

Tesis de Posgrado

La propagación de bacterias del género *Brucella* en cultivos de células animales

Brunengo, Ana María Francisca

1964

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Brunengo, Ana María Francisca. (1964). La propagación de bacterias del género *Brucella* en cultivos de células animales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1246_Brunengo.pdf

Cita tipo Chicago:

Brunengo, Ana María Francisca. "La propagación de bacterias del género *Brucella* en cultivos de células animales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1964. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1246_Brunengo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TITULO

" LA PROPAGACION DE BACTERIAS DEL GENERO BRUCELLA EN CULTIVOS
DE CELULAS ANIMALES "

AUTOR : Ana María Francisca Brunengo

RESUMEN de la tesis presentada para optar al título
de : Doctora en QUIMICA, orientación Química Biológica

AÑO 1964

El presente trabajose ha realizado conla intención de cultivar Brucella abortus cepa B19 en medio líquido y en forma continua o semi-continua con miras a la obtención de vacuna contra la brucelosis bovina.

La primera parte, incluye una breve reseña ,de muy diversos autores sobre las bacterias en cultivos de tejidos y sus diversas aplicaciones .

En la segunda parte, se detallan: el material, medios de cultivos y técnicas empleadas, tanto para la obtención de los cultivos celulares y sus mantenimiento, como para el crecimiento de las bacterias en ellos y sus determinaciones cunitativas.

La tercer parte, es experimental y reproduce las técnicas empleadas para tratar de conseguir el objetivo previsto en el presente trabajo.

Se ha demostrado el carácter intracelular de la Brucella abortus realizando experiencias en monocapas de células de riñón de cerdo; previa eliminación de la infección extracelular. En efecto, se probó que las b bacterias habían penetrado en la célula cuando la infección era masiva y que continuaban liberándose si se hacían incubaciones sucesivas con cambio de medio de cultivo.

Se sembraron tubos de Leighton que se fotografiaron antes y después de la infección con Br.abortus : con esto se demostró que dicha bacteria afecta intensamente a las células de riñón de cerdo, destruyéndolas y desprendiéndolas del vidrio.

Se colocaron monocapas celulares bajo distintas condiciones y se estudió su influencia sobre el crecimiento de la Br.abortus , quedando demostrado que ella no existe cuando se las emplea como extracto calentado o como desintegrado ultrasónico.

Se realizaron pasajes sucesivos en tubos de monocapas de riñón de cerdo concluyéndose que existe una cierta adaptación de la Br.abortus a las células sobre las cuales se desarrolla, ya que se ha obtenido en

En todos los casos un aumento progresivo del número de bacterias viables presentes.

En estos mismos pasajes se estudiaron los tiempos óptimos de cultivo realizándose cuentas de colonias, demostrándose que el tiempo óptimo de cultivo era de 4 días a 37°C para Br.abortus cultivadas en monocapas de riñón de cerdo.

Se estudiaron los distintos pasajes desde el punto de vista antigénico, quedando demostrado que las bacterias obtenidas en cultivos sucesivos en número no menor de 11 poseen estabilidad de antígeno; lo cual representa una ventaja para un cultivo en masa.

Se inocularon pasajes alternados en cobayo realizando luego pruebas de aglutinación, quedando demostrado que poseen muy buenas propiedades antigénicas para los mismos, comparados con experiencias semejantes realizadas con cultivo de Br.abortus provenientes de medios sólidos.

Para tratar de conseguir cultivos continuos o semi-continuos trabajamos en monocapas de células de riñón de cerdo en frasco de Roux. Ello es posible pero resta por resolver la poca estabilidad de la capa celular por destrucción de las mismas debido a la acción bacteriana enérgica. Es factor adverso el hecho que se obtenga poca concentración de bacterias, pero hacemos incapié en que se podría subsanar ello trabajando en condiciones mejores, tales como agitación mecánica o burbujeo de oxígeno, dando así mejor rendimiento.

Trabajamos posteriormente con cultivos en suspensión, los resultados no del todo satisfactorios no son obvia para desechar las experiencias realizadas, de por sí pocas, pues se podría aquí también mejorar las condiciones de trabajo con agitación con oxígeno y estudio de la relación suspensión de células a volumen total.

Suspensiones bacterianas obtenidas por desarrollo en cultivos celulares en botella de Roux y posteriormente concentradas hasta obtener las cantidades de bacterias que requieren las normas internacionales fueron ino-

culadas a terneras, pudiéndose computar como buenos antígenos para ellas.

Queda pendiente realizar un ensayo de liofilización confirmando o negando el hecho comprobado de que los cultivos provenientes de medios líquidos por razones aún no establecidas son menos estables a la desecación.

Adm

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TITULO

" LA PROPAGACION DE BACTERIAS DEL GENERO BRUCELLA EN CULTIVOS
DE CELULAS ANIMALES "

AUTOR : Ana María Francisca Brunengo

TESIS presentada para optar al título de :
Doctora en QUÍMICA, orientación Química Biológica.

AÑO 1964.

El difundido empleo de cultivos celulares animales para el desarrollo de virus y el reciente empleo de dichos explantes celulares para la determinación de toxinas bacterianas y el cultivo de la E. portuensis sugirió el empleo de dicho material celular para estudiar algunas propiedades de las bacterias del género Brucella.

Es bien conocido el problema del cultivo de las bacterias de dicho género en medios líquidos debido a la facilidad de implantación mutante rugosa lo que hace poco recomendable el empleo de dichos medios para el cultivo de Brucella abortus cuando se le desea emplear en la preparación de vacunas .

Se planeó primeramente investigar si, la Brucella abortus , desarrollaba en presencia de cultivos celulares.

Luego determinar la influencia de las células en el cultivo de Br. abortus desde el punto de vista del género de bacterias obtenidas y de el grado de disociación producido.

Finalmente y solo en forma de tentativa se planeó obtener un cultivo en masa de Br. abortus cepa 419 bajo condiciones de cultivo distintas .

La búsqueda bibliográfica que figura a continuación, tratará de centralizar el problema del cultivo de bacterias en explantes celulares.

Tratando de seguir un ordenamiento por tema, vemos que estos estudios se centran principalmente en pocas bacterias, pudiéndose mencionar los masos de la toxina diftérica, Micobacterium lepraecarium , los diversos Clostridium , el bacilo de Koch, los PPL6, en los cuales los trabajos realizados tienen cierta continuidad. El resto de ellos se presentan aisladamente sobre Shigellas sp., Escherichia coli, Salmonella sp., E. portuensis, etc..

Comenzando con las toxinas diftéricas y stafilocócicas podría decirse que su estudio comenzó en el año 1957 en forma más o menos paralela, con Penzo y col.(1) y(2), Sousa y col.(3) y Masacre y col.(4).

Encarándose el estudio de la acción de las toxinas sobre los

distintos cultivos celulares humanos, el ataque que sufren estos y la posible reversibilidad del proceso por acción neutralizante de las antitoxinas si la degeneración celular no era muy alta. Lo es decir si se tomaba en la etapa de la adsorción previa a la destrucción total. Aplicándolo a los fenómenos inmunitarios pudiéndose titular con cultivo de tejido.

Guorin y col.(5) hicieron también un estudio desde el punto de vista inmunológico sobre tejido celular pero con toxina stafilocócica purificada.

Dishon (6) estudió los cambios citopatológicos en tejido por titulación colorimétrica debido a los cambios de pH que sufre el medio por acción de la toxina o antitoxina.

En el año 1960, André y col.(7) proveyeron con el cultivo de tejido una técnica de diagnóstico sensible y específica para difteria, utilizando células HeLa y IB.

En el año 1961, Gablitz y col.(8) estudiaron el efecto de las mismas toxinas sobre tejidos celulares derivados de especies susceptibles y resistentes.

Ormy y col.(9) titularon también la toxina diftérica, la antitoxina y el toxoide con cultivos celulares.

Conventre (10) estudió la acción de la toxina sobre el metabolismo celular en referencia a hidratos de carbono y fósforo. Al disminuirse la cantidad de compuestos de alta energía se impedía la formación de ATP, peligrando entonces la integridad de las células.

Lehan y col.(11) estudiaron la sensibilidad de los diferentes tejidos, llegando a la conclusión que es más sensible a la toxina el tejido de embrión humano.

En el año 1963, Kornandy y col.(12) aplicaron la técnica de el Disc plate para la determinación de toxina y antitoxina.

Zibistker (13) realizó titulaciones sobre fibroblastos de embrión humano y HeLa de antitoxina en suero y en epidemiología.

Desrosiers (14) estudió también la acción de las endotoxinas glucido-lipídicas, sobre los cultivos de tejidos normal y embrionario de algunas bacterias Gram negativas. Dichos tejidos presentan susceptibilidad variable de acuerdo a las cantidades de endotoxina, a la naturaleza del tejido y edad del mismo. De allí que el embrionario sea el más susceptible.

Las lesiones de endotoxina son menores que la de exotoxina, pues solo hipertrofia el citoplasma y las vacuolas,

Los trabajos sobre Mycobacterium lepraesimilis en cultivo de tejidos se presentan en forma cronológica a partir del año 1957 que, DeSouza y col.(15) lo cultivaron en células de tumor histiocítico demostrándose que por 7 pasajes consecutivos a través de tejido no se producían formas degeneradas .

Wallace y col.(16) en 1958, estudiaron el límite de la multiplicación de esas bacterias en cultivos de hígado de ratón, células L y fibrocitos . Concluyendo que aumentaban en 2 y 3 veces el número viable en la primer semana.

Después de este período no se pudo obtener un aumento mayor ni con medio de Earle+0.5 Bactopeptona +2% suero equino.

En el año 1962 Rees y col.(17),(18)y(19) estudiaron la multiplicación y las características de crecimiento de dicha bacteria en fibroblastos de rata. Lográndolas mantener indefinidamente por pasajes sucesivos a través de cultivos en frascos, donde una gran cantidad de bacterias permanecen viables. Por lo contrario en medio bacteriológico y en medio de cultivo libre de células las bacterias mueren. Estudiaron además la producción y las propiedades del antígeno soluble en los mismos tejidos celulares.

Se determinó así que el antígeno era un polisacárido y que a pesar de encontrarse en el medio, no estaba en el fibroblasto, lo cual significaba que el bacilo se multiplicaba y el antígeno difundía rápidamente fuera de las células. Era muy potente y solo se reproducía cuando la

infección de bacilos era masiva.

Respecte a las bacterias del género Clostridium los trabajos comenzaron con el estudio de la acción de sus toxinas sobre cultivos celulares en el año 1957 por Veto y col.(20) quienes trabajaron con Cl. Welchii, Cl. septicum y Cl. oedematiens.

En el año 1959, Pense y col.(21),(22) y (23) en sus estudios sobre los fenómenos inmunológicos, experimentaron la acción citopatógena sobre cultivos celulares del Clostridium histolyticum, Cl. septicum y Cl. oedematiens, viéndose que actuaban sobre hígado humano, riñón humano y de mono y carcinoma bucal. En todos los casos se producía hipertrofia de los núcleos a la hora de inoculación; y desintegración y muerte después de 6 horas.

En el año 1961 Saltykov y col.(24) demostraron que las toxinas de Cl. perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum y Cl. septicum producían una marcada acción citotóxica sobre cultivos de células HeLa y cultivos primarios de embrión de pollo.

Estudios sobre el Bacilo tuberculoso fueron iniciados por Fjeldo (25) y (26) en el año 1958; realizándose sobre tejido de células cancerosas. Se llegó así a la conclusión que esta bacteria no crece sin la presencia de dichas células. El crecimiento de los bacilos es directamente proporcional al área y al número de células de los cultivos de cáncer humano. Demostraron el hecho extraño de que el bacilo era capaz de crecer extracelularmente en presencia de estreptomizina en las mismas células a pesar de su sensibilidad al antibiótico.

Posteriormente deben considerarse los trabajos de Seto y col. (27) en el año 1960, de Sharma (28) en 1962 y Bakareva y col.(29) en 1963, donde se estudiaron el crecimiento y la inmunidad de B. tuberculoso en cultivo de tejidos de células HeLa, Hep.2, fibroblastos de pulmón y amio humano. El crecimiento de esta bacteria es intracelular en las células de pulmón donde se produce la invasión a los núcleos, en los otros tejidos su acción se reduce al citoplasma.

En el año 1960, Hayflich y col.(30) estudiaron el crecimiento intra y extracelular del PPL0 en varios tejidos celulares primarios, los cuales presentaron gran estabilidad pudiendo mantenerlos durante 2 años a -20°C . El efecto de estos microorganismos sobre las células es distinto ya se trate de cultivos celulares distintos a las células HeLa o fétas células. En estas últimas no presentan ningún efecto degenerativo.

En el año 1961, Basile y col.(31) estudiaron al PPL0 en cultivos de tejidos aplicando las técnicas de inmunofluorescencia.

Caraki y Shepard (32) trataron de cultivar dichos microorganismos en tejido celular y en medio basal solo. Solo el primero permitía el desarrollo. En efecto a las 48 hs, se eleva su concentración al 10^3 y se asocia a las células y su antígeno se localiza en la membrana celular.

Los estudios del crecimiento de bacterias del género Shigella en monocapa celulares fueron realizados en el año 1961 por Gerber y col.(33) quienes trabajaron con Sh.flexneri y Sh.sonnei, las cuales crecieron intracelularmente en monocapas de células epiteliales. Las dos cepas actuaron en forma diferentes y esto estaba asociado a su diferente grado de resistencia intracelular a la estreptomizina. Su crecimiento se lleva a cabo solo en el citoplasma, el cual se presenta lleno de microorganismos antes de la destrucción de la célula.

En el año 1963, Sbarapova y col.(34) estudiaron el comportamiento de cepas enteropatógenas y no enteropatógenas de Escherichia coli sobre cultivos celulares de riñón y fibroblastos pulmonares humanos así como en el medio de cultivo solo.

Ohno Shizuko (35) en el año 1958 estudió la infección en cultivos irradiados con rayos X por una cepa atenuada de Salmonella enteritidis. Se vio la multiplicación intracelular de los microorganismos y se estudió la susceptibilidad de las células irradiadas y las no irradiadas a la infección.

Zaglukhinskaya (36) en 1963 estudió la interacción del Hemo-

phila portuensis y el tejido en monocapas. Su acción se manifiesta por rotura de las uniones intercelulares y su despegue del vidrio. En el medio de cultivo fué dable observar una fuerte aglutinación de las bacterias.

Grawford y col.(37) estudiaron la multiplicación de Bordetella portuensis en cultivos de tejidos de riñón de mono y células HeLa, KB y 3T3.

Dicha bacteria no se multiplica en medio 199 solo, pero sí lo hace cuando están presentes células de riñón de mono (vivas o muertas) o cuando se encuentran separadas de ellas por una membrana semi-permeable y aún en presencia de antibióticos.

Carrere y col.(38) en 1958 y McPherson y col.(39) en 1960, estudiaron las formas L de diversas bacterias en cultivo de tejidos,

Magie (40) estudió en 1962 la inhibición de la Pasteurella tularensis en cultivo de tejido de células murinas; y Wolf (41) la acción de los productos extracelulares del Streptococcus pyogenes sobre cultivo de tejido.

Entrando por último a considerar el género bacteriano motivo de nuestro estudio, digamos que Holland y Pickett en 1956 (42) y Helman y Rice en 1960 (43) se abocaron al tema.

Los primeros estudiando el comportamiento intracelular de las brucellas en cultivo de embrión de pollo y los segundos la acción de las fracciones nucleoproteicas sobre cultivo de tejidos.-

At. N. 11111

I) Preparación del material de laboratorio utilizado

a) Botellas de vidrio

Se lava con detergente. Se enjuaga con agua destilada y bidestilada. Se prepara con placa a utilizar, haciendo pasar luego abundantemente agua bidestilada con objeto de eliminar la alcalinidad. Esterilizar en autoclave a 1 at. durante 20 minutos.

b) Material de vidrio para cultivo de tejidos

I) Material nuevo de vidrio se limpia por inmersión en mezcla sulfocrómica durante 3 horas. Esta etapa es seguida de 6 enjuagues en agua demineralizada.

II) Todo el material de vidrio se hierve en mezcla de detergente y agua durante 20 minutos, mientras está aún caliente se cepilla a mano. El cepillado es seguido de 6 enjuagues de agua destilada y 6 enjuagues de agua demineralizada. Se deja drenar y se seca en aire caliente en horno a 90 °C. Se prepara para esterilizar envolviéndolo en papel manteca o de aluminio según el caso.

III) Todo el material de vidrio se esteriliza en horno a 180 °C por 3 horas o autoclave a 1 at. durante 20 minutos.

c) Tapones de Goma Atómicos para Cultivo de Tejidos

I) Los tapones se hierven en bicarbonato de sodio al 5 % durante una hora, luego se enjuaga 2 veces con agua destilada.

II) Se completa la limpieza hirviendo los tapones en detergente durante 20 minutos. Esto es seguido de 6 enjuagues en agua destilada y 6 enjuagues en agua demineralizada. Luego se seca a horno a 90 °C.

III) Se esteriliza en cajas de petri forradas de papel de aluminio colocando luego en autoclave a 1 at. durante 1 hora.

d) Material de laboratorio

Tijeras, pinzas, etc., se lavan con detergente, se secan bien y se acondicionan en fondos téberos de ensayos tapados con papel de aluminio

Se esterilizan en autoclave a 1 at. durante 30 minutos.

II) MEDIOS DE CULTIVO CELULAR Y BACTERIOLÓGICOS EMPLEADOS

a) SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS (P.B.S.)

CLNa		9.00	gr.	} Solución A 800 ml. de agua bidestilada
CLK		0.20	"	
PO4H2K		0.20	"	
PO4H2Na2	anh.	1.18	"	
	2H2O	1.442	"	
	12 H2O	2.30	"	
CL2Mg.6H2O		0.100	gr.	} Solución B 100 ml. de agua bidestilada
CL2Ca	anh.	0.100	"	
	2H2O	0.132	"	
	6H2O	0.166	"	
Agua bides . e.s.p.		1.000	ml.	
NaOH	1N	0.25	"	
pH	final	7.50		

Disolver los componentes de cada una de las dos soluciones. Mezclar, ajustar el pH, completar a volumen y esterilizar por filtración por placa E.K.S.. Conservar en heladera (4°-6°C).

b) SOLUCION DE TRIPOLINA

Se prepara una solución al 0.25 % en P.B.S. procediendo de la siguiente forma. En un erlenmeyer conteniendo el P.B.S. se agrega la tripolina lentamente y agitando con agitador magnético. Se controla el pH ajustándolo a pH 7.5. Cuando se ha disuelto totalmente se filtra por placa E.K.S.. Se envasa y se congela.

c) SOLUCION DE LUCIFERA S.S.F

Se prepara una solución en agua bidestilada, se filtra por placa E.K.S., se envasa y se conserva en refrigerador (4°-6°C).

d) SOLUCION DE ANTIBIOTICOS

Streptomicina : 5 mg. por ml.

Penicilina : 15 mg. por ml. = 23.794 u por ml.

Se disuelve en agua bidestilada y se esteriliza por filtración por placa E.K.S.. Se envasa y se conserva en congelador.

e) SUERO EQUINO

Suero proveniente de caballos jóvenes sangrados previo ayuno.

Se esteriliza por filtración por placa E.K.S.. Se envasa y se conserva en congelador.

f) SOLUCION BALANCEADA SALINA (HANKS)

CLNa	0.90 gr.	} a 1.000 ml.
ClK	0.40 "	
SO4Mg.7H2O	0.10 "	
Cl2Mg.6H2O	0.10 "	
PO4HN2.12H2O	0.06 "	
PO4H2K	0.06 "	
Glucosa	1.00 "	
Rojo fenol	0.02 "	
CO2HNa	0.35 "	
pH final	7.35- 7.45	

Disolver los componentes. Ajustar el pH y esterilizar por filtración por placa E.K.S.. Conservar en refrigerador (4°-6°C).

g) SOLUCION DE HANKS + HIDROLIZADO DE LACTOALBUMINA (H.L.)

Al medio de Hanks se le agrega hidrolizado de lactoalbúmina para tener una concentración final de 0.5 % y luego se procede a la esterilización por filtración por placa E.K.S.

h) SOLUCION DE HANKS + HIDROLIZADO DE LACTOALBUMINA + SUERO EQUINO (H.L.S.)

En el momento de su empleo se prepara esterilmente una solución de Hanks hidrolizado de lactoalbúmina con 10 % de suero equino (H.L.S. 10%) cuando el medio se emplea para cultivo celular; 7.5% (H.L.S. 7.5%) para el medio de cambiado los cultivos celulares obtenidos y 2% (H.L.S. 2%) para las

suspensiones celulares. Se ajusta el pH a 7.5 con solución de CO_2HNa .

1) MEDIO DE AGAR PARA

Infusión de papa	1.000 cc.
Agar (lavado)	20 gr.
Peptona, difco o equivalente	10 gr.
Extracto de carne, Liebig o equivalente	5 gr.
Cloruro de sodio U.S.P.	5 gr.
Glicerina U.S.P.	20 cc.

Se lavan papas sanas y maduras. Se cortan en pequeñas cubas, se muelen y se pesan 300 gr. sin mayor exposición al aire, a 1.000 cc. de agua destilada. La mezcla se deja en infusión a 50°C de un día para otro, en un recipiente cerrado, y luego se filtra a través de una capa de gasa. Este filtrado, restituido al volumen original con agua destilada, constituye la infusión de papa indicada en la fórmula anterior. Se agregan todos los demás ingredientes a la infusión (ver fórmula), aplicando suficiente calor para lograr la disolución completa. Con este objeto se utiliza un baño maría hirviendo.

El medio se ajusta a pH 7.5 con el fin de obtener un pH final de 6.8. Después se distribuye en botellas (de alta resistencia y baja alcalinidad). Des pués las botellas con medio se esterilizan a 15 libras de presión (121°C) durante 30 minutos. Se conservan en refrigerador.

PREPARACION DE LAS COLONIAS DE ESTERIL CON AGAR PARA

Se guarda las siguientes relación: 140 ml. de agar +10 ml. de suero equino para 6 cajas de petri. Se procede a fundir el agar. Se le enfría a 50°C , se agrega el suero equino se mezcla bien y se vierte en las cajas de petri estériles a razón de aproximadamente 20 ml. por caja. Se dejan enfriar y solidificar, secándolas luego en estufa.

Para la experiencia de disociación el agar papa es purificado y filtrado debiendo presentar una apariencia límpida y transparente debido al carácter de observación que se realiza.

III) TÉCNICAS ESPECIALES EMPLEADAS

a) TÉCNICA DE INMUNIZACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE AGUTIMINAS EN SUERO

IMUNOLÓGICO

La prueba serológica para diagnóstico de brucelosis, que se utiliza en este trabajo consiste en colocar el suero a analizar frente al antígeno Brucella abortus elaborado con las cepas 1119-3, BAI (Bureau of Animal Industry, de los Estados Unidos.).

Se colocan sobre los cuadrados de una placa de vidrio las siguientes cantidades de suero : 0.08 cc., 0.04 cc., 0.02 cc. y 0.01 cc.; se deja caer una gota de antígeno bien agitado, con un gotero calibrado sobre cada dilución, se mezcla bien con un asa de alambre, que se flama después de cada prueba o con un monodientes que se utiliza una sola vez.

Se trata de evitar que se unan las mezclas de los cuadrados adyacentes.

Hay que rotar la placa varias veces durante 5 a 8 minutos, y se lee el resultado con luz indirecta.

Las reacciones positivas se manifiestan por la presencia de grumos que pueden clasificarse de acuerdo a su intensidad, desde una (+) a cuatro (++++) cruces.

Las anteriores diluciones corresponden a los siguientes títulos respectivamente: 1/ 25 , 1/50 , 1/100 y 1/200.

Si se debe titular más allá de 1/200, es necesario agregar 15 ml. de solución fisiológica a 1 ml. de suero; tomándose nuevamente 0.08 cc. de mezcla frente a una gota de antígeno, de título de 1/ 400 y siguiendo así 1/800, 1/1.600 y 1/3.200.

b) TÉCNICA DE LA LUZ OBLICUA PARA EL EXAMEN DE LA DISOCIACIÓN

DETERMINACIÓN EN EL GÉNERO BRUCELLA

Se observa la disociación bacteriana que puede sufrir la Br. abortus examinando los cultivos en caja de agar papa ; bajo microscopio de débil aumento con luz oblicua. Este método fue descrito por primera vez por

Henry en 1933.

Se coloca un microscopio binocular de aproximadamente 15 diámetros de aumento con un espejo cóncavo situado delante a 10 cm. de la platina. Se dispone una lámpara de 15 cm. en frente del espejo y aproximadamente a 10 cm. sobre él y que proyecte un haz de luz convergente,

De esta manera los rayos de luz se reflejan sobre el espejo y penetran en la caja de cultivo en un ángulo de aproximadamente 45°.

La determinación del tipo de colonia depende esencialmente de diferencias de color, opacidad, y forma.

Las colonias de la fase lisa "S" son generalmente más pequeñas y de bordes perfectamente definidos que las variantes no lisas; y presentan a la luz un color azul pálido o verdoso.

Las colonias de la fase "R" son opacas, generalmente de color crema, muy granuladas y de bordes irregulares.

Se observan un gran número de colonias que no pertenecen a ninguna de estas dos categorías. Ellas forman un grupo intermedio, es decir que están en comienzo de mutación, pero más son aún bien definidas.

e) TÉCNICA DE LA DESINTEGRACIÓN ULTRASONICA PARA LA SUSPENSIÓN CELULAR

Se aplicó ondas ultrasónicas de 20 Kciclos por seg. , a suspensiones de células de riñón de cerdo (100 ml. por vez de aproximadamente 300.000 células por ml.) durante 20 minutos.

Luego se centrifugó a 3.000 rpm y en el sobrenadante se realizaron las experiencias indicadas en la sección correspondiente.

PARTES EXPERIMENTAL

1) CULTIVOS BACTERIANOS. BACILLAS. OBTENCION DEL CULTIVO. MANTENIMIENTO

Se partió para este trabajo de un cultivo liofilizado de B_g shering cepa B19. Dicho cultivo se reconstituyó con 27 ml. de solución fisiológica, sembrándose por estría la suspensión en sendos tubos de agar papa que se incubaron 4 días a 37°C.

Dichos tubos constituyeron el material de partida para obtener los cultivos que se emplearon en los distintos experimentos efectuados.

En cada ocasión un cultivo estría de B_g shering de no más de 4 días de incubación a 37°C se suspendió en una cantidad suficiente de solución fisiológica estéril como para obtener una suspensión bacteriana de la turbiedad de la escala de Mc.Farland requerida.

Se emplearon turbiedades iguales a los tubos 3, 6 y 10 de dicha escala con un contenido de aproximadamente 3.5×10^9 , 1.5×10^{10} y 2.5×10^{10} bact.per ml.

2) DETERMINACION DEL NUMERO DE BACTERIAS DEL GENERO BACILLAS (cuenta viable)

Se hizo por siembra en superficie en sendas placas de agar papa de diluciones de los cultivos en agua de peptona.

3) TECNICA DEL CULTIVO EN MAMUCARA

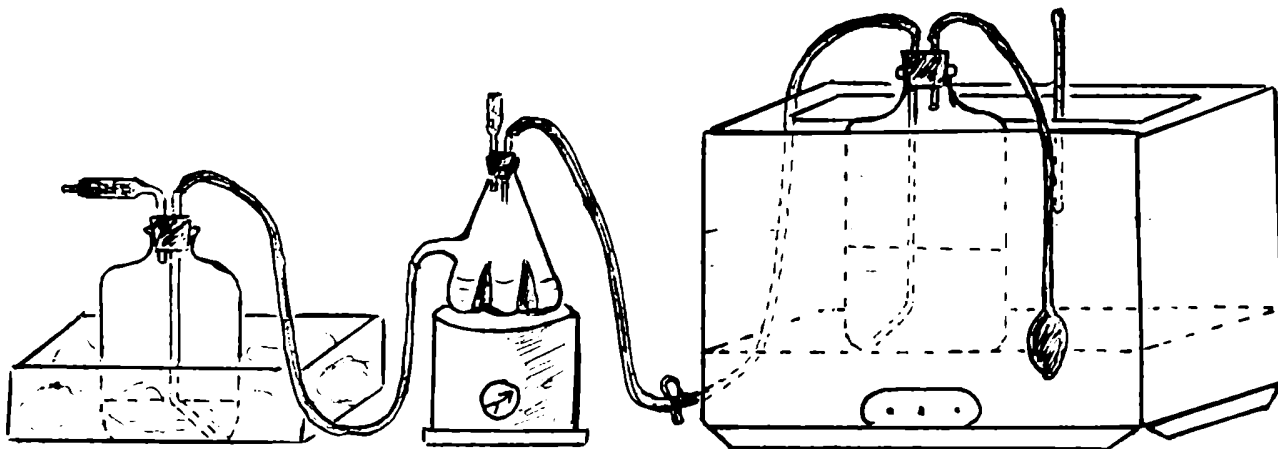
A un cordo recién muerto y sangrado a blanco se le extraen en torzante los riñones con el peritoneo que los envuelve. Se efectúa un primer lavado para eliminar restos de sangre con P.D.S. adicionado de antibióticos (Ver apéndice).

Luego y trabajando bajo campana se extrae el peritoneo y la cápsula, se corta en sentido craneal a caudal y con tijera uterina y pinzas se separa la parte cortical de la medular, esta se desecha.

La cortical precedente de un riñón se coloca en un tubo de centrifuga de aproximadamente 50 ml. y se lava con P.D.S. adicionado de antibióticos repitiendo los lavados hasta que el líquido sobrenadante sea límpido. Se suspende el sedimento y se tritura con tijera la cortical de forma

de obtener trozos de 1 mm. de lado que se colocan en un erlenmeyer especial acanalado de 500 ml. de capacidad, juntando el material proveniente de los dos riñones. Se agrega entonces 100 ml. de tripsina al 0.25% en P.D.S. previamente calentada a 37°C. Se agita con agitador magnético durante 15 mint. Se extrae el líquido sobrenadante (que se descarta para impedir la contaminación por el manipuleo sufrido por los riñones al extraerlos) y al tejido se le vuelve a agregar otros 100 ml. de tripsina que se dejan actuar durante 15 minutos con agitación constante. Se extrae el sobrenadante reuniéndole en un frasco de 1 litro en frío repitiéndose esta operación tantas veces hasta notar que todo el tejido ha sido desintegrado. Aproximadamente de 4 a 6 veces.

Para realizar esta operación sin peligro de contaminación se utilizó el sistema que se diseña a continuación.



Una vez finalizada la tripsinización se centrifuga en frascos de 250 ml. , la suspensión de células a 1.200 rpm durante 10 minutos en centrífuga refrigerada a 5°C, descartando el sobrenadante.

Al precipitado se le resuspende en aproximadamente 100 ml. de medio H.L./B. 10% + 5 ml. de solución de antibióticos por litro y se filtra a través de nylon. El filtrado se vuelve a centrifugar descartando el sobre-

mediante y repitiendo 3 veces el lavado y la centrifugación. En el último lavado se usa un tubo graduado cónico donde se lee la cantidad de precipitado obtenido. Dicho precipitado se suspende en un pequeño volumen de medio H.L., se toma 1 ml. para efectuar la cuenta de las células de la siguiente forma.

Se agregan partes iguales de suspensión de células y de solución de tripan-azul 0.2% o eosina 2%. Se deja en contacto 2 minutos y se efectúa la cuenta de las células en una cámara cuantaglobúlos. El colorante tiñe las células muertas, que de esa manera no se cuentan. Se hace la dilución con medio H.L.S. 10% de la suspensión de células obtenidas de modo de tener una concentración final de 3×10^5 células per ml. (Ver apéndice).

Se ajusta el pH a 7.2 -7.3 con solución de CO_3Na y se reparte a razón de 2 ml. per tube de ensayo o tube de Leighton y 100 ml. per Roux, Se incuba a 37°C durante tiempo variable de 4 - 5 días, observando si se forma capa confluyente.

4) PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR

Se sigue la misma técnica del cultivo en monocapa en todos sus pasos.

Al llegar a la determinación de viabilidad de las células per cuenta cámara; se hacen en este caso diluciones con medio H.L.S. 2% de manera de tener alrededor de 1.5×10^6 células per ml.

La uniformidad de la suspensión es mantenida durante la distribución mediante un agitador magnético, volcando 250 ml. per erlenmeyer.

Se tapa con goma atóxica y se cubre con papel de aluminio. a Se usa inmediatamente de obtenida.

5) EXPERIENCIAS EFECTUADAS

Con el objeto de determinar si la Br. abortus infectaba la célula y se reproducía en ella se planearon una serie de experiencias tal como se detalla a continuación.

a) Se ensayaron primeramente la influencia del tiempo de contacto de

bacterias con células. Para ello se eligieron sendos grupos de 5 tubos de cultivo en monocapas de riñón de cerdo cada uno.

Se lavaron 3 veces con 2 ml. de medio H.L. cada tubo, para eliminar el resto de antibiótico que pudiera tener la monocapa proveniente de su medio basal.

A los tubos de todos los grupos se les agregaron 0.5 ml. de suspensión de Br.abortus cepa B19 (aproximadamente 3.7×10^9 bacterias) dejando en contacto con las células tiempos diferentes para cada uno de los grupos de tubos, volcando una vez transcurrida el tiempo establecido en cada caso la suspensión de bacterias. Se lavaron posteriormente con el mismo medio H.L. adoptando precauciones para no romper la monocapa.

A todos los tubos se les agregaron 2 ml. de H.L.S.10% + 5 ml. de solución de antibióticos por litro, dejando en contacto 24 horas.

Al cabo de dicho tiempo se lavaron nuevamente, siempre con el mismo medio pero sin antibiótico y agregando finalmente a cada tubo 2 ml. de H.L.S.10%, incubando a 37°C en roller durante 96 hs.. Se contaron entonces las bacterias en placa de agar papa suero equino(Ver apéndice).

b) Con el objeto de determinar si las bacterias desarrolladas en contacto con células quedaban incorporadas a las mismas se planeó la siguiente experiencia.

Se tomaron 5 tubos de cultivo celulares lavados 3 veces con 2 ml. de solución H.L. sin antibiótico cada vez, con el objeto de eliminarlo del cultivo.

Se agregaron entonces 0.5 ml. de suspensión de Br.abortus ($3,7 \times 10^9$ bacterias) por tubo, dejando en contacto 10 minutos. Se desechó luego la suspensión y se agregaron a cada tubo 2 ml. de medio H.L.S. 10% incubando a 37°C en roller durante 96 hs..

Al cabo de dicho tiempo se separó el sobrenadante donde se contaron las bacterias desarrolladas. Es decir que esta etapa de la experiencia era la infección celular previa. A la monocapa se la trató de la siguiente forma.

Se lavaron las células con medio sin antibiótico, para quitar cualquier resto de bacterias extracelulares. Se agregaron 2 ml. de H.L.S.10% +antibiótico, dejando en contacto 24 horas.

Posteriormente se lavaron con medio sin antibióticos. Finalmente se agregaron 2 ml. de medio H.L.S. 10% por tubo y se incubaron nuevamente a 37°C en roller durante 96 horas.

Transcurrido dicho tiempo se contaron las bacterias del sobrenadante. Además se hizo una determinación del grado de disociación de las colonias obtenidas.

c) Como la acción celular sobre las bacterias puede manifestarse de diversas maneras se trató de valorar si las células actuaban mediante algún principio activo de las mismas o al ser las bacterias del género Brucella intracelulares influye el metabolismo celular sobre el desarrollo de ellas.

Con el objeto de aclarar cuál era la acción celular se han realizado las experiencias siguientes y que consisten en líneas generales en colocar al mismo número de bacterias, en diferentes condiciones y observar el crecimiento en cada uno de los casos.

c') Se calentaron sendos tubos de cultivos de riñón de cerdo a 100°C durante 80 minutos. Se lavaron para eliminar antibióticos y se inocularon con 0.5 ml. de suspensión de bacterias Br.abortus (aproximadamente 3.7×10^9 bacterias).

Se dejaron en contacto 10 minutos, se descartó la suspensión y se agregaron 2 ml. de H.L.S.10%. Se incubaron a 37°C en roller durante 96 horas.

c'') Se procedió en forma idéntica que en c' pero sobre cultivos celulares no calentados, infectados con la misma suspensión bacteriana. Este ensayo se consideraba testigo.

c''') A sendos tubos con 2 ml. de sobrenadante de células desintegradas por ondas ultrasónicas (Ver apéndice) se le agregaron 0.5 ml. de suspensión de bacterias empleadas en c' y c''). Se incubaron a 37°C en roller

durante 96 horas.

a''') Se adicionó un conjunto de tubos como testigos sembrando la misma cantidad de la misma suspensión bacteriana en 2 ml. de H.L.S. 10%, es decir todo en ausencia de células. Se incubaron de la misma forma que en los ensayos anteriores,

d) Para estudiar la influencia de las células sobre el cultivo de Br. abortus, se efectuaron una serie de experiencias que se agrupan como sigue para mejor ordenamiento.

d') Estudio del tiempo de incubación óptimo en medio y en medio + células.

d'') Influencia del número de pasajes sobre el número máximo de bacterias obtenidas para determinar si hay adaptación celular.

d''') Influencia del número de pasajes sobre el grado de disociación de la Br. abortus.

En todos los casos se trabajó mediante la misma técnica que es la siguiente.

Unos 10 a 15 tubos de cultivo de riñón de cerdo, se lavaron 3 veces con 2 ml. de medio H.L. sin antibióticos con el objeto de eliminar éstos últimos. Luego se agregaron 0.5 ml. de suspensión de Br. abortus por tubo (3.7×10^3 bacterias) dejando en contacto células + bacterias durante 10 minutos. Una vez pasado dicho tiempo se volcaron los contenidos de los tubos y se agregaron 2 ml. de medio H.L.S. 10% por tubo, incubando a 37 °C en rellero. A las 72, 96, 120 y aún 168 hs. se tomaron 2 -3 tubos, se mezclaron sus contenidos y se procedió a efectuar una cuenta viable con el objeto de determinar al número de bacterias obtenidas.

Las cuentas se realizaron en agar papa y suero equino tal como se detalla en el apéndice.

En forma paralela se repitieron las mismas experiencias empleando esta vez medio H.L.S. (sin células) procediendo en lo demás de idéntica forma que en las experiencias anteriores.

En determinadas ensayos se procedió a observar el grado de de-
s estimación microbiana de los cultivos obtenidos de acuerdo a la técnica que
se detalla en el apéndice.

e) De varios pasajes alternados, tanto en medio H.L.S., como en tejido
celular se hicieron inoculaciones en cobayo para estudiar la antigénicidad
y concentración antigénica límite de cultivos obtenidos.

Se trabajó con los pasajes N°7 y N°11, empleándose un cul-
tivo reciente de no más de 96 horas a 37°C en cultivo de tejido o en medio
H.L.S. según las circunstancias.

Se usaron cobayos de aproximadamente 350 gr. cada uno, uti-
lizando 5 por experiencias. Cada uno recibió 1 ml. por vía subcutánea de cer-
das diluciones, en las cuales se contaron el número de bacterias que conte-
nían.

Los cobayos se sangraron a los 14 días de la vacunación por
punción cardíaca, separándose el suero.

Para la determinación de anticuerpos en el suero de los co-
bayos se empleó la prueba de soro-aglutinación de Huddleston (Ver apéndice).

Se ensayó primero la influencia del pasaje sobre la antige-
nicidad, vacunándose cobayos con cultivos bacterianos correspondientes al 7°
y 11° pasaje sobre cultivos celulares.

Posteriormente se trató de aclarar para cada uno de los mis-
mos pasajes cuál era la concentración mínima que inducía en el cobayo una re-
acción equivalente a un título $\geq 1/50$

En todos los casos se agregó un grupo de cobayos vacunados con
cultivos obtenidos por desarrollo en medio H.L.S. 10% solo, es decir sin célu-
las.

f) Se partió para esta experiencia de células en suspensión, obtenidas
según la técnica descrita en el apéndice.

Se realizaron también experiencias por duplicado actuando una
de ellas como control de cultivo sin células. A ambos erlenmeyer de 500 ml .

conteniendo en un caso 100 ml. de suspensión celular medio H.L. sin antibiótico y en el otro 100 ml. de medio H.L. también sin antibiótico, se agregaron 10 ml. de suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente 7.5×10^9 bact. por ml. y 10 ml. de suero equino.

Se incubaron a 37°C en shaker durante 96 hs. al cabo de dicho tiempo se procedió a hacer un pasaje en las mismas condiciones y a efectuar una cuenta viable del cultivo bacteriano obtenido.

g) Varios tubos de Leighton con cultivos celulares de riñón de cerdo se lavaron 2 veces con 2 ml. de medio H.L. para eliminar el antibiótico que pudieran retener las células.

Se sacaron microfotografías de la monocapa antes de la inoculación bacteriana.

Luego se sembraron 0.5 ml. de suspensión de Br. abortus (3.7×10^9 bacterias) dejando en contacto 10 minutos, volcando dicha suspensión al cabo de los mismos. Se agregaron 2 ml. de medio H.L.S. 10% por tubo, se incubaron durante 96 hs. a 37°C .

Se quitaron con pinzas los portachijos de los tubos para fijar con metanol las células. Se hicieron coloración de Gram para poder visualizar las bacterias intracelulares y se microfotografiaron las células atacadas.

h) Seis cultivos de riñón de cerdo obtenidos en botellas de Roux se lavaron 3 veces con 10 ml. de medio H.L. para quitar el resto de antibiótico que pudieran tener las células.

Se agregaron a cada botella 10 ml. de suspensión de bacterias dejando en contacto 10 minutos y volcando. Posteriormente se agregaron 100 ml. de H.L.S. 10% por cada Roux, incubado a 37°C durante 96 horas.

Al cabo de dicho tiempo se realizaron las cuentas de bacterias en agar papa.--

RESULTADOS OBTENIDOS

Como ya se mencionó en la parte experimental se desarrollaron a estas experiencias con el objeto de determinar si en cultivos celulares la cepa Brucella abortus N19 parasitaba la célula y se reproducía dentro de ella.

Se consideró esta tesis debido al hecho de que a dicho microorganismo se le conoce como parásito intracelular cuando está sobre el hospedador entero.

En el Cuadro I figuran los resultados obtenidos cuando cultivos celulares de riñón de cerdo se pusieron en contacto con una suspensión bacteriana durante tiempos variables desde 30 minutos hasta 48 horas.

CUADRO N° 1

Experiencias para determinar el desarrollo intracelular de Br. abortus en cultivos en monocapas de riñón de cerdo.

Tube N°	Cantidad de bacterias inculadas	Tiempo de contacto de bact. y células (en minutos)	Tiempo de desarrollo luego del tratamiento con antibióticos
1 a 5	3.7×10^9	30	no desarrolló
6 a 10	"	60	" "
11 a 15	"	1.440	" "
16 a 20	"	2.880	" "

Como se observa no se pudo demostrar la infección de la célula ya que dichos cultivos fueron totalmente esterilizados por la acción de antibióticos, cosa que es consecuencia del hecho de que las bacterias se han mantenido en el medio de cultivo.

Sin embargo y antes de abandonar la idea de que las bacterias en su medio pudieran infectar las células en cultivos histicos y desarrollarse en ellas, se planeó otra experiencia, los resultados de la cual figuran

en el Cuadro 2.

Es decir se demostró la presencia de infección de las células pero cuando existe una mayor concentración de bacterias.

CUADRO N° 2

Experiencias para determinar el desarrollo intracelular de H. salinarum en cultivos en monocapas de riñón de serpiente previamente infectado.

Tubo N°	Cantidad de bacterias inoculadas	Tiempo de contacto de bac. y células (en min.)	N° de bac./ml. en sobrenadante luego de 4 días de incubación a 37°C	N° de bac./ml. en sobrenadante de cultivo ya tratado con antibiótico durante 24 hs. y luego inoculado 4 días a 37°C
31 a 25	3.7×10^9	10	6.0×10^8	5.0×10^9

Evidentemente que el éxito de la infección de los cultivos celulares que se ha expresado en el Cuadro 2 se ha debido a que el remanente de las 3.7×10^9 gérmenes se ha multiplicado en el medio de cultivo y han llegado a un número capaz de infectar las células presentes.

Es de resaltar el hecho de que dichas células infectadas pueden seguir liberando bacterias cuando se las incuba nuevamente con medio de cultivo estéril.

A la luz de los resultados del Cuadro 2 se trató de aclarar que influencia tenían las células sobre el desarrollo bacteriano.

En el Cuadro 3 figuran los resultados obtenidos y ellos expresan que prácticamente las células no aportan ningún factor que favorezca el desarrollo de las bacterias cuando se las compara con el desarrollo obtenido en el medio sin células.

Cuadro N° 3

Influencia de las células de riñón de cerdo sobre el cultivo de B. abortus

Condiciones de cultivo (1)	N° de bacterias por ml.					
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Valor medio
Medio H.L.S.	1.5×10^9	7×10^8	1.25×10^8	4×10^9	1.3×10^9	1.77×10^9
Tejido + H.L.S.	1.1×10^9	3.6×10^7	1.9×10^9	5×10^8	1.5×10^9	1.01×10^9
Medio H.L.S. + células calcinadas	1.5×10^9	1.5×10^9	1×10^9	7×10^8	—	1.17×10^9
Medio H.L.S. + células desintegradas	—	—	—	—	1.8×10^9	1.8×10^9

(1) H.L.S.=medio Hanks hidrolizado lactoalbúmina 0.5% y suero equino 10%

Cuadro N° 4

Variación del n° de bact. con respecto al n° de pasajes por cultivo de tejido para distintos tiempos de incubación

Pasaje N°	Bact./ml 10^6			
	Tiempo de incubación (en días)			
	3 días	4 días	5 días	7 días
2°	—	400	—	210
3°	670	870	—	—
4°	—	1000	1000	—
5°	1800	—	—	—
6°	2100	2500	3900	—
7°	—	4000	7000	1000
8°	—	—	—	1350
9°	2500	—	—	—

En los Cuadros 4 y 5 figuran los resultados obtenidos cuando se hicieron pasajes sucesivos de la cepa B19 B. abortus sobre cultivos celulares. Con esta experiencia se pretendió obtener una doble información.

La primera, si por cultivos sucesivos había una adaptación de las bacterias a las células y al medio o a éste solo; y segundo cuál era el tiempo óptimo de cuenta bacteriana. Es decir si excederse en él le era en detrimento del número de bacterias obtenidas. Para mejor concluir sobre estos resultados se han colocado en el

Cuadro N° 5

Variación del n° de bact. con respecto a el n° de pasajes por medio H.L.S. para distintos tiempos de incubación

Pasaje N°	Bact./mlx10 ⁶			
	Tiempo de incubación(en días)			
	3 días	4 días	5 días	7 días
3°	—	—	—	200
3°	150	350	—	—
4°	550	—	850	500
6°	—	1800	—	—
7°	2300	2500	1500	900
8°	—	—	—	1400
10°	—	3500	—	—

Gráfico 1.

Para concluir de él que sí, hay adaptación ya que a iguales tiempos de incubación el número de bacterias aumenta con el número de pasajes tanto para las bacterias cultivadas en cultivos celulares como en medio solo.

También surge que el tiempo de incubación óptimo se halla entre los 3 -4 días ya que con mayores tiempos de incubación parece haber una destrucción de bacterias.

Debido a los resultados obtenidos en esta experiencia se ha

elegido como tiempo de incubación óptimo el de 4 días.

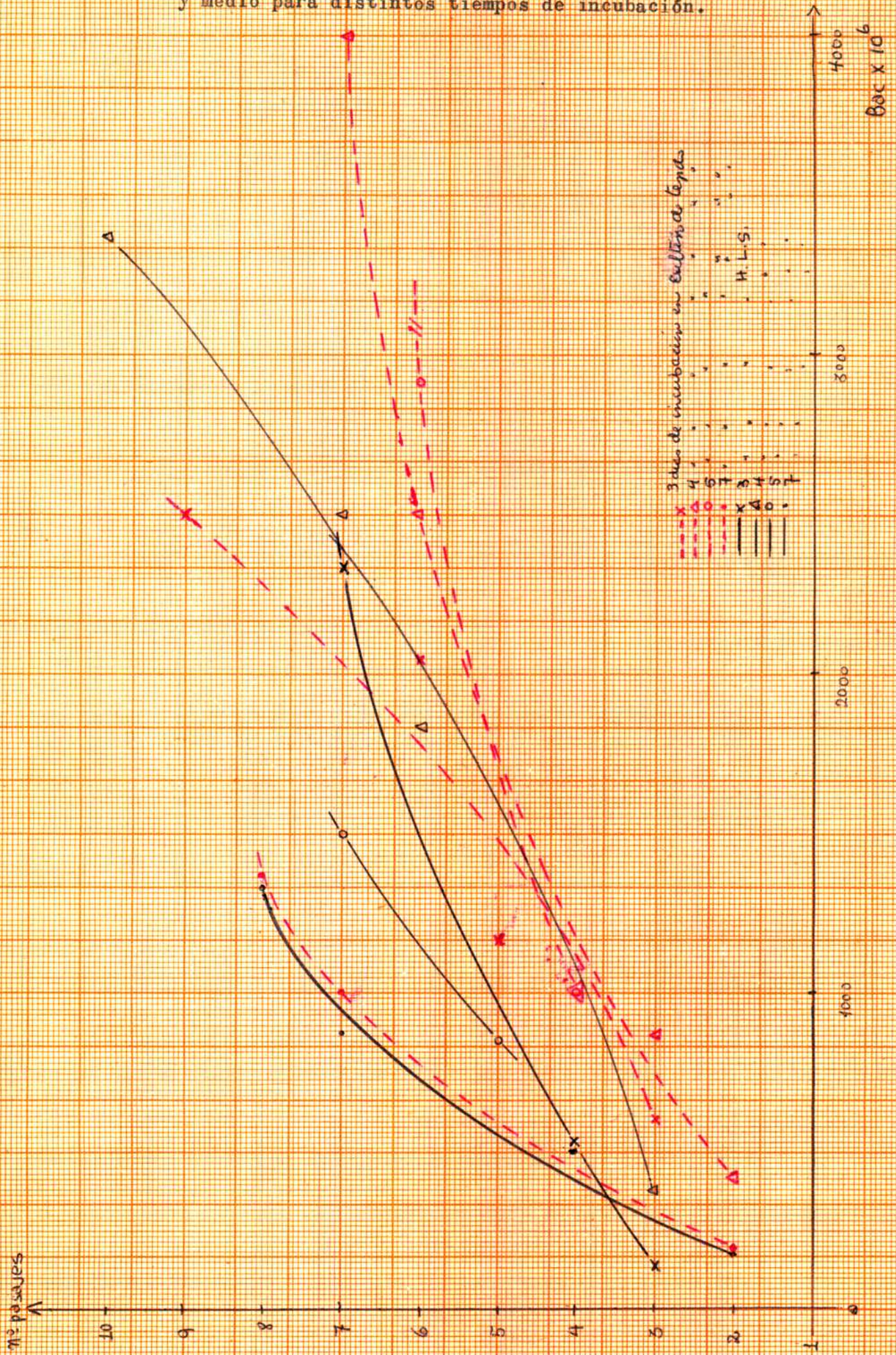
El principal inconveniente con que se tropieza cuando se cultivan bacterias del género *Brucella* es la aparición bastante frecuente de forma disociada(44).

Dichas formas disociadas carecen o presentan poco antígeno "S" por lo que su empleo como vacuna no es recomendable.

Con el objeto de aclarar si el número sucesivos de pasajes a través de cultivo celular o en medio influyen sobre la estabilidad antigénica, se planeó una experiencia determinando el número de colonias "R" que aparecen al aumentar el número de pasajes.

Los resultados figuran en el Cuadro 6. De él surge que las células confieren cierta estabilidad a las bacterias ya que recién al 10° pasaje por ellas la disociación fue nota, mientras que han bastado 9 pasajes a través de medio H.L.S. para que las bacterias se hayan transformado

Variación del n° de bacterias con respecto al n° de pasajes por cultivo y medio para distintos tiempos de incubación.



con él totalmente en rugosas. Como conclusión puede decirse que es posible efectuar hasta 9 pasajes a través de cultivos colulares sin alterar significativamente la composición antigénica de la cepa B19.

Si en los mismos pasajes se hacen a través de medio H.L.S. no deben ir más allá del 5º pasaje.

CUADRO N° 8

Acción del N° de pasajes por medio H.L.S.
y por cultivo celular sobre la estabilidad
antigénica.

Pasaje N°	Condiciones de cultivo	% de colonias Rugosas
1º	Medio H.L.S.	0
3º	" "	0
5º	" "	(1)
9º	" "	87%
7º	Cultivo celular	< 1%
8º	" "	1%
9º	" "	2%
10º	" "	47%

(1)-Colonias en comienzo de disociación.

Con los resultados anteriores a la vista y sin perder el objeto de nuestro trabajo que era el de poder obtener cultivos bacterianos en medio líquido y su empleo en la inmunización animal, se trató de determinar cuál era el poder antigénico de los cultivos bacterianos obtenidos, así como cuál era la mínima cantidad de bacterias necesarias para inmunizar.

Estas experiencias se hicieron sobre cobayos, de acuerdo a una técnica standard y los resultados figuran en los Cuadros 7, 8, 9 y 10.

Como pueden verse a través de ellos los cultivos bacterianos

obtenidos son buenos antígenos para cobayos y además antígenos potentes ya que se requieren concentraciones relativamente pequeñas de bacterias para inducir la formación de aglutininas.

El hecho significativo es que si se emplea como indican las normas internacionales una dosis de 50×10^9 bacterias para inmunizar al bovino, los cultivos bacterianos que se han ensayado contienen en dicha concentración por lo menos a 50 dosis cobayo.

CUADRO N° 1

Demostración de la antigenicidad de las bacterias obtenidas sobre cultivos de células renales perovinas y sobre medio H.L.S. para cobayo.

Origen del Antígeno	Diluciones del suero de cobayo			
	1/25	1/50	1/100	1/200
7° pasaje por cultivo de tejido (1)	+(3)	+	+	-(4)
7° pasaje por medio H.L.S. (2)	+	+	+	-

(1) = 3.4×10^9 bast./ml.. Cultivo de 96 hs. a 37°C/.

(2) = 0.8×10^9 " " " " " "

(3) = Indica aglutinación.

(4) = Indica ausencia total de aglutinación.

CUADRO N° 8

Demostración de la antigenicidad de las bacterias obtenidas sobre cultivos de células renales porcinas y sobre medio H.L.S. para cobayo.

Origen del Antígeno	Diluciones del suero de cobayo						
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1000
11° pasaje por cultivo de tejido (1)	+(3)	+	+	+	+	-(4)	-
11° pasaje por medio H.L.S. (2)	+	+	+	+	+	+	-

(1) = 1.2×10^9 bact./ ml. Cultivo de 96 hs. a 37°C.

(2) = 0.4×10^9 " " " " "

(3) y (4) Ver Cuadro N° 7.

CUADRO N° 9

Determinación de la concentración antigénica límite para el cobayo de bacterias obtenidas sobre cultivo de células renales porcinas y sobre H.L.S.

Origen del Antígeno	N° de bact. inyectadas	Diluciones del suero de cobayo				Concentración antigénica límite de bac.
		1/25	1/50	1/100	1/200	
11° pasaje por cultivo de tejido	0.18×10^9	+	+	+	-	0.18×10^9
	0.018×10^9	-	-	-	-	
	0.0018×10^9	-	-	-	-	
11° pasaje por medio H.L.S.	0.09×10^9	+	-	-	-	$\geq 0.09 \times 10^9$
	0.039×10^9	-	-	-	-	

CUADRO N° 10

Determinación de la concentración antigénica límite para el cobayo de bact. obtenidas sobre cultivos renales porcinos y sobre medio H.L.S.

Origen del Antígeno	N° de bact. inyectados	Diluciones del suero de cobayo				Concentración antigénica límite de bac.
		1/25	1/50	1/100	1/200	
11° pasaje por cultivo de tejido	1.5x10 ⁹	+	+	-	-	1.5x10 ⁹
	0.15x10 ⁹	-	-	-	-	
	0.015x10 ⁹	-	-	-	-	
11° pasaje por medio H.L.S.	0.9x10 ⁹	+	+	+	+	0.09x10 ⁹
	0.09x10 ⁹	+	-	-	-	
	0.009x10 ⁹	-	-	-	-	

Con miras a una obtención masiva de bacterias en condiciones lo más simples pensamos en cultivar sobre cultivos colimares en suspensión.

CUADRO N° 11

Cultivo de Br. abortus cepa B19 en forma seriada sobre células renales porcinas en suspensión

Pasaje N°	Cultivo sobre células renales en suspensión	Cultivo sobre medio H.L.S.
	Bact./ml.(1)	Bact./ml(1)
1°	1.0x10 ⁹	3.3x10 ⁹
2°	—	2.6x10 ⁹
3°	1.2x10 ⁶	1.15x10 ⁹
4°	1.1x10 ⁶	9.70x10 ⁸
5°	—	7.0x10 ⁸

(1)= Cultivos de 96 hs. a 37°C.

Los resultados obtenidos en experiencias sobre dichos cultivos figuran en el Cuadro 11.

De ellos se deduce que el método no aporta ventajas sobre el cultivo en monocapas. Es dable observar además que por pasajes sucesivos el número de gérmenes disminuye.

Con todos los resultados a la vista se planeó una experiencia final.

El cultivo masivo de bact

terias del género Brucella en monocapas obtenidas en frascos de Roux. La idea fué de aprovechar las células infectadas para efectuar un cultivo semi-continuo. Infección primaria de los Roux con la monocapa de células renales pecuinas. Incubación durante 4 días a 37°C., separación del sobrenadante y reemplazo por medio fresco. Incubación y separación del sobrenadante. Es decir el cultivo celular de una botella de Roux daría origen a dos de cultivos de Br. abortus. Este plan falló debido al desprendimiento total de la monocapa luego de la primera infección, hecho que hacía imposible su empleo.

Relacionando este hecho se trató de determinar que acción tenían las bacterias sobre la capa celular. Para ello se cultivó la cepa D19 sobre cultivos histiocitos obtenidos en cubreobjeto en tubo de Leighton.

Al cabo de 4 días de incubación se coloreó el cultivo y se fotografió. Se adjuntan sendas fotografías de cultivo de ríñón de cerdo normal y uno infectado obtenido tal como se describe.

Se ha concluido de esta experiencia que el cultivo de las brucellas es intracelular y además produce alteración y desprendimiento de la célula parasitada.

CUADRO N° 12

Cultivo de Br. abortus sobre monocapas de células renales pecuinas obtenidas en frascos Roux.

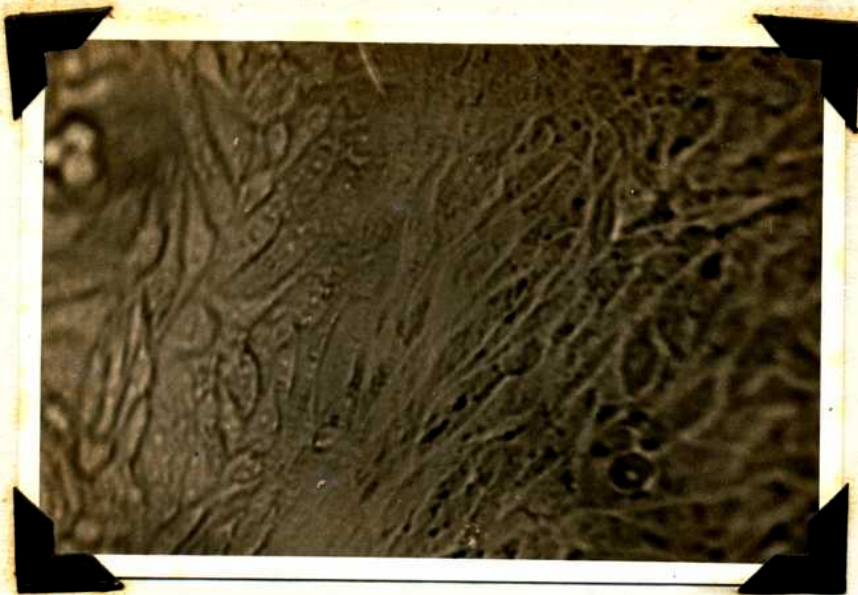
Experiencia N°	N° de bacterias inoculadas(1)	N° de bac./ml. obtenidas
1°	7.5×10^{10}	2.0×10^9
2°	7.5×10^{10}	1.5×10^9
3°	1.5×10^{11}	3.0×10^9

(1) Ver el texto.

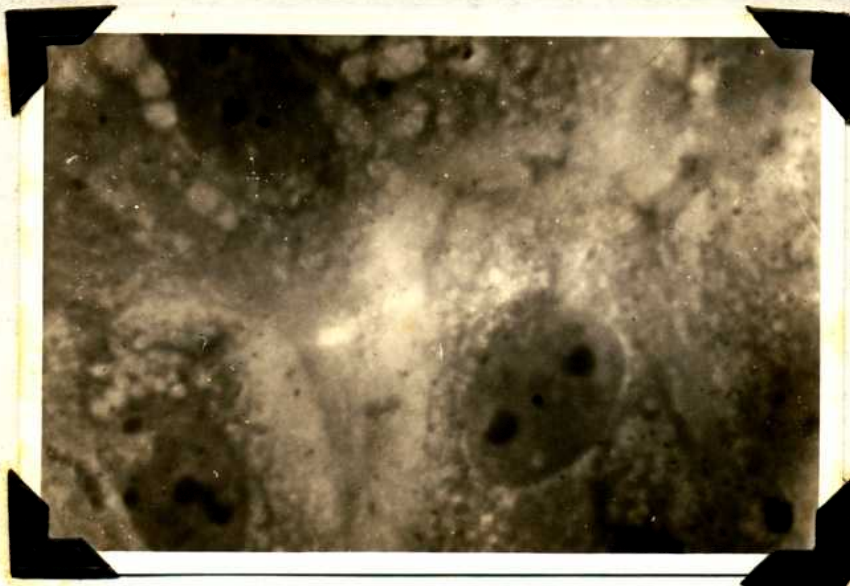
En el Cuadro 12 figuran sendos experimentos realizados en monocapas obtenidas en frascos de Roux que indican un rendimiento bastante constante.

Para obviar el inconveniente mencionado y con objeto de aprovechar el cultivo de bacterias sobre monocapas obteni-

das en frasco de Roux se realizó una experiencia de cultivar bacterias y



Células normales de riñón de cerdo.- 200 X.-



Células de riñón de cerdo infectadas con bacterias^s
del género *Brucella* .- 1.000 X .-

Obsérvese en la parte superior derecha la presencia de
bacterias y la gran vacuolización de las células.-

posterior concentración del cultivo obtenido mediante el agregado de 20 % de solución estéril de carboximetilcelulosa al 1%. Se dejó reposar una noche en heladera y se obtuvo una concentración de aproximadamente diez veces el volumen original.

Con dicha suspensión de bacterias se vacunaron tres terneras de 8 meses de edad que se sangraron a los 14 días practicándose la investigación sobre el suero respectivo.

Los resultados obtenidos así como la concentración de bacterias en el cultivo y en el concentrado (vacuna) figuran en el Cuadro 13 a continuación.

CUADRO N° 13

Resultados obtenidos al vacunar tres terneras con vacuna Br. abortus cepa B10 preparada por concentración de cultivos bacterianos sobre monocapas de células de ríñón de cordero.

N° bact. cultivo sin con.	Vol. sin conc. ml.	Vol. de conc. ml.	N° bac./ml. conc.	N° de bac. por dosis de 5 ml.	Concentración de aglutininas		
					Animal N°		
					1	2	3
1.8x10 ⁹	100	20	9x10 ⁹	45x10 ⁹	i= 0 f= 1/400	i= 0 f= 1/800	i= 0 f= 1/1600

i= Valor antes de vacunar.

f= " 14 días después de vacunar.

DISCUSION

Teniendo en cuenta cual ha sido el objeto del presente trabajo, este es cultivar en medio líquido y en forma continua o semi-continua Brucella abortus cepa B19 haremos algunas consideraciones sobre los resultados obtenidos .

Teóricamente la idea de cultivar Br. abortus sobre cultivos celulares y aprovechar la infección de los mismos para tener un tipo de cultivo semi-continuo, es posible. El problema a resolver es la poca estabilidad de la capa celular por parcial destrucción de la misma debido a la acción bacteriana. No se ha podido buscar solución a este problema pero él queda planteado.

Por otra parte se ha demostrado que es posible mantener Br. abortus antigénicamente líneas durante por lo menos 11 pasajes sucesivos a través de cultivos celulares, lo que es ya una ventaja para su cultivo en masa.

Evidentemente un factor adverso es la baja concentración bacteriana obtenida lo que lleva a concentrar los cultivos.

No creemos que esté dicha la última palabra sobre este punto. Tal vez con condiciones de cultivo mejoradas (agitación mecánica o con burbujeo con oxígeno) el rendimiento sea mejor.

Tampoco creemos que deben descartarse los cultivos en suspensión pues en nuestro caso se ha trabajado poco y lo ensayado solo con miras a aclarar la posibilidad de empleo que tenía. Es muy posible que las mejoras que se pueden introducir en su práctica (relación de suspensión de células a volumen total, agitación con oxígeno, etc.) mejoren el panorama del aprovechamiento de esta técnica.

El resultado que nos parece interesante de recalcar es el hecho de que es posible subcultivar durante 11 veces sucesivas en cultivos de tipo Br. abortus sin que ésta presente forma "R" en manera pronunciada.

Esperamos que debería ensayarse la acción de cultivos celu-

lares sobre los cultivos bacterianos disociados. ¿se podrán tener aquellas si se cultiva sobre los mismos cultivos total o casi totalmente disociados?. Será posible mediante el cultivo de formas "R" sobre cultivos celulares la transformación de las mismas a "S".?

Por lo que respecta a la antigenicidad para el cobayo de los cultivos, ello ha sido excelente y si se la compara con valores obtenidos en experiencias semejantes efectuadas con suspensiones más concentradas de B. abortus provenientes de cultivos en medio sólidos, se puede decir que son superiores (45).

Ello se ha confirmado al inmunizar terneras con una suspensión que contenía la cantidad de bacterias que requieren las normas internacionales .

Quedó pendiente de realización un ensayo de liofilización de las suspensiones obtenidas con el objeto de comprobar su estabilidad a la desecación ya que en general y por razones aún no aclaradas las suspensiones de B. abortus provenientes de medios líquidos son menos estables que aquellas que provienen de medios sólidos (45).-

CONCLUSIONES

- 1) Se ha demostrado el carácter de parásito intracelular de la Br. abortus.
- 2) La Br. abortus al parasitar las células de riñón de cerdo en cultivo, las afecta intensamente.
- 3) Células de riñón calentadas o desintegradas por ondas ultrasónicas no tienen influencia sobre el desarrollo de Br. abortus.
- 4) Todo indica que hay una cierta adaptación de la Br. abortus a las células sobre las cuales se las hace desarrollar ya que pasajes sucesivos sobre ellas tienen como consecuencia un aumento progresivo del número de bacterias obtenidas.
- 5) El tiempo óptimo de cultivo es de 4 días a 37°C para bacterias cultivadas en cultivos de células de riñón de cerdo.
- 6) Los pasajes sucesivos en número no mayor de 11 por cultivo celular no afectan la estabilidad del antígeno de la Br. abortus.
- 7) Las bacterias obtenidas por desarrollo en cultivos histiocitos son buenos antígenos para el caballo y el bovino hombre.
- 8) Suspensiones bacterianas obtenidas por desarrollo en cultivos celulares en botellas de Roux y posteriormente concentradas para obtener no menos de 10×10^9 bacterias por ml. se ha computado como buenos antígenos para el bovino hombre.

bibliografia

- 1.- Penco G. and Vicari. Studia dei fenomeni immunitari per mezzo della coltura di tessuti. I. Nota preliminari. Rend. Ist. Super. Sanita 20(7/8):655-658. 1957.-
- 2.- Penco G. and Vicari. Studia dei fenomeni immunitari per mezzo della coltura di tessuti. sull'azione citotossica della tossina stafilococcica. Rend. Ist. Super. Sanita 20(12):1098-1106. Illus. 1957.-
- 3.- Souza Filicido and Evans D. The action of diphtheria toxin on tissue culture and its neutralization by antitoxin. Brit. Jour. Expt. Pathol. 38(6): 644-649. 1957.-
- 4.- Messore Caracci. Azione della tossina difterica su vari tipi di cellule coltivate in vitro. Rev. Ist. Sieroter. Ital. 32(6):446-451. 1957.-
- 5.- Guerin M., Jackson A. and F. Morgan. Tissue culture and immunological studies with purified Staphylococcal toxins. Canadian Jour. Publ. Health 53(1):38-39. 1962.-
- 6.- Dis hon Theodor. The cytopathogenic effect of bacterial toxins on tissue cultures. I. Colorimetric titration of diphtheria toxin and antitoxin in chick embryo cell cultures. Ann. Hist. Nat. Israel Sect. B 3(4):168-177. 1957.-
- 8.- Gablitz J. and Solotorevsky H. Effect of diphtheria toxin upon tissue culture cells derived from susceptible and resistant species. Bact. Proc. 61: 137-1961.-
- 7.- André J., G. Andobaud and R. Chambon. Diagnosis of diphtheria on tissue culture. Ann. Inst. Pasteur. 99(2):170-187. 1960.-
- 9.- Ormay L. and K. Ujbelyi. Titration of diphtheria toxin, antitoxin and toxin in tissue culture. Acta Microbiol. Sc. Hungaricae. 8(4):389-396. Illus 1961.-
- 10.- Bonventre Peter. Effect of diphtheria toxin on the metabolism animal tissue and tissue cultures. Jour. Infect. Dis. 169(3):287-298. Illus 1961.-
- 11.- Lehan Alina, Felicia Felisa, Angela Matloacu, Mihai Jitaru, Mihaela Simoesu and Rodica Dragulescu. The action of diphtheria toxin on tissue culture. Spitalul 74(4):359-362. Illus, 1961.-

- 12.- Kormandy, Agnes and Leone Farrell. Disc Plate assay of diphtheria toxin and antitoxin using tissue culture methods. Canadian Jour. Publ. Health 54(1):46.1963.-
- 13 - Zibitzker D. The cytotoxic effect of diphtheria toxin and the titration diphtheria antitoxin on tissue culture. Epidemiol. & Immunobut. 40(2): 82-87.1963.-
- 14.- Magroben Y. I. Actions des toxines microbiennes sur les cultures de ti-
ssus. II. Action cytotoxique des endotoxines glucido-lipidiques. Arch. Roumain. Pathol. Exptl. et Microbiol. 19(3):345-354. Illus. 1960.-
- 15.→ Wallace J., Sealeh and J. Hanks. Limited multiplication of Mycobacterium lepraecurium in cells cultures. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 97(1):103-104.1958.-
- 16.- DeSouza P., M. de Azevedo and P. de Castro. Mycobacterium leprae in tissue cultures. Rev. Assoc. Med. Brasil 5(6):408-412. Illus. 1959.-
- 17.- Roes R. and E. Garbutt. Studies on mycobacterium lepraecurium in tissue cultures. I. Multiplication and growth characteristics in culture of rat fibroblasts. Int. Jour. Exptl. Pathol. 43(3):221-227. Illus. 1962.-
- 18.- Roes R. and R. Tees. Studies on Mycobacterium lepraecurium in tissue cul-
ture. II. The production and properties of soluble antigens from Myco-
bacterium lepraecurium in tissue cultures. Int. Jour. Exptl. Pathol. 43(5): 480-487. Illus. 1962.-
- 19.- Roes R., Celia Fildes, E. Garbutt and R. Tees. Some growth characteristic and properties of tissue culture. Growth Mycobacterium lepraecurium. Microb. Abstracts. Montreal 136 6p.122.1962.-
- 20.- Voteli. and Backhaus and I. Horvath. Investigation of Clostridium volchii
antitoxin and sedentation toxina in tissue culture. Proc. Inter. Meeting Biol. Stan. 333-44.1957.-
- 21.- Penscoff. and Vaccari. Studia dei fenomeni immunitari per mezzo della cul-
tura di tes auto. IV. Sull'azione citotattogena della tossina di clostrid-
ium histolyticum. Rend. Ist. Super. Sanita 22(2):131-134. Illus/1959.-

- 22.- Ponso G. and Vacari. Studio dei fenomeni immunitari per mezzo della coltura di tessuti.V. Sull'azione citotossica della tossina di Clostridium botulinum. Rend. Ist. Super. Sanita 22(2):135-137. Illus. 1959.-
- 23.- Ponso G. and Vacari. Studio dei fenomeni immunitari per mezzo della coltura di tessuti.VI. Sull'azione citotossica della tossina di Clostridium oedematis. Rend. Ist. Super. Sanita 22(2):138-140. Illus. 1959.-
- 24.- Salytkoy M., L. Zuzakov and V. Milyutin. The action of toxins from pathogenic anaerobes on tissue culture. Bull. Akad. Biol. i Med. 82(12):43-46. 1961.-
- 25.- Fjorde Andrey. The effect on Tubercle bacilli of cancer in tissue culture. Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 42(3):288-285. 1958.-
- 26.- Fjorde A. and H. Ingbach. The relationship of Mycobacteria and mammalian cells in tissue culture. Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 43(2):171-174 1958.-
- 27.- Seto K., H. Hoshino, M. Watanabe and Hoshishima. Study on the tuberculosis by the method of tissue culture. Jap. Jour. Vet. Sci. 22(Suppl.)530. 1960.-
- 28.- Sharma K. Immunity studies in experimental tuberculosis in tissue culture. Indian Jour. Microbiol. 2(3):150. 1962.-
- 29.- Rakarova N. and S. Tedodov. The growth of Tubercle bacilli in tissue culture. Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Infekt. u Hyg. 189(3):308-315. 1963.-
- 30.- Hayflich L. and W. Stinebring. Intracellular growth of Pleuropneumonia like organisms (PPL0) in tissue culture and in eye. Ann. New York Acad. Sc
- 31.- Basile M., F. Diggs and W. Malina. Immunofluorescence of PPL0 in tissue culture. Mast. Proc. 61:83. 1961.-
- 32.- Orski T. and C. Shepard. Pleuropneumonia-like (Myxococplasma) infections tissue culture. Jour. Mast. 81(4):626-635. 1961.-
- 33.- Gorber D. and M. Wathiria. Growth of Shigellae in monolayer tissue culture. Jour. Mast. 82(6):818-822. Illus. 1961.-
- 34.- Sharapova T. and B. Gavrilyuk. Differentiation of enteropathogenic and non pathogenic Escherichia coli in tissue culture. Zh. Mik. p. iluz. 40(8):94-98

- 35.- Ohno Shimsho. Influence of X-radiation on infection with attenuated Salmonella enteritidis in cultivated macrophages. Japanese Jour. Bact. 13(1):33-38.1958.-
- 36.- Zaglobinskaya L.. Interaction between Hemophilus pertussis and tissue culture. Zhur. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol. 40(9):49-52.1963.-
- 37.- Crawford J. and W. Fishel. Growth of Bordetella pertussis in tissue culture Jour. Bact. 77:465-474.1959.-
- 38.- Carrere L. and J. Roux. Etude des formes "L" des bacteries et leur culture en poufs embryones. Inter. Cong. Microb. Proc. Sixth. 1:136-137.1955.-
- 39.- McPherson I. and K. Allner. L forms of bacteria as contaminants in tissue culture. Nature. 186(4729)992.1960.-
- 40.- Magie Stanley. Inhibition of Pasteurella tularensis in tissue culture of mammalian cells. Bact. Proc. 62:93.1962.-
- 41.- Wolf David. The effects of extracellular products of Streptococcus pyogenes on tissue culture cells. Trans. Kansas Acad. Sc. 65(4):472-477.1962.-
- 42.- Holland J. and M. Pickett. Intracellular behavior of Brucella variants in chick embryo cells in tissue culture. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 93(3) 476-479.1956.-
- 43.- Helman D. and L. Rice, and C. Carpenter. Tissue culture on bacterial allergy in experimental brucellosis. Jour. Immunol. 85(3):258-267.1960.-
- 44.- Brown W. Bacterial Genetics.
- 45.- Hulse E. and M. Collins. The preparation of freeze dried Br. abortus (D19) vaccine. VIII Cong. Microbiol, Inter. 1962.-

Carroll H. K.
1962