

# EXPERIMENTACIÓN CON VACUNAS RIBOSOMALES DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* y DE *SALMONELLA TYPHI* Ty2

J. L. MOLINARI, M.C.

*Departamento de Biología Experimental  
Instituto de Biología. UNAM México, D. F.*

1. Introducción	183
II. Materiales y métodos	184
1. Bacterias	184
2. Preparación de cultivos	184
3. Preparaciones ribosomales	184
4. Animales	185
5. Inmunizaciones	185
6. Pruebas de inmunidad	185
7. Prueba de toxicidad aguda	186
8. Prueba de tolerancia en humanos	187
9. Pruebas bioquímicas	187
10. Antisueros	188
11. Inmunoelectroforesis	188
12. Microscopía electrónica	188
III. Resultados	189
1. Análisis estadísticos	200
IV. Discusión	209
Referencias	211

## I. Introducción

La Fiebre Tifoidea representa un problema muy importante tanto en salud pública (1) como en sanidad animal. En países como el de México, por ejemplo, se desconocen las pérdidas económicas reales que produce esta enfermedad en la Industria Pecuaria, y puede

afirmarse que ninguna de las medidas de control conocidas (2), para la prevención y erradicación se lleva a cabo.

Por otro lado, las vacunas tifoídicas disponibles dejan mucho que desear en cuanto a su potencial inmunogénico y en cuanto a los serios efectos tóxicos que producen (3).

Estas son algunas de las razones por las que se realizó el trabajo de investigación que se presenta a continuación y con el cual fue posible estudiar un producto biológico exento de toxicidad y con un elevado potencial inmunogénico como es "la preparación ribosomal de *Salmonella typhi* Ty2".

## II. Materiales y métodos

### 1. Bacterias

La *Salmonella typhimurium* (cedida por L. Filloy)\* y la *Salmonella typhi* Ty2 (cedida por J. Fernández de Casto)\*\* utilizadas en esta investigación, se mantuvieron como cultivos de abastecimiento en Agar-Caseina peptona de Merck.

### 2. Preparación de cultivos

Los frascos, conteniendo 7 litros de Caseina-peptona caldo, se inocularon con 50 ml de cultivos crecidos durante la noche, de *S. typhimurium* o *S. typhi* Ty2 e incubados a 37°C durante 4 hrs. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6000 rpm (8000 x g). 20 min en una centrífuga Sorvall refrigerada a 4°C y el sedimento se almacenó en refrigeración hasta su uso.

### 3. Preparaciones ribosomales

Las preparaciones ribosomales de *S. typhimurium* y de *S. typhi* Ty2 se obtuvieron siguiendo el método de Youmas y cols (8), con algunas modificaciones hechas por el autor de este trabajo. Las bacterias se suspendieron en un amortiguador de fosfatos a 0.01 M y pH 7.2, conteniendo 0.44 M de sacarosa y 0.03 M de MgCl<sub>2</sub>. Esta suspensión se pasó por una prensa Ribit a una presión de 14 000 libras por pulgada cuadrada. El material obtenido, se centrifugó a 17500 rpm (36000 x g) 15 min., a 4°C.; el sobrenadante se decantó y fue nuevamente

\* Jefe del Laboratorio de Bacteriología Determinativa. Hospital Infantil, México, D. F.

\*\* Director del Instituto Nacional de Higiene. SSA. México, D. F.

centrifugado a 22 500 rpm (46 000 xg) 20 min. El sobrenadante de esta segunda centrifugación, se decantó cuidadosamente para ser centrifugado a 39 000 rpm (144 000 xg) 180 minutos, en una ultracentrifuga Beckman Modelo L5-65. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento se resuspendió en un amortiguador de fosfatos a 0.01 M Y pH 7.2, conteniendo 0.003 M de MgCl<sub>2</sub>; y añadiendo un volumen igual de dodecil sulfato de sodio al 0.05% se agitó a temperatura ambiente durante una hora. El material se mantuvo durante una noche a 4° C, centrifugándose posteriormente a 22 500 rpm (46000 x gr 20 min. El sobrenadante se decantó y centrifugó a 39000 rpm (144 000 x g) 180 min., y luego, el sedimento se resuspendió en un amortiguador de fosfatos con MgCl<sub>2</sub>. Esta suspensión se filtró a través del filtro milipor. de 0.065  $\mu$  de poro, esterilizado previamente. La concentración de ARN de la muestra se determinó en un espectrofotómetro Zeiss Modelo PMQ M a 260 nm, 7.0 U de densidad óptica que es equivalente a 50  $\mu$ g de ARN (90) o El material se envasó en frascos esterilizados; se liofilizó y se mantuvo a 4° C hasta su uso.

#### 4.0 Animales

Ratones albinos cepa CD-1, de ambos sexos, con peso de 24 a 26 g Y obtenidos de una colonia mantenida en el Bioterio del Departamento de Biología Experimental del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, fueron usados en todos los experimentos. Se albergaron de 10 a 12 ratones por jaula y se alimentaron con purina para ratón yagua *ad-libitum*.

#### 5. Inmunizaciones

Los ratones se inmunizaron subcutáneamente en dos ocasiones, usando dosis progresivas de las preparaciones ribosomales resuspendidas en 0.01 ml de solución salina 0.015 M estéril. La segunda dosis se administró 7 días después de la primera.

#### 6.0 Pruebas de inmunidad

Los animales inmunizados con la preparación ribosomal obtenida de *So typhimurium* se desafiaron intraperitonealmente con 100 DL50 (3 x 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias -UFC-) de *So typhimurium*, 7 días después de la segunda inmunización.

Para los desafíos por vía oral, se inoculó *So typhimurium* (Strs) en tubos conteniendo caldo soya tripticasa con 1 mg de estreptomi-

Cinal ml, que se incubaron a 37° C/24 horas. Las bacterias que crecieron en presencia de estreptomycinina se denominaron Strr (estreptomycinina resistente) y se emplearon en los experimentos de desafío. Se cultivó *S. typhimurium* Strr, en caldo soya tripticasa, hasta que se alcanzó una densidad óptica de 1.5, leída a 550 nm, cosechada por centrifugación a 6000 rpm (8000 x g) 15 min. Y resuspendida en NaCl 0.15 M. Con esta suspensión se practicó un desafío por vía bucal usando una cánula de polietileno P-20, a razón de 0.5 ml por ratón. A todos los animales, incluyendo a los testigos, se administró 24 horas antes del desafío 50 mg de estreptomycinina por vía bucal, con el fin de hacerlos susceptibles a la infección salmonelósica.

La dosis de desafío se describe en cada experimento. Simultáneamente se hicieron diluciones progresivas, de las cuales se mezcló 1 ml en agar blando mantenido a 55° C, vertiendo éste sobre agar soya tripticasa por duplicado. Los cultivos se incubaron a 37° C/24 horas y se contaron las colonias que crecieron. El resultado se expresó como número de unidades formadoras de colonias (UFC). La muerte de los ratones se registró diariamente durante 14 días y los resultados se expresaron como por ciento de sobrevivientes.

Los ratones inmunizados con la preparación ribosaroyal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2 Y con la vacuna estándar Vacuna tifoídica inactivada con acetona tipo K, se desafiaron intraperitonealmente, 7 días después de la segunda inmunización, con *S. typhi* Ty2 incluida en mucina al 5% (10) .. Las dosis de desafío, Se describen en resultados.

Para los desafíos, las bacterias fueron obtenidas durante su fase logarítmica de crecimiento. La inmunidad es reportada como el número de animales sobrevivientes 21 y 30 días después del desafío para los experimentos con *S. typhimurium* y 3 días en los experimentos con *S. typhi* Ty2.

En todos los experimentos se determinó el tiempo en que murió el 50% de los animales desafiados (TL50). La virulencia de ambas salmonelas, se estimó simultáneamente por el método de Reed y Muench (11). La significancia estadística de los resultados se determinó mediante la prueba de X' modificada por Yates (12).

### 7. Prueba de toxicidad aguda

Este estudio se hizo en base al índice Terapéutico, que es el resultado de dividir la dosis toxica al 50% (DT50), Y es la dosis que produce el efecto específico en el 50% de los individuos estudiados. La finalidad de esta prueba es conocer el margen de seguridad que deba

manejarse cuando se emplee en seres humanos. La dosis efectiva al 50% (DE<sub>50</sub>), es la dosis que protege al 50% de los individuos tratados. Una DE<sub>50</sub> baja, caracteriza a una droga o a un biológico potentes, pero si la DT<sub>50</sub> es baja también, el margen de seguridad es completamente inadecuado (13).

Tres grupos de ratones CD-1 de ambos sexos pesando de 25 a 26 g se inocularon por vía subcutánea con 500, 2000 Y 4000 ug respectivamente, de la preparación ribosomal obtenida de *S. typhiTy2*, resuspendida en 0.2 ml de solución salina estéril, 0.15 M. Los animales se pesaron antes y después de la administración del biológico y se observaron durante 14 días.

#### 8. Prueba de tolerancia en humanos

Esta prueba se realizó siguiendo las "recomendaciones para guiar a doctores en investigación clínica" (14). Voluntarios humanos se inocularon intradérmicamente con 100 o 200 ug de la preparación ribosomal de *S. typhiTy2*. El grupo testigo se inoculó con 0.1 ml de toxoide tetánico.\* Una semana después todos los voluntarios se reinocularon las mismas condiciones. Los tres grupos se observaron durante 72 hrs después de cada inoculación, y diariamente se registraron los signos que se detectaron durante el tiempo de observación. Los resultados se expresaron en por cientos.

Las lesiones producidas por ambos biológicos se midieron cada 24 hrs, y los resultados se estimaron como el promedio del diámetro del eritema. Con los resultados se elaboró una gráfica.

#### 9. Pruebas bioquímicas

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et al.* (15); el ácido ribonucleico (ARN) Y el ácido deoxirribonucleico (ADN) se determinaron por los métodos del orcinol y de la p-nitrofenilhidrazina respectivamente (16, 17). Los azúcares reductores, por el método de Antrona (18). Albúmina Sérica Bovina (Sigma), ARN de levadura Tórula (Baker), ADN de timo de ternera (Sigma) y glucosa (Baker)

se usaron como estándares.

\* Obtenido del Instituto Nacional de Higiene. S.S.A.

### 10. Antisueros

Los antisueros de los antígenos "O" de *S. typhimurium* y *S. typhi* Ty2, fueron de BBL. \* Los antisueros de las preparaciones ribosomales Se obtuvieron como sigue: conejos blancos Nueva Zelanda se inocularon subcutáneamente con 100  $\mu$ g de cada inmunógeno incluido en adyuvante incompleto de Freund. Se administraron 4 dosis a intervalos de 7 días y 5 días después de la última inmunización, los animales se sangraron por punción Cardíaca para obtener los sueros hiperinmunes.

### 11. Inmuno-electroloresis

La reacción antígeno-anticuerpo se estudió por inmunolectroforesis empleando la microtécnica usual (19). Se preparó agar purificado al 1% (Difco) en amortiguador de veronal (0.05 M, pH 8.6). Se usaron 3 antígenos: preparación ribosomal obtenida de *S. typhimurium*, lipopolisacárido obtenido también de *S. typhimurium*, y preparación ribosomal de *S. typhi* Ty2. 10  $\mu$ l de las preparaciones ribosomales a diferentes concentraciones y 20  $\mu$ l de Lipopolisacáridos' a concentraciones de 5 mg/ml se depositaron en los pozos. La electroforesis se llevó a cabo a 300 V Y de 2.7 a 3.3 mA por lámina durante 2 hrs Y posteriormente 200  $\mu$ l de los sueros de conejo antipreparación ribosomal de *S. typhimurium* o suero antipreparación ribosomal de *S. typhi* Ty2 se aplicaron en el canal. Las láminas se incubaron durante 48 hrs en cámara húmeda a temperatura ambiente; los geles se lavaron durante 3 días con dos cambios diarios de una solución de cloruro de sodio 0.15 M, se secaron y se tiñeron con amido negro al 0.1% en ácido acético al 10%.

### 12. Microscopía electrónica

La preparación ribosomal liofilizada de *S. typhi* Ty2 se resuspendió en agua, para dar una D.O. de aproximadamente 0.1. De esta suspensión se tomó una gota que se colocó sobre una rejilla de cobre de 400 mesh, recubierta con película de Formvar y se dejó aproximadamente un minuto; se eliminó el exceso y se añadió una gota de ácido fosfotúngstico al 2% (pH 6.8), que se dejó secar al aire. La preparación se observó en el microscopio Jeol JEM-100B operado a 60 K.V. (20).

\* Becton Dickimon de México, S. A., de C. V.

## III. Resultados

La preparación ribosomal de *S. typhimurium* inmunizó con buen éxito, contra desafíos letales de *S. typhimurium*, tanto por vía intra· peritoneal como por vía oral. El cuadro 1 muestra cómo la supervivencia aumentó conforme aumentó la dosis de preparación ribosomal. El 94.4% de los animales vacunados con 100 ug, estimados como ARN en la preparación ribosomal, fueron protegidos durante el tiempo de observación, que fue de 30 días, contra el desafío infeccioso de 100 DL50 de *S. typhimurium*. El tiempo letal al 50% (TL50) también se incrementó conforme se incrementó la dosis de vacuna. Los efectos protectores de las dosis mayores de 0.1 ug ARN/ratón no se calcularon como TL50, ya que más del 50% de animales desafiados, sobrevivieron al periodo de observación.

CUADRO 1

POR CIENTO DE SOBREVIDA y TIEMPO LETAL AL 50% EN RATONES INMUNIZADOS SUBCUTÁNEAMENTE CON PREPARACIÓN RIBOSOMAL DE 1 DÍA OBTENIDA DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* y DESAFIADOS 30 DÍAS DESPUÉS  
POR VÍA INTRAPERITONEAL CON 100 DL50 DE LA SALMONELA VIRULENTA

<i>Dosis inmuni- zante (ug ARN/ratón)</i>	<i>N' sobrevivientes Total</i>	<i>% Supervivencia</i>	<i>TL<sub>50</sub> (hrs)</i>
0	0/16	0.00	48
0.1	2/17	11.76	144
1.0	9/12	75.00	>720
10.0	14/16	87.50	>720
100.0	16/17	94.11	>720

Esencialmente, los mismos efectos se observaron cuando la preparación ribosomal se almacenó en refrigeración durante noventa días, comparados con la vacuna preparada de 1 día. La máxima sobrevida en este experimento fue de 95% y también ocurrió en el grupo de

ratones inmunizados con 100 ug ARN /ratón (cuadro 2,-. El tiempo en que murió el 50% de los animales controles fue de 48 hrs como en el experimento anterior. Asimismo también el  $TL_{50}$  se incrementó conforme aumentaron las dosis inmunizantes.

En estos experimentos se usó la vía intraperitoneal para realizar los desafíos infecciosos.

#### CUADRO 2

POR CIENTO DE SOBREVIVENCIA y TIEMPO LETAL AL 50% EN RATONES INMUNIZADOS SUBCUTÁNEAMENTE CON PREPARACIÓN RIBOSOMAL ALMACENADA DURANTE 90 DIAS OBTENIDA DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* y DESAFIADOS 30 DIAS DESPUÉS INTRAPERITONEALMENTE CON 100 DL50 DE LA SALMONELA VIRULENTA

<i>Dosis inmuni- zante (ug ARN/ratón)</i>	<i>N° sobrevivientes Total</i>	<i>% Supervivencia</i>	<i>TL<sub>50</sub> (hrs)</i>
0	0/16	0.00	48
0.1	6/21	28.57	144- 168
1.0	9/16	56.25	>720
10.0	15/20	75.00	>720
100.0	19/20	95.00	>720

La persistencia del estado inmune contra 100 DL50 se exploró setenta y cinco días después de la inmunización con vacuna almacenada por un día. En este experimento el grupo inmunizado con 1 ug ARN /ratón se omitió. El cuadro 3 muestra, esencialmente, los mismos resultados previamente descritos. El máximo por ciento de supervivencia fue de 93.3% y se obtuvo con la dosis más alta de vacuna (100 ug ARN/ratón).

La fracción ribosomal de *S. typhimurium* indujo en el ratón un alto grado de inmunidad contra el desafío infeccioso administrado por vía oral. En el experimento cuyos resultados están contenidos en el cuadro 4, se observó un por ciento muy elevado de superviven-



CUADRO 3

POR CIENTO DE SOBREVIVIENTES y TIEMPO LETAL AL 50% EN RATO.  
 ANIMALES INMUNIZADOS SUBCUTÁNEAMENTE CON DIFERENTES DOSIS  
 DE PREPARACIÓN RIBOSOMAL OBTENIDA  
 DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* y DESAFIADOS  
 75 DÍAS DESPUÉS INTRAPERITONEALMENTE CON 100 DL50 DE  
 LA *SALMONELLA* VIRULENTA

<i>Dosis zante (ug ARN/ratón)</i>	<i>NV sobrevivientes Total</i>	<i>% Supervivencia</i>	<i>TL50 (hrs)</i>
0	0/16	0.00	55
0.1	4/18	22.22	72-96
10.0	14/16	87.50	>720
100.0	14/15	93.30	>720

CUADRO 4

POR CIENTO DE SOBREVIVIENTES DE RATONES VACUNADOS POR  
 VÍA SUBCUTÁNEA CON 2 DOSIS DE FRACCIÓN RIBOSOMAL DE  
*SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRs y DESAFIADOS POR VÍA ORAL CON  
 $5.5 \times 10^9$ \* UFC DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRr; SIETE  
 DÍAS DESPUÉS DE LA 2ª INMUNIZACIÓN

<i>Dosis de Ir ug de ARN</i>	<i>Nº de sobrevivientes Total</i>	<i>Por ciento de sobrevivencia</i>	<i>Tiempo Letal50 en días</i>
0.13	6/11	55	>14
1.3	3/4	75	>14
130.0	5/5	100a	>14
<b>controles sin inmunizar</b>	2/11	18	4.5

\* La DL50 de *S. typhi.murium* str, fue de  $14 \times 10^3$  por vía intraperitoneal.  $P = > 0.05 > 0.01$  Significancia de animales no inmunizados:.

cia en los animales vacunados con respecto a los testigos. El grado de inmunidad dependió de la dosis vacunal; la Óptima, en este caso, fue de 130 ug de la fracción ribosomal, con significancia estadística muy elevada. En ningún grupo de los animales vacunados, se llegó a 50% de mortalidad dentro del periodo de observación, en tanto que en el grupo testigo, se observó TL50 de 4.5 días. En la figura I se hace la representación gráfica de! por ciento de mortalidad en los diferentes grupos, en función del tiempo.

Con los resultados de este experimento, se determinó la dosis efectiva de esta vacuna que protege a 50% de los animales probados (DE50), siguiendo el método gráfico de Miller-Tainter (11); ella resultó ser de 0.1085 ug (figura 2). Para este experimento se empleó vacuna ribosomal mantenida durante 90 días en refrigeración, hecho que confirmó la estabilidad de la potencia inmunogénica de estas preparaciones.

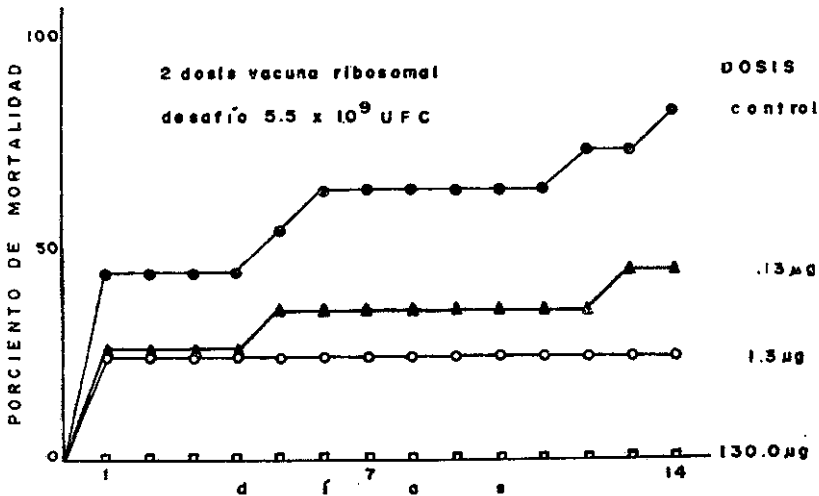


FIG. 1. Protección inducida con diferentes dosis de vacuna ribosomal obtenida de *S. typhimurium*, inoculada por vía subcutánea; contra el desafío oral de  $5.5 \times 10^9$  UFC de *S. typhimurium*. La vacuna empleada en este experimento, estuvo almacenada durante 90 días a 40 C.

En el siguiente experimento la dosis de desafío fue de  $7.2 \times 10^9$  UFC en animales vacunados con las mismas dosis que en el experimento anterior; los resultados se resumen en el cuadro 5. El porcentaje de sobrevivida en este caso indica que el estado inmune de los

animales vacunados ya no fue tan eficaz en contra de esta dosis de desafío, sin embargo la diferencia de TL50 entre los animales vacunados y la de los testigos es evidencia de inmunidad, la que también es dependiente de la dosis inmunizante (figuras 3 y 4)., En este experimento se empleó vacuna ribosomal de 82 días.

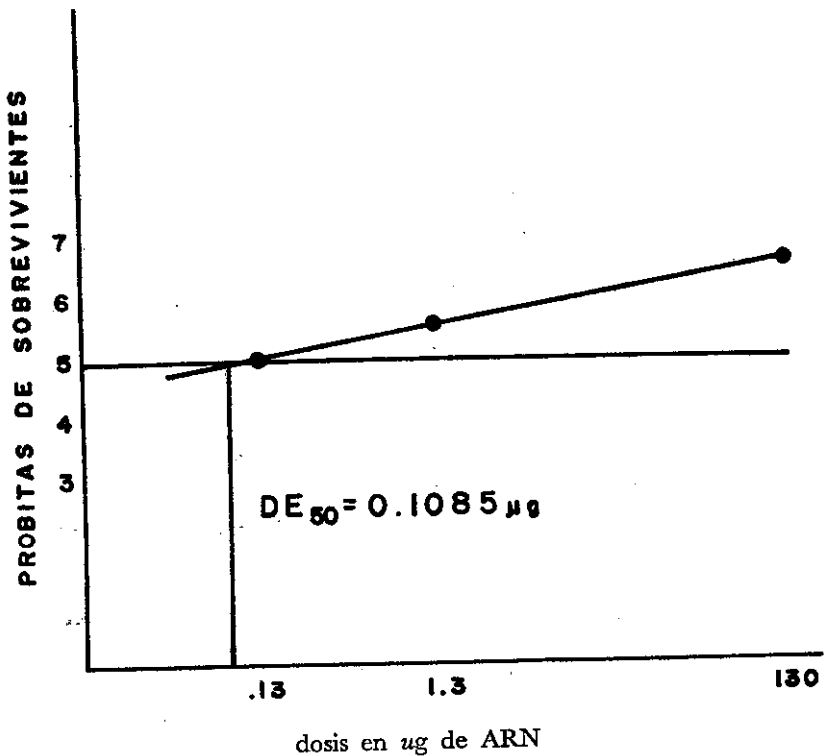


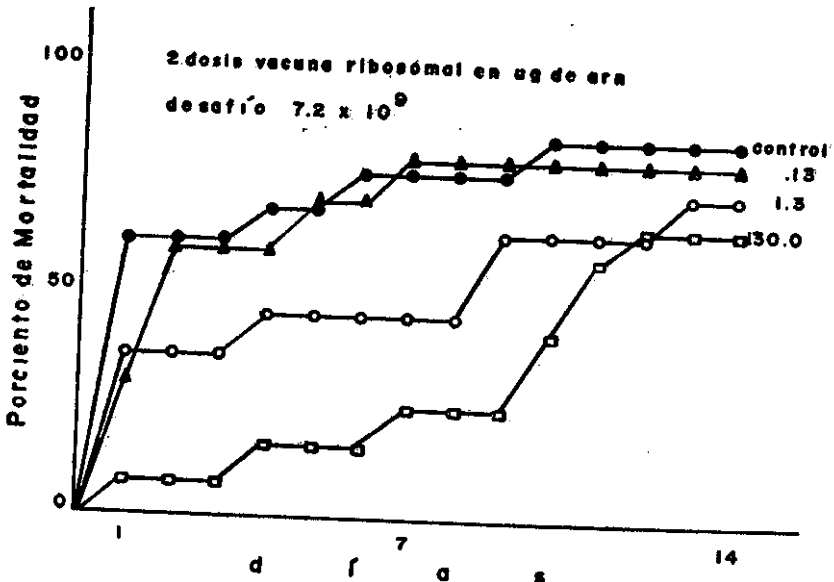
FIG. 2. Dosis efectiva al 50% de vacuna ribosomal, contra el desafío infeccioso de  $5.5 \times 10^9$  de *S. typhimurium*. La vacuna estuvo almacenada a 40 C. durante 90 días antes de su empleo.

Empleando dosis menores de desafío, en este caso  $4.1 \times 10^9$  UFC, la protección inducida por la fracción ribosomal, fue de 920/0 de sobrevida con la dosis vacunal de 1.3 ug. En, este caso, 'hubo' 55% de mortalidad en los animales testigos(cuadró 6)'. Esta vacuna había estado almacenada durante '105 días. En la figura '5 se expone de

## CUADRO 5

POR CIENTO-DE SOBREVIVIENTES DE RATONES VACUNADOS POR VIA SUBCUTANEA CON 2 DOSIS DE FRACCIÓN RIBOSOMAL DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM STRs* Y DESAFIADOS POR VIA ORAL CON  $7.2 \times 10^9$  UFC DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM STR<sup>R</sup>*, SIETE DÍAS DESPUÉS DE LA 2<sup>a</sup> INMUNIZACIÓN

Dosis de fr en ug de ARN	N' de sobrevivientes Total	Por ciento de sobreviv	Tiempo Letal/l en dias
0.13	2/10	20	1.7
1.3	3/11	27	8.25
130.0	4/12	33	10.45
controles sin inmunizar	2/13	15	.8



Fro. 3. Protección inducida con diferentes dosis de vacuna ribosómica obtenida de *S. typhimurium*, inoculada por vía subcutánea; contra el desafío oral: de  $7.2 \times 10^9$  UFC. de *S. typhimurium*. La vacuna empleada en este experimento, estuvo almacenada durante 82 días a  $4^{\circ}$  C.

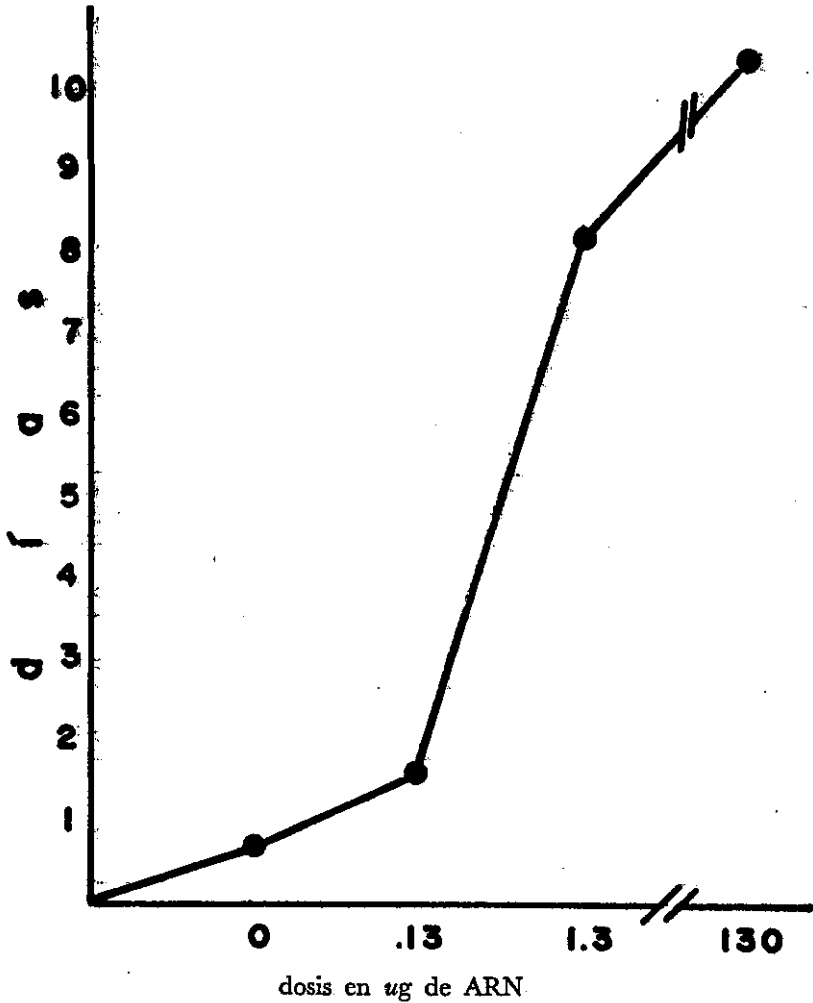


Fig. 4. Tiempo letal al 50% de ratones inmunizados subcutáneamente con diferentes dosis de vacuna ribosomal de *S. typhimurium* almacenada 82 días Y desafiados por vía oral con  $7.250 \cdot 10^9$  UFC de *S. typhimurium*.

manera gráfica el por ciento de sobrevivientes en los tres experimentos, con el objeto de comparar la sobrevida en los animales vacunados con diferentes dosis de vacuna y desafiados con dosis diferentes de! microorganismo virulento. En los tres casos se observa el mismo fenómeno, o sea que a mayor dosis vacunal es mayor el por ciento de sobrevida; con *las* dosis de desafío de  $4.1 \times 10^7$  y  $5.5 \times 10^7$  UFC se alcanza 100% de sobrevida en animales vacunados con 130 ug de fracción ribosomal y 92 Y 75% con dosis de 1.3 ug respectivamente.

#### CUADRO 6

POR CIENTO DE SOBREVIVIENTES DE RATONES VACUNADOS POR VIA SUBCUTÁNEA CON 2 DOSIS DE FRACCIÓN RIBOSOMAL DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRs y DESAFIADOS POR VIA ORAL CON  $4.1 \times 10^7$  UFC DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRr SIETE DIAS DESPUÉS DE LA 2ª INMUNIZACIÓN

<i>Dosis de fr ug d. ARN</i>	<i>Nº de sobrevivientes Total</i>	<i>Por ciento de sobrevida</i>	<i>Tiempo Letal5, en ~ días</i>
0.13	4/6	67	>16
1.3	12/13	92	>16
130.0	6/6	100	>16
<b>controles</b>			
<b>inmunizar</b>	5/11	45	>16

Comparando la sobrevida de los animales desafiados con  $5.5 \times 10^7$  con los de la dosis de  $7.2 \times 10^7$ , el por ciento de ésta en los primeros fue hasta de 100% en animales vacunados con la dosis más alta; en cambio en los segundos, la sobrevida no es significativa respecto de los testigos. Por otro lado, en ninguno de los dos experimentos se observó diferencia en el por ciento de sobrevida ~ en los animales testigos.

En los experimentos con *S. typhi* Ty2, el desafío con 1 DI<sub>0</sub>, equivalente a 187 UFC de la cepa virulenta, a ratones inoculados

con la preparación ribosomal, evidenció en éstos, un mayor grado de inmunidad en relación al inducido en los animales inmunizados con la vacuna estándar de referencia.

Los criterios para estimar la protección inducida fueron: el número de sobrevivientes sobre el total de animales desafiados, en función del tiempo, y fundamentalmente los datos obtenidos por análisis estadístico. Con el registro de sobrevivientes y el por ciento de sobrevivida se elaboró la figura 6 y el cuadro 7, en donde se muestra claramente la gran diferencia entre ambos grupos, correspondiendo las cifras más altas de eficacia a las tres dosis más concentradas de vacuna ribosomal. En cambio el por ciento de sobrevivida con la dosis más alta de vacuna estándar, comparada con el por ciento de sobrevivida del grupo testigo, indica que no se indujo una protección significativa. Otra observación muy evidente relativa a la vacuna ribosomal, fue la notable disminución de la mortalidad en función del incremento

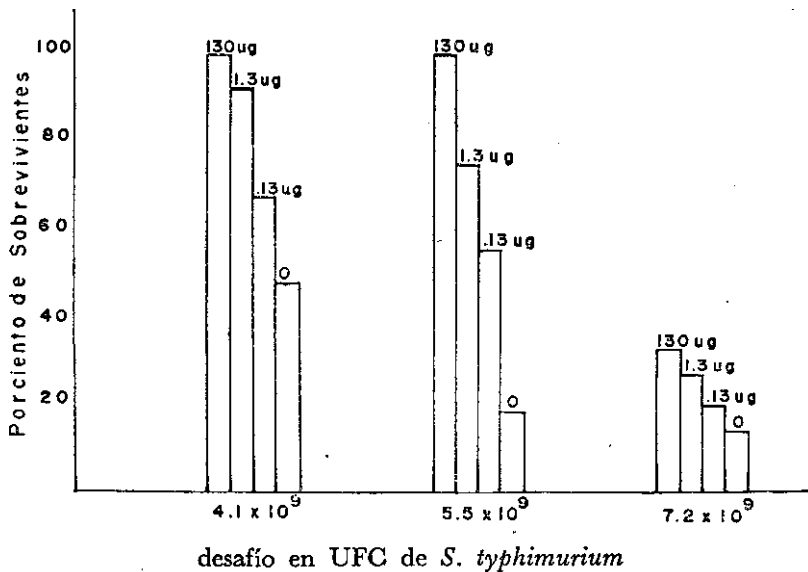
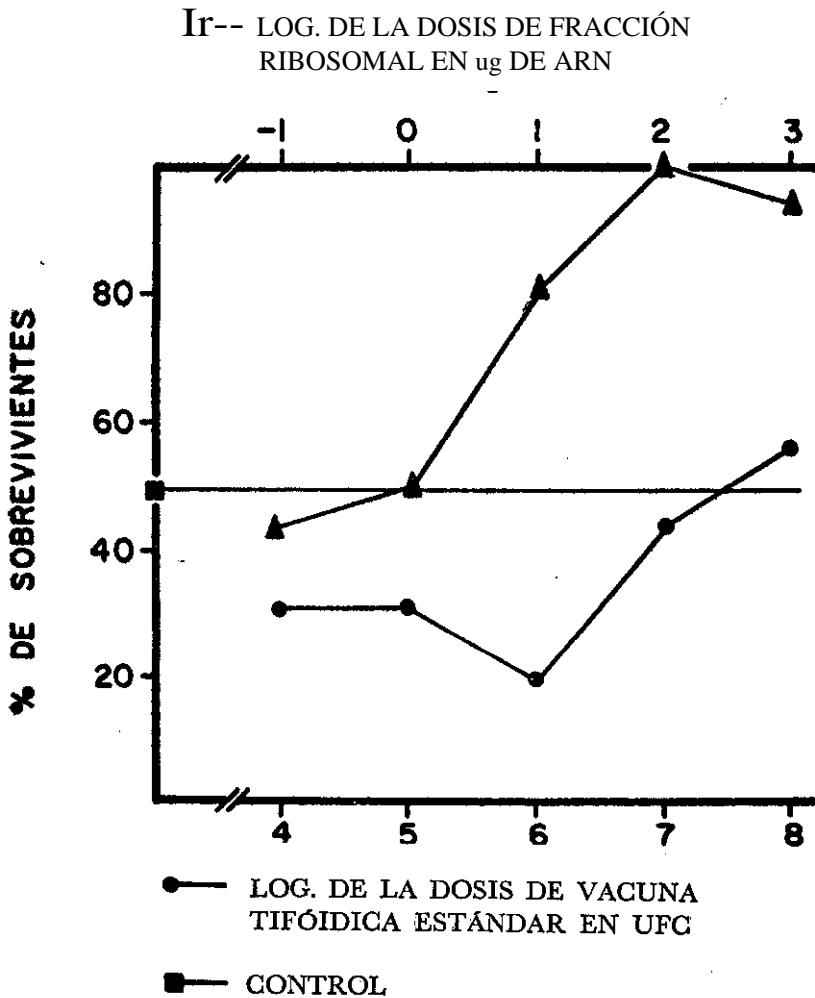


FIG. 5. Comparación de Porcientos de Supervivencia en animales vacunados por vía subcutánea, con diferentes dosis de Fracción Ribosomal de *S. typhimurium* y desafiados con diferentes dosis de *S. typhimurium* por vía oral.

FIGURA 6

CURVA DE DOSIS RESPUESTA AL DESAFÍO DE  
1 DL50 DE *S. typhi* Ty,





CUADRO 7

POR CIENTO DE SOBREVIVIDA DE ANIMALES INMUNIZADOS CON FRACCIÓN RIBOSOMAL DE  
SALMONELLA TYPHI TY2 CON VACUNA TIFOÍDICA ESTÁNDAR DE REFERENCIA Y DESA-  
FIADOS CON 1 DL<sub>50</sub> DE LA CEPA VIRULENTA

Tipo de vacuna	Dosis por ratón	Sobrevivientes		Probitas
		Total	% Sobrevivida	
Fracción Ribosomal (estimada como (ac. nucleicos)	1000.0 ug	15/16	93.75	6.53
	100.0 ug	16/16	100.00	7.24
	10.0 ug	13/16	81.25	5.88
	1.0 ug	8/16	50.00	5.00
	0.1 ug	7/16	43.75	4.84
Estándar (INS) "K"	10 <sup>8</sup>	9/16	56.25	5.15
	10 <sup>7</sup>	7/16	43.75	4.84
	10 <sup>6</sup>	3/16	18.75	4.12
	10 <sup>5</sup>	5/16	31.25	4.50
	10 <sup>4</sup>	5/16	31.25	4.50
Titulación de Virulencia (Ty2)	Nº de bacterias UFC	Muertes Total	% Muertes	DL <sub>60</sub>
	P/dosis, P/ratón			
	187.0	5/10	50	187.0
	18.0	4/10	40	
	1.8	1/10	10	
	.18	2/10	20	

de la dosis inmunizante. Un fenómeno que debe resaltar, es que los porcentajes de sobrevida de los animales inoculados con las primeras tres dosis de la vacuna de referencia, fueron menores que el de los animales testigos. Es posible que estas dosis pudieron haber inducido lejos de un proceso inmunitario, un estado de hipersensibilidad, o de tolerancia, causa probable del aumento en la mortalidad posdesafío. Cabrera, Pacheco y Pérez-Miravete (23) han reportado un fenómeno análogo al estudiar bacteremia en animales inmunizados con dosis de vacuna tifoidea equivalentes a las empleadas en este trabajo. Sin embargo, esto es especulativo y son necesarios más estudios para comprobar la repetición del fenómeno y en este caso, diseñar experimentos que permitan dilucidar este problema.

#### CUADRO 8

#### COMPARACIÓN DE DATOS ESTADÍSTICOS: FRACCIÓN RIBOSOMAL CONTRA VACUNA TIFOIDICA ESTÁNDAR (INS)\*

<i>Dosis</i> mI	<i>dilución</i>	<i>Factor de homogeneidad</i> + <i>I.D.E.</i>	<i>**DE50</i> mI	<i>Potencia</i> ++ <i>U/DTI</i>
0.01	1/10			
0.001	1/100	0.6009 ± 0.2825	0.00253	8.0
0.0001	1/1000			
0.01	1/10			
0.001	1/100	0.58655 ± 0.27897	0.0004847	155.0
0.0001	1/1000			

\* Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.

\*\* Dosis efectiva al 50%.

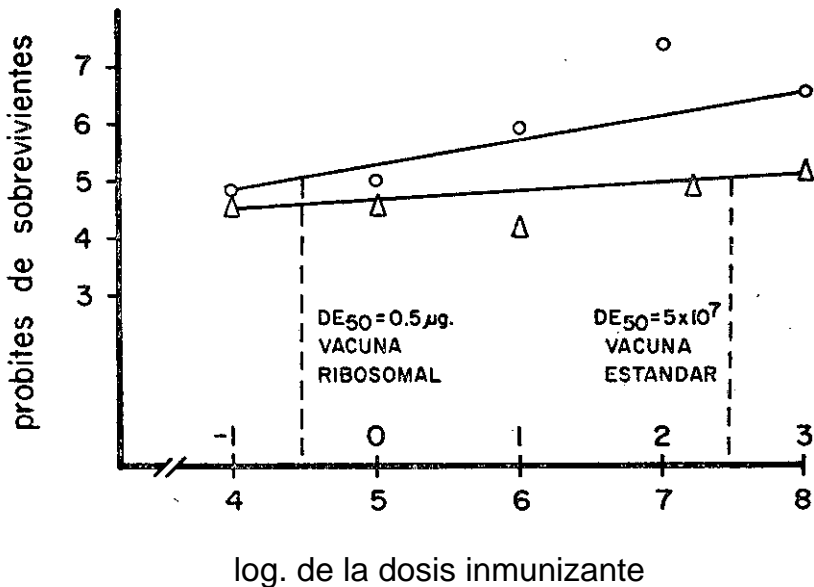
+ Desviación Estándar.

++ Unidades por dosis total inmunizante humana.

#### 1. Análisis estadístico

El análisis resumido en el cuadro 8 reveló que: la potencia de la vacuna ribosomal fue 19 veces más alta que la de la vacuna estándar. Que la desviación estándar de la vacuna de prueba, se encontró den-

tro del rango establecido para la vacuna de referencia, y que la dosis para proteger al 50% de los animales. contra el desafío de 1 DL50 fue de 0.5 ug de la preparación ribosomal, de acuerdo al método de Miller-Tainter (figura 7) y 0.5 ug con el método de Willson y Worcester (21).



Fm. 7. Dosis efectiva que protege al 50% de los animales probados (DE50), M-todo de Miller-Tainter. (O) Vacuna ribosomal. (A) Vacuna estándar.

Se demostró también que la fracción ribosomal obtenida de *S. typhi* Ty2 fue capaz de inducir en el ratón un alto grado de inmunidad en contra del desafío de tres cepas diferentes de *S. typhi* (cuadro 9). Aunque este estudio se limitó a un número reducido de cepas de desafío, fundamentalmente a dos de las causantes de fiebre tifoidea en la República Mexicana, teóricamente, es lógico extrapolar esta inmunidad contra otras cepas de *S. typhi*; sin embargo, esto deberá ser demostrado experimentalmente. En cambio, la fracción ribosomal no indujo protección significativa contra el desafío infeccioso de *S. typhimurium-typhi* híbrida. Estos híbridos retienen el mismo grado

de virulencia para el ratón, como la cepa original de *S. typhimurium* y proveen un número de organismos que producen una verdadera infección sistémica en el ratón.

### CUADRO 9

POR CIENTO DE SOBREVIVENCIA EN ANIMALES INMUNIZADOS CON 100 UG DE FRACCIÓN RIBOSOMAL DE *SALMONELLA TYPHI* TY2 Y DESAFIADOS CON DIFERENTES CEPAS DE *SALMONELLA TYPHI* INCLUYENDO UNA CEPA DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM\_ TYPHI* HÍBRIDA

Cepa de desafío	DL50	Vacunados		Controles	
		S tes. Total	%de sobrevivida	Sobrevivientes_ tes. Total	%de sobrevivida
T y 2*	40	10/10	100	0/10a	0
154 R**	10	10/10	100	0/10	0
Endémica					
Epidémica					
230 R+	10	10/10	100	0/10	0
WR 4010++	14	3/10	30	0/10b	0
Híbrida					

a P = < .001 significancia de animales controles

b P = >.4 significancia de animales controles

\*DL50 = 100 UFO (Unidades Formadoras de Colonias)

\*\*DL50 = 450 UFO

+DL50 = 18 UFC

++DL50 = 50 UFC

Esta cepa de *S. typhimurium* que expresa los antígenos 9, d Y Vi de *S. typhi*, fue usada en este trabajo en base a las observaciones de Diena *et al.* (22), en el sentido de que las vacunas tifoídicas empleadas por ellos, protegieron contra el desafío de esta cepa híbrida, pero no contra la cepa, original de *S. typhimurium*. Estos autores están de acuerdo en que los antígenos de *S. Typha* están sin duda involucrados en el mecanismo inmune. Sin embargo, los resultados obtenidos por

nosotros parecen estar con contradicción con los resultados de Diena, ya que la fracción ribosomal no protegió ,contra el desafío de la cepa híbrida y si contra las cepas de *S. typhi*, lo que puede sugerir que los mecanismos de inmunidad inducidos por la fracción ribosomal no están dirigidos fundamentalmente contra antígenos somáticos.

La DLs0 de cada cepa fue calculada por el método de Reed y Muench.

Por inmunoelectroforesis se demostró la presencia de tres antígenos en la fracción ribosomal de *S. typhi* Ty2 cuando se hizo reaccionar con su antisuero. En la figura (A1) puede observarse tres bandas de precipitado. Estos antígenos están presentes en la fracción ribosomal de *S. typhimurium* . cuando se hizo reaccionar antisuero de fracción ribosomal de *S. typhimurium* contra fracción ribosomal de *S.typhi* (fig. A2), se puso en evidencia un antígeno de esta última, que parece tener relación con el antígeno somático ec0" de *S. typhimurium*, ya que se observa la misma banda cuando se hace reaccionar la fracción ribosomal de *S. typhi* contra el antisuero del lipopolisacárido obtenido de *S. typhimurium* (figura A3), en esta misma no se observa ninguna banda contra el lipopolisacárido, lo que puede deberse a una baja concentración del antígeno.

Uno de los aspectos importantes en el conocimiento de un producto biológico, es su potencial tóxico, para tal fin se seleccionó la prueba de toxicidad aguda en el ratón, demostrándose que a las dosis usadas no se produjo daño aparente en ninguno de los animales inoculados por vía subcutánea con la plIeparación ribosomal. Este resultado es una evidencia de la inocuidad de este producto biológico, y se demuestra que el margen de seguridad es muy alto debido a que la DE,0 de este producto, es muy baja, 0.5 ug (figura 8). Los resultados de sobrevida y peso se observan en el cuadro 10.

Sobre la base de cantidades de sustancias químicas necesarias para producir daño, se han ideado categorías de toxicidad y un ejemplo es el siguiente:

1. Extremadamente tóxico (1 mgfkg o menos).
2. Altamente tóxico (1 a 50 mgfkg).
3. Moderadamente tóxico (50 a 500 mgfg).
4. Ligeramente tóxico (0.5 a 5 gr fkg).
5. Prácticamente no tóxico (5 a 15 grfkg).
6. Relativamente dañino (más de 15 grfkg).

El hecho de que 160 mg de FRfkg (3er. grupo 4 mg/25 g) no hayan inducido efectos tóxicos en el ratón sugiere de acuerdo a la

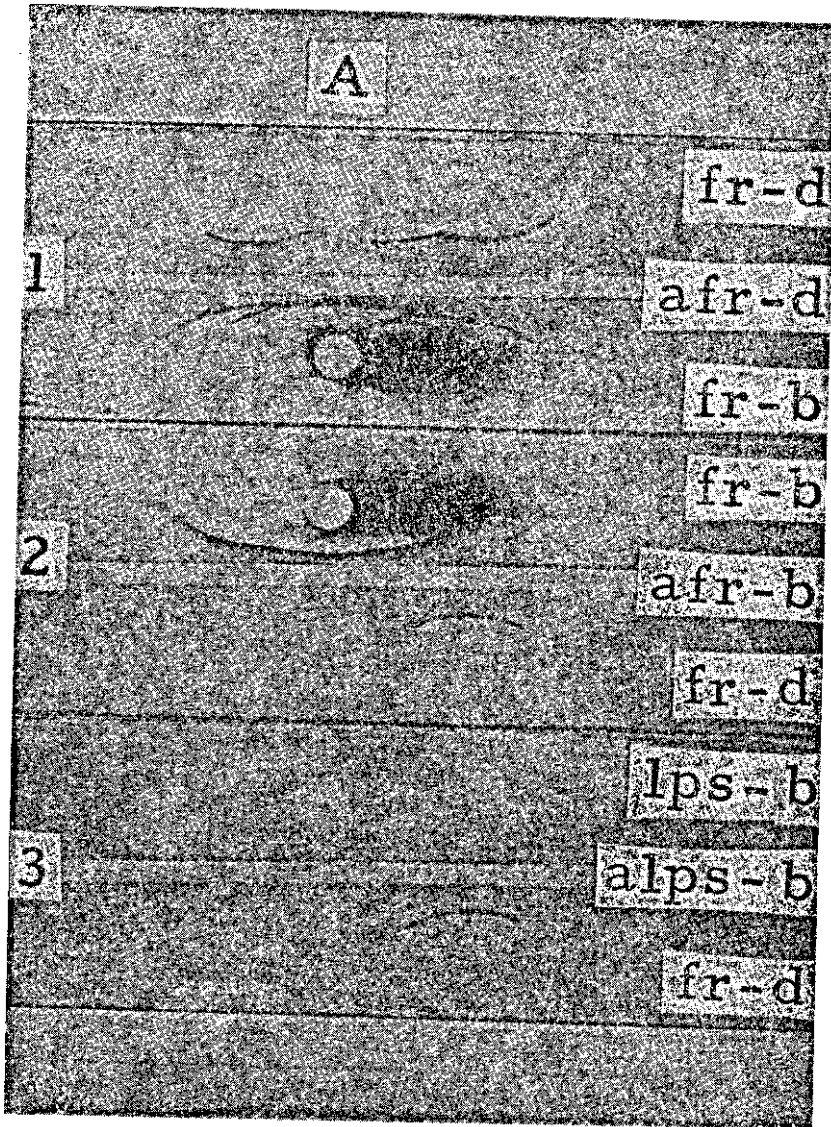


FIG. A. Inmunolectroforesis de fracciones ribosomales contra suero homólogo y heterólogo:

- fr-d = fracción ribosomal de *S. typhi* Ty2.
- afr-d = suero anti fracción ribosomal de *S. typhi*.
- fr-b = fracción ribosomal de *S. typhimurium*.
- afr-b = suero anti fracción ribosomal de *S. typhimurium*.
- lps\_b = lipopolisacárido obtenido de *S. typhimurium*.
- alps-b = suero anti polisacárido de *S. typhimurium*.

clasificación de toxicidad mencionada anteriormente, que el potencial tóxico de la fracción ribosomal debe estar entre el rango de moderadamente tóxico y relativamente dañino, y por lo mismo se necesitan

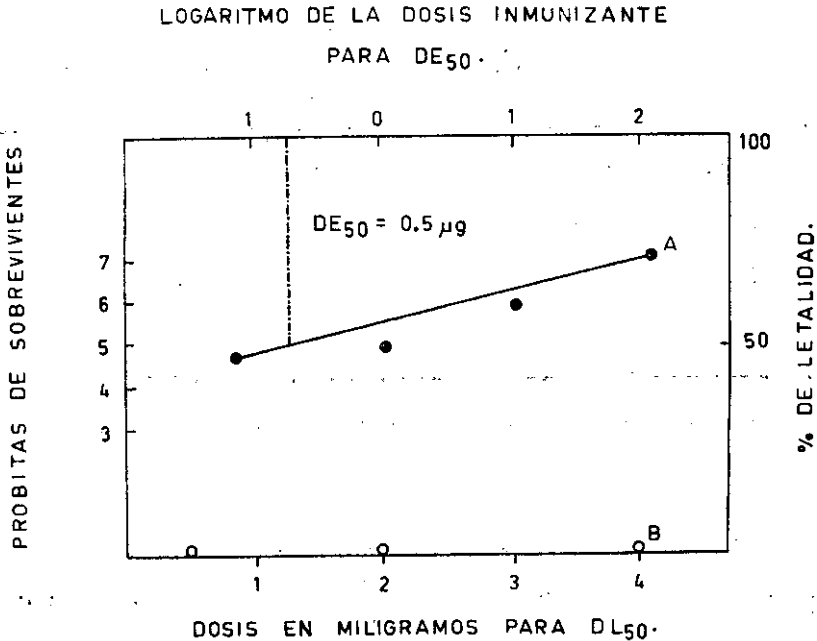


FIG: 8. Curva-dosis-respuesta. La curva A representa Probitas de sobrevivientes en animales vacunados con Fracción ribosomal obtenido de *S. typhi* Ty2 y desafiados por vía intraperitoneal con 1 DL99 de *S. typhi* Ty2 incluida en mucina para estimar la Dosis efectiva que protege al 50% (DE<sub>50</sub>). La curva B representa la búsqueda de la dosis tóxica que mate al 50% al inocular dosis elevadas de Fracción Ribosomal por vía subcutánea.

nuevas pruebas usando dosis más altas y otras vías de administración para precisar esta cuestión.

De estos resultados, se desprende el análisis sobre el Margen de Seguridad o índice Terapéutico representado por la proporción  $\frac{DL_{50}}{DE_{50}}$ . Experimentalmente, se obtuvo la DE<sub>50</sub> por respuesta inmune acumulativa de acuerdo al método de estimación gráfica de Miller-Tainter (curva B de la misma figura).

CUADRO 10

POR CIENTO DE SOBREVIVENCIA\* y CONTROL DE PESO EN RATONES INOCULADOS CON DOSIS CRECIENTES DE FRACCIÓN RIBOSOMAL OBTENIDA DE *SALMONELLA TYPHI* TY2 POR VÍA SUBCUTÁNEA

<i>ug de FR inoculado</i>	<i>Nº de ratones</i>	<i>Promedio de peso en gramos</i>			<i>% de sobrevivencia</i>
		<i>Pre-ino- culación</i>	<i>7 días después</i>	<i>14 día, después</i>	
Controles	10	21.22	24M	27,50	100
500	10	21.80	24,00	26.04	100
2000	10	21.50	24.50	27,47	100
4000	10	21.40	22.00	26.29	100

\* **Prueba de Toxicidad Aguda; tiempo de observación 14 días.**

Habiendo estimado que el margen de seguridad es muy grande, puesto que  $DL_{50} / DE_{50} = \frac{> 4000ug}{0.5ug} = > 8000$  (Índice Trepéutico), donde la  $DE_{50}$  es muy baja y la  $DL_{50}$  debe ser muy alta, Se procedió a estudiar "Tolerancia" en dos grupos de personas, ninguna refirió manifestaciones clínicas atribuibles a la inoculación de la fracción ribosomal, a excepción del desarrollo de un proceso inflamatorio en el sitio de administración levemente doloroso a la presión y que desapareció al cuarto día.

El diámetro de enrojecimiento fue medido diariamente y los resultados se dan como promedio para cada grupo. El promedio de diámetro máximo fue de 3,8 cm en ambos grupos (cuadro 11). Con estos promedios se construyó una gráfica (fig. 9). El hecho de que la inoculación de fracción ribosomal en 24 individuos, incluyendo a uno de nosotros, no haya inducido reacciones de intolerancia es muy significativo ya que las vacunas tifoídicas, como la acetonzada y la muerta por calor, inducen en los dos primeros días fiebre por arriba de los 37° C, del 22 al 29%, incapacidad para trabajar, del 14 al 23 %, dolor de cabeza intenso, del 9 al 10% y dolor local intenso



CUADRO 11

REACCIONES INDUCIDAS POR LA INOCULACION INTRADÉRMICA DE LA VACUNA RIBOSOMAL DE SALMONELLA TYPHY TY2 EN VOLUNTARIOS HUMANOS

Dosis	Nº de personas (a)	Temperatura arriba 37° C %			Incapacidad para trabajar %			Dolor de cabeza intenso			Dolor local intenso %			Promedio del diámetro de enrojecimiento en cm
		días 1	días 2	días 3	días 1	días 2	días 3	días 1	días 2	días 3	días 1	días 2	días 3	
100 ug	12	—*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 2 3 3.8, 3.8, 1.25
200 ug	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.8, 3.6, 1.25
Control	12	8.3	—	—	—	—	—	16.6	—	—	—	—	—	3.7, 3.4, 1.5

\* Negativo.

a El promedio de edad de las personas inoculadas excepto una, fue de 20 años.

del 10 al 3.5%. Además de que inducen un proceso inflamatorio de 10 cm o más de diámetro en el 11 % de la población inoculada (3). Las diferencias entre la vacuna ribosomal y las que se emplean actualmente para prevenir la fiebre tifoidea son tan grandes que hacen

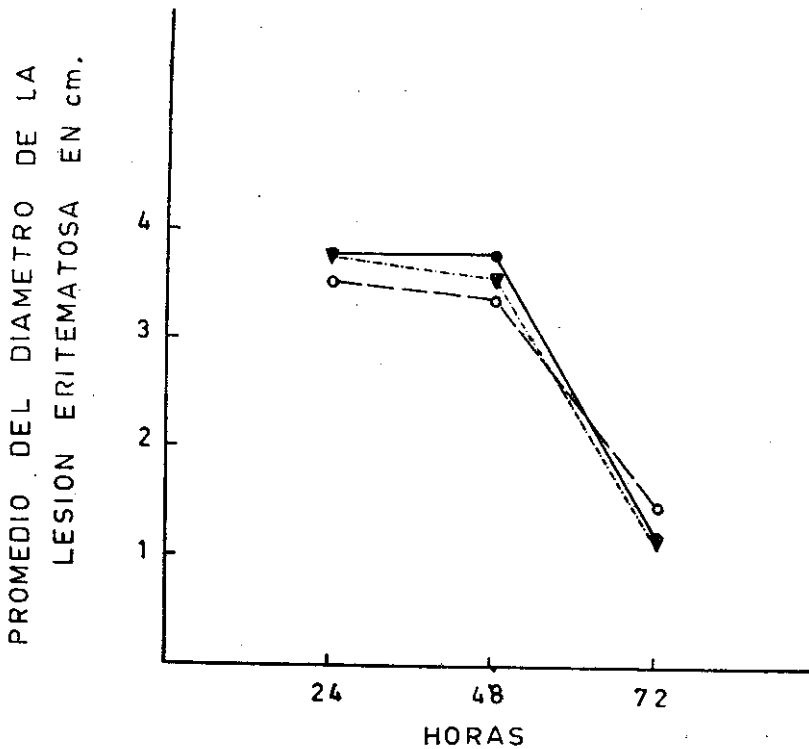


Fig. 9. Promedio del diámetro de la lesión inflamatoria en función del tiempo, producida por la inoculación intradérmica en voluntarios humanos de: (O) 100 ug de Fracción Ribosomal, (▼) 200 ug de Fracción Ribosomal y (●) 0.1 ml de Toxoide Tetánico como control.

que nos inclinemos a sugerir estudios de tolerancia y epidemiológicos en poblaciones humanas, para poder dilucidar el valor real de esta vacuna ribosomal.

La preparación ribosomal de *S. typhi* Ty2, consiste principalmente de pequeñas partículas aparentemente esféricas de aproximadamente

200 Å de diámetro semejantes a monosomas. Otros componentes minoritarios, parecen ser vesículas membranales, como el que aparece en la parte inferior derecha de la figura 10.

## V. Discusión

Varias líneas de investigación científica se han realizado para el estudio de vacunas antibacterianas, una de ellas esta relacionada a la investigación con *Salmonella*. En este aspecto muchos investigadores han estudiado vacunas ribosomales obtenidas de *S. typhimurium* (22-35). Sus puntos de vista en general están relacionados con el \_ papel inmunogénico que puedan jugar los diferentes componentes obtenidos de las preparaciones ribosomales. Venneman *et al.*, (25) encontraron una elevada actividad inmunogénica en fracciones de ARN. Margolis y Bigley (30) y Smith y Bigley (28, 29) creen que el inmunógeno activo es un complejo ARN-proteína. Houchens y Wright (31) observaron que una glicoproteína o mucopolisacárido es el antígeno activo. Einsenstein (33) ha reportado que los antígenos "O" contaminaron extractos ribosomales de proteína y ARN Y que éstos son los responsables en parte del efecto protector. Hoops *et al.* (34) han reportado que componentes extrínsecos adheridos a la superficie y no los constituyentes internos de los ribosomas, son los responsables del excelente grado de inmunidad. Los resultados de Johnson (32) mantienen la idea de que la fracción inmunogénica de los ribosomas es una proteína o un grupo de proteínas.

Los resultados presentados en este trabajo, demostraron características inherentes a estas vacunas ribosomales no estudiadas en otros laboratorios, como es la persistencia de la inmunidad que aquí fue de al menos de 75 días y que además con el mismo grado de protección que induce una preparación ribosomal fresca.

La potencia inmunogénica de estas preparaciones liofilizadas y mantenidas durante 90 días, fue estable al mismo nivel de la vacuna fresca.

Con el modelo de fiebre tifoidea murina experimental, se pudo comprobar la elevada eficacia de este biológico para proteger a los ratones cuando el desafío infeccioso se realizó por vía intraperitoneal o por la vía natural de infección, la vía oral

Con la prueba de potencia confrontando como vacunas: la preparación ribosomal de *S. typhi Ty2 Y* la vacuna estándar, se demostró que la primera fue 19 veces más eficaz.

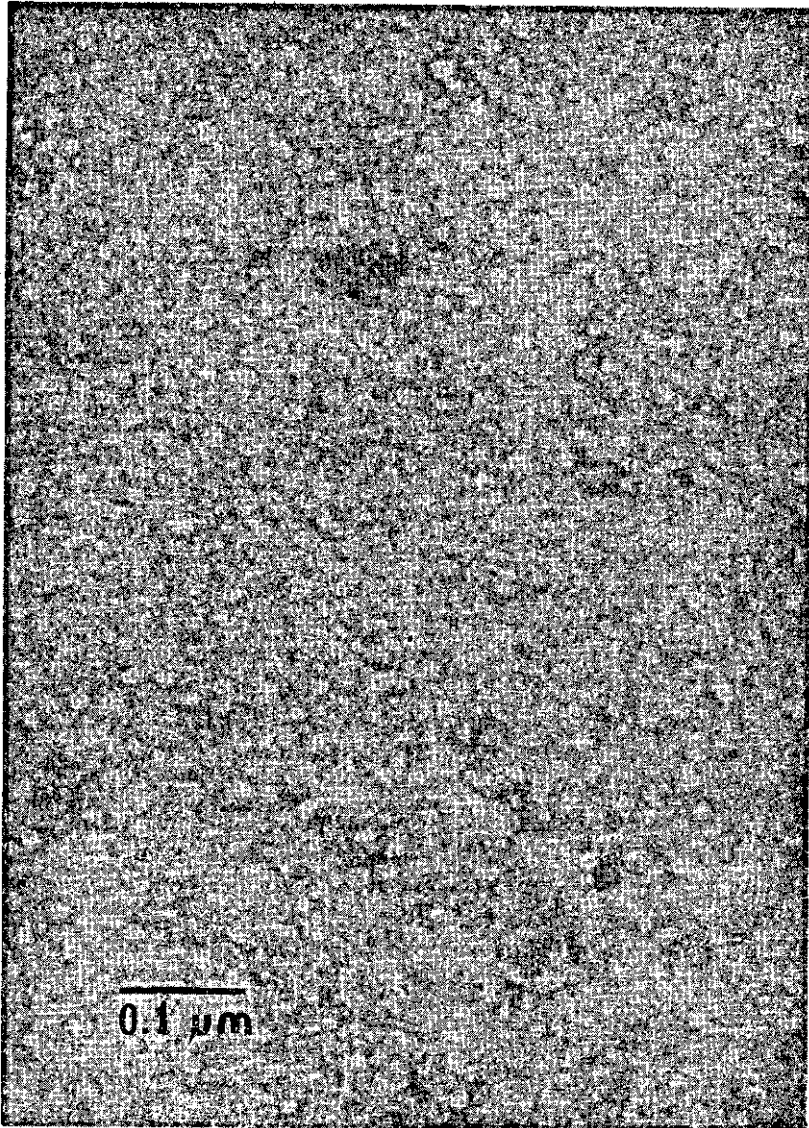


Fig. 10. 10 Ribosomas de *Salmonella typhi* Ty2. 120,000 X.

Creemos que es relevante el hecho de que la vacuna ribosomal de *S. typhi* Ty2, haya protegido a un 100% de los ratones desafiados con cepas diferentes de *S. typhi*.

Finalmente al haber sido demostrada su baja toxicidad en ratones, y al no haber producido efectos indeseables en humanos, como los que producen las vacunas tifoideas que se emplean actualmente (3, 35), hacen de estas preparaciones ribosomales, productos biológicos más idóneos para el control y erradicación de las Salmonelosis.

#### REFERENCIAS

1. Bounda, O. F. *Datos estadísticos de la Salmonelosis en los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Dirección General de Asistencia. Séptima MisiÓN Médica. Colima, Col. 27-29 junio, 1974.
2. Dubos, R. J., and Hirsch, J. G. *Bacterial and Mycotic infections -of man*. J. B. Lippincott Company., pp. 633-634, 1965.
3. Yugoslav Typhoid Commission. A controled Field Trial of the Effectiveness of Acetonedried and Inactivated and Heath-Phenol inactivated Typhoid Vaccines in Yugoslavia. *Bull. WHO*. 30:623-630, 1964.
4. Molinari, J. L., and Larralde, C. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fractions of *Salmonella typhimurium*. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.* 16: 189-197, 1974.
5. Molinari, J. L., y Cabrera, R. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2 *Rev. Lat-amer. Microbio/.* 16: 199-204, 1974.
6. Molinari, J. L., Flisser, A., and Cabrera, R. Immunity Induced with Ribosomal Fraction obtained from *Salmonella typhi* Ty2 against differents strains of *Salmonella typhi*. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.* 17:149~ 156, 1975.
7. Molinari, J. L., Gavilanes, M., y Tato, P. Vacuna ribosomal obtenida de *Salmonella typhimurium* probada contra el desafio del microorganismo virulento administrado por via bucal. *Arch. Inu. Med.* 7-3: 127-135, 1976.
8. Youmans, A. S., and Youmans, G. P. Preparation of Highly Immuno-genic Ribosomal Fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by use of Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Bacteriol.* 91 :2139-2145, 1966.
9. Cantoni, G. L., y Davies, D. R. *Procedures in Nucleic Acid Research*. Harper & Row. New York. p. 491, 1966.
10. Army Medical Department Research and Graduate School Laboratory of Biologic Products. *Preparation and testing of Mucine Suspensions for enhancement of the virulence of Salmonella typhosa*. Michigan Department of Health. 1960.
11. Batson, H. C. *An Introduction to Statistics in the Medical Sciences*. Burgess Publishing Co. 1956.
12. Spiegel, M. R. *Teoría Y Problemas de Estadística*. Mc Graw Hill de México. 1970.
13. Goldstein, A., Aronow, L., and Kalman, S. M. *Principles of Drug Action*. Harper & Row Publishers. New York. 1959.

14. Declaration of Helsinki. Recommendations guiding doctors in clinical research. *World Med. J.* 11:281, 1964.
15. Lowry, C. M., Rosebrough, J. J., Fan, A. L., and Randall, R. J. Protein-Measurement with the Folin Serial reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
16. Ashwell, G. Colorimetric analysis of sugars. In *Methods in Enzymology*. Ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press Inc. New York. 3: 73-105, 1957.
17. Welles, J. M., and Lury, H. B. New developments in the chemical determinations of nucleic acids. *Methods Biochem.* ano 6: 1-30, 1960.
18. Kabat, E. A. *Inmunoquímica Experimental*. 2ª edición. Ed. Prensa Médica Mexicana. 1968.
19. Clausen, J. Immunochemical techniques for the identification and stimulation of macromolecules. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Eds. T. S. Work and E. Work. Amsterdam. North Holland Publ. Co., pp. 447-463, pp. 519-523, 1971.
20. Dawes, J. C. *Biological Techniques in Electron Microscopy*. Barnes & Noble Inc., New York, pp. 146-148, 1971.
21. U. S. Department of Health Education and Welfare. National Institutes of Health. *Application Of the method proposed by Wilson and Worcester for determining the ED so to the evaluation of the potencies of pertussis Vaccine, 1956.*
22. Diena, B. B., Johnson, E. V., Baron, L. S., Wallace, R., and Greenberg, L. Assay of typhoid Vaccines with *Salmonella typhosa-typhimurium* hybrids. *Infec. Immunity.* 7 :5-8, 1973.
23. Cabrera, C. R., González-Pacheco, M., y Pérez-Miravete, A. Método experimental empleando la bacteremia como índice para valorar potencia de las vacunas tifoídicas. *Rev. Inv. Salud Pública.* México, 33: 83-97, 1973.
24. Venneman, M. R., Bigley, N. J., and Berry, L. J. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. *Infec. Immunity.* 1:574-582, 1970.
25. Venneman, M. R., and Berry, L. J. Cellular mediated resistance induced with immunogenic preparations of *Salmonella typhimurium*. *Infec. Immunity.* 4:381-387, 1971.
26. Venneman, M. R. Purification of Immunogenically active ribonucleic acid preparations of *Salmonella typhimurium*: Molecular sieve and anionexchange chromatography. *Infec. Immunity.* 5: 269-282, 1972.
27. Johnson, W. Ribosomal Vaccines. 1. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia Putis*. *Infec. Immunity.* 5:947-952, 1972.
28. Smith, R. A., and Bigley, N. J. Ribonucleic acid-protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogens. *Infec. Immunity.* 6:377-383, 1972.
29. Smith, R. A., and Bigley, N. J. Detection of delayed hypersensitivity in mice injected with ribonucleic acid protein fractions of *Salmonella typhimurium*. *Infec. Immunity.* 6:384-399, 1972.
30. Margolis, J. M., and Bigley, N. J. Cytophilic macroglobulin reactive with bacterial protein in mice immunized with ribonucleic acid-protein frac-

- nons of virulent *Salmonella typhimurium* *Infec. Immunity*. 6:390-397, 1972.
31. Houchens, D. P., and Wright, J. L. Jr. Immunity to *Salmonella typhimurium* infection characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis. *Infec. Immunity*. 7:507-511, 1973.
  32. Johnson, W. Ribosomal vaccines. 11. Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic and protein isolated from *Salmonella typhimurium*. *Infec. Immunity*. 8:395-400, 1973.
  33. Eisenstein, T. K. Evidence for O-antigens as the antigenic determinants in "ribosomal" vaccines prepared from *Salmonella*. *Infec. Immunity*. 12: 364-377, 1975.
  34. Hoops, P., Prather, N. E., Berry, L. J., and Ravel, J. M. Evidence for an extrinsic immunogen in Effective Ribosomal Vaccines from *Salmonella typhimurium*. *Infec. Immunity*. 13: 1184-1192, 1976.
  35. Hejfec, L. B., and Steinberg, O. Immunological reactions in children with general reactions of different intensity in response to the immunization with typhoid vaccines, *Zh. Mikrobiol* Moscú. 47:22-28, 1970.