

DESARROLLO DE UNA TECNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA "WESTERNBLOT" PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA COMPONENTES PROTEINICOS DE *SALMONELLA TYPHI*

MIGUEL GUZMAN U.* CARMEN ALICIA NIÑO** y LUZ MARLENY SIERRA**

Desde su desarrollo la Inmunoelectrotransferencia (INMET) ha sido una herramienta útil en biología molecular así como también en el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas.

Tradicionalmente la demostración de anticuerpos contra *Salmonella typhi*, se ha enfocado hacia la detección de aquellos, que se producen contra lipopolisacáridos, especialmente los que se relacionan con el antígeno somático "O". Pero pocos trabajos, se han realizado para la detección de anticuerpos contra otros antígenos tales como proteínas protoplasmáticas. Este trabajo intenta demostrar si tales anticuerpos se producen en conejos inmunizados experimentalmente, así como también en voluntarios vacunados contra la fiebre Tifoidea con la vacuna oral (cepa Ty21a).

El antígeno preparado y purificado a partir de una cepa de *Salmonella typhi*, fue suspendido en una solución tampón y sonicado para obtener sus productos celulares; de esta manera y con la adecuada concentración de proteínas fue separado en gel de poliacrilamida en sus diferentes fracciones antigénicas y luego transferidos a membranas de nitrocelulosa en donde por medio de reacción inmunoenzimática, se visualizó la banda característica, al poner en contacto la membrana con el antisuero hiperinmune obtenido en conejos (Modelo Experimental) y el suero de voluntarios antes y después de la inmunización (Modelo Humano). La banda visualizada correspondió a un peso aproximado de 38.000 kd. Trece de los voluntarios (32.5%), presentaron esta misma banda antes de la inmunización, la cual, aunque más tenue, representó un complejo antígeno-anticuerpo, lo cual, induce a pensar en un posible contacto con el microorganismo en el pasado. La posibilidad de la reacción cruzada se descartó realizando el mismo procedimiento con lisados de *Escherichia coli*.

ABREVIATURAS USADAS: SDS: duodecil sulfato de sodio. PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida. INMET: Inmunoelectrotransferencia. MNC: Membranas de nitrocelulosa.

*Jefe del Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Salud. Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.
**Estudiantes de bacteriología, Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá - Colombia.

INTRODUCCION

La Fiebre Tifoidea es una enfermedad de prevalencia relativamente alta, en lugares donde las condiciones sanitarias son deficientes (1, 2, 3). En Colombia se registra una mortalidad del 12-15% en pacientes no tratados; no se conocen datos específicos de incidencia e incidencia y prevalencia, debido a la falta de una prueba diagnóstica, suficientemente sensible y simple para hacer estudios epidemiológicos (4, 5).

Actualmente la reacción de aglutinación de Widal se sigue utilizando, pero dado que las circunstancias epidemiológicas y tecnológicas han cambiado, su verdadera utilidad merece una reconsideración (6, 7, 8). Recientes estudios han demostrado que la *Salmonella* al igual que otras bacterias gram-negativas, presentan proteínas antigénicas que son tan importantes en la respuesta inmune como el lipopolisacárido. Tsang midió la respuesta inmune, contra proteínas antigénicas de *Salmonella typhi* en pacientes con fiebre tifoidea, y desde entonces hasta ahora no se ha explorado la posibilidad de usar técnicas para tal fin (9).

Con la INMET, técnica moderna que combina la alta resolución de la electroforesis, con la sensibilidad y especificidad de los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida, se buscó la posibilidad de captar anticuerpos contra proteínas antigénicas de *Salmonella typhi*, usando dos modelos: Experimental y Humano e intentar probar si estos anticuerpos, pueden ser útiles como indicadores de la infección por este microorganismo (10, 11, 12).

MATERIALES Y METODOS

Salmonella typhi: provino de una cepa madre del departamento de Microbiología, Unidad de Enterobacterias del Instituto Nacional de Salud.

Preparación del antígeno: la cepa de *Salmonella typhi* fue cultivada en agar nutritivo, recolectada y suspendida en una solución tampón pH 7.35; la masa celular fue obtenida por centrifugación a 6000 x g. durante 15 minutos y lavada por tres veces con el mismo buffer, las células bacterianas sedimentadas fueron suspendidas en alícuotas de 30 ml hasta una concentración de 30 x 10⁸ U.F.C/ml equivalente al tubo No. 10 del nefelómetro de Macfarland y lisadas

por medio de ultrasonido a intervalos de cinco minutos, hasta completar media hora, tiempo que fue suficiente para lisar más del 95% de la suspensión bacteriana, lo cual se determinó haciendo coloración de Gram; durante todo el procedimiento se mantuvo refrigerado a 4°C. El lisado por ultrasonido fue centrifugado a 3000 x g por 30 min; el sobrenadante fue removido y delipidado con dietil-eter (v/v). La concentración final de proteínas fue medida usando el método descrito de Lowry (13, 14); el sobrenadante fue diluido con solución tampón pH 7.35, hasta obtener una concentración final de proteínas de 9.8 mg/ml. El antígeno fue dividido en alícuotas de 10 ml y liofilizado para su posterior uso.

Obtención de los antisueros de referencia: para el modelo experimental, se inocularon conejos por vía intradérmica (una inoculación por semana, durante cinco semanas); el extracto antigénico fue mezclado con adyuvante de Freund, uno de los conejos se inoculó con solución salina y sirvió de control negativo. Posteriormente se hizo la titulación de anticuerpos mediante el método de doble inmunodifusión (15, 16). Los conejos se sangraron cuando los títulos se consideraron aceptables y los sueros fueron almacenados en congelador.

Para el modelo humano se inmunizaron 40 voluntarios con la vacuna Ty21a (ampliamente probada, comercializada y licenciada en Colombia); previamente a la inmunización se les tomó una muestra de sangre (sueros controles negativos); 20-30 días después de la última dosis se tomó una segunda muestra de sangre para el posterior desarrollo de la INMET. (17, 18, 19).

Electroforesis en el gel de poliacrilamida: SDS-PAGE: la electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo en un gel 12.8% (14 x 16 x 0.1 cm), en un buffer de electroforesis (0.025 M tris, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS y agua, pH: 8.3 (20), el extracto antigénico fue suspendido en cinco mil de este buffer y luego solubilizado en un buffer tratamiento (0.0625 M Tris-HCl pH:6.8 que contenía: 2% p/v SDS, 10% p/v Glicerol, 1% v/v mercaptoetanol y 0.001% p/v de azul de bromofenol); se incubaron las muestras a 90 grados centígrados por 8-10 min. (21, 22, 23).

Después de un precorrido del gel (70 V - 50 mA - 30 min), se aplicaron 35 microlitros del antígeno a cada pozo y se usaron los siguientes marcadores de

bajo peso molecular; Fosforilasa B (94.000 KD), Albúmina (67.000, Ovalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000), Inhibidor de tripsina (20.100), alfa lactalbúmina (14.400 kd).

Cuando las muestras entraron al gel separador, las condiciones electroforéticas se cambiaron a: 350 V, 70 mA, hasta que el frente demarcado por azul de bromofenol llegó hasta un centímetro antes de finalizar el gel (aprox. 2 horas).

Coloración: transcurrido el tiempo de electroforesis, una parte del gel se coloreó en una solución de azul de coomassie al 0.1% en 25% de metanol, al 10% de ácido acético, 25% de metanol en agua destilada, hasta que se visualizaron las bandas bien definidas del antígeno. La otra parte del gel se usó en la INMET.

Inmunoelctrotransferencia (INMET): las proteínas separadas electroforéticamente, fueron transferidas a MNC, para lo cual se construyó un sandwich que secuencialmente se compuso de: una esponja schot brite, papel de filtro Whatman No. 1, el gel a transferir, MNC, un segundo papel de filtro y una segunda esponja; el sandwich así construido se cerró con bandas de caucho y se llevó a la cámara de transferencia.

Se estandarizó una técnica rápida, a temperatura ambiente, durante 3 horas a 300 mA y 30 Voltios, con un buffer transferencia que contenía: 25 mM tris, 192 mM glicina, 20% metanol y agua desmineralizada pH: 8.3.

Luego de esto la membrana de nitrocelulosa (MNC) se cortó en tiras de 0.5 cm de ancho y una de ellas se coloreó con una solución de amidoblack 10 B al 0.1% en 45% metanol 10% de ácido acético y agua destilada, durante 20-30 minutos; inmediatamente después se decoloró con una solución que contenía 90% metanol, 2% de ácido acético y agua destilada v/v, hasta que se observaron las bandas transferidas (24, 25).

Inmunorreacción: las membranas a las cuales fueron transferidas las proteínas antigénicas, se incubaron todo el día a 4°C. con el agente bloqueador PBS-tween 20 (4 mM K₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl 0.1% Tween 20 pH: 7.3), en continua agitación, luego se procedió a lavar tres veces, 15 min.

cada lavado con el mismo buffer pero sin tween; paralelamente se incubaron con la dilución 1/1000 los sueros. La dilución se hizo con PBS-tween (tween al 0.05%) y la incubación se realizó toda la noche a 4°C en continua agitación. se repitieron los lavados y luego se siguió con la incubación y el conjugado correspondiente (fosfatasa alcalina conjugada con anti IgG para el conejo; y fosfatasa alcalina conjugada con el anti IgG humano, para el modelo humano), esto se dejó una hora a temperatura ambiente. Nuevamente tres lavados y finalmente uno de 10 segundos con agua destilada.

La detección del complejo antígeno-anticuerpo se hizo disolviendo una cantidad apropiada de los reactivos de revelado (alfa naftil fosfato y fast-blue), en un buffer revelador Tris-HCl 0.05% y cloruro de magnesio 0.01 M pH: 8.6 (26).

RESULTADOS Y DISCUSION

La Fig. 1 muestra la titulación de anticuerpos de los antisueros de referencia luego de la última inoculación, esta titulación se hizo por el método de doble inmunodifusión. En la sangría previa a la inmunización de los conejos se comprobó la ausencia de anticuerpos contra el antígeno protéico de *Salmonella typhi*.

Una vez se estandarizó la electroforesis para el antígeno de *Salmonella typhi*, mediante la optimización de diferentes condiciones, se procedió a identificar el peso molecular de las principales bandas antigénicas, mediante la comparación con marcadores de peso molecular conocidos; hallándose que las bandas más nítidas para el antígeno de *Salmonella typhi*, correspondieron aproximadamente a los siguientes pesos moleculares: 61.000, 56.000, 46.000, 38.000 y 17.300 kd (como se muestra en la Fig. 2).

Para determinar cual fue la banda específica, los antisueros de referencia (conejos inoculados con proteínas antigénicas de *Salmonella typhi* y algunos de los sueros de voluntarios inmunizados, fueron diluidos inicialmente 1/10, 1/100 y 1/500, pero aún a esta dilución se observó mucha inespecificidad (muchas bandas e incluso manchas); por lo cual fue necesario seguir aumentando las diluciones progresivamente hasta 1/1000, dilución a la que se visualizó solamente una

RESPUESTA INMUNE DE LOS CONEJOS LUEGO DE LA ULTIMA INOCULACION

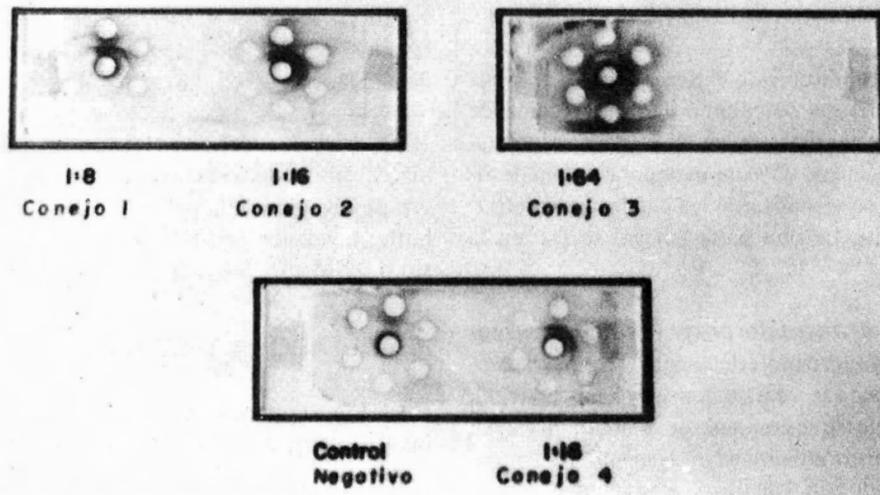


Figura 1. Respuesta inmune de los conejos luego de la última inoculación con el extracto antigénico de *Salmonella typhi*.

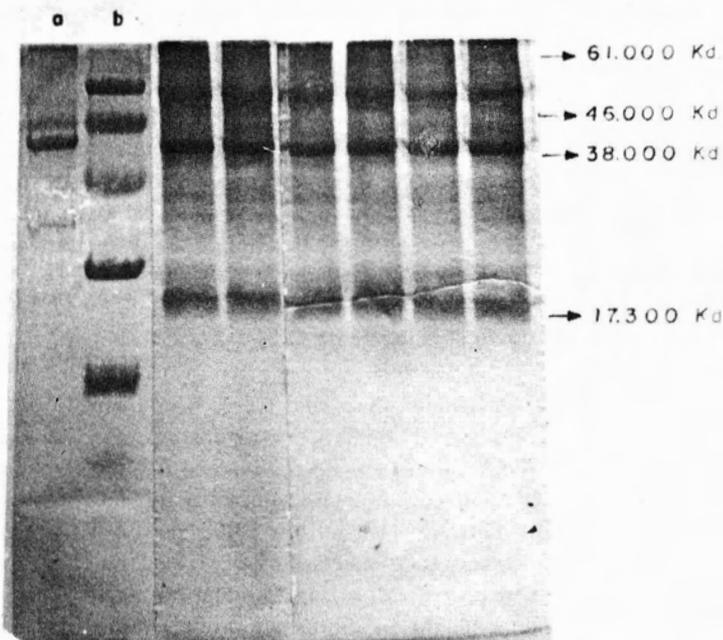


Figura 2. Peso molecular de las principales bandas en SDS-PAGE de *Salmonella typhi*. a-b: marcadores de alto y bajo peso molecular; la banda específica de aproximadamente 38.000 kd se localizó entre dos marcadores de peso molecular de 43.000 kd. A la derecha se observan las principales bandas de *Salmonella typhi*.

banda en los sueros de los pacientes inmunizados, la misma, que además de otras, se visualizó también en los sueros de los conejos.

Por consiguiente se asumió, que la banda común al modelo experimental y humano es una banda específica, por considerarse que las otras bandas visualizadas únicamente en el modelo experimental, pudieron aparecer en respuesta a la heterogeneidad proteica del antígeno inoculado.

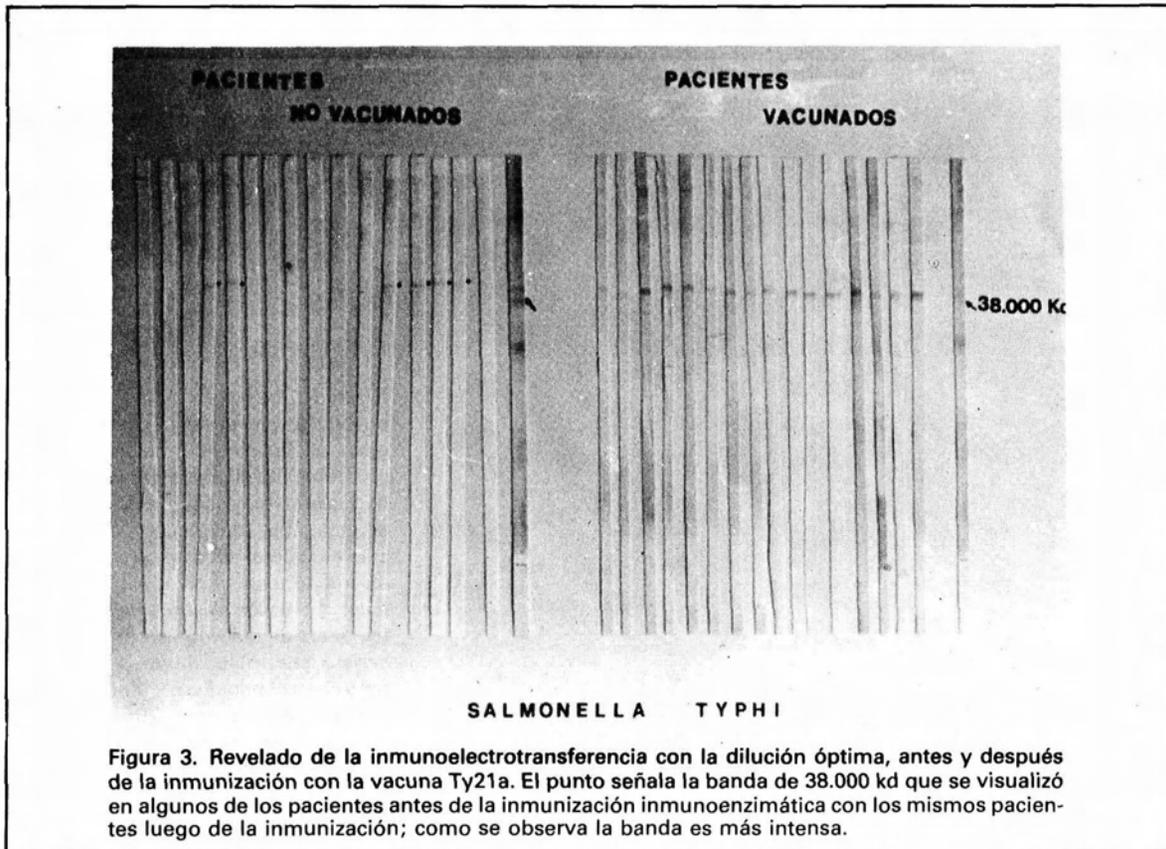
Esta banda correspondió a un peso molecular aproximado de 38.000 kd, en la SDS-PAGE.

Una vez establecida la dilución 1/1000 como la óptima se procedió a desarrollar la inmunoelectrotransferencia para la totalidad de los sueros de voluntarios antes y después de la inmunización, asumiendo que los sueros de los pacientes antes de ser inmunizados servirían como controles negativos para desarrollar el modelo humano y los de los conejos antes de la inoculación del antígeno para el modelo experimental.

Después de la reacción inmunoenzimática, se visualizó la banda específica que correspondió a un peso molecular de 38.000 kd, en el 100% de los pacientes inmunizados con la vacuna Ty21a. Esto nos permitió correlacionar la eficacia de la vacuna con el nivel de anticuerpos producidos después de la inmunización (respuesta de tipo humoral) la cual no había podido ser demostrada mediante otras pruebas serológicas.

Sin embargo, se encontró, que en 13 (32.5%) de los 40 voluntarios antes de la inmunización se visualizó una banda que, aunque muy tenue, representó un complejo antígeno-anticuerpo, siendo imposible dilucidar si estos anticuerpos fueron debidos a una infección antigua por *Salmonella typhi* que hubiera pasado como un episodio inadvertido de la enfermedad, si se presentaron porque el paciente hubiera sido vacunado anteriormente, o si correspondían a un caso de portador sano. Ver Fig. 3.

Fue necesario entonces, probar nuevos controles negativos, por lo cual se utilizó el suero de neonatos



de 1-5 días, que se suponía no habían tenido contacto con el microorganismo.

Luego de la reacción inmunoenzimática con estos sueros no se visualizó ningún tipo de banda. Ver fig. 4.

Para descartar la posibilidad de que estos anticuerpos se hubieran presentado en respuesta a una reacción cruzada contra otro tipo de enterobacterias, se realizó el mismo esquema de INMET con lisados de *Escherichia coli*, (antígeno preparado bajo las mismas condiciones que el de *Salmonella typhi*,) por ser la bacteria representativa por antonomasia de la flora entérica normal. Luego de la reacción inmunoenzimática no se observó la banda característica. Ver Fig. 5.

Por todo esto se confirma que la prueba detecta anticuerpos contra componentes proteínicos de *Salmonella typhi*, puesto que en los antisueros de referencia

y en los sueros de los 40 voluntarios inmunizados, siempre se visualizó la banda característica (38.000 kd). También se comprueba porque los controles negativos funcionaron correctamente.

A pesar de que los resultados obtenidos fueron satisfactorios, y porque no se presentó reacción cruzada con *Escherichia coli*, se sugiere ampliar el trabajo estudiando otras salmonellas, específicamente algunos serotipos de *Salmonella enteritidis*.

Un estudio concluyente para hallar la sensibilidad y especificidad de la técnica podría ser la autoradiografía, en la cual las proteínas inmovilizadas, pueden ser luego, visualizadas por radiografía -in situ- adicionando el anticuerpo específico y la subsecuente unión, de la proteína A del *Staphylococcus* marcada con radioisótopos, detectaría el complejo inmune (27, 28).

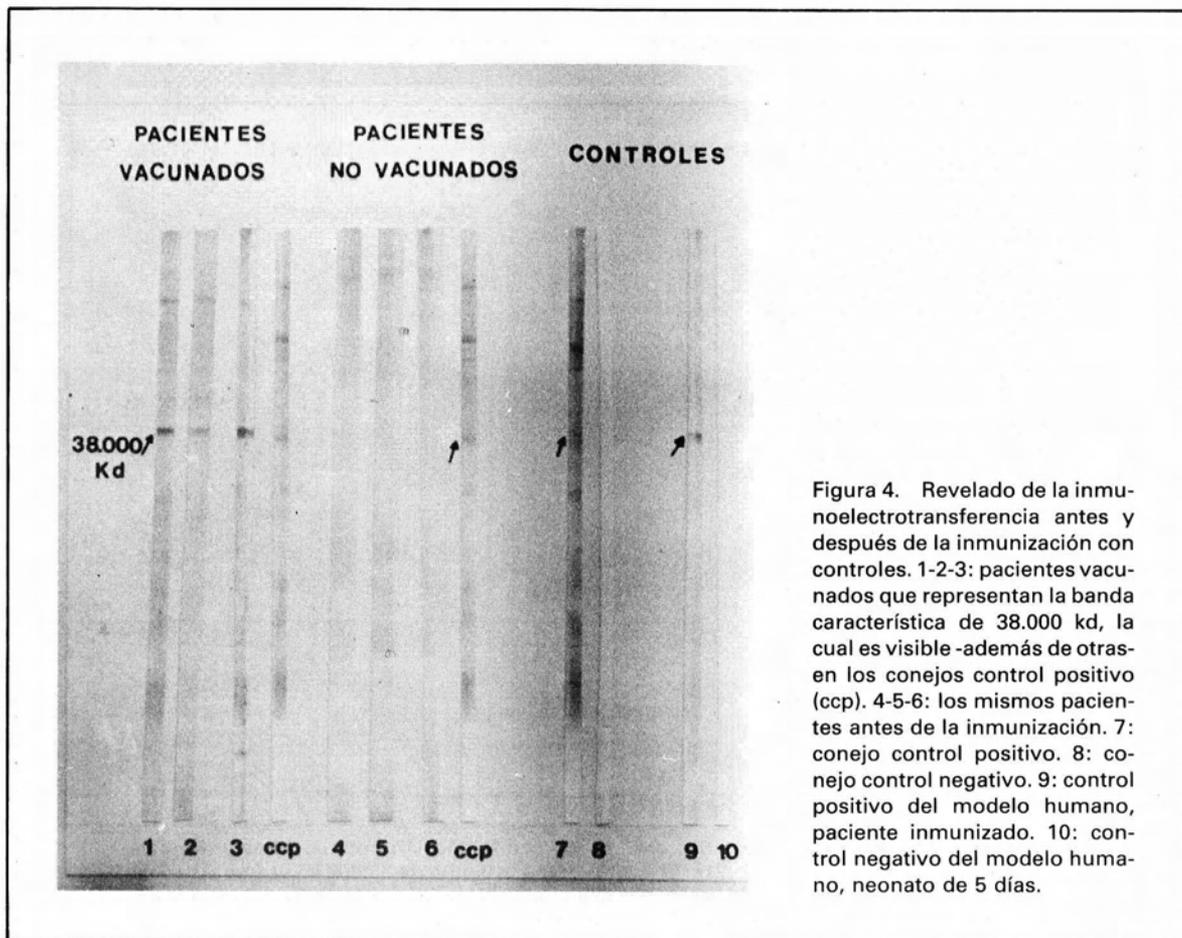


Figura 4. Revelado de la inmunoelectrotransferencia antes y después de la inmunización con controles. 1-2-3: pacientes vacunados que representan la banda característica de 38.000 kd, la cual es visible -además de otras- en los conejos control positivo (ccp). 4-5-6: los mismos pacientes antes de la inmunización. 7: conejo control positivo. 8: conejo control negativo. 9: control positivo del modelo humano, paciente inmunizado. 10: control negativo del modelo humano, neonato de 5 días.

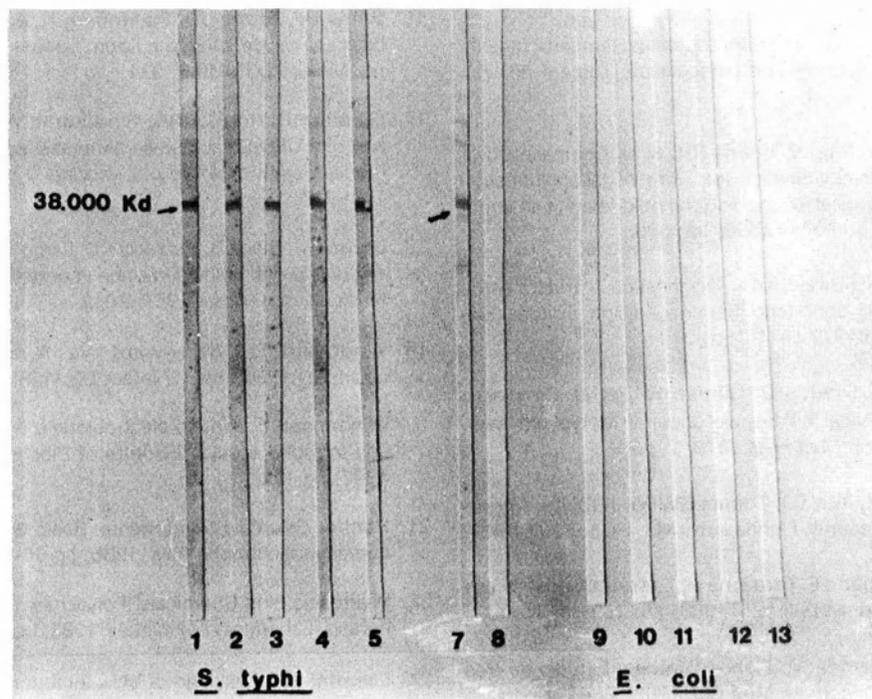


Figura 5. Revelado comparativo de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. 1-2-3-4-5: antígeno transferido: *Salmonella typhi*, en reacción con suero en pacientes inmunizados con la vacuna Ty21a, nótese la banda de 38.000 kd. 7: antígeno transferido: *Salmonella typhi*, en reacción con antisueros de conejo inmunizados con proteínas antigénicas de *Salmonella typhi*. La flecha indica la banda característica. 8: antígeno transferido: *Escherichia coli*, en reacción con antisuero de conejo inmunizado con proteínas antigénicas de *Salmonella typhi*. No se observa inmunorreacción. 9-10-11: antígeno transferido: *Escherichia coli*, en reacción con sueros de voluntarios antes de la inmunización. No se visualizó la banda característica. 12-13: antígeno transferido: *Escherichia coli*, en reacción con sueros de voluntarios después de la inmunización. Tampoco hubo reacción.

SUMMARY

Since its development, immunoblotting has been widely used as a tool in molecular biology studies as well as in the diagnosis of infectious diseases.

Traditionally the demonstration of antibodies against *Salmonella typhi* has focussed in those against polysaccharide components specially related to somatic antigen "O". Very few works, if any, have been done to investigate antibodies against other antigens such as protoplasmic proteins. The paper presented hereby intends to demonstrate the presence of such antibodies in experimentally immunized rabbits as well as in volunteers vaccinated with oral anti-typhoid fever vaccine (Ty21a strain).

A sonicate protein mixture from *Salmonella typhi* was separated into fractions by polyacrylamide-SDS electrophoresis; after transfer to nitrocellulose membranes, bands were immuno-stained with sera from rabbits immunized with the sonicate mixture, or with sera from volunteers before and after immunization with the vaccine strain Ty21a. The immuno-staining was performed with enzymatic reactions, using either anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase, or anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase.

A 38 kd band was consistently seen with sera from immunized rabbits and with sera from the vaccinated volunteers. No such a band was seen in the controls. No cross reactions were observed, suggesting that immunoblotting could be a useful technique for detection of antibodies against *Salmonella typhi*.

BIBLIOGRAFIA

1. Botero D, Díaz F, Jaramillo C y otros. Fundamentos de Medicina, enfermedades contagiosas. Tercera edición. CIB. 1987; 552.
2. Covadia YM, Sing V, Bhana RH, et al. Comparasion of passive haemagglutination test with Widal agglutination test for serological diagnosis of typhoid fever in an endemic area. *J Clin Pathol* 1986; 39: 680.
3. Tood-Sanford-Davidhson. Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. Séptima edición. Editorial Salvat. 1988; pp 1872-1874.
4. Levine MM, Grados O, Gilman RH, et al. Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever. *Am Soc J Trop Med Hyg.* 1978; 27: 795.
5. Hoffaman At, Ruiz CJ, Counts GW. Waterborne typhoid fever in dade county, Florida, *Am J Md.* 1975; 59:481-487.
6. Lifshitz A, Cejudo E, Tarazona M. Las reacciones febriles hoy. *Rev Med IMSS (Mex).* 1988; 26: 263.
7. Prada G, Guzmán M. Fiebre Tifoidea. Estudio de tres brotes epidémicos. *Ac Med Col.* 1982; 7: 81.
8. Reynolds DW, Carpenter LR, Simon WH. Diagnostic especificity of Widal's reaction for typhoid fever. *JAMA.* 1970; 214: 2192.
9. Tsang SW, Chau PY, Lam SH, et al. antibody response to the lipopolysaccharide and protein antigens of *Salmonella typhi* during typhoid infection. *Clin Exp Immunol.* 1981; 282: 1505.
10. Gershoni JM, Palade GE. Protein transfer from isoelectric focusig gels: the native blot. *Ann Biochem.* 1982; 123: 229.
12. Towbin H, Gordon J. Imunonoblotting and dot immunobinding courrent status and outlook. *J Immunol Meth.* 1984; 71: 313.
13. Lowry OH. Protein meassurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265.
14. Tsang R, Chau P. Serological diagnosis of typhoid fever by counter-immunoelectrophoresis. *Brit Med J.* 1981; 282: 1505.
15. Pelczar MJ Chan EC. Elementos de microbiología. México. Editorial Mc Graw Hill. 1985; 531.
16. Stites DP, Stobo JD, Fudenberg H, et al. Inmunología básica y clínica. Quinta edición. Editorial Manual Moderno. México D.F. 1985; 334.
17. Gilman RH, Hornick RB, Woodmard WE, et al. Evaluation of a UPD-Galactose-4-epimerase less mutant of *Salmonella typhi* as a live oral vaccine. *J Infect Dis.* 1977; 136: 717.
18. Levine M, Black R, Ferreccio C. Large scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric coated capsule formulation. *Lancet.* 1987; 1049.
19. Woorward Te, Woowward We. A new oral vaccine against typhoid fever. *J Infect Dis.* 1982, 145: 289.
20. Johansson E. Protein electroblotting (Western blotting) and immune assays. Institute of Biochemistry. Uppsala 1987; pg 122.
21. Hoeffer Scientific Instruments. Basic techiques and excerses in electrophoresis. 1985; pg 96-116.
22. Pharmacia Fine Chemicals. Polyacrylamide gel electrophoresis. Laboratory techniques. 1983; Uppsala. Sweden.
23. Laemmi Uk. Cleavage of structural porteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680.
24. Ashman LK, O'Connor CG. Application of the nitrocellulose transfer technique and alkaline phosphatase conjugate anti- inmunoglobulin for determination of the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *J Immunol Meth* 1982; 54:180.
25. Knecht DA, Dimond RL. Visualization of antigenic proteins Westernnblots. *Ann Biochem.* 1984; 136: 180.
26. Batteiger B, Newhall Wj, and Jones RB. The use of tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Meth.* 1982; 55: 297.
27. Burnette NW. "Westernblotting": Electrophoretic transfer of proteins from SDS polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Ann Biochem.* 1981; 112: 195.
28. Sutton R, Wrigler CW, Baldo BA. Detection of IgE and IgG binding proteins after electrophoresis transfer from polyacrylamide gels. *J Immunol. Meth.* 1982; 52: 183.