

## FIEBRE TIFOIDEA DIAGNOSTICO POR PRUEBAS INMUNOENZIMATICAS: ELISA

MIGUEL GUZMAN,\* MOISES WASSERMAN\*\*

Este trabajo describe el desarrollo y normalización de una técnica inmunoenzimática para el diagnóstico indirecto de la Fiebre Tifoidea. El método permite un análisis simple y objetivo de los resultados. La reacción enzimática es proporcional a la concentración de anticuerpos en el suero contra el antígeno somático-O, por tanto, el método es cuantitativo. Por lo demás, la técnica tiene un alto grado de especificidad para *Salmonella typhi*, ya que los sueros de pacientes con Salmonelosis causada por *Salmonella enteritidis* serotipos paratyphi A, B y typhimurium dieron resultados negativos, en forma similar a los presentados por el grupo control antes de la vacunación específica.

Los resultados obtenidos con esta técnica permitieron definir el nivel de anticuerpos que puede presentar una población control supuestamente sana frente a los niveles inducidos por la enfermedad. Los resultados postvacunales en el grupo control mostraron títulos sorprendentemente bajos; un análisis de este fenómeno se presentó en forma amplia. Igualmente se propone futuras investigaciones sobre este campo.

### INTRODUCCION

La fiebre tifoidea continúa siendo un problema de salud pública para vastas zonas del mundo (1). El diagnóstico de esta entidad exige la confirmación por el laboratorio mediante el aislamiento e identificación del agente causal. Las pruebas indirectas mediante la determinación y cuantificación de anticuerpos circulantes específicos contra los determinantes antigénicos del microorganismo son obviamente útiles y se han venido utilizando desde la introducción de las técnicas de aglutinación de Widal (2.3). Sin embargo, esta técnica tiene serios

problemas de normalización e interpretación que la hacen de poca utilidad, cuando no de caprichosos resultados, llegándose a que su confiabilidad sea cuestionada por numerosos autores (4.5).

Muchos procedimientos serológicos se han explorado en los últimos años buscando sencillez, sensibilidad y especificidad en la medición de la afinidad de un suero por su antígeno homólogo (6.7). El desarrollo y avance acelerado de las técnicas inmunoenzimáticas (7) hace suponer, que pueda utilizarse ventajosamente un procedimiento similar para el diagnóstico indirecto de la Fiebre Tifoidea.

El presente trabajo tiene por objeto presentar el desarrollo y normalización de un procedimiento inmunoenzimático para tal fin.

\* Jefe Sección Diagnóstico, Investigación y Referencia. Instituto Nacional de Salud.

\*\* Jefe, Grupo de Bioquímica. Sección Diagnóstico, Investigación y Referencia. Instituto Nacional de Salud.

## MATERIALES Y METODOS

*Preparación de los sueros:*

Para conformar la población problema fueron aceptados en el estudio los pacientes con un cuadro clínico de Fiebre Tifoidea y de Salmonelosis por *Salmonella enteritidis*, serotipos paratyphi A, B y typhimurium, comprobado por hemocultivo positivo con aislamiento e identificación bioquímica y serológica del agente etiológico. A cada uno de estos pacientes se le tomó una muestra de sangre de 10 cc. Luego de la retracción del coágulo el suero fue retirado asepticamente, adicionado de azida de sodio (1 mg/ ml) y guardado para procesamiento posterior.

Con el objeto de tener un grupo control, se conformó un grupo de 100 voluntarios, aparentemente sanos, a quienes se les hizo una historia clínica, seleccionándose entonces, aquellos que no tuvieron antecedentes sospechosos de haber padecido Fiebre Tifoidea. A cada uno de ellos se le tomó una muestra de 10 cc. de sangre la cual fue procesada como en el caso anterior. Inmediatamente después de la sangría se inyectaron por vía sub-cutánea con una dosis de 0.5 cc. de vacuna antitifoidea (INS). Una segunda dosis les fue aplicada 15 días después. Pasados 30 días de esta segunda inoculación se tomó una segunda muestra de sangre la cual se procesó como se indicó antes.

*Cepa:* La cepa utilizada para la extracción del antígeno somático O fue una cepa de *Salmonella typhi* la No. 224 aislada y estudiada por la Unidad de Enterobacterias del Instituto Nacional de Salud (INS).

*Vacuna:* La vacuna utilizada en este estudio fue una preparación del Instituto Nacional de Salud (INS), la cual contiene por dosis de 1 ml.,  $10^9$  microorganismos muertos (8).

*Otros materiales utilizados:* IgG purificada a partir de un suero monoespecífico anti IgG humano obtenido en cabra: producido por la Unidad de Inmunoquímica del I.N.S.

Fosfatasa alcalina (Tipo VII); Paranitrofenil fosfato; Dietanolamina y fenol: Sigma

Chem. Co. Louisiana U.S.A. Glutaraldehido 8% grado para microscopía electrónica: Polysciences-Paul Valley U.S.A. Tween 20: Serva. Heidelberg. Medio de Cultivo y Caldo tripticase de soya: Difco. Michigan. U.S.A. Placas de microtitulación para ELISA: Dynatech-Alexandria, VA. U.S.A.

*Preparación de Antígeno:*

Para la obtención y purificación del antígeno somático O, de *Salmonella typhi*, se cultivó sobre agar nutritivo una cepa tipo de *Salmonella typhi*. Luego de comprobarse un adecuado crecimiento se seleccionó una colonia la que, suspendida asepticamente en 10 ml de caldo estéril de tripticase de soya, se incubó por 18 horas al término de las cuales y tras comprobarse un buen crecimiento se utilizó como cultivo base para inocular 1 ml. por cada fiola de 1 L. conteniendo 300 ml. de caldo estéril de tripticase de soya. Luego de una incubación a 37°C por 18 horas, se removió asepticamente de cada fiola una muestra para determinar por cultivo y pruebas bioquímicas la pureza de los mismos. Los cultivos fueron centrifugados a 10.000 xg. 30 minutos en centrífuga MSE Highspeed 18 refrigerada. Las células bacterianas sedimentadas, fueron resuspendidas en un volumen apropiado de solución salina estéril y lavadas por tres veces consecutivas. Luego se resuspendió el sedimento en 15 c.c. de agua destilada estéril. Esta operación se realizó a 4°C. Para la extracción del polisacárido se utilizó una modificación (9) de la técnica de Westphal (10); el material anterior fue mezclado con 10 volúmenes de acetona a -20°C, manteniéndose a esta temperatura por 60 minutos, con eventuales agitaciones: posteriormente se centrifugó a 2.000 xg por 15 minutos y el sedimento se resuspendió y centrifugó para lavarlos con 5 volúmenes de acetona fría. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente y se trituró en un mortero estéril de porcelana. El producto así obtenido fue resuspendido en agua destilada a una concentración del 6% (peso/volumen). Esta mezcla fue homogenizada y calentada en baño de agua hasta los 65°C, se le adicionó un volumen igual de una solución 90% de fenol en agua y se continuó su calentamiento a 65°C, bajo agitación constante, por 5

minutos. La mezcla fue luego enfriada a 0°C y centrifugada a dicha temperatura a 2.000 xg utilizando un rotor horizontal.

Con la anterior operación se logró la separación nítida de dos fases lo cual permitió remover cuidadosamente la fase acuosa que es la que contiene el lipopolisacárido, esta fase fue exhaustivamente dializada contra agua destilada con el objeto de remover el fenol contaminante. La solución así purificada se centrifugó a 100.000 xg por 4 horas, obteniéndose en el sedimento el lipopolisacárido en forma de un gel el cual fue resuspendido en un volumen adecuado de agua destilada estéril y lavado en forma similar al proceso anterior por dos veces. El sedimento final fue resuspendido en agua destilada, liofilizado y conservado para su utilización posterior.

#### *Preparación del Conjugado:*

El conjugado de anti-IgG-humana con Fosfatasa Alcalina fue preparado según la técnica de Voller y col. (11), utilizando  $\gamma$ -globulina anti-IgG-Humana en Cabra que contenía 1280 unidades precipitantes por ml. De ésta fueron suspendidos 2 mg en 1 ml. de una solución de Fosfatasa Alcalina que contenía 5000 U/ml. en solución 3.2 M de Sulfato de Amonio. La preparación se dializó contra solución salina buffer de Fosfatos pH 7.2., posteriormente se adicionó glutaraldehído hasta una concentración de 0.2% se incubó a 25°C por una y media hora y se dializó contra una solución buffer de Tris-HCL-0.05 M pH 8.0. La mezcla se diluyó luego en solución de Tris-HCL-0.05 M pH 8.0 conteniendo 1% de albúmina y 0.02% de Azida de sodio. El volumen final fue de 4 ml.

#### *Prueba Inmunoenzimática:*

Para realizar la prueba inmunoenzimática se utilizaron microplacas de poliestireno (Dynatech M 129 A). Cada uno de los orificios fue llenado con 0.2 ml de una solución del lipopolisacárido en buffer de carbonato 0.05M pH 9.6. preparada para contener 1;5 ó 10 mcg/ml. Las placas fueron incubadas por tres horas a temperatura

ambiente en cámara húmeda para permitir la adsorción del lipopolisacárido al plástico. Posteriormente fueron intensamente lavadas con solución salina buffer que contenía 0.05% de Tween 20 permitiendo que en cada ocasión el líquido de lavado permaneciera en los orificios por períodos de 5 minutos y removiéndolo por succión. Se hicieron diluciones dobles progresivas de los sueros a titular en solución salina-buffer-Tween 20, las que vertidas en su orificio correspondiente se incubaron por tres horas a temperatura ambiente en cámara húmeda; al término de este tiempo las placas fueron lavadas intensamente en forma similar a la anterior. El conjugado anti-IgG humana-fosfatasa Alcalina fue diluido 1:400 en solución salina-buffer-tween 20 y agregado en cada orificio en cantidad de 0.2 ml. Las placas fueron luego incubadas por 16 horas y posteriormente lavadas en forma similar a los pasos anteriores. Para revelar la reacción enzimática se utilizó como sustrato una solución de Paranitrofenilfosfato de concentración 1 mg/ml, en buffer de Dietanolamina al 10% pH 9.8., de la cual se agregó un volumen de 0.2 ml por orificio. La reacción se dejó operar por 30 minutos, al término de los cuales se frenó mediante la adición de 0.05 ml. de una solución 3M de NaOH y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro Dynatech a 405 nm. En cada prueba se incluyeron controles adecuados los cuales incluyen: un suero de reconocida positividad anti-antígeno-O de *Salmonella typhi*, uno negativo y los controles propios del sistema enzimático empleado.

#### RESULTADOS:

Se purificaron dos formas químicas del antígeno-O de *Salmonelle typhi*; lipopolisacárido, y polisacárido. Para la técnica aquí descrita el lipopolisacárido, es de preferible utilización por su buena capacidad de adsorción a las paredes de tubos de polipropileno o de poliestereno. A partir de 1.5 litros de cultivo de salmonella en la fase logarítmica de su crecimiento, se extrajeron 11 mg. de lipopolisacárido (Tabla I).

TABLA No. 1

FRACCION	PESO g.	% DEL PESO MOJADO	% DEL PESO SECO
Cultivo 1.5 litros.	4.0	—	—
Polvo extracto Acetona.	0.35	8.75	1000
Lipopolisacárido Antígeno-O (Toxina).	0.011	0.28	3.1
Polisacárido Antígeno-O.	0.007	0.18	2.0

Tabla No. 1. EFICIENCIA EN LA PURIFICACION DEL ANTIGENO-O DE *SALMONELLA TYPHI*.

Al realizar la reacción enzimática de acuerdo a lo recomendado por Engvall y Perlmann (7), se encontró que ésta, medida por absorbancia, aumenta en forma directamente proporcional a la concentración del antígeno como puede verse en la figura No. 1. Las diferencias observadas en la absorbancia en el suero positivo patrón en ausencia del antígeno y en este mismo suero con antígeno a concentraciones de 1 mcg/ml o más, son estadísticamente significativas; las probabilidades de que estas diferencias sean debidas al azar, están muy por debajo de P: 0.005.

Se encontró también que la absorbancia es proporcional a la concentración del suero problema como lo muestran las figuras 1 y 2, presentando una marcada significación estadística para las diferencias entre las absorbancias producidas por el suero problema y por el suero control, utilizando el antígeno somático-O específico a la concentración de 1 mcg/ml (Figura 2). Las probabilidades de que este fenómeno sea debido al azar, son nuevamente menores de P: 0.005.

La técnica detecta en forma específica anticuerpos contra *Salmonella typhi*; los sueros control producen una reacción enzimática mínima; es una línea base de muy baja absorbancia (Figuras 2, 3a y 3b). Los sueros de pacientes con Salmonelosis por *Salmonella enteritidis* serotipos paratyphy A,B y typhimurium (Figura 3) mostraron una reacción enzimática, similar a la que produce el suero control negativo y mucho más baja que la producida por un suero prove-

FIGURA No. 1

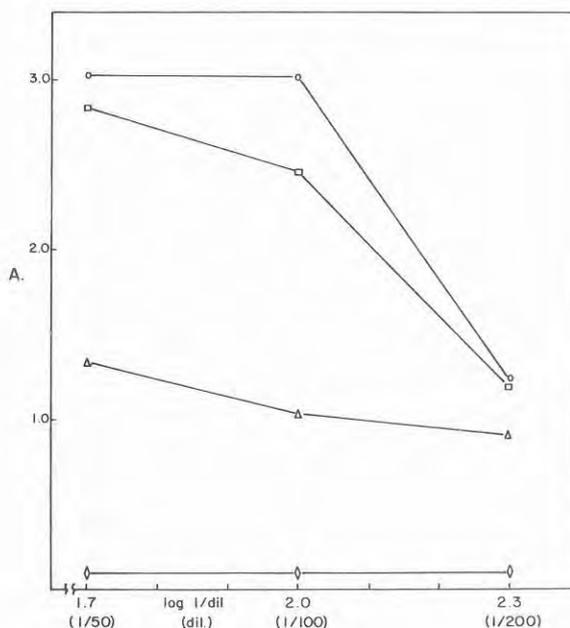


Figura No. 1. DEPENDENCIA DE LA RESPUESTA ENZIMATICA EN LA CONCENTRACION DE ANTIGENO-O.

Un suero control positivo fue usado en las diluciones indicadas en las abscisas. El lipopolisacárido fue adsorbido a los orificios de la microplaca de titulación a concentraciones de 1 mcg/ml  $\Delta$ — $\Delta$  ; 5 mcg/ml  $\square$ — $\square$  y 10 mcg/ml  $\circ$ — $\circ$ . Como control los orificios apropiados en la microplaca fueron tratados en idéntica forma, pero con buffer de adsorción libre de lipopolisacárido  $\diamond$ — $\diamond$ . El conjugado inmunoenzimático se usó a una dilución de 1/400.

niente de un paciente con Fiebre Tifoidea. En el experimento descrito en la figura 3b, las diferencias en las tres diluciones de los sueros de pacientes con *Salmonellosis* por *paratyphi B* y *typhimurium* y el suero control no tiene significación estadística alguna, mientras que los valores de absorbancia del suero del paciente con Fiebre Tifoidea son significativamente más altos. En el experimento de la figura 3a sin embargo, en la dilución de suero 1:50 la diferencia entre el suero del paciente con *Salmonellosis* por *paratyphi A* y Fiebre Tifoidea podría ser casual.

FIGURA No. 2

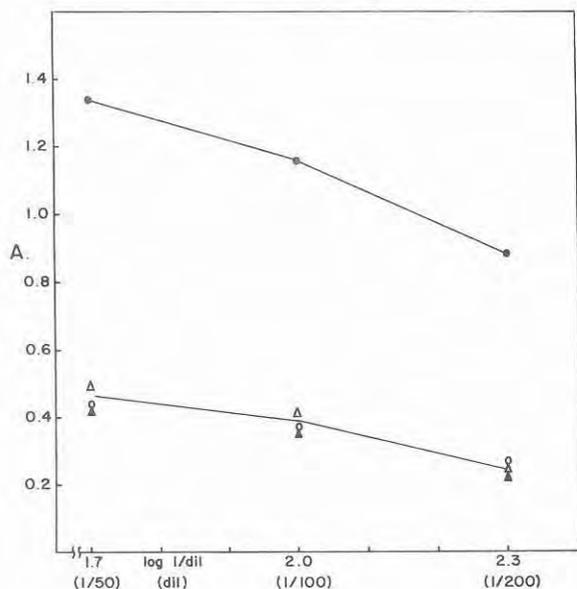


Figura No. 2. DEPENDENCIA DE LA RESPUESTA ENZIMATICA EN LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENO-0.

Se determinó, a las diluciones indicadas, las absorbancias inducidas por la incubación con: un suero control positivo a *Salmonella typhi*, previa adsorción del lipopolisacárido a concentración de 1 mcg/ml ●—●—● o en su ausencia ○—○—○ y con un suero control negativo previa adsorción del lipopolisacárido a 1 mcg/ml ▲—▲—▲ o en su ausencia △—△—△. El conjugado inmunoenzimático se usó a una dilución de 1/400.

Tomando en cuenta que: a) En los sueros control negativo hay cierto grado de absorbancia, b) La absorbancia disminuye a medida que disminuye la concentración del antígeno y del incremento en la dilución del suero, guardando esta variable relativa proporcionalidad para todos los sueros, positivos o negativos, y, c) Los valores de la absorbancia oscilan en el mismo suero pero se mantiene la proporción relativa entre el suero problema y el suero control, se optó entonces por introducir un patrón de medida que, siendo fácil de aplicar diera más exacta idea de las concentraciones de anticuerpos e hiciera posible la comparación entre resul-

FIGURA No. 3

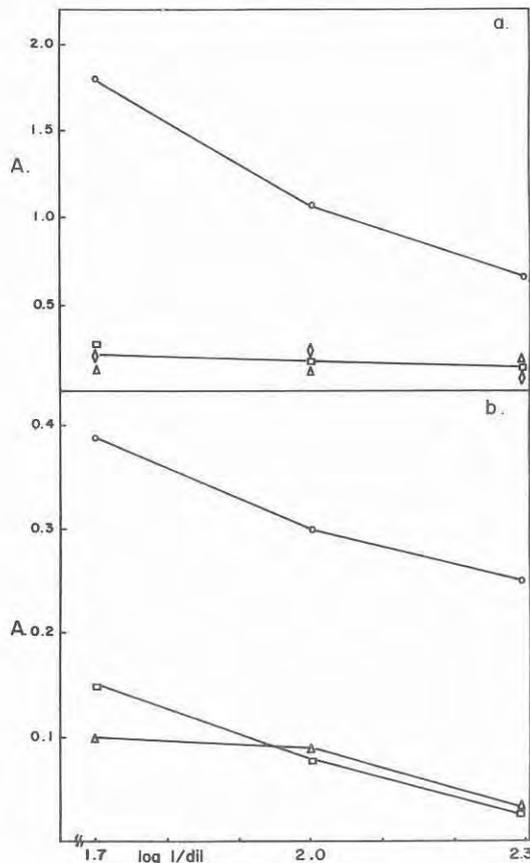


FIGURA No. 3. ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA.

a) Se determinó las absorbancias inducidas por diluciones de sueros obtenidos de pacientes: control no infectado □—□—□; infectado con *Salmonella paratyphi B* ◇—◇—◇; con *Salmonella typhimurium* △—△—△ y con *Salmonella typhi* ○—○—○. Las microplacas fueron previamente adsorbidas con lipopolisacárido a concentración de 1 mcg/ml. El conjugado inmunoenzimático se usó a una dilución de 1/400.

b) En distinto experimento se determinó las absorbancias inducidas por diluciones de sueros obtenidos de pacientes: control no infectado □—□—□; infectado con *Salmonella paratyphi A* △—△—△ y con *Salmonella typhi* ○—○—○. Las microplacas fueron adsorbidas con lipopolisacárido a concentración de 1 mcg/ml. El conjugado inmunoenzimático se usó en dilución 1/800.

tados. Se introdujo entonces en el estudio el Índice (o relación) Ap / Ac; relación entre la absorbancia del suero problema con el suero control, en el momento de la prueba. Esta medida se hace constante, así sean las oscilaciones en las absorbancias al momento y así sean las diluciones de los sueros en la prueba. Del análisis estadístico aplicado a los resultados obtenidos en las pruebas practicadas en 20 sueros, tomados al azar dentro de los sueros en estudio, se obtuvo la certeza de que las variaciones entre resultados para un mismo suero son atribuidas al azar en el 95% de los casos y de que el índice es el mismo cualquiera que sea la dilución del suero, con una seguridad también del 95%.

Utilizando estos criterios técnicos se midió el título de anticuerpos en los sueros de un grupo de pacientes con Fiebre Tifoidea y en el grupo compuesto de 92 personas aparentemente sanas y sin antecedentes conocidos de Salmonellosis o Fiebre Tifoidea, antes y después de ser vacunado contra *S. typhi*. La distribución de los títulos se puede apreciar en la Figura No. 4 y en las tablas 2 y 3. Los resultados en la población problema y control son perfectamente distintos. La probabilidad de que la población problema tenga un valor promedio de dos o menos de dos es inferior a 0.005. La probabilidad de que la población control tenga un valor promedio de uno con cinco o mayor es bastante inferior a 0.005.

En el grupo control post-vacunado se descartaron los casos cuyo índice de absorbancia (Ap/Ac) determinado antes de la vacunación fue de 1.5 o mayor. La vacunación aumenta el promedio del índice de absorbancia en forma significativa (Tabla 3). Sin embargo, solo un 30.44% de los vacunados tuvieron un alza en el título de anticuerpos contra *S. typhi*.

No hay significación estadística para la diferencia encontrada entre los porcentajes de alza según una o dos dosis de vacuna (Tabla 4).

El promedio del índice de absorbancia para el grupo control; es de 1.33 con intervalo de confianza de 1.20 a 1.46; para

el grupo de pacientes es de 2.92 con intervalo de 2.43 a 3.41 y para el grupo de vacunados es de 1.35 con intervalo de confianza de 1.19 a 1.51.

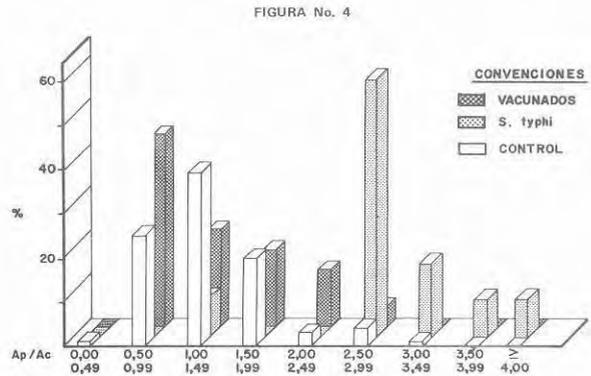


Figura No. 4. TITULO DE ANTICUERPOS EN UNA POBLACION VACUNADA CONTRA *SALMONELLA TYPHI*.

Se calculó el índice de absorbancia Ap/Ac dividiendo la absorbancia inducida por un suero, por el promedio de absorbancias producidas por tres sueros control negativos tratados en las mismas condiciones. La gráfica muestra los porcentajes por grupos de índice de absorbancia para 3 poblaciones: control (white bar); vacunada (hatched bar) e infectada con *Salmonella typhi* (dotted bar).

TABLA No. 2

POBLACIONES	INDICE DE ABSORBANCIA (Ap/Ac)									TOTAL
	0,00 0,49	0,50 0,99	1,00 1,49	1,50 1,99	2,00 2,49	2,50 2,99	3,00 3,49	3,50 3,99	≥ 4,00	
PROBLEMA			1			7	2	1	1	12
CONTROL	1	25	39	20	3	4	1			93
TOTAL	1	25	40	20	3	11	3	1	1	105

Tabla No. 2. DISTRIBUCION DE LAS POBLACIONES PROBLEMA Y CONTROL POR GRUPOS DE INDICE DE ABSORBANCIA (Ap/Ac). El índice de absorbancia fue calculado como se explica en el texto. El grupo problema fue formado por pacientes con infección de *Salmonella typhi* comprobada por hemocultivo. El grupo control fue escogido al azar entre voluntarios sin antecedentes sospechosos de haber padecido una Fiebre Tifoidea.

FIEBRE TIFOIDEA — DIAGNOSTICO POR PRUEBAS....

TABLA No. 3

MOMENTO DE LA PRUEBA	INDICE DE ABSORBANCIA, (Ap/Ac)									TOTAL
	0,00 0,49	0,50 0,99	1,00 1,49	1,50 1,99	2,00 2,49	2,50 2,99	3,00 3,49	3,50 3,99	≥ 4,00	
PREVACUNAL	1	10	12							23
POSTVACUNAL		10	5	4	3	1				23

Tabla No. 3. DISTRIBUCION DE LA POBLACION VACUNADA POR GRUPOS DE INDICE DE ABSORVANCIA Ap/Ac). Entre la población vacunada se tomaron únicamente aquellos que antes de la vacunación presentaban un índice de absirbancia Ap/Ac inferior a 1,5. Los demás se descartaron por considerarlos como probables de haber tenido contacto con la *Salmonella typhi* ya por infección o por vacunación.

TABLA No. 4

DOSIS DE VACUNA	NO ALZA		ALZA		TOTAL
	NUMERO	%	NUMERO	%	
UNA DOSIS	7	63,64	4	36,36	11
DOS DOSIS	9	75,00	3	25,00	12
TOTAL	16	69,56	7	30,44	23

Tabla No. 4. DISTRIBUCION DE LOS CASOS VACUNADOS SEGUN VACUNACION CON UNA O DOS DOSIS.

Se tomaron solo los casos que antes de la vacunación tenían un índice de absorbancia Ap/Ac inferior a 1,5. Se consideraron como alzas significativas en los índices aquellas que sobrepasaron las dos y media desviaciones estandar de la diferencia calculada sobre la tabla No. 3.

DISCUSION:

La fiebre tifoidea es para países de escaso desarrollo sanitario un problema importante. En 1975 se informaron más de 32.000 casos en las Américas, excluidos los Estados Unidos (1). En Colombia, es frecuente. En 1978 nuestro laboratorio estudió más de 200 casos incluida una epidemia en una guarnición con más de 100 casos. En la ciudad de Bogotá es de común ocurrencia habiéndose presentado inclusive epidemias intrafamiliares (12). La confirmación de su diagnós-

tico descansa en el hemocultivo positivo en las primeras semanas de la enfermedad, sin embargo un diagnóstico serológico indirecto y específico es altamente deseable. Tradicionalmente la aglutinación introducida por Widal, se ha venido utilizando, sin embargo el hecho de utilizar una suspensión de microorganismos hace que el antígeno sea una mezcla cruda de componentes con posibilidad de reacciones cruzadas que recienten su especificidad. El uso incontrolado de antígenos comerciales diversos, la valoración subjetiva de la aglutinación y la mala normalización hacen difícil su interpretación y demeritan su confiabilidad. En un estudio (4) en el que cuatro laboratorios analizaron los mismos sueros, con idéntico protocolo de trabajo y utilizando los mismos reactivos se encontraron discrepancias del 36%; estas llegaron al 76% cuando los laboratorios utilizaron sus propios reactivos y sus propios protocolos de trabajo. Otros autores encuentran porcentajes de falsa positividad hasta de 8% y de falsa negatividad de 30% (5) lo cual los hace afirmar que el procedimiento de antígenos febriles es: "no específico, pobremente estandarizado, frecuentemente confuso y difícil de interpretar". En países como el nuestro en donde el control de calidad es un concepto exótico y donde no existe ningún control biológico estatal, el uso diagnóstico de los antígenos febriles es altamente peligroso por la cantidad de epidemias falsas de Fiebre Tifoidea que se denuncian en base a sus resultados. Por todo esto, es apenas lógico explorar nuevos procedimientos. La técnica aquí propuesta tiene ventajas definidas ya que utiliza un antígeno puro, el lipopolisacárido, asegurando así la especificidad de la reacción. El uso de reactivos ordenados en una reacción secuencial precisa, asegura una normalización inviolable y la lectura hecha en base a una reacción enzimática mensurable espectrofotométricamente elimina los factores subjetivos de lectura. La utilización del antígeno-0 purificado de *Salmonella typhi*, en lugar de la mezcla cruda de antígenos y de tipos diferentes de *Salmonella typhi* usados en el método de los antígenos febriles (2,3), además de sentar las ventajas anteriormente mencionadas comunes al trabajar con sistemas definidos, evita el problema de la persistencia por periodos muy

largos, de altos títulos contra el antígeno H en sueros de personas que han tenido contacto con *Salmonella* (13).

Los sueros de pacientes infectados con *Salmonella enteritidis* serotipos typhimurium, paratyphi A y paratyphi B produjeron reacciones enzimáticas similares a las obtenidas con sueros control negativos. Esto sugiere una alta especificidad para detección de infecciones por *Salmonella typhi*. Esta especificidad es en cierta forma sorprendente, pues el antígeno somático-O de *S. Typhi* comparte el determinante número 12 con los serotipos paratyphi y typhimurium (14).

El método es reproducible por lo menos en el marco limitado del presente trabajo: puede ser fácilmente estandarizado para una sola dilución y podría eventualmente ser montado como método de rutina en cualquier laboratorio de centros asistenciales u organismos de salubridad.

La producción del antígeno purificado no confronta mayores problemas y su rendimiento es eficiente ya que de uno y medio litros de cultivo en crecimiento logarítmico se obtuvo alrededor de 11 mg. de lipopolisacárido. Esta cantidad es suficiente para realizar más de 50.000 pruebas. El conjugado inmunoenzimático es relativamente de sencilla fabricación y podría ser también regularmente suministrado por un centro de referencia como el Instituto Nacional de Salud.

Un hecho que conviene ser discutido es la pobre respuesta de IgG inducida por la vacunación sobre nuestro grupo control y estudiada mediante la técnica aquí propuesta. Solamente 30% presentó una respuesta que puede interpretarse como una seroconversión. Este hecho sugiere la búsqueda de vacunas más eficientes que induzcan una buena respuesta a base de IgG, ya que según numerosos estudios las vacunas en uso a base de microorganismos muertos inducen una respuesta mayor de IgM (15, 16, 17,18) y es un hecho conocido que la protección conferida es muy baja y de muy corta duración, (19) en cambio la enfermedad induce una buena respuesta a base de IgG como lo muestra en forma clara este trabajo y está demostrado que la inmunidad induci-

da por la enfermedad es factor decisivo en la recuperación de los pacientes y que confiere un grado de resistencia que hace improbable un segundo ataque de Fiebre Tifoidea.

En conclusión creemos que la prueba inmunoenzimática en fase sólida (ELISA) aquí propuesta, para el diagnóstico de Fiebre Tifoidea es altamente promisoriosa y que un estudio más amplio debe realizarse para probar su validez estadística, su reproducibilidad y confiabilidad.

#### SUMMARY

The hereby presented work describes the development of an "Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)" for the indirect diagnosis of Typhoid Fever. It is possible, by means of this technique, to do an objective and neat analysis of the results. The technique is a quantitative one, since the extent of the enzymatic reaction is proportional to the concentration of circulating antibodies against the somatic antigen (O-antigen) of *Salmonella typhi*. Furthermore, the technique is highly specific for *Salmonella typhi*. Sera from patients who suffered infections caused by *Salmonella enteritidis* serotypes paratyphi A,B and typhimurium gave negative results, undistinguishable from those obtained with sera from an uninfected control group.

The technique was useful as well, to define the level of antibodies against the somatic antigen of *Salmonella typhi* in a population which was assumed as a healthy one and to compare it with the level of antibodies induced by the illness.

Post-vaccinational levels of antibodies were determined and found surprisingly low. The results are widely discussed.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al doctor Mario Salazar Niño, del Grupo de Microbiología e Inmunología del Instituto Nacional de Salud, por su invaluable ayuda en la recolección de sueros y conformación del grupo control, y al doctor Alvaro Aguilera, Jefe de la Oficina de Epidemiología y Red Nacional de Laboratorio, por el análisis estadístico de los resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. World Health Statistics Report. 1976; 29: 380.
2. Widal GFS, Sicard A. 1896 citados en: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP. Edts. Manual of Clinical Microbiology 3o. Ed. 1980, p. 253. Am. Soc. Microbiol. Washington.
3. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gorzynski EA. The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1965, 66: 141.
4. Gardner AD. An international experiment on the Widal reaction. J. Hyg. 1937; 37: 124.
5. Schoroeder SA. Interpretation of serologic tests for typhoid fever. J. Am. Med. Assoc. 1968; 206: 839.
6. Kirkham KE, Hunter WA. Radioimmunoassay Methods. 1971, Williams and Wilkins Edts. Baltimore.
7. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA. III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol. 1972; 109: 129.
8. OMS. Informe Técnico. 1967; 361: 63.
9. Sutherland IW, en Handbook of Experimental Immunology. 1967; pp. 368-370. Weir DM Edt. FA Davis Co. Philadelphia.
10. Westphal O, Luderitz O, Bister F. Uber die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser. Z. Naturforsch, 1952; 7: 148.
11. Voller A, Bidwell, DE, Bartlett A. Enzyme Immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World Health Organ, 1976; 53: 55.
12. Guzmán MA. Informe del Grupo de Microbiología. 1978; Instituto Nacional de Salud. Bogotá.
13. Wilson AS, Miles, A. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity, 5th ed. 1964; pp. 1841-1848. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
14. Freter R. Manual of Clinical Immunology. 1976; p. 286. Rose, NR and Friedman H. Edts. Am Soc. Microbiol. Washington.
15. Friedman H. Cellular and molecular aspects of the immune response to a bacterial somatic antigen. J. Inf. Dis. 1973; 128-561.
16. Moller G, Sjoberg, O, Anderson J, Immunogenicity, tolerogenicity and mitogenicity of lipopolysaccharides. J. Inf. Dis. 1973; 128-552.
17. Turner MW, Rowe, DS. Characterization of human antibodies to Salmonella Typhi by gel-filtration and antigenic analysis Immunology. 1964; 7: 639.
18. Kenny K, Herzberg M. Early antibody response in mice to either infection or immunization with *Salmonella typhimurium* J. Bact. 1967 ; 93: 773-778.
19. OMS. Informe Técnico No. 500. 1972.