ciento en grupos muy seleccionados de niños con diarrea.⁹ Probablemente la cifra real esté entre el uno y el dos por ciento, lo que arrojaría un número aproximado de 1 200 000 casos anuales, sobre la base muy conservadora de un episodio diarreico por año y por habitante, para una población de ochenta millones.

Aunque el diagnóstico de absceso hepático amibiano es más confiable que el de colitis amibiana, el cálculo del número probable de casos también es difícil, pues su frecuencia casi siempre se notifica en relación a población hospitalizada. Existen pocos datos que nos pueden orientar sobre su frecuencia en la población general. En 1984, Martínez encuentra una frecuencia de un caso de absceso hepático por 1 000 habitantes, en el área de influencia de un hospital rural del altiplano, considerada como hiperendémica.¹⁰ En 1969, se registraron 1 804 casos en sólo 29 hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social.¹¹ En los primeros once meses de 1986, primer año en que se registró este padecimiento en el Sector Salud, el Boletín Epidemiológico notificó 2 249 casos.¹² Sobre estas bases tan endeble y haciendo las correcciones y extrapolaciones pertinentes, es posible estimar que el número

anual de casos en todo el país, sea superior a los 10 000 (Cuadro IV).

Por último y con base en los datos de la encuesta seroepidemiológica nacional de 1974,¹³ la cual reveló que 5.95 por ciento de la población estudiada tenía anticuerpos, es posible estimar que de acuerdo con la población actual, más de cuatro millones de individuos exhiben en el país anticuerpos circulantes, como consecuencia de una lesión tisular amibiana.

Cuadro IV

**Frecuencia de la amibiasis en México*
1987**

Condición	Número
Portadores	16 000 000
Seropositivos	4 000 000
Enfermos	
Intestinal	1 200 000
Hepática	10 000
Defunciones	13 000**

* Cálculos con base en los estudios epidemiológicos publicados.

** Considerando una letalidad aproximada del 10% para absceso hepático y de 1% para colitis.

Los datos anteriores, aun con todas las deficiencias comentadas muestran, una vez más, que la amibiasis constituye un grave problema de salud en México, por el elevado número de casos y defunciones que ocasiona, así como por sus repercusiones económicas y sociales.

Métodos de prevención y control

Como cualquier otra enfermedad de transmisión fecal, la prevención de la amibiasis se basa en el saneamiento ambiental y en la educación higiénica. Comprende ello una serie compleja y amplia de acciones sanitarias, tales como el abastecimiento de agua potable, la correcta eliminación de excretas y basuras, la higiene de los alimentos y de la vivienda, así como la corrección de hábitos higiénicos defectuosos, la inducción de conductas adecuadas y el cambio de conceptos erróneos sobre la salud y la enfermedad. La modificación y los avances en los aspectos antes mencionados son necesariamente lentos, sobre todo en países donde la ignorancia y la pobreza predominan. Aun con acciones sanitarias enérgicas, no se peca de pesimismo al decir que pasarán muchos años antes de que la amibiasis sea controlada en países pobres como México.

Por otra parte, son frecuentes los errores en el diagnóstico de la enfermedad,⁴ particularmente en los casos de amibiasis intestinal, por deficiencias de las técnicas, mala capacitación del personal de laboratorio o mal criterio clínico, circunstancias que también limitan el control del padecimiento.

Por todo ello y tal como lo expresó repetidamente Bernardo Sepúlveda, se justifica la búsqueda y desarrollo de una vacuna anti-amibiasis, segura y eficaz, cuya eventual aplicación masiva controlaría el padecimiento, mientras los cambios sociales, económicos y políticos, permitan la elevación del nivel de vida de la población y la erradicación de este mal, cuya raíz es la pobreza.

Bases inmunológicas de la vacuna

Los hallazgos inmunológicos que permiten suponer que es posible el desarrollo de una vacuna para uso en humanos, son los siguientes:

Resistencia adquirida a la enfermedad en los sujetos curados de absceso hepático.

Resistencia adquirida en los hamsters curados de absceso hepático.

Inmunidad pasiva en el hamster, inducida por suero inmune humano.

Efecto amebicida del suero humano inmune y de la gammaglobulina específica.

Inmunidad activa, inducida por diferentes inmunógenos, en diversos modelos experimentales.

La experiencia clínica en el sentido de que nunca o muy rara vez repetía el absceso hepático amibiano en un mismo sujeto fue corroborada en 1970 por De León,¹⁴ cuando al analizar los expedientes clínicos de 1 029 casos de absceso hepático atendidos entre 1963 y 1968, en sólo tres de ellos hubo recidiva, entre cuatro y siete meses después del primer episodio, lo cual da una tasa de sólo 0.29 por ciento. Para algunos autores,¹⁵ estas cifras no constituyen una evidencia de resistencia adquirida, máxime que en la amibiasis intestinal se ha demostrado la reinfección con invasión amibiana en sujetos con títulos elevados de anticuerpos.^{16,17} Sin embargo, Sepúlveda siempre sostuvo la existencia de resistencia adquirida, al menos después de una invasión amibiana grave, como lo es el absceso hepático. En apoyo de ello, Vázquez-Saavedra y colaboradores, demostraron en 1973 la existencia de inmunidad consecutiva a la infección amibiana curada en el hamster,¹⁸ y en 1974, Sepúlveda demostró que es posible inducir inmunidad pasiva anti-amibiana en el hamster adulto, al inyectar suero humano inmune y posteriormente retar con trofozoítos de amiba por vía intrahepática.¹⁹

El estudio de la capacidad amebicida del suero humano inmune y de la gamma-globulina inmune, obtenidos de sujetos convalcientes de absceso hepático, fue motivo de varios experimentos que demostraron su efecto citopatogénico sobre los trofozoitos de *E. histolytica*, en diferentes formas.²⁰⁻²⁴

Efecto citopatogénico directo del suero humano inmune y la gammaglobulina específica, sobre trofozoitos de *E. histolytica*.

Inhibición del crecimiento de cultivos axénicos y monoxénicos de *E. histolytica*.

Comprobación de la naturaleza inmunológica de los fenómenos anteriores por la absorción del suero y de la gammaglobulina, con antígeno o con cultivo de amibas.

Por último, las expectativas de la inmunoprofilaxis activa contra la amibiasis, se sustentan en varios experimentos que han demostrado que es posible desarrollar diversos grados de inmunidad por medio de la inyección de diversos inmunógenos, en diferentes modelos experimentales.

Inmunógenos y modelos experimentales

En 1971, Sepúlveda llevó a cabo el primer experimento de inmunoprofilaxis activa.¹ Utilizó antígeno crudo total de trofozoitos de la cepa HK9 cultivada en forma axénica, el cual inyectó a hamsters adultos, por vía subcutánea, en tres dosis de 0.50 mg, solo o mezclado con adyuvante completo e incompleto de Freund; siete días después de la última dosis, retó a los animales inmunizados y a los testigos con la inyección intrahepática de trofozoitos de la misma cepa. Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro V.

Cuadro V

Inducción de inmunidad antiamebiana en hamsters adultos, con antígeno crudo total obtenido de cultivos axénicos de *E. histolytica*

Grupo	Núm.	Por ciento con anticuerpos*	Por ciento con absceso hepático
Inmunizados	24	95.8	29.1
Testigos	37	43.2	91.8
valor de $p > 0.001$			

* Por contrainmunolectroforesis.

FUENTE: Sepúlveda B y col. Arch. Invest. Med (Méx.) 1971; 2(Supl.): 289.

A partir de entonces se han probado diversos antígenos en varios modelos experimentales, los cuales se resumen en el Cuadro VI.²⁵⁻³⁴ De los experimentos realizados entre 1970 y 1986, se pueden derivar las siguientes conclusiones:

Diversos inmunógenos amebianos son capaces de inducir, en diferentes modelos experimentales, una respuesta inmunológica, humoral y celular.

Esta respuesta inmunológica confiere diversos grados de resistencia contra la inoculación intrahepática de trofozoitos de *E. histolytica* cultivados en forma axénica, fenómeno particularmente evidente en el hamster lactante.

La resistencia adquirida es evidente, tanto para la misma cepa amebiana de la cual procede el inmunógeno, como para cepas diferentes. No se observaron fenómenos colaterales indeseables, locales o generales, atribuibles a la inyección del inmunógeno, si bien los experimentos no se diseñaron para el estudio de este fenómeno.

En este último aspecto, es pertinente señalar que el Instituto Behring de Química Hoechst, en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, está realizando estudios con el antígeno deslipidizado, relativos a estabilidad, capacidad de protección en hamsters, así como de seguridad farmacológica y de toxicología en ratas y ratones, cuyos resultados permiten suponer que en un plazo relativamente corto se dispondrá de un antígeno confiable, para pruebas clínicas en humanos.

Este paso en el programa de investigación es indispensable, ya que todos los ensayos en los diversos modelos experimentales en animales, por ser diferentes a los caminos y mecanismos patogénicos de la enfermedad en el hombre, no permiten extrapolar sus resultados a los esperados en esta especie.

La tarea inmediata

La posibilidad de llevar a cabo ensayos clínicos en humanos dependerá en primer lugar de la producción en escala semiindustrial y posteriormente en escala industrial, de un antígeno potente, puro, seguro, uniforme y estable, e idealmente de bajo costo, que permita llevar a cabo las pruebas necesarias en las diferentes etapas de evaluación farmacológica.

La evaluación farmacológica previa al ensayo en humanos, deberá comprender los siguientes aspectos:

Pruebas de identidad

Concentración y naturaleza de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos

Experimentos de inmunización activa con diferentes antígenos en diversos modelos experimentales

Autor	Año	Antígeno	Modelo Experimental	Anticuerpos (%)	Protección (%)
Sepúlveda, B. y col.	1971	Cepa HK9 axénica Cruto total	Hamster adulto Inyección intrahepática Cepa HK9 axénica	91.8	68.5
Sepúlveda, B. y col.	1973	Cepa HM2: IMSS Axénica Monoxénica Crudo total	Hamster adulto Inyección intrahepática Cepa HM2: IMSS Axénica	—	N.S.
Tanimoto-Weki, M. y col.	1973	Cepa HK9 Cruto total	Hamster adulto Inyección intrahepática Cepa HK9 axénica	—	~ 40.5
			Cepa HM2: IMSS monoxénica	—	N.S.
Sepúlveda, B. y col.	1970	Cepa HM3: IMSS Axénica Soluble I Soluble II "Tribosómico" "Lisosómico"	Hamster lactante Inyección intrahepática Cepa HM1: IMSS axénica	100.0 100.0 100.0 100.0	~ 90.0
Isibasi, A. y col.	1976	Cepa HK9 Axénica Lipopéptido-fosfoglicana	Conejos	100.0	
Sepúlveda, B. y col.	1980	Cepa HM3: IMSS Axénica "Lisosómico"	Primates Subhumanos	84.0*	
*Entre 33.3% (monos "pata") y 100.0% (monos "verdes" y "arañas").					
En el 45.0% hubo también respuesta positiva a la prueba intradérmica con histolítica.					
Ortiz-Ortiz, L. y col.	1986	Cepa HM1: IMSS Cepa HM2: IMSS Axénica Deslipizado	Ratones BALB/C y Hamster lactante Inyección intrahepática Cepa HM1: IMSS axénica	100.0 80.0	100.0 70.0
Tanimot-Weki, M. y col.	1986	Cepa HM1: IMSS Axénica Deslipizado	Hamster lactante Inyección intrahepática Cepa HM1: IMSS axénica	90.0	88.9

Pruebas de pureza

Contaminantes químicos: principalmente de los derivados del medio de cultivo

Contaminantes biológicos: virus, bacterias y micoplasmas

Pirógenos.

Pruebas de potencia

Antigenicidad (anticuerpos)

Potencia (protección contra desafíos)

Pruebas de seguridad

Toxicidad aguda

Toxicidad crónica

Pruebas de uniformidad

Establecer los límites de las variaciones permitidas en un mínimo de cinco lotes.

Variaciones intra-lote

Variaciones inter-lote

Pruebas de estabilidad

En condiciones "normales"

Simulando diferentes condiciones de temperatura, humedad y luminosidad.

Es en esto en lo que actualmente trabaja el Instituto Behring en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Sólo el ensayo en seres humanos, sujeto a las normas éticas y de investigación nacionales e internacionales, podrá dar respuesta a las múltiples incógnitas que sobre la eficacia y seguridad de una posible vacuna sobre la amibiasis, aún quedan por responder.

Epílogo

Diversas críticas y objeciones se le han hecho al proyecto de la vacuna antiamibiasis. La mayoría de ellas se comentan más en "los pasillos" y "entre bastidores" que en la palestra de la discusión abierta y académica. La que podría ser más preocupante es la relativa a la posibilidad teórica de la existencia de un mecanismo inmune en la patogenia de la enfermedad amibiana en el hombre, que podría, más teóricamente, ser evocado por la vacuna antiamibiasis. Este temor se basa en que, a diferencia de otras enfermedades infecciosas, la amibiasis invasora es supuestamente más frecuente en el adulto que en el niño, tal como evidentemente sucede con el absceso hepático amibiano, el cual claramente predomina en el adulto joven del sexo masculino. Contra esta hipótesis se pueden ofrecer los siguientes argumentos:

La amibiasis invasora es más frecuente en niños de cinco a diez años de edad, tal como lo demostró la encuesta seroepidemiológica nacional llevada a cabo en 1974, en cerca de 20 000 individuos de todos los grupos de edad.¹³ Ello se debe a la mayor frecuencia de amibiasis intestinal en la infancia.

No existe, por ahora, explicación para la mayor frecuencia de absceso hepático en el adulto del sexo masculino.

No existe evidencia alguna, clínica, patológica, ni de laboratorio,¹⁵ de la existencia de mecanismos inmunes en la patogenia de la enfermedad amibiana.

La extraordinaria capacidad invasora de *E. histolytica* puede explicar, por sí sola, la génesis de todas las lesiones amibianas.

De cualquier forma, seguirán las voces que impugnan estos argumentos. Ello es necesario, pues obligarán a continuar el estudio de dicha posibilidad inmunológica. A la luz de los conocimientos actuales, el riesgo es mínimo y remoto, comparado con los beneficios que otorgaría una vacuna antiamibiasis razonablemente protectora. En este sentido, y recordando al Quijote, puedo sin dificultad alguna imaginar un diálogo entre Librado Ortiz, activo investigador en el campo de la amibiasis, y el espíritu de Bernardo Sepúlveda, en el cual el primero demandaría:

"Ladran los perros, Maestro"

y Don Bernardo, con su inolvidable e irónica sonrisa, respondería:

"Señal de que andamos. Librado"

Referencias

1. SEPULVEDA B; TANIMOTO-WEKI M; VAZQUEZ-SAAVEDRA JA; LANDA L: *Inducción de inmunidad antiamibiana en el hamster con antígeno obtenido de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1971; 2(Supl):289.
2. STOLL NR: *This wormy world*. J Parasitol 1947; 33:1.
3. WALSH JA: *Amoebiasis in the world*. Arch Invest Méd (Méx), 1986; 17(Supl):385.
4. GUTIERREZ G: *Epidemiología y control de la amibiasis en México*. Arch Invest Méd (Méx), 1986; 17(Supl):375.
5. SARGEANT PG; WILLIAMS JE; GRENE JD: *The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1978; 72:519.
6. JIMENEZ E; KUMATE J: *Correlación clínica de zimodemes de E. histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1982; 13(Supl 3):77.
7. Sargeant PG; Baveja VK; Nanda R; Anand BS: *Influence of geographical factors in the distribution of pathologic zimodemes of Entamoeba histolytica: identification of zimodeme XIV in India*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1984; 78:96.
8. MARTINEZ MC; MUÑOZ O; GUTIERREZ G: *Epidemiología intrafamiliar de la diarrea aguda en una comunidad del altiplano mexicano*. Datos no publicados.
9. DONTA ST; WALLACE RB; WIPP SC; OLARTE J: *Enterotoxigenic Escherichia coli and diarrheal disease in Mexican children*. J Infect Dis, 1977; 135:482.
10. MARTINEZ MC; CASTRO-DELGADO JM; ARMENTA M; MUÑOZ O; Y GUTIERREZ, G: *Características del*

- absceso hepático amibiano en un hospital rural del altiplano mexicano. Arch Invest Méd (Méx). 1986; 17(Supl):335.
11. ALVAREZ-ALVA R; DE LA LOZA-SALDIVAR A: Frecuencia del absceso hepático amibiano en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social de la República Mexicana. Arch Invest Méd (Méx), 1971; 2(Supl):327.
 12. Información estadística sobre enfermedades transmisibles. Epidemiología (Méx), 1987; 2:44.
 13. GUTIERREZ G; LUDLOW A; ESPINOSA G; HERREIRA S; MUÑOZ O; RATTONI N; SEPULVEDA B: Encuesta serológica nacional. II. Investigación de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* en la República Mexicana. Mem Conferencia Internacional sobre Amibiasis, México, Instituto Mexicano del Seguro Social. 1976. p. 599.
 14. DE LEON A: Pronóstico tardío en el absceso hepático amibiano. Arch Invest Méd (Méx). 1970; 1(Supl):205.
 15. KAGAN IG: Pathogenicity of *E. histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1974; 5(Supl 2): 457.
 16. KRUP IM; POWELL SJ: Comparative study of antibody response in amebiasis. Persistence after successful treatment. Am J Trop Med Hyg, 1971; 20:421.
 17. STAMM WP; ASHLEY MJ; BELL K: The value of amebic serology in an area of low endemicity. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1976; 70:49.
 18. VAZQUEZ-SAAVEDRA JM; TANIMOTO-WEKI M; OLIVERA-LOPEZ JI; CARACHEO-REYES F; CORTES-ARCOS A: Inmunidad consecutiva a la infección amibiana curada en el hamster. Arch Invest Méd (Méx), 1973; 4(Supl 1):155.
 19. SEPULVEDA B; TANIMOTO-WEKI M; CALDERON P; DE LA HOZ R: Inducción de inmunidad pasiva anti-amibiana en el hamster por la inyección de suero inmune. Arch Invest Méd (Méx), 1974; 5(Supl 2):451.
 20. GUERRERO-ALCAZAR M; SEPULVEDA B; GONZALEZ SM; RAMIREZ-ESPINOSA ME: Adición de complemento al suero humano. Su efecto sobre el trofozoito de *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1972; 3(Supl 2):325.
 21. SEPULVEDA B; CHEVEZ A; ITURBE-ALESSIO I; ORTIZ-ORTIZ L: Efecto de la gammaglobulina inmune anti-amibiana sobre el trofozoito de *E. histolytica*. Arch Invest Méd (Méx) 1973; 4(Supl 1):79.
 22. CHEVEZ A; ITURBE-ALESSIO I; SEPULVEDA B; SEGURA M; ORTIZ-ORTIZ, L: Respuesta morfofisiológica de los trofozoitos de *E. histolytica* a la acción del suero humano inmune correspondiente. Arch Invest Méd (Méx), 1973; 4(Supl 1):71.
 23. DE LA TORRE M; ORTIZ-ORTIZ L; DE LA HOZ R; SEPULVEDA B: Acción del suero humano inmune y de la gammaglobulina anti-amibiana sobre cultivos de *E. histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1973; 4(Supl 1):67.
 24. SEPULVEDA B; ORTIZ-ORTIZ L; CHEVEZ A; SEGURA M: Comprobación de la naturaleza inmunológica del efecto del suero y la gammaglobulina inmune sobre el trofozoito de *E. histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1974; 5(Supl 2):343.
 25. SEPULVEDA B; TANIMOTO-WEKI M; GUERRERO A; SOLIS G: Inmunidad en el hamster consecutiva a vacunación con cultivos monoxénicos y axénicos de *E. histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1973; 4(Supl 1):159.
 26. TANIMOTO-WEKI M; VAZQUEZ-SAAVEDRA JA; CALDERON-LARA P; AGUIRRE-GARCIA J: Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amibiano axénico en el hamster. Arch Invest Méd (Méx), 1973; 4(Supl 1):147.
 27. ISIBASI A; GARCIA-TAMAYO F; KUMATE J: Poliscáridos obtenidos de *Entamoeba histolytica* en cultivo axénico. Mem Conferencia Internacional sobre Amibiasis, México, Instituto Mexicano del Seguro Social, 1976. p. 82.
 28. SEPULVEDA B; ARROYO-BEGOVICH A; TANIMOTO-WEKI M; MARTINEZ-PALOMO A; ORTIZ-ORTIZ L: Inducción de inmunidad protectora anti-amibiana con nuevos antígenos en el hamster lactante. Arch Invest Méd (Méx), 1978; 9(Supl 1):309.
 29. SEPULVEDA B: Inducción de inmunidad anti-amibiana en primates sub-humanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica*. I. Introducción. Arch Invest Méd (Méx), 1980; 11(Supl 1):245.
 30. SANCHEZ ME; MARTINEZ-PALOMO A: Inducción de inmunidad anti-amibiana en primates subhumanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica*. II. Aislamiento y caracterización del antígeno lisosomal. Arch Invest Méd (Méx), 1980; 11(Supl 1):247.
 31. AUBANEL M; GOMEZ-REYES I; SEPULVEDA B: Inducción de inmunidad anti-amibiana en primates subhumanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica*. III. Reacciones de contrainmunolectroforesis y de hemaglutinación indirecta en el suero de los monos. Arch Invest Méd (Méx), 1980; 11(Supl 1):251.
 32. KRETSCHMER RR; GOMEZ-REYES I; FERNANDEZ DE CASTRO J; TENA E: Inducción de inmunidad anti-amibiana en primates subhumanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica*. V. Reacciones intradérmicas con histolítica en monos. Arch Invest Méd (Méx), 1980; 11(Supl 1):263.
 33. OLIVA A; CORREA I; ORTIZ-ORTIZ L: Inmunogenicidad de un antígeno deslipidizado de *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1986; 17(Supl):229.
 34. TANIMOTO-WEKI M; AGUIRRE-GARCIA J; SANCHEZ ME; SEPULVEDA B: Inducción de inmunidad protectora anti-amibiana en el hamster por medio de antígeno soluble deslipidizado. Arch Invest Méd (Méx), 1986; 17(Supl):233.
 35. ORTIZ-ORTIZ L; GOMEZ R; ESTRADA-PARRA S: ¿Existen complejos inmunes en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano? Arch Invest Méd (Méx), 1974; 5(Supl 2):491.

V. PAPEL DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE SALMONELLATYPHY EN LA INDUCCION DE PROTECCION CONTRA FIEBRE TIFOIDEA, EN UN MODELO MURINO

ARMANDO ISIBASI*
VIANNEY ORTIZ**
MARTIN VARGAS*
JACOBO TELLEZ-GIRON*
JORGE PANIAGUA*
JESUS KUMATE**

* Académico numerario.

** Académico titular. Subsecretaría de Servicios de Salud. Secretaría de Salud.

* Laboratorio de Inmunoquímica, Unidad de Investigación Biomédica, Subjefatura de Investigación, Jefatura de Servicios de Enseñanza e Investigación, Instituto Mexicano del Seguro Social.

** Laboratorio de Investigación. Instituto Nacional de Higiene. Secretaría de Salud.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión intestinal de *Salmonella typhi*. Eberth, en 1880 describió por primera vez al bacilo tifoidico. La primera inmunización experimental exitosa con suspensión de *Salmonella typhi* fue llevada al cabo en 1886 por Frankel y Simmons en conejos y en 1887 por Bauner y Peiper en ratones, empleando en ambos casos microorganismos vivos. En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas hechas a base de bacterias vivas atenuadas y administradas por vía oral; desafortunadamente, al probar sus efectos, hubo muertos entre los individuos vacunados.¹ En 1955,^{1,2} bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo sobre la eficacia de vacunas preparadas con células enteras de *Salmonella typhi* inactivadas con acetona, calor y fenol o con alcohol. De los resultados obtenidos en tales estudios, se concluyó que la vacuna inactivada con acetona (designada K), era la mejor. Los efectos colaterales adversos de las vacunas parenterales, motivaron la búsqueda de nuevas vacunas. A la fecha se han estudiado dos vacunas administradas por vía oral y elaboradas a base de bacterias vivas. Una de ellas se obtiene de una cepa de *Salmonella typhi* dependiente de estreptomycin y otra con una mutante deficiente en la enzima UDP-4-galactosa epimerasa (designada por Germann como Ty 21a).^{3,4} Los estudios realizados en Alejandría, Egipto, indicaron que esta vacuna inducía protección en 95 por ciento de la población estudiada;⁵ sin embargo, al aplicarla en Chile (1983), sólo indujo una protección del 51-67 por ciento.⁶

De las experiencias anteriores resalta el hecho de que se desconoce la naturaleza de los antígenos de *Salmonella typhi* relacionados directamente con la protección y más aún, la respuesta inmune del hombre a estos mismos antígenos. En los últimos años, la proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias gram-negativas han adquirido gran importancia y diversos investigadores han enfocado sus estudios hacia el papel que desempeñan en la relación huésped-parásito en salmonellosis. Las PME más estudiadas, han sido las de *E. coli* y *S. typhimurium*. Di Rienzo, Nakamura e Inouye en 1978 y Osborn y Wu en 1980, hicieron una revisión extensa de ellas^{7,8} y las clasificaron en proteínas principales y menores.

Las proteínas principales se dividen en: 1) proteínas matrices o porinas, que participan en el transporte pasivo de moléculas de bajo peso molecular a través de la membrana; 2) proteína modificable por el calor (ompA), relacionada con los procesos de conjugación y que actúa como receptor de algunos fagos y colicinas; 3) lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es mantener la integridad estructu-

ral y funcional de la membrana. Con respecto a las proteínas menores, se ha demostrado que intervienen como acarreadoras en el transporte de moléculas de alto peso molecular, además de estar relacionadas con la replicación celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de membrana externa con actividad enzimática de fosfolipasa A demostrada a la actualidad.^{7,8}

La evidencia de que la PME están expuestas al medio externo, llevó a algunos autores a investigar su eficacia como inmunógenos protectores, Frasch y col. encontraron que las PME de *Neisseria meningitidis* grupo B, eran inmunogénicas al ser inoculadas a conejos y que los anticuerpos anti-PME presentaban actividad bactericida, mediada por complemento, contra la bacteria.⁹ Buchanan y Arko demostraron que un antígeno capaz de proteger a chimpancés contra la uretritis gonocócica estaba presente en la membrana externa de la *Neisseria gonorrhoeae*.¹⁰ Posteriormente se demostró que las proteínas de dicha membrana, eran las que conferían la protección específica en cobayos con una infección gonocócica experimental.¹¹ Kussi y col. demostraron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de *S. typhimurium* protegían al ratón de un reto con una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos.^{12,13} Basados en dichos resultados, el presente estudio se diseñó para investigar el papel de las PME en la inducción de protección específica contra la infección por *S. typhi* en ratones, así como la capacidad de transferir dicha inmunidad en forma pasiva mediante el uso de suero inmune contra PME.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas. *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi aislada de un paciente con fiebre tifoidea; *Salmonella typhi* Ty2 (empleada para la producción de la vacuna tifoidica parenteral) y *Salmonella typhimurium*. Esta dos últimas cepas fueron donadas por el Instituto Nacional de Higiene, S. S., México.

Aislamiento y caracterización de las proteínas de membrana externa (PME). Para aislar las PME de las tres cepas de *Salmonella* se empleó el método de Schnaitman.¹⁴ Estas proteínas se caracterizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio) según el sistema de amortiguadores de Laemmli¹⁵ y por inmunotransferencia de acuerdo a la técnica descrita por Towbin y col.¹⁶ *Preparación de LPS.* El lipopolisacárido (LPS) de *S. typhi* 0 901 fue extraído por el método de fenol-agua.¹⁷ Este LPS se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñó según la técnica de Tsai y Fresch.¹⁸

Determinación de proteínas y LPS. La concentración de proteínas se hizo por el método de Lowry¹⁹ y el contenido de LPS como contaminante de las

PME, fue medido en forma indirecta al través de la concentración del ácido 2-ceto 3-manoolutónico (KDO).²⁰

Suero de conejo contra PME. El anticuerpo anti-PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi se obtuvo inmunizando conejos Nueva Zelanda de acuerdo al esquema propuesto por Makela y col.²¹ El título de anticuerpos se determinó mediante la técnica de ELISA.²²

Determinación de la dosis letal al 50 por ciento (DL₅₀). Se calculó la DL₅₀ de acuerdo al método de Reed y Munch.²³

Ensayo de protección activa y pasiva. Para la protección activa se inmunizaron por vía ip 10 ratones de la cepa NIH (18-20 g) con dos dosis de PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi disueltas en amortiguador de Tris 50 mM-EDTA 5 mM pH 7, 8 a una concentración de 30 µg con un intervalo de dos semanas entre cada inmunización. El reto se hizo diez días después de la última inmunización por vía ip con 20 y 500 DL₅₀ de *S. typhi* 9, 12, d, Vi, *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium* resuspendidas en mucina al 5 por ciento.

En los ensayos de inmunidad activa se emplearon como testigos grupos de diez ratones cada uno, a los que se les administró para la primera por vía ip, 0.2 ml de amortiguador Tris-EDTA. La protección en todos los casos se evaluó como el por ciento de sobrevivencia durante los diez días posteriores al reto.

Resultados

El contenido de LPS como contaminante de las PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi medido a través de la concentración de KDO fue del 4 por ciento.

En la figura 8 se observa el patrón electroforético de las PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi; *S. typhimurium* y *S. typhi* Ty2, en ella se destaca la presencia tanto de proteínas principales como de proteínas menores. Entre las primeras se encuentran diversas bandas localizadas entre 36 y 41 Kd; 23 y 28 Kd y una de 17 Kd y las segundas están constituidas por bandas que van de 17 a 70 Kd.

Los resultados de la inmunotransferencia se observan en la figura 9. El suero de conejo anti-PME de *S. typhi* Ty2; en ella se destaca la presencia tanto de al grupo de las porinas y ompA tanto de la cepa homóloga como de *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium*.

En el cuadro VII se muestra la dosis letal al 50 por ciento (DL₅₀) para cada una de las cepas estudiadas.

Los cuadros VIII, IX y X muestran los resultados de la protección conferida con 30 µg de PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi. Los resultados obtenidos de este experimento demuestran una sobrevivencia del 100 por ciento con un reto de 20 DL₅₀ y 500 DL₅₀ tanto para su cepa homóloga como para *S. typhi* Ty2 mientras que para *S. typhimurium* fue de 60 y 30 por ciento respectivamente.

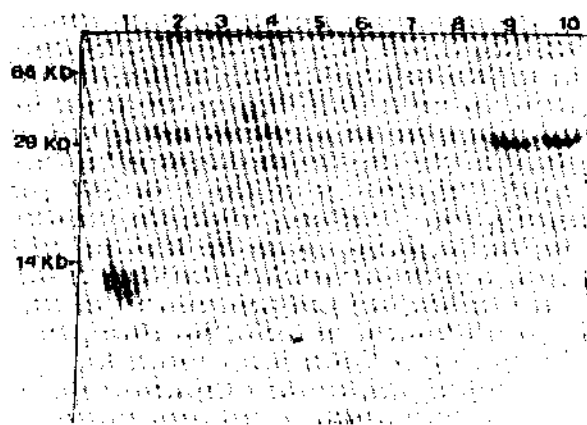


FIG. 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida de PME de: *S. typhi* 9, 12, d, Vi (10 µg carriles 2, 3, 4); *S. typhi* Ty2 (10 µg carriles 5, 6, 7); *S. typhimurium* (10 µg carriles 8, 9, 10); marcadores de peso molecular (carril 1).



FIG. 9. Inmunoelectrotransferencia revelada con suero de conejo anti-PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi. Marcadores de peso molecular teñidos con tinta china (carril 1); PME de: *S. typhi* 9, 12, d, Vi (carril 2); *S. typhi* Ty2 (carril 3); *S. typhimurium* (carril 4).

El suero hiperinmune de conejo anti-PME mostró protección del 100 por ciento ante el reto con 100 DL₅₀ de la cepa homóloga y *S. typhi* Ty2 y del 80 por ciento para *S. typhimurium* (cuadros XI, XII y XIII).

Cuadro VII

Dosis letal al 50% en ratones NIH para tres diferentes CEPAS de *Salmonella*

Cepa	DL ₅₀
<i>S. typhi</i> 9, 12, d, Vi	150 × 10 ³ bacts. (macho)
<i>S. typhi</i> Ty2	40 × 10 ³ bacts. (macho)
	160 × 10 ³ bacts. (hembra)
<i>S. typhimurium</i>	1.6 × 10 ² bacts. (hembra)

* La mortalidad de los ratones se registró a los tres días, excepto en los experimentos con *S. typhimurium* donde la prueba se registró a los 10 días.

* Los experimentos se realizaron por triplicado, verificando el número de bacterias inoculadas con cuenta viable en placas de agar nutritivo.

Cuadro VIII

Sobrevivencia de ratones NIH inmunizados con 30 µg de PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi al reto con la cepa homóloga

DL ₅₀	% Sobrevivencia		
	3	5	10
20 DL ₅₀	100	100	100
500 DL ₅₀	100	100	100

Cuadro IX

Sobrevivencia de ratones NIH inmunizados con 30 µg de PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi al reto con *S. typhi* Ty2

DL ₅₀	% Sobrevivencia		
	3	5	10
20 DL ₅₀	100	100	100
500 DL ₅₀	100	100	100

Cuadro X

Sobrevivencia de ratones NIH inmunizados con 30 µg de PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi al reto *S. typhimurium*

DL ₅₀	% Sobrevivencia		
	3	5	10
20 DL ₅₀	100	60	60
500 DL ₅₀	100	30	30

Cuadro XI

Sobrevivencia de ratones NIH inmunizados con 0.2 ml de suero Inmune, anti-PME, al reto con 100 DL₅₀ de *S. typhi* 9, 12, d, Vi

Suero	% Sobrevivencia		
	3	5	10
Inmune	100	100	100
No inmune	20	0	0

Cuadro XII

Sobrevivencia de ratones NIH inmunizados con 0.2 ml de suero Inmune, anti-PME, al reto con 100 DL₅₀ de *S. typhi* Ty2

Suero	% Sobrevivencia		
	3	5	10
Inmune	100	100	100
No inmune	20	20	20

Cuadro XIII

Sobrevivencia de ratones NIH inmunizados con 0.2 ml de suero Inmune, anti-PME, al reto con 100 DL₅₀ de *S. typhimurium*

Suero	% Sobrevivencia		
	3	5	10
Inmune	100	100	100
No inmune	40	30	0

Discusión

El presente estudio se realizó con el fin de determinar el papel que tienen las PME en la protección contra la infección por *S. typhi* en un modelo experimental murino. Para ello, las PME fueron obtenidas de tres cepas de *Salmonella*, mediante el método descrito por Schnaitman, en el cual se logra una amezcla de PME que contiene fundamentalmente a las porinas y ompA, con una contaminación de LPS no mayor del 4 por ciento. Estas PME fueron utilizadas para inmunizar a ratones de la cepa NIH, en donde se llevaron a cabo los experimentos de protección activa. Para los experimentos de protección pasiva, se utilizaron también ratones NIH inyectados con suero de conejos inmunizados con PME. Los hallazgos principales de estos estudios pueden resumirse de la siguiente manera: 1) Las PME son adecuadas como inmunógenos y la respuesta generada es protectora contra el reto con las bacterias vivas. 2) Hay inmunidad cruzada entre las tres cepas de *Salmonella* utilizadas lo que indica que los epítopes que participan en la protección son compartidos. 3) La administración pasiva de suero inmune anti-PME confiere protección, también contra las tres cepas utilizadas.

Una de las metas en el estudio de la fiebre tifoidea es el obtener una vacuna efectiva, libre de los efectos colaterales de las vacunas actualmente disponibles. Diversos estudios han analizado la utilidad de diversos componentes antigénicos obtenidos de *S. typhi*. De esta manera, se ha encontrado que el LPS o antígeno O, a pesar de ser un buen inmunógeno e inducir títulos altos de anticuerpos, éstos no son útiles en la protección contra la infección. El uso de antígenos proteicos, como el H o flagelar, también induce anticuerpos, los cuales tampoco han sido efectivos en conferir protección. Debido a lo anterior, en estudios más recientes, los grupos de investigadores se han dedicado a analizar el papel que un grupo de proteínas, componentes constitutivos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, entre las cuales se encuentran las porinas (ompC, ompF, lamB, phoE, etc.), así como la proteína modificable por el calor (ompA). Al utilizar a dichas proteínas, se ha encontrado que son inmunogénicas y que cuando son inyectadas en un vehículo adecuado, son capaces de conferir protección contra la infección por la bacteria. El presente estudio corrobora dichos hallazgos y señala que, por lo menos, para las tres cepas de *Salmonella* utilizadas, existe reactividad cruzada en cuanto a protección (y reactividad inmunológica) se refiere.

El corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida de las proteínas de las tres cepas de *Salmonella* estudiadas, mostró la presencia tanto de proteínas principales como de proteínas menores. Entre las primeras se encontraron diversas bandas localizadas entre 36 y 41 Kd; 23 y 28 Kd y una de 17

Kd y las segundas estaban constituidas por bandas que se ubicaban entre 17 y 70 Kd. Esto es similar a lo encontrado por Nikaido para *S. typhimurium*, en especial en lo que corresponde a las denominadas porinas y a la ompA cuyos pesos moleculares van de 36 a 38Kd;²⁴ de manera que nuestro antígeno está constituido por una mezcla de PME.

Kussi y col. encontraron que en ratones B6B/c, las PME de *S. typhimurium* eran capaces de inducir protección al reto con ésta.^{21,25} El presente trabajo demostró que los ratones inmunizados con la PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi fueron parcialmente protegidos a un reto con *S. typhimurium*. La protección cruzada está relacionada con el hecho de que las PME de ambas *Salmonellas* comparten algunos determinante antigénicos. De acuerdo a los resultados obtenidos con la inmunización activa, se encontró que 30µg de PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi confieren una protección del 100 por ciento contra el reto de 500 DL₅₀ con la cepa homóloga y con *S. typhi* Ty2, mientras que la protección contra el reto *S. typhimurium* fue de sólo 30 por ciento.

Tokunaga²⁵ y Lee²⁷ encontraron semejanzas en los perfiles peptídicos de las porinas de *S. typhimurium* y *E. coli* lo que sugirió que había secuencias de aminoácidos comunes para ambas, por lo tanto es posible suponer que también existan secuencias comunes entre las PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi y *S. typhimurium*, ya que éstas son filogenéticamente mucho más cercanas. Esto está de acuerdo con el hecho de que las PME de ambas enterobacterias tiene un patrón similar de corrimiento electroforético. Dichos hallazgos explican la inmunidad cruzada obtenida en el presente estudio.

Los experimentos de inmunidad pasiva reflejan también protección efectiva al reto con la cepa homóloga y protección parcial al reto con *S. typhimurium*. El mecanismo de protección cruzada se podría explicar a través de los resultados obtenidos en la inmunoelectrotransferencia, ya que el suero hiperinmune de conejo anti-PME de *S. typhi* 9, 12, d, Vi empleado en la inmunidad pasiva, reconoce también las PME de *S. typhimurium* y en especial a las que corresponden al grupo de las porinas. Estos resultados indican que la inmunidad humoral es suficiente para inducir protección contra *Salmonella*, sin embargo, no se analizó la duración de dicho estado de inmunidad; posiblemente la inducción de inmunidad celular mediada por linfocitos T sea necesaria para inducir una inmunidad permanente. El presente estudio tampoco analiza dicha posibilidad.

En conclusión, ésta investigación demuestra la utilidad de la PME en la inducción de inmunidad protectora contra bacterias del género *Salmonella*, así como la posibilidad de inducir inmunidad contra diversas bacterias del mismo género con la utilización de PME derivados de una sola cepa, lo que aumenta la utilidad potencial de las mismas. Queda

por analizar la naturaleza exacta del inmunógeno, así como el papel que la inmunidad celular tiene en la inducción de protección y la duración de la misma. En la actualidad se están iniciando estudios tendientes a resolver estas interrogantes.

Referencias

- PEREZ MA; CABRERA R: Medidas preventivas empleadas en la infección tifoidea. *Rev Salud Pub (Méx)*, 1974; 15:185.
- PFEIFFER R; KOLLE W: *Über die spezifische Immunitäts Reaktion der Typhusbazillen*. *Z Hyg Infektkr*, 1896; 21:202.
- GERMANIER R; FURER E: Isolation and characterization of *S. typhi* gal E mutant Ty 21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine. *J Infect Dis*, 1975; 131:553.
- REITMAN M: Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent, *Salmonella typhosa*, *J Infect Dis*, 1967; 117:101.
- WAHDAN MH; SERIE C; CERISIER Y; SALLAM S; GERMANIER R: Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a as oral vaccine against typhoid: Three years results. *J Infect Dis*, 1982; 145:292.
- GERMANIER R: The live oral typhoid vaccine Ty 21a: Recent field trial results. *Sclavo International Conference on Bacterial Vaccines and Local Immunity*, 1986. Siena, p. 10.
- DI RIENZO JM; NAKAMURA K; INOUE M: The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. *Annu Rev Biochem*, 1978; 47:481.
- OSBORN MJ; WU HC: Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 1980; 34:369.
- FRASCH CE; ROBBINS JD: Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a Guinea pig model. *J Exp Med*, 147:629.
- BUCHANAN TN; PEARCE WA; SCHOOLNICK GK; ARKO RJ: Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. *J Infect Dis*, 1977; 136(Supl 1):132.
- BUCHANAN TM; ARKO RJ: Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in Guinea pigs. *Infect Dis*, 1977 135:879.
- KUSSI N; NURMIEN M; SAXEN H; VALTONEN M; MAKELA PH: Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect Immun*, 1979; 25:857.
- KUSSI N; NURMIEN M; SAXEN H; MAKELA PH: Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in experimental murine salmonellosis: Effect of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1982; 34:328.
- SCHNAITMAN CA: Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1971; 108:553.
- LAEMMLI UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680.
- TOWBIN H; STAHELIN T; GORDON J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350.
- WESTPHAL B; JANN K: Bacterial lipopolysaccharides extractions with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr Chem*, 1979; 5:83.
- TSAL CM; FRASCH CE: A sensitive silver stain detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1982; 119:115.
- LOWRY OH; ROSEBROUGH NJ; FARR AL; RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193:265.
- KARKHANIS TO; ZELTHER JY; JACKSON JJ; CARLO DJ: A new improved microassay to determine 2-Keto 3-doxo octonate in lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. *Anal Biochem*, 1978; 85:595.
- KUSSI N; NURMINEN M; SAXEN H; VALTONEN M; MAKELA PH: Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect Immun*, 1979; 25:857.
- ENGRAL E; PERLMAN P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Immunochim*, 1971; 8:874.
- REED LJ; MUENCH HA: A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Hyg*, 1938; 27:493.
- KAMIO Y; NIKAIKO H: Outer membrane of *Salmonella typhimurium* identification of proteins exposed on cell surface. *Biochim Acta*, 1977; 464:589.
- KUSSI N; NURMINEN M; SAXEN H; MAKELA PH: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine *Salmonellosis*. *Infect Immun*, 1982; 34:328.
- TOKUNAGA H; TOKUNAGA M; NAKAE T: Characterization of porins from the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Eur J biochem*, 1979; 95:433.
- LEE DR; SCHNAITMAN CA; PUGSLEY PA: Chemical heterogeneity of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 1979; 138:861.