

PAPEL PROTECTOR DE LOS ANTICUERPOS EN LA SALMONELLOSIS EXPERIMENTAL

Por

Miguel Guzmán U., M.D., M.Sc. *
Germán Ramírez G., M. D. **

INTRODUCCION

El presente trabajo fue realizado con el propósito de demostrar la capacidad protectora de anticuerpos contra la *Salmonella typhi*, en la infección experimental en pollos recién nacidos, previamente protegidos con tales anticuerpos. (1, 10, 11, 7).

MATERIALES Y METODOS

La cepa de *Salmonella typhi* usada, tanto para preparar los antígenos O y H como para reproducir experimentalmente la Salmonellosis, fue una cepa Standard de la colección de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina.

Los medios de cultivo usados, tanto para preparar los antígenos como para aislar los microorganismos de los animales inoculados fueron medios usuales, recomendados para el estudio de Enterobacteriaceas (3): Endo McConkey y Agar-sangre.

Los animales utilizados en la preparación de los sueros anti-H y anti-O fueron pollos de tres meses de edad, de raza "New-Hampshire", comercialmente obtenidos. Los animales de experimentación utilizados para la reproducción de la Salmonellosis, fueron pollitos de 3 a 4 días de nacidos, de raza "Hy-line", comercialmente obtenidos.

La cepa de *Salmonella typhi* fue sembrada en medio de McConkey para su estudio, y de este medio resembrada en los habituales para su caracterización bioquímica; posteriormente fue estudiada serológicamente. Más tarde la cepa fue sembrada en medio de Ruiz Castañeda (9), con el objeto de obtener buenas cantidades del germen para la preparación del antígeno O, el cual fue preparado según los procedimientos recomendados por Edwards y Ewing (3). Para la preparación del antígeno H, el microorganismo fue cultivado en caldo nutritivo y tratado según la técnica descrita por Edwards y Ewing (3).

Una vez obtenidos los antígenos, fueron inoculados por vía endovenosa en los pollos (a través de la vena del ala), usándose dos para cada antígeno y siguiendo el esquema de inoculación

* Profesor Asistente y Jefe de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional.

** Instructor Asistente de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional.

recomendado también por Edwards y Ewing (3). Terminado el período de inoculación, el cual se prolongó por cuatro semanas, se tomó una muestra de sangre de cada uno de los animales inoculados, con el objeto de obtener suero y hacer titulación de los anticuerpos con los antígenos correspondientes; esta titulación fue realizada mediante reacciones de aglutinación en tubo. Cuando tales títulos se consideraron suficientes, los pollos fueron sangrados totalmente y la sangre colectada en tubos estériles independientemente, con el objeto de obtener suero, el cual fue guardado previa adición de un preservativo y mantenido en congelador para su uso posterior.

Los pollitos de tres y cuatro días de nacidos fueron divididos en grupos de 10, colocados en jaulas independientes y correctamente identificados. El suero anti-O fue dividido en tres fracciones: una de suero puro, una diluida al 1:10 y una diluida al 1:100. Cada uno de los 10 pollitos de un grupo fueron inoculados intramuscularmente con 0.2 cc. del suero puro; un segundo grupo de 10 pollitos fue inoculado con 0.2 del suero diluido al 1:10, y un tercer grupo fue inoculado con 0.2 cc. de la dilución 1:100; iguales diluciones y grupos fueron usados con el suero anti-H. Un grupo de 10 pollitos fue inoculado cada uno de ellos con 0.2 cc. de suero normal de pollo, el cual serviría de control.

Veinticuatro horas después de esta inoculación se preparó una suspensión

de *Salmonella typhi* de 18 horas de crecimiento y se hicieron diluciones progresivas (10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6) para determinar el número de gérmenes viables por los procedimientos usuales de recuento de colonias, en medio de Endo. La dilución de 10-6 fue seleccionada para inocular los pollitos; una gota de tal dilución fue inoculada con jeringa de tuberculina y aguja N° 26, directamente en la masa encefálica, a cada uno de los pollitos arriba mencionados. Dos grupos de 10 pollitos cada uno fueron utilizados como controles; uno al que se inoculó intracerebralmente la suspensión del germen, sin haber sido previamente protegidos con suero, y el otro grupo inoculado intracerebralmente únicamente con solución salina estéril, con el objeto de determinar si este tipo de traumatismo repercutía en la vida del animal. Los pollitos fueron observados cuidadosamente, por un período de 10 días, tiempo durante el cual fueron alimentados con agua y purina. Con el objeto de tener resultados comparables y consistentes, este tipo de experimento fue repetido varias veces.

Los pollitos que murieron fueron autopsiados inmediatamente, y material obtenido de cerebro, hígado, bazo, sangre intracardiaca y contenido intestinal fue sembrado en Endo, con el objeto de determinar si una diseminación del germen había ocurrido y podía considerarse responsable de la muerte del animal.

RESULTADOS

La respuesta inmunológica de los pollos inoculados con los antígenos O y H, fue bastante buena, obteniéndose títulos de: anti-O 1:360, y anti-H 1:160.

De cada uno de los pollos se obtuvo aproximadamente 40 cc. de suero.

Según el recuento de gérmenes, cada pollito recibió intracerebralmente una cantidad aproximada de 200 microorganismos viables.

Como puede verse en la Tabla N° 1, los pollitos que fueron previamente inmunizados con el suero anti-O fue-

ron protegidos contra la diseminación del microorganismo, siendo esta protección mucho más evidente cuando el suero fue inoculado puro que cuando fue diluido al 1:10 o al 1:100. La protección es muy evidente comparada con los controles en los cuales, como puede verse en el cuadro N° 2, todos los pollitos inoculados con el germen, sin previa protección, murieron la mayoría durante las primeras cuarenta y ocho horas, al igual que los pollitos que fueron inoculados con suero normal de pollo. Es evidente que el traumatismo recibido por los pollitos, como consecuencia de la inoculación intracerebral, no produce ningún tipo de alteración que comprometa la vida del animal, ya que estos controles per-

manecieron bien durante el período de observación, como puede apreciarse en la Tabla N° 2.

Similar grado de protección al anterior pudo observarse con el suero anti-H (ver Tabla N° 3).

Cuando la cantidad de microorganismos inoculados excedió de 200, la protección solamente se obtuvo con suero puro anti-O, ya que los pollitos protegidos con suero anti-H murieron prácticamente el 100% en las primeras 24 horas (ver Tablas Nos. 5 y 6).

Las autopsias realizadas en todos los animales que murieron demostraron una franca diseminación del microorganismo, puesto que éste pudo ser aislado de los diferentes órganos estudiados.

DISCUSION

La capacidad protectora de los anticuerpos, producidos como respuesta al estímulo antigénico de las fracciones antigénicas de la *Salmonella typhi* ha sido muy controvertida (6, 8, 12) y los trabajos realizados hasta este momento dan resultados que no pueden compararse entre sí, dado que utilizan animales de experimentación disímiles tales como ratón, por vía intraperitoneal (4) y ratón por vía intracerebral (4, 5), pollo por vía intraperitoneal y por-oral (7), en los cuales no siempre se puede reproducir la Salmonellosis experimental y obtenerse la diseminación de los microorganismos.

Con la introducción del método de inoculación por vía intracerebral en pollitos recién nacidos, usada por Shaffer y colaboradores (1, 10, 11), se contó con un excelente sistema biológico, ya que con cantidades mínimas del germen, inoculadas intracerebralmente, se obtiene la multiplicación y diseminación del microorganismo, evitándose de esta manera que los fac-

tores tóxicos sean los causantes del deceso, dado el escaso número de gérmenes inoculados; por otra parte, en el pollo recién nacido parece que no hay variabilidad de susceptibilidad en las diferentes razas. Usando este medio biológico, hemos encontrado que los sueros inmunes anti-O y anti-H evidentemente ejercen una acción protectora, ya que los pollitos se recuperan y no mueren; el grado de protección conferido varía así: con el suero hiperinmune anti-H se obtiene más baja protección, lo que está de acuerdo con diferentes estudios (9, 12). El suero hiperinmune anti-O se muestra con una capacidad protectora muy grande, ya que protegió a un alto porcentaje de los animales, aun con dosis elevadísimas de microorganismos (8).

Por otra parte, el traumatismo que sufren los pollos por estas inoculaciones es mínimo, descartándose cualquier factor de error por este motivo, como puede verse en las Tablas Nos. 2 y 6.

CONCLUSIONES

1) La vía intracerebral en el pollo recién nacido es un método excelente por su sensibilidad y facilidad en la reproducción experimental de la Salmonellosis.

2) Los sueros hiperinmunes contra las fracciones H y O de la *Salmonella typhi* confieren inmunidad pasiva, evi-

tando la diseminación y muerte de los pollitos.

3) La capacidad protectora conferida por el suero anti-O es mayor que la conferida por el suero anti-H, lo cual se hace más aparente cuando se efectúa una inoculación con gran cantidad de gérmenes.

SUMARIO

Se reproduce experimentalmente la Salmonellosis con *Salmonella typhi* inoculada intracerebralmente en pollitos recién nacidos, previamente protegidos con sueros hiperinmunes anti-O

y anti-H, con el fin de conocer el papel protector de dichos sueros.

Se demostró que dicho papel protector es bueno tanto por los sueros anti-O como los anti-H, pero siendo mejor el primero.

TABLA N° 1

POLLITOS PROTEGIDOS CON SUERO HIPERINMUNE ANTI-O E INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE CON 200 MICROORGANISMOS VIABLES

Días de observación	Suero sin diluir	Suero diluido al 1:10	Suero diluido al 1:100
1	0	5	9
2	0	1	0
3	0	1	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	1	0	0
8	0	0	0
9	1	0	0
10	0	0	0
Total decesos	2	7	9

TABLA N° 2
CONTROLES. - CON 200 MICROORGANISMOS VIABLES INOCULADOS
INTRACEREBRALMENTE

Días de observación	Control con suero normal de pollo	Control con microorganismos intracraneales solamente	Control con S. S. intracerebral solamente
1	6	8	0
2	2	0	0
3	0	1	0
4	1	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	1	0
10	0	0	0
Total decesos	9	10	0

TABLA N° 3

POLLITOS PROTEGIDOS CON SUERO HIPERINMUNE ANTI-H E INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE CON 200 MICROORGANISMOS VIABLES

Días de observación	Suero sin diluir	Suero diluido al 1:10	Suero diluido al 1:100
1	1	0	3
2	0	0	6
3	1	0	1
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	1	0
7	0	1	0
8	0	1	0
9	0	1	0
10	0	0	0
Total decesos	2	4	10

TABLA N° 4

POLLITOS PROTEGIDOS CON SUERO HIPERINMUNE ANTI-O E INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE CON MAS DE 100.000 MICROORGANISMOS VIABLES

Días de observación	Suero puro	Suero diluido al 1:10	Suero diluido al 1:100
1	5	7	8
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	1
Total decesos	5	7	9

TABLA N° 5

POLLITOS PROTEGIDOS CON SUERO HIPERINMUNE ANTI-H E INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE CON MAS DE 100.000 MICROORGANISMOS VIABLES

Días de observación	Suero puro	Suero diluido al 1:10	Suero diluido al 1:100
1	9	7	9
2	0	0	0
3	0	1	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	1	0
8	0	0	0
9	0	0	1
10	0	1	0
Total decesos	9	10	10

TABLA N° 6

CONTROLES CON MAS DE 100.000 MICROORGANISMOS VIABLES INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE

Días de observación	Control con suero normal de pollo	Control con microorganismos intracerebrales solamente	Control con S. S. intracerebral solamente
1	7	9	0
2	2	1	0
3	1	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
Total decesos	10	10	0

BIBLIOGRAFIA

1. Bridges, J. F., Clemmer, D. I., and Shaffer, M. F.—Treatment of Experimental Salmonellosis in Chicks with Synnematin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116: 1001, 1964.
2. Cujetanovic, B. B.—Field Trial of Typhoid Vaccines. *Amer. J. Publ. Health*, 47: 578, 1957.
3. Edwards, P. R., and Ewing, W. H.—Identification on Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company, 2nd. Edition 1962.
4. Gaines, S., and Tully, J. G.—Comparison of intracerebral and intraperitoneal Infective Techniques for Assaying Mouse Virulence of *Salmonella Typhosa* Strains. *Amer. J. Hyg.* 74: 60, 1961.
5. Landy, M., Sidney, Gaines and Sprinz, H. Studies on intracerebral Typhoid Infection in Mice. *Brit. J. Exp. Path.* 38: 25, 1957.
6. Landy, M., Gaines, S., and Sprinz H. Studies on Intracerebral Typhoid Infec-

- tion in Mice. *Brith. J. Exp. Path.* 38: 25, 1957.
7. Milner, K. C., and Shaffer, M. F.—Bacteriologic Studies of Experimental Salmonella Infections in Chicks. *J. Infec. Dis* 20: 81, 1952.
 8. Osawa, E., and Muschell, L. H.—The Bactericidal Actions of O and Vi antibodies Against *Salmonella Typhosa*. *J. Imm.* 92: 281, 1964.
 9. Ruiz-Castañeda, M.—Practical Method for rutine blood cultures in brucellosis. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 64: 114, 1947.
 10. Shaffer, M. F.—Sero-protection Against Intracerebral *Salmonella typhosa* Infection in Chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118: 71, 1965.
 11. Shaffer, M. F., Bridges, J. F., Clemmer, D. I. and Pontoppidan, K. C.—Susceptibility of Chicks to Experimental Infection with *Salmonella typhosa*. *Amer. J. Hyg.*, 80: 1964.
 12. Tully, J. G. and Gaines, H.—Antigen of *Salmonella typhosa*. *J. Bact.* 81: 926, 1961.