

Tesis de Posgrado

Mutantes bacterianas termosensibles como prototipo de vacunas vivas atenuadas

Gherardi, María Magdalena

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas 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:

Gherardi, María Magdalena. (1993). Mutantes bacterianas termosensibles como prototipo de vacunas vivas atenuadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2624_Gherardi.pdf

Cita tipo Chicago:

Gherardi, María Magdalena. "Mutantes bacterianas termosensibles como prototipo de vacunas vivas atenuadas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2624_Gherardi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad Nacional de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"Mutantes bacterianas termosensibles como prototipo
de vacunas vivas atenuadas"

por

María Magdalena Gherardi

Directora de tesis: Dra. M. Cristina Cerquetti

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas

1993

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)
Serrano 665, 1414. Buenos Aires. Argentina.

2524
y 2



El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

M. Cristina Cerquetti, M. Magdalena Gherardi, and Daniel O. Sordelli. "Evaluation of different temperature-sensitive mutant phenotypes of *Salmonella enteritidis* as vaccine potentials". *Current Microbiology* Vol 21 (4):225-228, October, 1990.

M. Magdalena Gherardi, Verónica E. García, and M. Cristina Cerquetti. "Protective capacity of temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis* after oral or intragastric inoculation in a murine model." *Vaccine* 11:19-24, 1993.

M. Magdalena Gherardi, Verónica E. García, Valeria Brizzio Daniel O. Sordelli and M. Cristina Cerquetti. "Differential persistence, immunogenicity and protective capacity temperature-sensitive mutants of *Salmonella enteritidis* after oral or intragastric administration to mice". *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 7:161-168, 1993.

M. Magdalena Gherardi, D. O. Sordelli y M. Cristina Cerquetti.
" Importancia de la inmunidad local intestinal como parámetro de la protección otorgada por vacunas atenuadas de *Salmonella*". *Medicina* 53 (II):128, 1993.



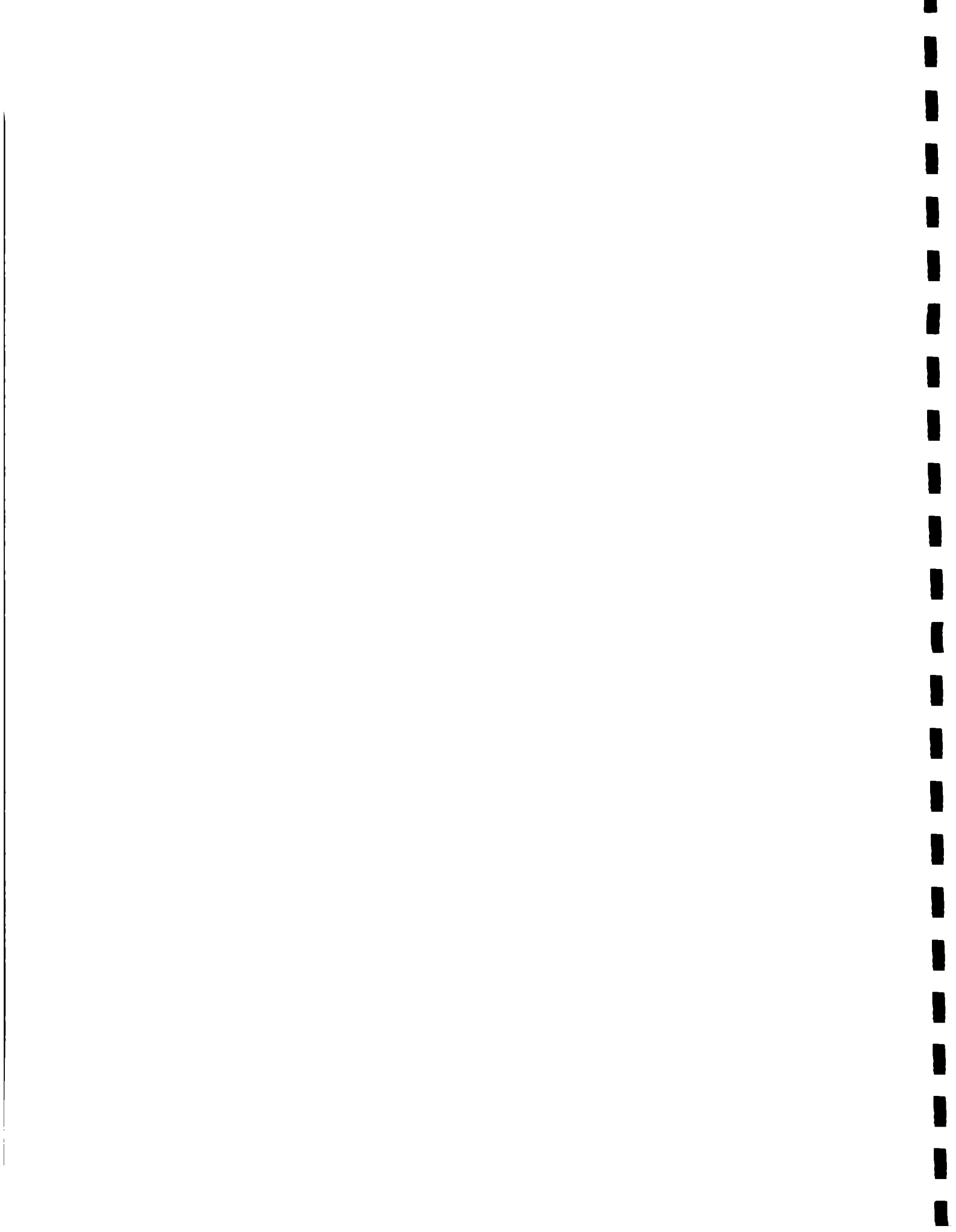
Agradezco profundamente a la Dra. M. Cristina Cerquetti por haberme acompañado durante la realización de este trabajo, brindándome todo su apoyo, dedicación y paciencia.

Agradezco a la Dra. Verónica García por haber estado siempre presente dándome su importante aporte humano y científico.

Agradezco a la Sra. M. Isabel Bernal por su incondicional y fundamental asistencia técnica para la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Daniel Sordelli por su constante apoyo haciendo posible que este trabajo se llevara a cabo.

Agradezco también, al Dr. Enri Borda y a la Dra. Martha. F. Gimeno directores del CEFYBO por permitir la realización de mi tesis doctoral en el instituto a su cargo.



" Uno se embarca hacia tierras lejanas, indaga la naturaleza, ansía el conocimiento de los hombres, inventa seres de ficción, busca a Dios. Después se comprende que el fantasma que se perseguía era Uno-Mismo."

Ernesto Sábato.



Abreviaturas

D.O. : Densidad Optica.

EGTA : Etilén glicol tetra acético.

i.g. : intragástrica.

i.p. : intraperitoneal.

IFN- γ : Interferón gama

IgA : Inmunoglobulina A

IgAs : Inmunoglobulina A secretoria

IgG : Inmunoglobulina G

IgM : Inmunoglobulina M

LB : caldo Luria.

m.o.i : multiplicidad de infección.

ml : mililitro.

p.o. : por vía oral.

PBS : Buffer fosfato salino.

PMSF : Para metil sulfonil fluoruro.

PP : Placas de Peyer.

RES : Sistema del retículo endotelial

S. enteritidis: *Salmonella enteritidis*

ts : termosensible.

TSA : Agar tripticase soja.

TSI : del inglés (triple sugar iron : hierro triple azúcar).

UFC/ml : unidades formadoras de colonias / mililitro.

UFP/ml : unidades formadoras de placas/ mililitro.

ul : microlitro.



Indice

Introducción	1-1
Infecciones bacterianas entéricas	1-1
Patogénesis de las infecciones entéricas	1-1
Impacto de las zoonosis en la salud humana	1-2
Salmonella	1-3
Salmonelosis como infección de origen alimentaria ..	1-4
Patogénesis de Salmonella	1-5
Salmonelosis no tifoidea	1-5
Fiebre tifoidea	1-5
Importancia e incidencia de las infecciones por Salmonella	1-6
Incidencia de fiebre tifoidea	1-6
Incidencia de salmonelosis	1-6
Invasión y defensas del huésped	1-7
Sistema inmune de la mucosa intestinal	1-8
IgA secretoria	1-9
Inmunidad mediada por células y otros mecanismos inmunes	1-10
Vacunas bacterianas	1-11
Vacunación en contra de enfermedades entéricas	1-12
Atenuación de cepas de Salmonella	1-12
Vacunas disponibles contra Salmonella	1-13
Vacunas contra fiebre tifoidea	1-13
Vacunas contra salmonelosis	1-14
Mutantes termosensibles	1-15
Tipos de mutantes termosensibles	1-15
Objetivo general del trabajo	1-16
Objetivos específicos	1-16
Materiales y Métodos	2-1
Resultados	3-1
Estudios para la obtención, aislamiento	



y caracterización de cepas ts de S. enteritidis ...	3-1
Análisis de diferentes cepas ts, en cuanto a su potencia como inmunógenos protectivos y a su inocuidad	3-11
Estudios tendientes a la construcción de la cepa a ser utilizada como vacuna	3-37
Estudio de los mecanismos de inmunidad en la salmonelosis mediante la utilización de cepas ts con diferentes propiedades	3-46
Discusión	4-1
Resumen	5-1
Bibiografía	6-1



1. Introducción



1. Infecciones bacterianas entéricas.

Las infecciones entéricas que derivan en enfermedades diarreicas representan uno de los principales problemas de la salud mundial. En los países del tercer mundo, ocurren por lo menos mil millones de casos por año, resultando en 5 a 10 millones de muertes. Las infecciones entéricas asociadas con diarrea también representan un tipo de enfermedad común asociada con los viajeros internacionales (Black R.E., 1990; Holmgren J. y col., 1986).

Las diarreas agudas infecciosas ocasionan más del 50% de los fallecimientos de la población infantil del tercer mundo. Se estima que mueren 4,5 millones de niños menores de 5 años en Africa Asia y América Latina por este flagelo (Snyder J., y col., 1982)

La Fundación Nacional para Enfermedades Infecciosas de E.E.U.U., realizó una clasificación de las diez enfermedades infecciosas más importantes, de acuerdo al impacto que producen en la salud pública. A las "enfermedades diarreicas" se las consideró en cuarto lugar. Dentro de esta clasificación, se encuentran varias enfermedades infecciosas, muchas de ellas son transmitidas por alimentos contaminados, dentro de las cuales está la salmonelosis (National Foundation for Infectious diseases 1988,1989).

Excepto los rotavirus que ocasionan una proporción importante de episodios de diarrea en niños menores de dos años, los principales patógenos que provocan enfermedades diarreicas agudas son bacterias. Dentro de ellas están *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y enteropatogénica (EPEC), *Shigella*, *Vibrio cholerae* 01, *Campylobacter* y *Salmonella*.

1.1. Patogénesis de las infecciones entéricas.

Los enteropatógenos bacterianos pueden causar enfermedad mediante diversos mecanismos, los síntomas resultantes pueden ser atribuidos a factores de virulencia específicos del microorganismo.

Para poder establecer una infección, un enteropatógeno debe ser capaz de colonizar el intestino; la colonización es un proceso muy complejo en el cual la adherencia de los



microorganismos al epitelio intestinal es usualmente una etapa crítica (Freter R., 1980).

Algunas especies bacterianas tales como *V. cholerae* 01, ETEC, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas hydrofila*, producen enterotoxinas que ocasionan la secreción de electrolitos provocando diarreas acuosas y deshidratación. Otras especies como *E. coli* entero-hemorrágica y *Clostridium difficile* producen citotoxinas generando colitis hemorrágicas. Algunas especies del género *Shigella* y *E. coli* enteroinvasiva invaden el epitelio dañando la mucosa intestinal, esto ocasiona fiebre y diarrea con mucus y sangre. *Salmonella* no tifoide, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia entero-colitica*, producen una infección invasiva a través del epitelio intestinal, inflamación de la lamina propia y a veces bacteriemia. Por otro lado *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* invaden la lámina propia diseminándose por el sistema linfático y circulación (Holmgren J. y Svennerholm A.M., 1992)

2. Impacto de las zoonosis en la salud humana.

La mayoría de las enfermedades humanas que han surgido recientemente son zoonosis, ya que los reservorios animales naturales representan una fuente más frecuente de nuevos agentes de enfermedades humanas, que la aparición súbita de un nuevo agente. Los factores que explicarían la aparición de enfermedades zoonóticas son complejos, involucrando mecanismos a nivel molecular tales como cambios y movilización génica y modificaciones del estado inmune de los individuos y poblaciones. El aumento del mercado internacional en animales vivos y alimentos ha favorecido la diseminación de infecciones entéricas zoonóticas de una manera impredecible. De acuerdo con la Organización Panamericana de Salud varias de estas enfermedades se han incrementado en casi un 100% en pocos años. El programa de la Organización Mundial de la Salud para el control de las infecciones e intoxicaciones alimentarias en Europa reportó una incidencia de más de 1200 casos por millón de habitantes por año.

Dentro de estas infecciones la salmonelosis ha comenzado a ser un problema principal en el control de la higiene de alimentos y zoonosis. Varios serotipos de *S. enteritidis*, transmitidos por huevos contaminados se han convertido en los agentes causales de las



salmonelosis que se incrementan en los E.E.U.U. y en varios países europeos (WHO reports, 1989).

3. *Salmonella*.

El género *Salmonella* comprende a bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos, agentes etiológicos de diferentes enfermedades referidas colectivamente como salmonelosis. La salmonelosis humana se puede dividir en cuatro síndromes: gastroenteritis, fiebre entérica, bacteriemia con o sin gastroenteritis, y el estado carrier asintomático.

La taxonomía de *Salmonella* es complicada por haber utilizado diferentes nomenclaturas a lo largo de los años. El esquema antigénico de Kauffmann-White dió origen a más de 2000 especies de *Salmonella* ya que a cada tipo antigénico nuevo descubierto se lo describió como una especie diferente. Luego Ewing y sus colaboradores propusieron que hubiese sólo tres especies : *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, y *S. typhi*. El resto de las especies o serotipos se definieron como serotipos de *S. enteritidis*. Esta designación de 3 especies fue utilizada por centros de referencia de E.E.U.U. desde 1972 hasta 1983. , pero no fue utilizado por otros países. Estudios genéticos revelaron que todas las *Salmonella* y organismos clasificados en el género *Arizona* provenían de la misma especie en un sentido genético filogenético y evolutivo. Se considero que cualquier diferencia en tipos antigénicos, reacciones bioquímicas o de distribución geográfica o de huésped se debía a divergencias dentro de la misma especie: *S. entérica*. Dentro de esta especie se dividen 6 grupos en base a estudios de hibridación del DNA. El primer subgrupo comprende a *Salmonella entérica* subespecie entérica, el resto de los subgrupos comprenden a las subespecies: *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hacetanae*, *bongori* e *indica*. La mayoría de los aislamientos de humanos se encuentran en el subgrupo 1. El principal uso de estas designaciones sería en publicaciones científicas (Zinser y col.). *S. typhi* está remarcadamente adaptada al huésped humano, el que representa el único reservorio natural de infección. En contraste, los casi 2000 serotipos de *S. enteritidis* que causan la mayoría de los casos de gastroenteritis debida a *Salmonella*, no están adaptados a un huésped en particular,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

estando presentes en poblaciones animales domésticas y naturales (E.A. Groisman y col.).

3.1. Salmonelosis como infección de origen alimentario.

Anualmente se registran cientos de enfermedades atribuibles a la ingestión de alimentos contaminados. Los microorganismos tradicionalmente involucrados en estas infecciones han sido *Salmonella* spp, *Clostridium perfringes* y *Staphylococcus aureus* (Potter, M.E., 1992). Otros patógenos causantes de enfermedades contraídas por alimentos son *Campylobacter* y *E. coli* serotipo O 157:H7 (considerado un patógeno nuevo) (Griffin, P.M., 1991).

La salmonelosis es un importante problema de salud en todas partes del mundo. Mientras que el número de casos de fiebre tífica o paratífica disminuye en la población de las grandes ciudades, el de las infecciones alimentarias provocadas por *Salmonella* aumenta, debido principalmente al cambio de hábitos y a deficiencias en su elaboración, almacenamiento y distribución (Eiguer, T. y col., 1990). En los años recientes en E.E.U.U. se han reportado 45,000 aislamientos anuales de *Salmonella*. De los brotes de *Salmonella* el vehículo alimentario más importante resultó el pollo (45% de los casos), seguido de carne vacuna (25%) y de la carne de cerdo (19% de los casos) (Potter, M.E., 1992). El procesamiento de los alimentos de cualquier tipo ofrece la oportunidad para que el alimento pueda ser contaminado. Para poder prevenir las salmonelosis de origen alimentario es fundamental asegurar la salud animal en especial la avícola asegurando el menor nivel posible de colonización por potenciales patógenos alimentarios. (Potter, M.E., 1992).



3.2 Patogénesis de *Salmonella*.

3.2.1 Salmonelosis no tifoidea.

La salmonelosis humana provocada por cepas no tifoideas de *Salmonella* generalmente ocurre como un episodio de enterocolitis que termina resolviéndose a los 5 días de comenzada la enfermedad. Seguido de un período de incubación, de 8h a 72h, comienzan los síntomas tales como dolor abdominal, náuseas, diarrea, también pueden presentarse vómitos dolores de cabeza y falta de apetito (Johnson W.D. y Pape J.W., 1983). Salvo *S. choleraesuis* y *S. dublin* que muestran una predilección para la diseminación sistémica, la salmonelosis no tifoidea generalmente está restringida al tracto intestinal, donde provoca una reacción inflamatoria de leucocitos polimorfonucleares en la mucosa de la lámina propia (Hornick R.B., 1988).

3.2.2 Fiebre tifoidea.

La fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica, con escasa o nula participación del intestino, y no debe ser confundida con el tifus provocado por *Rickettsiae*. Generalmente se contrae por la ingestión de agua o alimentos contaminados. El microorganismo ingresa al cuerpo pasando a través del epitelio del intestino delgado al sistema reticuloendotelial (RES), donde la bacteria se multiplica dentro de las células fagocíticas mononucleares en el hígado, bazo nódulos linfáticos y Placas de Peyer (PP). La enfermedad en general es autolimitada los síntomas pueden perdurar hasta 4-5 semanas, en algunos casos pueden ocurrir severas hemorragias intestinales con peritonitis.



3.3 Importancia e incidencia de las infecciones por *Salmonella*.

3.3.1 Incidencia de fiebre tifoidea.

Con respecto a la incidencia de la fiebre tifoidea en nuestro país durante el período 1990-92 se registraron 888 casos, las tasas más altas se encontraron en Catamarca, Salta, Jujuy y Entre Ríos (Boletines epidemiológicos nacionales 1990, 1991, 1992).

3.3.2. Incidencia de salmonelosis.

Los datos de la Organización Mundial de la Salud sobre salmonelosis en humanos indicaron que entre 1979-87 las infecciones causadas por *S. enteritidis* incrementaron tanto en Europa como en América (Rodríguez D.C. y col., 1990).

Se estima que la fuente principal de las salmonelosis son los alimentos de origen animal, y en particular, las carnes rojas y blancas y productos sin pasteurizar preparados con huevos (Padula E. A. y col., 1988). El comercio internacional de piensos y alimentos hace que se tienda a la prevalencia de un serotipo en el orden mundial: *S. enteritidis* (Fernández M.C. y Frade A.H.).

En nuestro país, los estudios de las diarreas infantiles muestran que *Salmonella* se aísla en alrededor de un 8% de los casos (Vidal P. y col., 1988). En un estudio epidemiológico en el que se evaluó la frecuencia de enteropatógenos aislados durante 1982-87 en 18 provincias de la Argentina, de 8466 cepas analizadas se observó una gran prevalencia de *Salmonella* (2882 cepas) de origen humano (Vidal y col., 1988).

En la Argentina durante el período de 1986-88 se registraron 39 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos producidos por *Salmonella enteritidis*. En este período fueron afectadas más de 2500 personas en distintas provincias, caracterizándose el cuadro clínico por síntomas graves tales como fiebre, diarrea, vómitos y gran deshidratación. La principal fuente de infección se relacionó con la ingestión de huevos crudos, consumidos en forma de mayonesa



artesanal. Durante 1989 hubo un aumento en el número de brotes registrándose un total de 23 (Eiguer T. y col., 1990).

En un estudio realizado en el hospital de niños "R. Gutierrez" de Santa Fé durante el período 1981-1990, se aislaron 20 serovariedades de *Salmonella*. En 1981 el 98% de las cepas correspondió a *S. typhimurium*, a partir de 1986 se comenzó a aislar *S. enteritidis*, la que en 1990 predominó notablemente (36 sobre un total de 48) (Mayoral C. y col., 1992). Con respecto a los datos de otros países, en los E.E.U. en 1990 *S. enteritidis* se convirtió en el serotipo predominante de las infecciones humanas por *Salmonella*, superando a *S. typhimurium* (Centers for Disease Control, 1991). El aumento de las infecciones por *S. enteritidis* en humanos está asociado en parte con cáscara de huevos (Telzak E.E. y col., 1990). Gallinas con infecciones subclínicas del tracto reproductivo pueden transmitir la bacteria a los huevos intactos (Humphrey T.J. y col. E.E. U.U.). Entre 1985 y 1989, el 78% de los brotes de *S. enteritidis* en los que se identificó un vehículo alimentario este contenía huevos crudos o parcialmente cocidos (Tauxe R. y col., 1990)

3.4 Invasión y defensas del huésped.

La salmonelosis refleja el resultado de la confrontación entre las defensas del huésped y los determinantes de virulencia bacterianos. Las células de *Salmonella* ingeridas deben superar varios mecanismos de defensa, no específicos que operan a nivel del tracto intestinal (Pavia y col, 1990). Si la bacteria logra evadir estos primeros mecanismos de defensa, se une a receptores de las células epiteliales mediante sus fimbrias de tipo 1. El complejo patógeno-receptor es internalizado en una vesícula, este proceso que se denomina endocitosis, requiere de microfilamentos funcionales del huésped y de una síntesis bacteriana activa tanto proteica como de ácido ribonucleico (Williams y col., Finlay y Falkow, 1989). Las bacterias atrapadas en las vacuolas pueden replicarse y producir enterotoxinas (Finlay y Falkow, 1988), luego ocurre una translocación citoplasmática de las vacuolas infectadas hacia la región basal de la célula epitelial,



liberándose una gran cantidad de bacterias activas en la lámina propia. Las salmonellas no tifoideas, generalmente generan una respuesta inflamatoria cuya función es la de circunscribir la infección. La habilidad de *Salmonella* de sobrevivir y poder replicar dentro de macrófagos deriva en parte por la producción bacteriana de enzimas tales como superóxido dismutasa, catalasa, y peróxido. La acción bactericida de fagocitos, sumada a la lisis generada por linfocitos T killer y y la activación del complemento sérico circunscriben la infección no tifoidea a una manifestación local intestinal, sin participación sistémica. Los eventos descritos también ocurren en una infección por *S. typhi*, pero en este caso la enfermedad es mucho más severa y genera una mayor respuesta inmune. *S. typhi* puede ingresar al torrente sanguíneo directamente a través de los capilares de los tejidos, o como resultado del drenaje linfático de los tejidos dentro del conducto torácico y posterior entrada a la vena porta. Luego los microorganismos migran al hígado, bazo o médula ósea donde replican dentro de macrófagos residentes. En el tránsito de la bacteria desde el intestino hacia el conducto torácico, varias células de *S. typhi* son filtradas a través de los nódulos linfáticos vecinos, donde se generan respuestas inmunes específicas. Estas respuestas inmunes involucran una respuesta humoral como celular (D'Aoust J. Y., 1991).

4. Sistema inmune de la mucosa intestinal.

El intestino es el órgano de mayor tamaño del sistema inmune del organismo. Comprende el 70%-80% de las células productoras de anticuerpos, y produce más IgA secretoria (50-100 mg/Kg de peso corporal/ día) que la producción total de IgG en el cuerpo (aprox 30 mg/kg/día) (Brandzaeg P., 1989). El sistema inmune local intestinal posee dos funciones principales: la protección en contra de infecciones entéricas, y la protección en contra de la captación y/o respuesta inmune contra antígenos alimentarios que pueda ser no beneficiosa para el individuo (Hanson L.A., 1989).

Los antígenos que son administrados en forma oral son tomados en las PP del intestino,



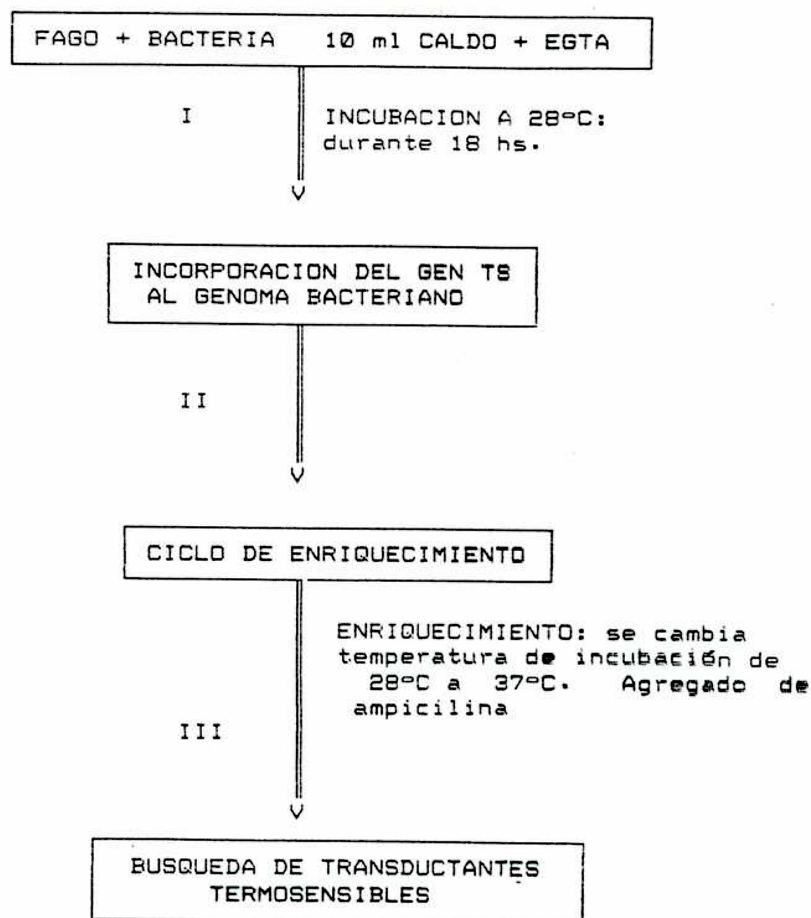
tarde.

4.2. Ensayo de placa para la titulación de los lisados transductores.

La determinación del título de los lisados transductores obtenidos según la metodología descrita en el punto anterior, se realizó mediante un ensayo de placa. Para ello se realizó un cultivo de la cepa parental *S. enteritidis*, en medio LB + Cl_2Ca 2.5 mM a 37°C con agitación, a partir de un cultivo de 18 hs de incubación crecido en LB. El cultivo se incubó hasta una DO correspondiente a 2×10^8 UFC/ml. Por otro lado se hicieron diluciones seriadas al décimo de los respectivos lisados. Dichas diluciones se llevan a cabo con caldo P22 (cada 20 ml: LB 15 ml, sales E: 5 ml, glucosa 40%: 0.1ml, Cl_2Ca 1M: 0.05 ml). En un tubo de ensayo se mezclaron 0.3 ml del cultivo con 0.1 ml del lisado diluído, la mezcla de fago y bacteria se incubaron en estufa a 37°C durante 15 min para permitir la adsorción del fago a la bacteria. Luego se agregó 3 ml de agar L.B. al 0.5% a cada uno de los tubos, la mezcla se volcó sobre una placa con una base de agar LB + Cl_2Ca . La incubación de las placas se realizó en estufa a 37°C.

4.3. Ensayo de transducción.

Se realizó un cultivo de la cepa receptora, en forma similar a la descrita en el ensayo de placa. Las m.o.i utilizadas fueron del orden de 1 y 10, en cada experimento. Los volúmenes de fago y bacteria fueron de 0.2 ml cada uno, las mezclas de fago y bacteria se incubaron 15-20 min a 37°C, luego se les agregó 10 ml de LB fresco + etilén-glicol-tetra-acético (EGTA) en una concentración final: 10 mM. La metodología que se siguió en los pasos posteriores se describe en el siguiente esquema.



*El momento del agregado de la ampicilina (0.2 mg/ml) varió en base al tiempo de crecimiento residual, a la temperatura restrictiva, de la mutación ts a transferir.

4.4. Búsqueda de las transductantes:

Para facilitar el aislamiento de las transductantes ts, se diseñó una metodología que consistió en una vez finalizado el ciclo de enriquecimiento y los lavados, realizar siembras de la dilución adecuada (aprox. 100 UFC/placa), que se incuban a 28°C durante 18 hs, hasta que las colonias presentan el tamaño de una cabeza de alfiler. Luego se cambió la temperatura de incubación de las placas a 37°C, y se continuó incubándolas durante 24 hs más (Ver esquema). Para cada una de las mutaciones ts que se transdujeron, se realizaron placas de screening control con una mezcla de la cepa salvaje y la cepa ts original.

4.5. Caracterización en medio líquido de las mutantes ts "limpias".

Las mutantes ts transferidas al genoma salvaje fueron caracterizadas con respecto a su crecimiento en medio líquido.

Las curvas de crecimiento se realizaron a partir de diluciones (1/50), de cultivos de 18 hs a 28°C como se describió en el punto 3.2. Las curvas de cada una de las mutantes ts "limpias" se realizaron en paralelo con sus respectivas cepas ts parentales. De las curvas de crecimiento obtenidas se calcularon el tiempo medio de generación, índice de duplicación y tiempo de crecimiento residual, como se describió anteriormente. También se determinó el índice de reversión de las mutantes ts transducentes, en cada experimento se recalculó el índice de reversión de las mutantes ts originales.

4.6. Aislamiento de las mutantes Thy- y Thy- ts.

Las mutantes Thy- (auxotrofia para timidina) se aislaron según (Ahmed Z.U. y col., 1990). Células de la cepa salvaje cultivadas durante 18 hs en TSB (con 200 ug/ml de timina) se sembraron en placas de TSA, conteniendo 200 ug/ml de timina y 30 ug/ml de trimetoprim (agente selectivo). Las colonias resistentes a trimetoprim, se reaislaron en placas con el agente selectivo y luego se analizaron en medio mínimo para determinar el requerimiento de timina. Para el aislamiento de la doble mutante Thy- ts, se siguieron los procedimientos antes descriptos, pero utilizando la cepa E/1/3 L (cepa *S. enteritidis* con la mutación ts E/1/3 transferida mediante transducción con el fago P22) y la cepa E/1/3.

5. Estudios en animales.

Se emplearon ratones de las cepas exocriadas Swiss y CF1, y de la cepa endocriada

Balb/C; los cuales llevaron un régimen de alimentación normal, y fueron controlados diariamente.

5.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) para *S. enteritidis*.

Para el cálculo de la DL50 i.p., grupos de 10 ratones ya sea de las cepas exocriadas Swiss y CF1, como de la cepa endocriada Balb/c fueron inyectados i.p. con un volumen de 0.2 ml de suspensión bacteriana de diferente densidad. Para el cálculo de la DL50 oral grupos de 10 animales fueron privados de agua durante un período de 4-5 horas y luego se les dió a tomar suspensiones bacterianas en solución fisiológica con CO_3HNa al 3 % en un volumen de 0.02 ml. La mortalidad de los animales fue registrada diariamente, durante 30 días. Tanto la DL50 i.p. como oral se calcularon mediante el método de Reed y Muench.

5.2. Inmunización y desafío.

5.2.1 Vía intraperitoneal.

En los primeros ensayos de protección el esquema de inmunización que se adoptó, consistió en la inoculación por vía i.p. de los animales con dosis variadas (10^5 a 10^8 UFC/animal) de las mutantes ts, a los 14 días de la inmunización se realizaron desafíos, por vía i.p., con distintas dosis de la cepa salvaje virulenta.

Una vez determinada la dosis inmunizante óptima por vía i.p., se realizaron ensayos de protección inmunizando diferentes grupos de animales con distintas mutantes ts. Se utilizaron dos esquemas de inmunización uno consistió en administrar dos inmunizaciones espaciadas por una semana realizando el desafío a los 7 días. El otro esquema adoptado se realizó como administrando una sola inmunización. A los 14 días se realizó el desafío con la cepa virulenta por vía i.p. en los diferentes grupos. En todos los experimentos de protección i.p. se determinó

la sobrevivencia de los animales durante los 14 días posteriores al desafío.

5.2.1. Vía oral.

Se utilizaron grupos de 8-10 ratones los que se inmunizaron por vía p.o. con una dosis de 10^{10} UFC/animal de diferentes cepas ts. La inoculación de los animales p.o. se llevó a cabo como se describe en (R.Curtiss y S.M. Kelly, 1987), privándolos de ingerir agua durante un período de 4 a 5 hs, y luego dándoles a tomar 10 ul de solución salina + CO_3HNa al 10%, luego se les dió la suspensión bacteriana, en un buffer salino con gelatina, en un volúmen de 30 ul. Se siguieron diferentes esquemas de inmunización, el Grupo a: recibió dos inmunizaciones p.o. en los días 0 y 4; Grupo b, recibió dos administraciones p.o. en los días 0 y 4 más una inoculación i.p. (10^7 UFC/animal) en el día 18. Los animales se desafiaron al día 25 por la ruta oral con 100 a 250 DL50 de la cepa virulenta de *S. enteritidis*.

5.2.3. Vía intragástrica.

En estos experimentos los animales se inmunizaron por la ruta i.g. recibiendo una o dos dosis en los días 0 y 7, y se desafiaron por vía oral con 100 DL50 de la cepa virulenta, 21 días después de la última inmunización. La inoculación de los animales por vía i.g. se realizó utilizando una sonda unida a una jeringa por una aguja sin punta, el volúmen del inóculo en este caso fue de 0.5 ml.

En todos estos experimentos se determinó la mortalidad de los animales durante un período de 30 días.

5.2.4. Determinación del grado de colonización esplénica post-desafío.

Como un parámetro de la protección se determinó la colonización esplénica por la cepa virulenta luego del desafío. Cinco a ocho días luego del desafío con la cepa virulenta, ya sea en forma i.p. o p.o. se determinó el grado de colonización esplénica en los grupos inmunizados

y en un grupo control. Grupos de 5 animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron los bazo que fueron homogenizados en 3 ml de solución salina, luego se sembraron diluciones apropiadas en placas de TSA.

5.3. Permanencia de las cepas mutantes ts y de la cepa parental en diferentes órganos.

5.3.1. Inoculación de los animales.

Estos ensayos consistieron en la inoculación p.o con 10^9 UFC/animal ó por vía i.g con 10^{10} UFC/animal de diferentes mutantes ts y de la cepa salvaje. La infección de los animales p.o. e i.g. se llevó a cabo como se describió en los puntos 5.2.2 y 5.2.3.

5.3.2. Determinación del grado de colonización y permanencia.

La colonización y la permanencia de las cepas ts y parental en PP y bazo y la excreción de las mismas en heces, se determinaron durante los primeros 4 días después de la inoculación p.o.. En el caso de la inmunización i.g. se evaluó la permanencia de las cepas ts a los 1, 4, 7, y 15 días luego de la administración.

En ambos experimentos grupos de 5 animales se sacrificaron en cada tiempo. Las PP ubicadas a lo largo del intestino delgado y el bazo

de cada uno de los animales se removieron en forma ascéptica. Las PP y el bazo se homogeneizaron en 0.6 y 3 ml de solución salina, respectivamente. Los homogenatos se diluyeron apropiadamente en solución salina y se sembraron en medio de cultivo sólido selectivo, agar para *Salmonellas* y *Shigellas*, (SS) ó líquido de enriquecimiento (caldo Selenito) según el caso.

También se determinó la permanencia esplénica de las mutantes al primer y quinto día de la inoculación i.p con 10^7 UFC/animal. Los bazo se removieron y homogenizaron como

se describió anteriormente.

Se evaluó la excreción de las cepas ts en heces, que se homogeneizaron en salina, y se sembraron diluciones apropiadas en placas de agar SS. Las colonias con apariencia de *Salmonella* que aparecieron en las placas de agar SS se cultivaron en picos de flauta de TSI, y fueron ensayadas con respecto a la sensibilidad a la temperatura y a la presencia del Factor 9.

6. Respuesta inmune inducida por las mutantes ts.

6.1. Determinación de anticuerpos específicos contra S.enteritidis

6.1.1. Obtención de las muestras.

Las muestras de plasma se obtuvieron sangrando a los animales del seno retroorbital, mediante la utilización de capilares heparinizados. La obtención de las muestras de los lavados intestinales, se realizó como se describió previamente (Elson C.O. y col., 1984). Se extrajeron los intestinos delgados a través de los que se pasaron 2 ml de una solución de un inhibidor de tripsina de soja (0.1 mg/ml), en EDTA 50 mM. El líquido de lavado se diluyó al medio con buffer de fosfatos salino (PBS), el material se dispersó muy bien con una varilla de vidrio y luego se mezcló vigorosamente. La suspensión fue centrifugada 10 min a 3500 rpm, por cada ml del sobrenadante obtenido se agregaron 10 ul de fenil-metil- sulfonil-fluoruro (PMSF) 100 mM en 95% de etanol. Se centrifugó el sobrenadante a 15.000 rpm durante 20 min, al sobrenadante se agregó PMSF en la misma proporción que en el paso anterior y azida sódica al 1% (10ul cada 1 ml). Finalmente se mantuvo 15 min en hielo y se le agregó suero fetal bovino (100ul cada 1 ml).

6.1.2. Preparación del antígeno.

Para los ensayos de ELISA y ELISPOT se utilizó como antígeno la bacteria salvaje muerta que se preparó tratando un cultivo 30 min a 100°C. Las células muertas se recuperaron por centrifugación, se lavaron con solución salina y se resuspendieron en buffer de bicarbonato de sodio, en un volumen tal que proporcionara 2×10^7 bacterias en 50 ul.

6.1.3. Ensayo de ELISA.

Se determinaron inmunoglobulinas G (IgG), M (IgM), y A (IgA) específicas contra células enteras de *S. enteritidis* usando una modificación del método ELISA (del inglés: Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) descrita previamente (Sordelli D.O. y col., 1987). Se utilizaron microplacas de 96 pocillos (Immulon 2 plates, Dynatech, Alexandria, VA). Las microplacas se recubrieron con el antígeno colocando 50ul en cada pocillo y se incubaron 18 horas a 4°C. Luego se lavaron con solución de lavado conteniendo 1% de seroalbúmina bovina y 0.05% de Tween 20. Posteriormente se agregó solución bloqueante con seroalbúmina al 2 % y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente seguido de tres lavados. Se adicionaron luego 50 ul de las diluciones seriadas de las muestras de sueros o líquidos de lavado intestinal y las placas se incubaron durante 60 min a 37°C. Los anticuerpos no unidos fueron lavados y luego se hizo una incubación con inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas a fosfatasa alcalina, durante 60 min a 37°C. Las microplacas se lavaron nuevamente, se adicionó el sustrato de la enzima (p-nitrofenil fosfato) y se lo incubó durante 30 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz. La intensidad de la reacción se midió en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm.

6.2. Determinación de células productoras de anticuerpos específicos contra *S. enteritidis* (ELISPOT).

Se investigó la presencia de células secretoras de anticuerpos específicos contra *S. enteritidis* usando el ensayo ELISPOT (del inglés: Enzyme-Linked-Immunospot) en fase sólida

descrito previamente (Sedgwick J.D. y Holt P.G., 1983; Czerkinsky C. C. y col., 1983). Placas de 24 pocillos (Linbro Chemical Corp. Inc., USA) se recubrieron con el antígeno colocando 0.5 ml de la suspensión celular en cada pocillo y haciendo una incubación de 18 horas a 4°C. Las placas cubiertas se lavaron con solución de lavado conteniendo PBS y 0.05% de Tween 20, luego se adicionaron diluciones de las suspensiones celulares (provenientes de bazo ó de ganglio mesentérico) en un volúmen de 0.5 ml y las placas se incubaron durante 60 min a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células que no se unieron se removieron, realizando dos lavados con PBS-TWEEN. Luego se realizó una incubación con inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas a fosfatasa alcalina, durante 60 min a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente, se adicionó 0.5ml de la mezcla agar sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) y luego de un minuto a temperatura ambiente para permitir la solidificación, se incubaron 30 a 60 min a 37°C. Las células productoras de Ig específicas aparecen como puntos azules los que fueron enumerados invirtiendo las placas sobre una fuente de luz.

6.3. Estudios de inmunidad celular.

6.3.1. Prueba de estimulación de linfocitos.

Se extrajeron linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (LGM) y de bazo (LB), de animales inmunizados por via i.g. y de animales controles de acuerdo con la técnica descrita previamente (Petersen JW, y col., 1992). Los linfocitos de LGM y LB se prepararon en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con L-glutamina , suero fetal bovino al 10% (Gibco) y con antibióticos (Gentamicina 50 ug/ml). Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en un volúmen apropiado de medio RPMI completo. Luego se cultivaron en microplacas de 96 wells (Gibco,NY) por triplicado.

Los cultivos se incubaron durante 3 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Veinte horas antes de cosechar las células, se adicionó a cada pocillo 0.7 uCi de [³H]-timidina.

6.3.2. Cuantificación de IFN- γ .

Las células provenientes de ganglio mesentérico y bazo se aislaron y cultivaron como se describió en 6.3.1. Luego de 72 h de cultivo, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se conservaron a -70°C . El IFN- γ en los sobrenadantes se cuantificó utilizando un kit para IFN- de ratón (Genzyme, Cambridge, Mass).

7. Consideraciones estadísticas.

Las consideraciones estadísticas de muestras sin distribución normal se llevaron a cabo por medio del contraste de la suma de rangos usando el programa RANKTEST del paquete estadístico EPISTAT (Tracy L. Gustafson, MD, Round Rock, Texas, USA). Para aquellos experimentos en que se obtuvieron datos con distribución normal, se utilizó el test t de Student del mismo paquete estadístico. Para la comparación estadística de proporciones, se utilizó el test exacto de Fisher, también del paquete estadístico EPISTAT.

3. Resultados

Estudios para la obtención, aislamiento y caracterización de cepas ts de *S. enteritidis*.

Objetivo 1

Obtención y aislamiento de mutantes termosensibles (ts) de *S. enteritidis* mediante mutagénesis con luz U.V. seguido de ciclos de enriquecimiento con Ampicilina.

1. Determinación de las condiciones experimentales.

1.1. Tiempo de exposición a la irradiación UV.

Se hicieron ensayos para determinar la viabilidad de la cepa salvaje de *S. enteritidis*, luego de la irradiación con UV. En la TABLA 1 se muestran los resultados de dicho estudio. Como puede observarse, una exposición tan corta como 30 seg produjo una muerte de 99,60 %.

TABLA 1 Viabilidad de *Salmonella enteritidis* luego de la irradiación luz ultravioleta*

Tiempo de irradiación (seg)	Concentración bacteriana (UFC/ml)	MORTALIDAD (%)
0	1.7×10^8	0
30	4×10^6	99.60
60	6×10^5	99.60
90	3×10^5	99.80
120	1.5×10^5	99.90
180	5×10^4	9.97

*La irradiación se realizó bajo lampara UV de 30 W a una distancia de 85 cm.

A fin de favorecer la producción de mutaciones se analizaron distintas soluciones para la resuspensión del cultivo bacteriano. Los componentes presentes en el caldo de cultivo absorben la luz UV, y por consecuencia se disminuye indirectamente la acción de ésta sobre la bacteria. Específicamente se utilizaron soluciones salinas simples, SO_4Mg 0.1 M y ClNa 0.15 M. No se encontraron diferencias entre las dos soluciones.

1.2. Concentración de Ampicilina para el ciclo de enriquecimiento.

Los experimentos de mortalidad bacteriana por ampicilina demostraron que una concentración del antibiótico de 0.2 mg/ml provocó una mortalidad del 99.99% de la población bacteriana. Esta concentración se utilizó en todos los ciclos de enriquecimiento utilizados.

2. Obtención de las mutantes ts.

Los experimentos de mutagénesis fueron descritos en detalle en Materiales y Métodos.

2.1. Aislamiento

El aislamiento de las mutantes se realizó sembrando en réplica, las colonias obtenidas de los experimentos de mutagénesis. Se utilizaron dos placas una incubada a 28°C y otra a 37°C, de las que se seleccionaron las colonias que presentaron un crecimiento diferencial [FIGURA 1].

De dos experimentos de mutagénesis se obtuvieron un total de 79 colonias con características de termosensibilidad en su crecimiento, lo que representó en promedio un 4 % del total de las colonias sembradas. Todas las mutantes fueron analizadas de acuerdo a su crecimiento en medio sólido y en base a estas características se preseleccionaron 40 mutantes, éstas fueron a su vez analizadas respecto a su crecimiento en medio líquido.

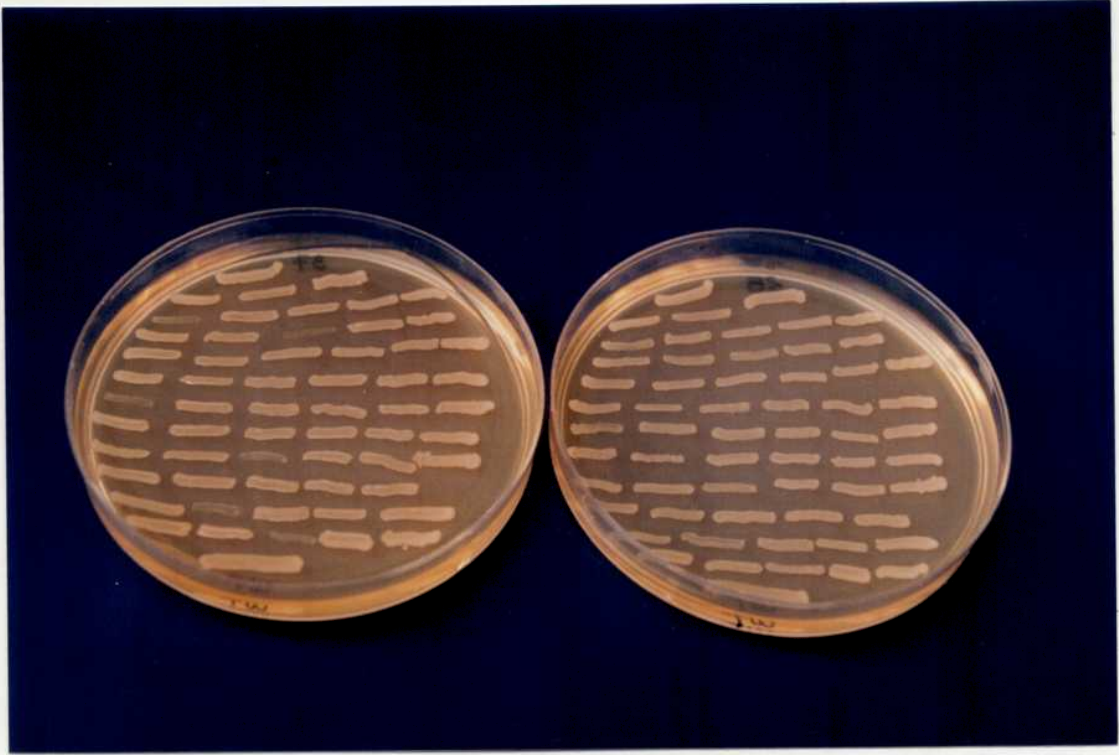


Figura 1. Siembra en réplica de colonias obtenidas de un experimento tipo de mutagénesis. La placa de la derecha fue incubada a 28°C y muestra el crecimiento de la totalidad de las estrías, comparable al crecimiento de la cepa parental (última estría). La placa de la izquierda fue incubada a 37°C y en ella puede observarse la falta de crecimiento de varias mutantes termosensibles.

Objetivo 2

Caracterización de las mutantes ts en base a su crecimiento en medio sólido y mediante cultivos en medio líquido. Evaluación de la frecuencia de reversión de las mutaciones ts al fenotipo salvaje.

2.1. Selección de las mutantes ts en base a su crecimiento en medio sólido.

Cada una de las estrías que presentó un crecimiento diferencial (FIGURA 1), fue sembrada en réplica a las dos temperaturas, utilizando un cuarto de placa (FIGURA 2). De ésta manera se consiguió el aislamiento de cada mutante y una primera caracterización de su crecimiento en medio sólido.



Figura 2. Aislamiento en réplica de cuatro mutantes termosensibles obtenidas en experimentos de mutagénesis. La placa de la derecha proviene de una incubación a 28°C, mientras que la placa de la izquierda fue incubada a 37°C.

En esta etapa se descartaron las bacterias que presentaron un crecimiento excesivo a la temperatura restrictiva. Las mutantes seleccionadas se conservaron a -20°C en DMSO (dimetil sulfóxido) hasta su caracterización en medio líquido. Se caracterizaron 79 mutantes mediante el crecimiento en medio sólido de ellas se seleccionaron 21 mutantes para estudios posteriores. En la Tabla 2 se describe como ejemplo el crecimiento de algunas mutantes.

TABLA 2. Crecimiento en medio sólido de mutantes de diversos fenotipos

MUTANTE	CRECIMIENTO A 37°C	CRECIMIENTO A 28°C
C/7/6	origen ^a y transversal ^b	muy bueno
C/2/2	origen, transversal y primer línea ^c	muy bueno
C/5/32	origen y transversal	muy bueno
H/1/6	escaso en origen	muy bueno
H/2/26	sin crecimiento	muy bueno
D/2/5	origen, transversal, primera y segunda línea.	muy bueno
E/1/3	origen y transversal	muy bueno

^aRefiere a la estría original de la siembra en placa de agar.

^bRefiere a la primer estría transversal de la siembra en placa de agar.

^cRefiere a la segunda estría transversal de la siembra en placa de agar.

2.2. Crecimiento en medio líquido

Luego del análisis del punto anterior se seleccionaron tres mutantes de diferentes características, las que se cultivaron en medio líquido a las temperaturas permisiva o restrictiva. Se construyeron curvas de UFC vs tiempo y DO vs tiempo, y se comprobó la correlación directa

entre UFC y DO para las dos temperaturas de incubación. En las Figuras 3, 4 y 5 se pueden ver las curvas de crecimiento de las mtantes H/2/26, C/2/2 y E/1/3.

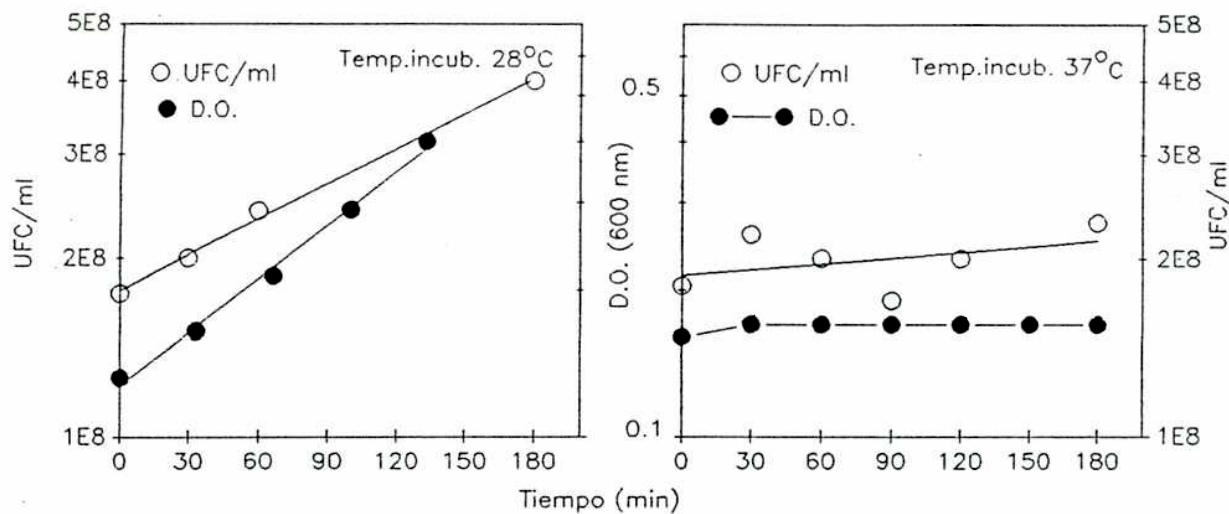


Figura 3. Curvas de crecimiento de la mutante H/2/26 a 28°C y a 37°C, cuadros de la izquierda y de la derecha respectivamente. A los tiempos indicados se midió la absorbancia a 600 nm y se tomaron alícuotas que se diluyeron apropiadamente para determinar la viabilidad bacteriana.

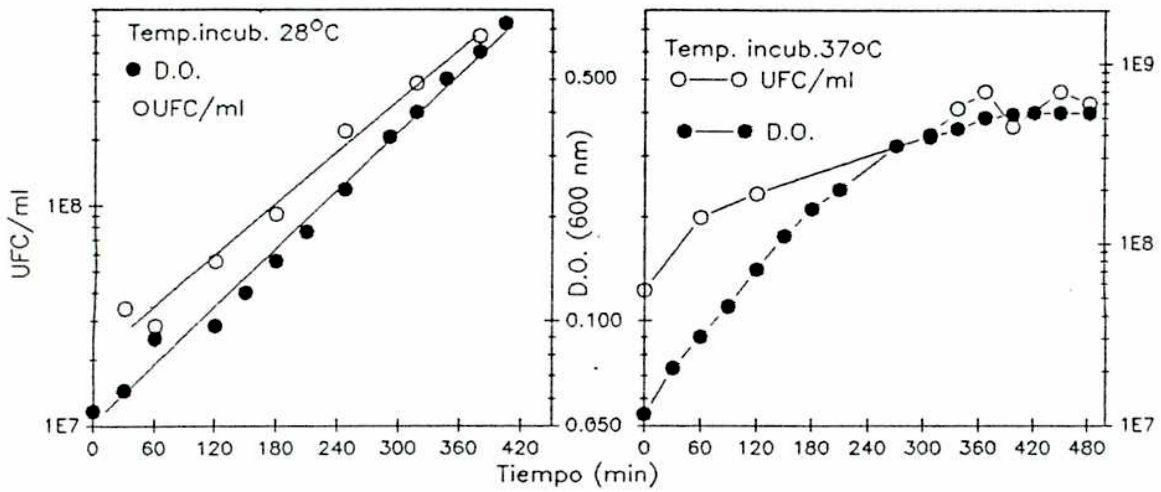


Figura 4. Curvas de crecimiento de la mutante C/2/2 a 28°C y a 37°C, cuadros de la izquierda y de la derecha respectivamente. A los tiempos indicados se midió la absorbancia a 600 nm y se tomaron alícuotas que se diluyeron apropiadamente para determinar la viabilidad bacteriana.

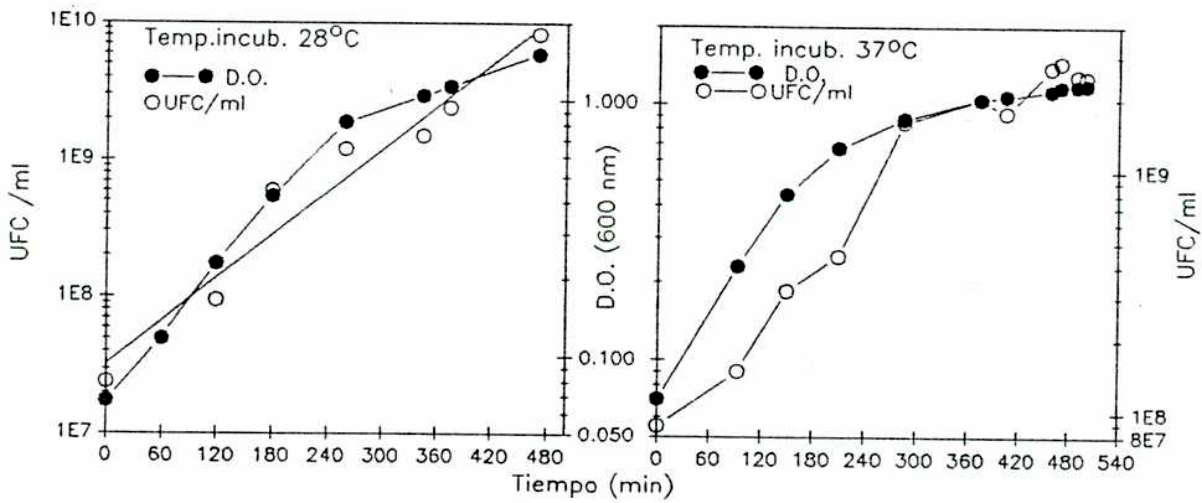


Figura 5. Curvas de crecimiento de la mutante H/2/26 a 28°C y a 37°C, cuadros de la izquierda y de la derecha respectivamente. A los tiempos indicados se midió la absorbancia a 600 nm y se tomaron alícuotas que se diluyeron apropiadamente para determinar la viabilidad bacteriana.

Las 21 mutantes seleccionadas por su crecimiento en medio sólido fueron caracterizadas en medio líquido construyendo curvas de DO vs tiempo. Del análisis de dichas curvas se determinaron los siguientes parámetros; TCR: Tiempo de crecimiento residual; TMG: Tiempo medio de generación; ID: Índice de duplicación. El ID se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: $\text{LOG DO}_{\text{final}} - \text{LOG DO}_{\text{inicial}} / \text{LOG}2$. De cada una de las mutantes se determinó además el índice de reversión. Los valores de los parámetros correspondientes a las mutantes seleccionadas se encuentran en la TABLA 3.

2.3. Otros parámetros determinados en las mutantes.

Con el fin de comprobar si las principales características de la cepa salvaje se mantenían en las cepas mutantes se analizó la capacidad de fermentación de azúcares, la infección por el bacteriófago P22 y la presencia del antígeno somático O. Como existen antecedentes (Jacobson A. y Gillespie D., 1968) de mutantes ts en el crecimiento en medios ricos que al ser transferidas a un medio mínimo (MM) alteraban su patrón de crecimiento termosensible, se analizó el crecimiento en MM de las cepas ts que se utilizaron en los ensayos posteriores.

2.3.1. Fermentación de azúcares

La fermentación de azúcares fue determinada mediante el crecimiento de las bacterias en picos de flauta de agar TSI. La cepa parental de *S enteritidis* presenta medio básico en la superficie, producción de ácidos en profundidad y producción de ácido sulfúrico que se evidencia por la precipitación de SFe en el medio.

TABLA 3. Características de crecimiento en medio líquido de mutantes representativas de un total de 24 analizadas.

MUTANTE	INDICE REVERSION	INDICE DUPLICACION	TPO MEDIO GENERACION (min)	CRECIMIENTO RESIDUAL (hs)
H/2/26	4.7×10^{-8}	0	60	0
H/3/30	5×10^{-8}	0	54	0
H/1/6	4×10^{-7}	0.3	48	0.75
H/2/22	ND	1.0	63	0.5
D/3/51	3×10^{-7}	1.0	72	2
H/3/8	6×10^{-9}	1.0	72	2
H/2/6	ND	1.3	60	3
D/2/5	5×10^{-8}	2.0	45	4
D/3/7	$>7 \times 10^{-7}$	2.0	54	3
D/5/27*	$>1 \times 10^{-6}$	2.0	42	3.7
G/2/20*	$>2 \times 10^{-6}$	2.0	75	1.5
C/7/6	1.2×10^{-7}	3.0	55	3.5
C/3/6	2.7×10^{-7}	3.2	63	4.33
C/7/5	2.8×10^{-7}	3.3	51	4.83
C/4/56	4.2×10^{-8}	3.3	53	3.75
C/5/32	1×10^{-7}	3.5	65	5
C/2/2	9×10^{-8}	4.0	63	4.5
E/1/3	2×10^{-7}	6.0	48	7

* Mutante descartada

Las mutantes descriptas en la TABLA 3, al ser incubadas a 28°C durante 24 hs tuvieron un patrón fermentativo igual al de la cepa salvaje.

2.3.2. Infección de las bacterias por el bacteriófago HTP22

Todas las mutantes obtenidas fueron infectadas por dicho bacteriófago (específico de

Salmonella) las placas de lisis resultaron anilladas, características de la *S enteritidis* al ser infectada por P22.

2.3.3. Determinación de antígenos somáticos.

Se hicieron reacciones de aglutinación utilizando antisueros anti-antígenos somáticos, en este caso se utilizó el antisuero anti Factor 9, presente en *S enteritidis*. La aglutinación fue positiva para la totalidad de las mutantes.

2.3.4. Crecimiento en Medio Mínimo

Se determinó el crecimiento en placas de medio mínimo de las mutantes H/2/26, C/2/2 y E/1/3 comparado con el crecimiento de la cepa parental. Al incubar las placas a 37°C no hubo crecimiento de ninguna de las mutantes, las placas incubadas a 28°C luego de 48 hs de incubación presentaron un crecimiento similar al de la cepa salvaje.

Conclusiones parciales:

Se caracterizaron 79 mutantes mediante el crecimiento en medio sólido, de ellas se seleccionaron 21 mutantes para estudios de crecimiento en medio líquido. De estos se hallaron mutantes de diferentes fenotipos, con índices de duplicación que variaron entre 0 y 7. Todas las cepas ts descritas mantuvieron las características de la cepa salvaje analizadas. La termosensibilidad resultó independiente del crecimiento de las cepas en diferentes medios (las mutantes mantuvieron su termosensibilidad tanto en TSA como en MM).

Análisis de diferentes cepas ts, en cuanto a su potencia como inmunógenos protectivos y a su inocuidad.

Objetivo 3

Ensayos de la inocuidad e inmunogenicidad de las cepas ts halladas, utilizando la vía sistémica para la inoculación de los animales.

3.1. Cálculo de la DL50 por vía i.p.

La DL_{50} se calculó en ratones de las cepas exocriadas Swiss y CF1 y en ratones de la cepa endocriada Balb/C, según se describe en la metodología. Se encontró que la dosis de *S. enteritidis* capaz de producir la muerte de la mitad de los animales inyectados fue menor de 10 microorganismos para cualesquiera de las cepas murinas utilizadas.

3.2. Determinación del grado de avirulencia de mutantes ts de diferentes fenotipos:

Previamente a realizar los estudios de protección se inocularon por vía i.p. diferentes grupos de animales con dosis variadas de las cepas ts. El fin de estos experimentos fue determinar el grado de atenuación de las mutantes al ser inoculadas por vía sistémica. Al inocular los animales con dosis de hasta 10^7 UFC/animal (equivalente a $>10^6$ DL50/animal de la cepa virulenta) la sobrevivencia de los mismos fue de un 100%. Al utilizar dosis de 10^8 UFC/animal hubo distintos grados de mortalidad de acuerdo a la cepa ts inoculada. Los resultados de dichos experimentos se hallan resumidos en la Tabla 4.

TABLA 4. *Sobrevida de ratones inoculados con mutantes ts de *S. enteritidis*.

DOSIS (UFC/animal)	H/2/26	H/3/10	C/2/2	E/1/3
10 ⁶	100 % (8/8) ^b	100 % (8/8)	100%(8/8)	100%(8/8)
10 ⁷	100 % (8/8)	100 % (8/8)	100%(8/8)	100%(8/8)
10 ⁸	88 % (7/8)	75 % (6/8)	25%(2/8)	100%(8/8)

*La sobrevida se registró durante los 30 días siguientes a la inoculación de los animales.

^bNúmero de animales vivos/número total de animales inoculados.

3.3. Determinación del plan de inmunización más apropiado.

Para poder determinar la dosis inmunizante más adecuada se realizó un primer ensayo de protección utilizando como inmunógeno a la cepa C/2/2. Se utilizaron grupos de 8 ratones de la cepa Swiss de 6 a 8 semanas de vida, los que recibieron diferentes dosis de inmunógeno en una sola inoculación i.p. Dos semanas luego de la inmunización los animales fueron sometidos al desafío por vía i.p. con la cepa salvaje de *S enteritidis*, en una dosis equivalente a > 100 DL50. La sobrevida de los animales fue registrada en forma diaria durante dos semanas.

En la Figura 6 se muestran resultados de protección obtenidos tras la inmunización con la mutante C/2/2. Al día 5 del desafío murieron todos los animales pertenecientes al grupo control. En el día 10, la sobrevida fue del 12, 50 y 75 % para los animales inmunizados con las dosis 10⁵, 10⁶ y 10⁷ UFC, respectivamente. Hacia el fin del ensayo, sobrevivieron el 37 % de los animales inyectados con la dosis 10⁶ y el 62 % de aquellos que habían recibido 10⁷ UFC de la mutante.

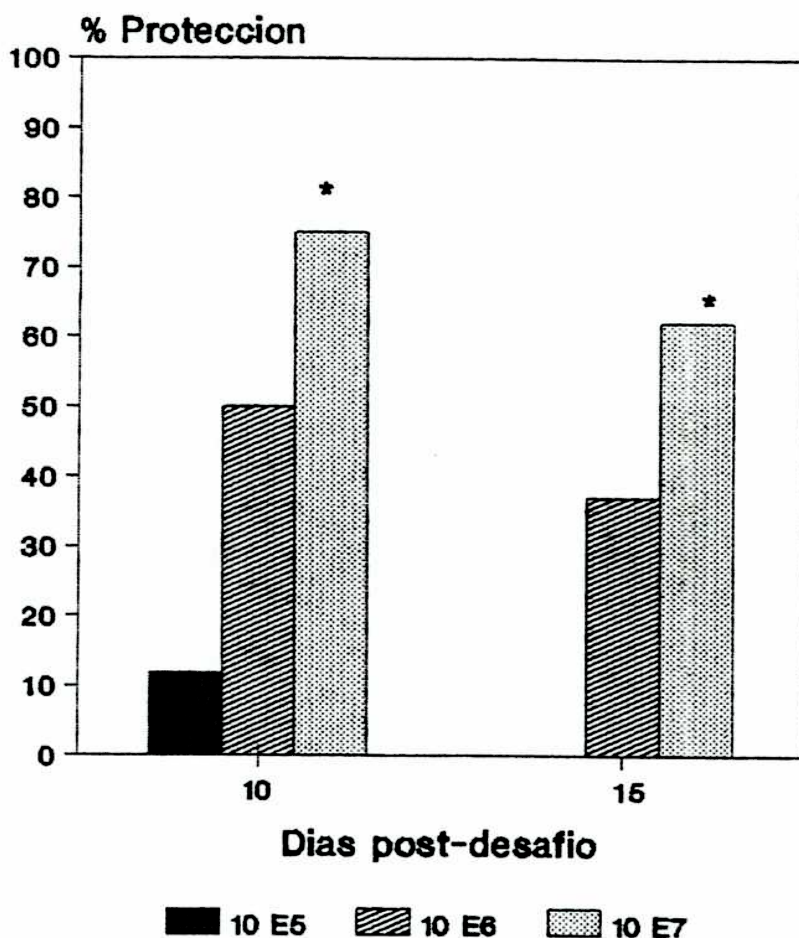


Figura 6. Protección (% de animales sobrevivientes) luego del desafío con > 100 DL50 de la cepa salvaje, de animales inmunizados con dosis de 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/animal de la mutante termosensible de *S enteritidis* C/2/2. Diferencia significativa con $p < 0.05$ [*] respecto al control.

En base a los resultados obtenidos se realizó un ensayo de protección, en el que se incluyeron dos dosis inmunizantes, para comprobar si se incrementaba la inmunidad otorgada por una sola dosis. En este experimento se comparó la protección inducida con diferentes dosis ya sea de la cepa ts C/2/2 o de la cepa virulenta muerta por calor. Los resultados de la sobrevivencia de los animales 15 días posteriores al desafío se encuentran en la TABLA 5. El grupo que recibió dos dosis de 10^7 UFC/animal de la cepa C/2/2, estuvo protegido en un 55%. Como

se puede apreciar, la administración de dos dosis inmunizantes no incrementó la inmunidad protectora generada por la cepa C/2/2. La inmunización con la cepa salvaje muerta por calor no indujo una inmunidad protectora significativa en ninguno de los grupos.

TABLA 5. Protección de animales inmunizados con la mutante C/2/2 o la cepa salvaje muerta por calor (SMC)^a

INMUNIZACION	C/2/2	SMC
2 dosis 10 ⁷ UFC/animal	55 % (5/9) ^b	8 % (1/12)
2 dosis 10 ⁶ UFC/animal	20 % (2/10)	0 % (0/10)

^aGrupos de 8 animales recibieron un plan de inmunización que consistió en dos dosis espaciadas por 7 días, una semana luego de la última inmunización, tanto los grupos inmunizados como un grupo control fueron desafiados con 200 UFC/animal de la cepa virulenta. Cinco días posteriores al desafío se produjo la muerte del 100% de los animales del grupo control.

^bDiferencias significativas con $p=0.01$ con respecto al control.

Los animales utilizados en el estudio de inocuidad de las mutantes ts fueron desafiados por vía i.p. con una dosis >2000 DL50 de la cepa virulenta. Los resultados se describen en la TABLA 6. En los grupos inoculados con una dosis de 10⁸ UFC/animal, hubo distintos porcentajes de mortalidad post-inmunización, por lo que no se podría descartar que los animales sobrevivientes hayan sufrido una infección subletal con revertantes de la cepa parental.

TABLA 6. Porcentaje de protección post-inmunización con dosis de 10^7 o 10^8 UFC/animal.

DOSIS (UFC/animal)	H/2/26	H/3/10	C/2/2
10^7	62% (5/8) ^b	12% (1/8)	12% (1/8)
10^8	43% (3/7)	67% (4/6) ^b	100% (2/2)

*A los 14 días de la inmunización los animales recibieron un desafío por vía i.p con > 2000 DI50 de la cepa salvaje. A los 5 días del desafío hubo un 0% (0/8) de sobrevida del grupo control.

^bDiferencias significativas con $p < 0.05$ con respecto al control calculadas mediante el test de Fisher.

Conclusiones parciales:

Las mutantes ts fueron capaces de otorgar protección contra el desafío. La administración de dos dosis inmunizantes de 10^7 UFC/animal espaciadas por una semana no incrementó la inmunidad protectora otorgada por una sola inmunización. Así mismo al inocular los animales con 10^8 UFC/animal de las distintas cepas ts se registraron distintos % de muerte, por lo que el plan de inmunización i.p. más apropiado sería la administración de una sola inoculación i.p. de 10^7 UFC/animal.

3.4. Estudios de protección.

3.4.1. Inmunización de los animales.

En el ensayo que se describe a continuación las cepas ts utilizadas como inmunógenos fueron H/2/26, C/2/2 y E/1/3, de fenotipos no replicante, replicante y replicación extendida, y

la cepa *S enteritidis* muerta por calor. Grupos de 13 animales de la cepa CF1 recibieron una inmunización de 10^7 UFC/animal, de cada uno de los inmunógenos. Se determinó el grado de colonización esplénica 14 días luego de la inmunización en 5 animales de cada uno de los grupos inmunizados con las cepas ts. Ninguna de las mutantes ts pudo ser recuperada de los bazos de los animales inmunizados.

3.4.2. Desafío con la cepa virulenta.

Los grupos inmunizados, más un grupo control, que no recibió ningún tipo de inmunización, fueron desafiados 14 días luego de la inmunización con la cepa parental virulenta, recibiendo una dosis de 10^3 UFC/animal (equivalente a > 100 DL50). El tiempo promedio de muerte se incrementó en todos los animales inmunizados con respecto a los controles, sin embargo se encontraron valores similares entre los diferentes grupos inmunizados (TABLA 7).

TABLA 7. Protección inducida por la inmunización i.p con mutantes ts de *S enteritidis*^a.

Inmunógeno	TPM ^b	Protección (%)	Sobrevida ^c
Control	7	0	(0/8)
E/1/3	8	100	(8/8) _{p=0.005}
C/2/2	9.3	62	(5/8) _{p=0.03}
H/2/26	8.2	38	(3/8)
SMC	9.2	38	(3/8)

^aGrupos de 8 ratones se inmunizaron i.p con una dosis de 10^7 UFC/animal.

^bTiempo promedio de mortalidad de los animales no protegidos.

^cProporción de animales sobrevivientes
(N° de animales vivos/N° total de animales desafiados).

Las diferencias con respecto al control se calcularon el test de Fisher's.

La protección varió de acuerdo al inmunógeno utilizado, los animales inoculados con la

mutante E/1/3 tuvieron un 100% de sobrevida, siendo la proporción de sobrevida (N° animales ob revivientes/No animales desafiados) diferente a la del control ($p=0.005$). La inmunización con la mutante C/2/2 otorgó una protección del 62% siendo la proporción de sobrevida diferente al control ($p=0.03$). Los animales inmunizados ya sea con la mutante H/2/26 o con SMC tuvieron un 38% de sobrevida, no obstante esta diferencia no fue significativa con respecto al control.

3.4.3. Determinación del grado de colonización esplénica, luego del desafío con la cepa virulenta.

A los 4 días del desafío se evaluó la colonización del bazo en animales de los grupos inmunizados y del control. En la Fig.7 se observa que el número de UFC de *S. enteritidis* halladas en bazo, fué notablemente menor en los animales inmunizados con las mutantes ts. Cuatro días después del desafío la mediana del N° de UFC/bazo, hallados en los animales no inmunizados fue de $5,4 \times 10^6$ (rango: 8×10^5 a 2×10^7). En los animales inmunizados con E/1/3 y C/2/2, la mediana del N° de UFC/bazo fue de 9×10^3 y 8×10^3 respectivamente (rangos: 5×10^2 a 2×10^4 para E/1/3, y 7.5×10^3 a 8×10^3 para C/2/2). En los animales inmunizados con la mutante no replicante H/2/26 la mediana del N° de UFC/bazo de la cepa salvaje fue de 2×10^4 (rango = 2×10^3 a 1×10^5), mientras que en los animales inmunizados con SMC la mediana de UFC/bazo recuperada fue de 4×10^6 (rango = 9×10^4 a 3×10^7). La mediana del N° de UFC/bazo hallado en los animales inmunizados con la cepa E/1/3 resultó significativamente menor con respecto al encontrado en los animales que no habían sido inmunizados. La protección conferida por los distintos inmunógenos estuvo indirectamente relacionada con el grado de colonización del bazo por la cepa virulenta.

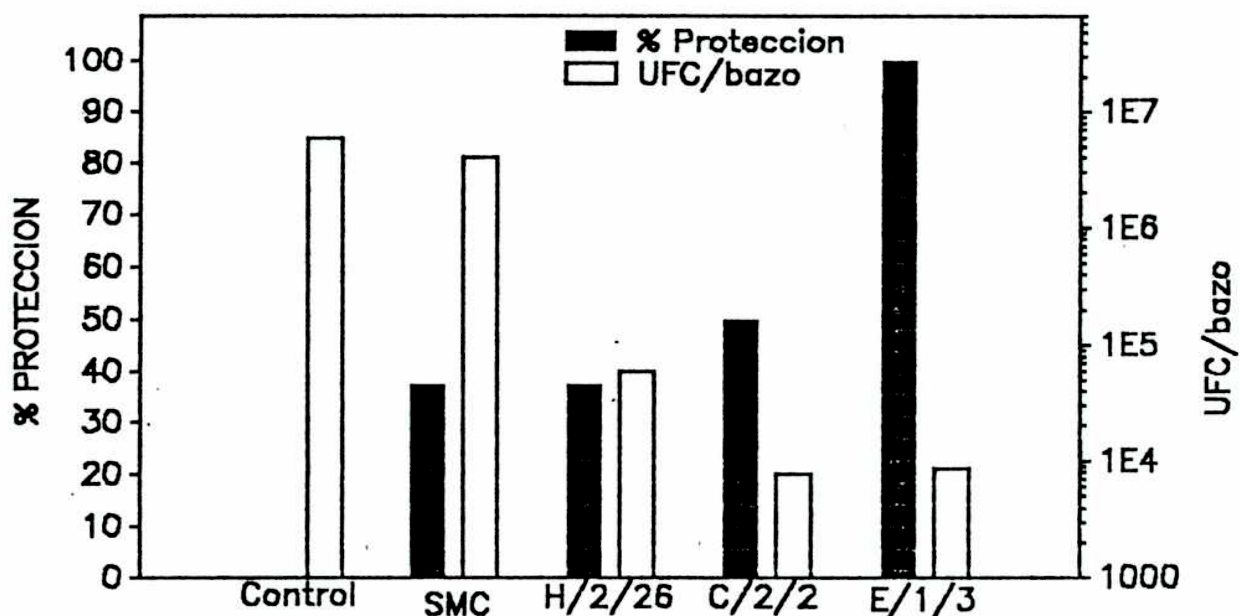


Figura 7. Relación entre la protección inducida por la inmunización i.p. con 10^7 UFC/animal y el número de UFC de la cepa virulenta hallado en el bazo luego del desafío con >100 DL50 de la cepa parental virulenta. Los inmunógenos descritos en la abcisa se encuentran en orden creciente de índice de duplicación.

Las barras abiertas representan la protección determinada en grupos de 8 animales, mientras que las barras cerradas representan la mediana del número de UFC de grupos de 5 animales.

La mediana del N° de UFC/bazo de los animales inmunizados con las mutantes E/1/3, fué significativamente menor ($p < 0.05$ determinada con la prueba de Wilcoxon Rank Sum).

3.5. Determinación de anticuerpos específicos contra *S. enteritidis*.

Se determinó la presencia de anticuerpos (IgG) circulantes, específicos en los animales incluídos en el estudio de protección (3.4.2.). Las muestras se tomaron 14 días luego de la inmunización. En la TABLA 8. se hallan los valores encontrados. Puede observarse que las mutantes ts indujeron mayores niveles de anticuerpos que la cepa parental muerta por calor.

TABLA 8. Determinación de anticuerpos circulantes específicos (IgG) contra *S. enteritidis*.

Inmunógeno	Título de anticuerpos*
Ninguno	< 1/128
SHK ^b	1/128
H/2/26	1/2048
C/2/2	1/4096
E/1/3	1/2048

*El título de anticuerpos está expresado como la mayor dilución del suero que presenta una absorbancia mayor o igual al punto de corte (promedio del Bco + 2 desv. std.).

Conclusiones parciales:

La inmunización con las mutantes ts de fenotipo replicante E/1/3 y C/2/2, indujo una protección significativa contra el desafío. La colonización esplénica de la cepa virulenta cuatro días posteriores al desafío, se relacionó en forma inversa con la inmunidad protectora inducida en los grupos que recibieron los distintos inmunógenos.

Objetivo 4

Permanencia de las mutantes ts y de la cepa salvaje en el huésped luego de la inoculación por vía oral.

Los experimentos que se describen a continuación se llevaron a cabo con el fin de conocer tanto la permanencia como el grado de colonización del huésped, luego de la inoculación oral con las diferentes cepas ts, y con la cepa salvaje.

4.1. Permanencia de la cepa salvaje post-inoculación p.o. con dosis bajas.

Los ensayos preliminares se realizaron con el propósito de determinar la dosis más adecuada para los estudios de permanencia tanto de la cepa salvaje como de las mutantes. La dosis utilizada en estos experimentos fue de 5×10^6 UFC/animal.

4.1.1. Permanencia en heces.

A las 5 horas de la inoculación los 4 animales analizados mostraron *Salmonella* en materia fecal. A las 24 h sólo en 2 de 5 animales se detectó *Salmonella*, y a las 48 h no se detectó la cepa en ninguno de los 5 animales estudiados.

4.1.2. Permanencia en Placas de Peyer.

La colonización de las PP se estudió desde el día 1 al día 5 post-inoculación, en todos los días analizados sólo 1 de 5 animales inoculados resultó colonizado. El número de UFC/PP fue del orden de 10^2 al primer día, aumentando al orden de 10^3 al segundo día y manteniéndose en ese orden hasta el quinto día.

4.1.3. Permanencia en bazo.

La colonización del bazo se detectó a partir del tercer día, en 1 o 2 de 5 animales; el número de UFC/bazo estuvo en el orden de 10^3 .

4.2. Permanencia de la cepa salvaje en diferentes órganos post-inoculación p.o. con dosis altas.

Los resultados anteriores demostraron que una dosis de 5×10^6 UFC/animal de la cepa salvaje no produjo una infección homogénea para todos los animales, por lo que se decidió aumentar el número de UFC a administrar.

En la Tabla 9 se encuentran los resultados del análisis de la permanencia de *S. enteritidis* en materia fecal post-inoculación p.o. con 2×10^9 UFC/animal.

TABLA 9. Permanencia de *S. enteritidis* en materia fecal post-inoculación oral.

Tiempo (horas)	Colonización ^a	UFC/gr ^b
	0/6	-
5	3/5	2×10^5
24	6/6	5×10^4
48	4/4	8×10^4
72	2/2	2×10^5
96	4/4	2×10^5

^a Proporción de animales colonizados
(N° de animales colonizados/No total de animales inoculados)

^b Los valores representan las medianas del número de UFC/g de materia fecal de los ratones inoculados.

A partir de las 5 horas post-infección, se detectó la presencia de *S. enteritidis* en 3 de los 5 ratones analizados. En los tiempos posteriores, el 100 % de los ratones evidenció *Salmonella* en heces.

En la Figura 8, se observa la permanencia de *S. enteritidis* en PP y bazo durante los primeros 4 días post-infección, entre el quinto y sexto día posteriores a la inoculación se produjo la muerte de los animales inoculados. Al primer día post-inoculación, la mediana del número de UFC en PP fue de 3×10^2 (rango= $1-4 \times 10^2$) al segundo día el número de UFC se incrementó en tres órdenes con una mediana de 2.4×10^5 (rango= $2-3 \times 10^5$) permaneciendo constante hasta el cuarto día, ocurriendo la muerte de los animales al día siguiente.

Al segundo día post-inoculación se halló *S. enteritidis* en bazo, la mediana del número de UFC/bazo fue de 1.2×10^3 (rango= 1.5×10^2 a 1.8×10^3). Luego de cuatro días, la mediana de UFC/bazo aumentó a 7×10^7 (rango = $7.3-5.8 \times 10^7$).

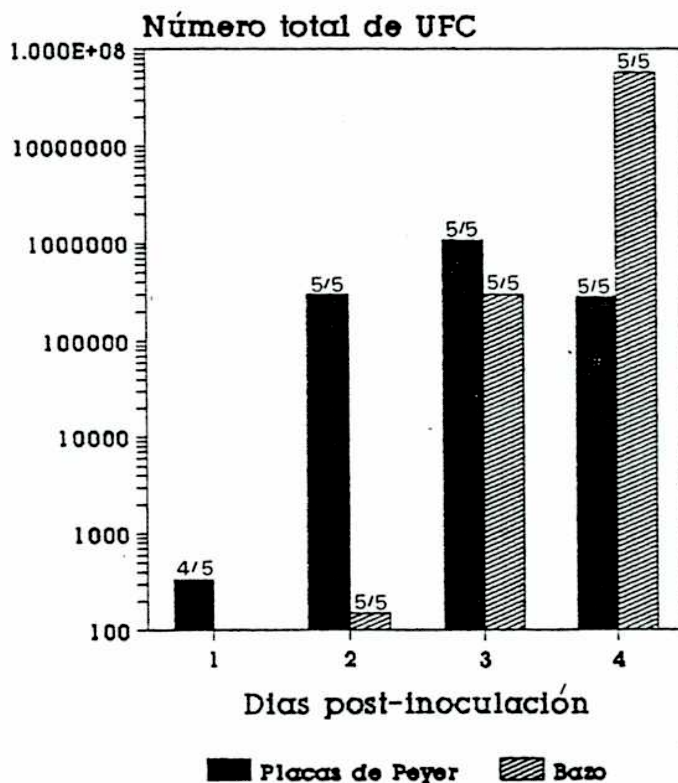


Figura 8. Permanencia de la cepa salvaje *S. enteritidis* en Placas de Peyer y bazo luego de la administración p.o. Los animales recibieron una dosis de 2×10^9 UFC. Se muestran las medianas del número total de UFC halladas a los diferentes tiempos. Los números sobre cada una de las barras indican la proporción de ratones colonizados/total inoculados.

4.3. Permanencia de diferentes cepas ts post-inoculación p.o. con dosis altas.

Cabe aclarar que al administrar dosis de 10^7 UFC/animal y 10^9 UFC/animal, la permanencia de las cepas ts en los diferentes órganos fue muy escasa, por lo que se inocularon los animales con dosis mayores. Se analizó la permanencia de las mutantes ts H/2/26, C/2/2 y E/1/3 en materia fecal, PP y bazo, luego de la inoculación p.o. con 10^{10} UFC/animal.

4.3.1. Permanencia en heces.

En la Tabla 10. se hallan los resultados de la permanencia de las mutantes en heces.

Tabla 10. Permanencia de *S. enteritidis* ts en materia fecal post-inoculación oral con 10^{10} UFC/animal^a.

Tiempo (horas)	H/2/26	C/2/2	E/1/3
5	4/5 ^b	1/5	4/5
24	1/4	3/4	4/5
48	0/4	0/5	1/5
72	0/5	0/5	0/5

^aUn grupo de 25 animales recibió la dosis indicada de cada una de las cepas ts.

A los tiempos indicados se analizó la presencia de las cepas en materia fecal en subgrupos de 5 animales.

^bN° de animales colonizados/N° total de animales analizados.

Se puede observar que al igual que en el caso de la cepa parental *Salmonella* fue detectada en heces a partir de las 5 horas post-inoculación. Dicha colonización perduró hasta 24 horas post-infección para H/2/26 y C/2/2, prolongándose hasta 48 horas post-inoculación para E/1/3.

4.3.2. Permanencia en PP.

Solo la cepa C/2/2 pudo detectarse significativamente en PP (Tabla 11). Durante los tres primeros días post-inoculación, el número de UFC detectadas varió entre 600 y 52. A la mutante de fenotipo no replicante, H/2/26, se la detectó sólo al primer día post-inoculación, mientras que a E/1/3, se la encontró hasta el cuarto día post-inoculación pero el número de UFC halladas fue menor a 5.

4.3.4. Permanencia esplénica de las diferentes cepas ts.

La colonización del bazo fue muy escasa luego de la inoculación oral y sólo con cultivos de enriquecimiento de los homogenatos de bazo pudieron ser detectados los microorganismos. Al tercer y cuarto día post-inoculación se pudieron detectar las mutantes H/2/26 y E/1/3, en 3 de 5 animales inoculados, a la cepa C/2/2 sólo se la pudo hallar al tercer día en uno de cinco animales inoculados.

Tabla 11. Colonización de las Placas de Peyer post-inoculación oral con diferentes cepas ts

CEPA	Día 1 ^a	Día 2	Día 3	Día 4
E/1/3 Prop. col ^b Mediana UFC Rango	1/5 3	0/5 0	1/5 1.5	1/5 1.5
C/2/2 Prop. col Mediana UFC Rango	5/5 6×10^2 $2-8 \times 10^2$	2/5 1.5×10^2 $1-5 \times 10^2$	3/5 52.5 6-74	0/5 0 0
H/2/26 Prop.col Mediana UFC Rango	3/5 19.5 3-46	0/5 0 0	0/5 0 0	0/5 0 0

^aDías post-inoculación oral con: 10^{10} UFC de la cepa E/1/3, 5×10^9 de C/2/2 y 4×10^{10} de la mutante H/2/26.

^bProporción de animales colonizados (No de animales colonizados/N° total de animales inoculados).

4.4. Estudios adicionales de caracterización.

El aumento de la dosis p.o de 10^7 UFC/animal a 10^{10} UFC/animal produjo en general un aumento de la proporción de los animales colonizados y del número de UFC halladas en los diferentes órganos. Sin embargo si se tiene en cuenta la alta dosis administrada, la cantidad de microorganismos recuperados, resultó muy baja. Por este motivo se decidió investigar ciertas características de las cepas ts que podrían estar disminuyendo la viabilidad de las mismas en el huésped.

4.4.1. Viabilidad al pH ácido.

Una posible explicación a la menor colonización observada es que las cepas ts tuvieran una sensibilidad mayor al pH del estómago que la cepa salvaje. Se realizó un experimento in vitro con la cepa C/2/2 y la cepa salvaje en la que se observó que la incubación durante una hora a 37°C en solución fisiológica + CIH con $\text{pH}=2.4$, produjo un porcentaje de mortalidad similar para las dos cepas. Por lo tanto la baja proporción de mutantes halladas en PP no se podría atribuir a una hipersensibilidad al pH del estómago.

4.4.2. Movilidad.

Se ha descrito anteriormente que existe (Liu S. L. y col., 1988; Jones B.D., 1992) una relación entre la movilidad, presencia de flagelos, y la virulencia de *Salmonella*. Al estudiar la movilidad de las cepas ts no se encontraron diferencias entre las tres cepas ts y la cepa salvaje.

Conclusiones parciales:

Tanto la viabilidad a pH ácidos como la movilidad no se vió alterada en las cepas ts con respecto a la cepa parental, sin embargo resultó muy escasa la recuperación de las mutantes

luego de inocularlas vía p.o. Por lo que se decidió utilizar la ruta i.g. con el fin de incrementar el inóculo bacteriano que llegaría al intestino.

Objetivo 5

Análisis de la permanencia de las cepas ts luego de la inoculación i.g.

Los animales se inocularon como se describe en la metodología, la dosis administrada fue de 10^{10} UFC/animal. Se analizó la presencia de las cepas ts en los diferentes órganos, a los días 1, 4, y 8 post-inoculación.

5.1. Excreción en heces.

La excreción de las cepas ts en heces siguió el mismo patrón que cuando se inocularon p.o. Al primer día las tres cepas se detectaron en materia fecal en todos los animales estudiados, al cuarto día sólo 3 de 5 animales inoculados con E/1/3 presentaron a la cepa ts en heces.

5.2. Permanencia en PP.

En la Figura 9A se describe la permanencia de las diferentes mutantes en PP. Un día después de la inoculación i.g. la mediana del número de UFC en PP fue de 2×10^3 para E/1/3, 5.8×10^3 para C/2/2 y 60 para la mutante ts H/2/26. Al día 4 la mediana de UFC/PP para la cepa E/1/3 fue de 12, y para la mutante C/2/2 esta resultó ser 320, mientras que no se pudo detectar a la cepa H/2/26. A los 15 días de la administración i.g. sólo la mutante E/1/3 estuvo presente en las PP, la mediana de UFC fue de 2.

5.3. Permanencia esplénica.

En la Figura 9B se muestran los datos de la permanencia esplénica de las mutantes.

Cuatro días luego de la inoculación i.g. se aislaron del bazo a las cepas E/1/3 y H/2/26 (las medianas del número de UFC fueron 150 y 105 respectivamente). A los 15 días la mediana de UFC/bazo fue de 52.5 para la cepa E/1/3 y 45 para la mutante H/2/26. No se pudo hallar a la cepa C/2/2 en el bazo salvo al día 8 en un único raton (15 UFC).

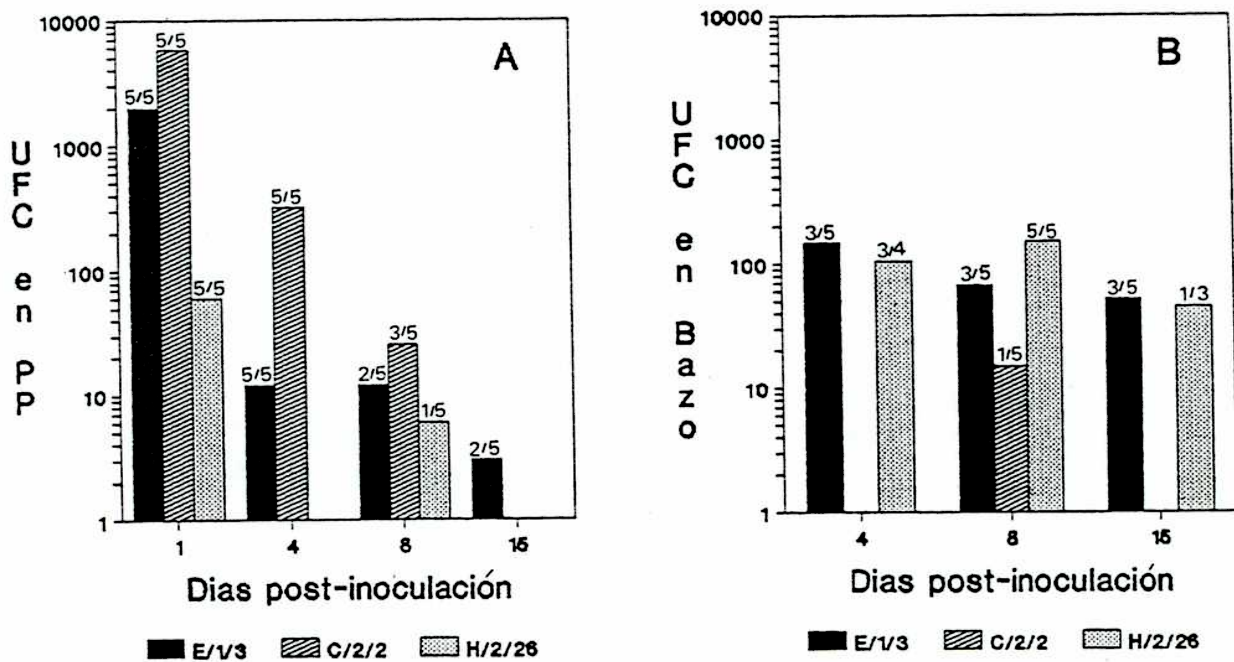


Figura 9 . Permanencia de las mutantes ts E/1/3, C/2/2 y H/2/26 en Placas de Peyer (A) y en bazo (B), luego de la administración i.g. Los animales recibieron 1×10^{10} UFC/animal de las cepas C/2/2 y H/2/26, y 5×10^9 UFC/animal de E/1/3. Se muestra la mediana del número total de UFC halladas en los diferentes tiempos para cada una de las cepas ts. Los números sobre cada barra indican la proporción de animales colonizados /total.

5.4. Estudios complementarios a la permanencia de las cepas ts post-inoculación p.o. e i.g.

De los estudios anteriores surge claramente la deficiencia de la cepa C/2/2 para colonizar el bazo tanto luego de la administración p.o. como i.g.. Se decidió entonces investigar la capacidad de esta mutante de colonizar el bazo luego de la administración i.p.

Las tres mutantes infectaron el bazo después de la inoculación i.p.. Las medianas del número de UFC no resultaron diferentes entre las mutantes. Al día 1 de la inoculación los valores de las medianas fueron de $1,8 \times 10^5$ para la cepa C/2/2, $1,1 \times 10^5$ para H/2/26 y 2×10^5 para la mutante E/1/3. A los 5 días los valores de las medianas fueron de 8×10^3 para C/2/2, 7×10^3 para H/2/26 y $7,4 \times 10^3$ para E/1/3.

Conclusiones parciales:

Las tres mutantes ts analizadas con respecto a su relación con el huésped post-inoculación p.o. o i.g., presentaron diferentes patrones de permanencia. La administración de los microorganismos por la vía i.g., incrementó el grado de colonización así como la permanencia de las distintas cepas ts. Sin embargo la distribución de las diferentes ts en los distintos órganos del huésped fue similar para las dos vías de inoculación ensayadas.

Objetivo 6

Inmunidad otorgada por las diferentes mutantes luego de la administración p.o. ó i.g.

6.1. Estudios de protección utilizando como vía de inmunización la ruta p.o.

Dado que la permanencia de las mutantes ts en PP post-inoculación p.o. se extendió entre 1 y 4 días, se diagramó un plan de inmunización que consistió en la administración de dos dosis de 10^{10} UFC/animal, espaciadas por un intervalo de tres días (Plan A, Figura 10). En el caso de la mutante H/2/26, que permaneció menos tiempo que el resto en las placas de Peyer, se inmunizó a un cuarto grupo de animales con tres dosis de 10^{10} UFC/animal (Plan B, Figura 10).

A los 21 días de la última inmunización p.o., se realizó un desafío con la cepa virulenta, por vía oral. La dosis del desafío fué : 1.2×10^8 UFC/animal, equivalente a 240 DL50.

Con el fin de aumentar la protección se implementó otro plan de inmunización que consistió en un régimen de administraciones p.o. igual al empleado en el experimento anterior, y una semana antes del desafío se realizó una inoculación i.p. con una dosis de 10^7 UFC/animal (Plan C, Figura 10).

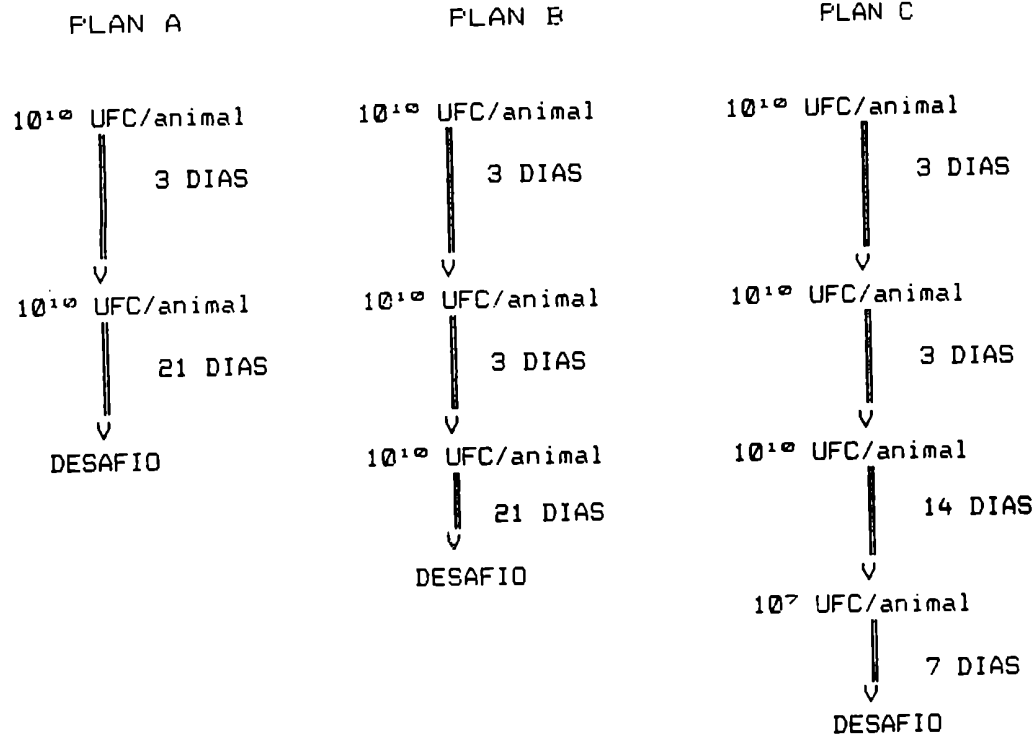


Figura 10. Distintos planes de inmunización utilizados con las mutantes E/1/3, C/2/2 y H/2/26, según se describe en el texto. La dosis de 10^{10} UFC/animal se inoculó vía p.o., la dosis de 10^7 UFC/animal se administró por la vía i.p.

En la Figura 11 está representada la protección como el porcentaje de sobrevivida (N° de animales vivos/ N° total x 100) a los 30 días del desafío.

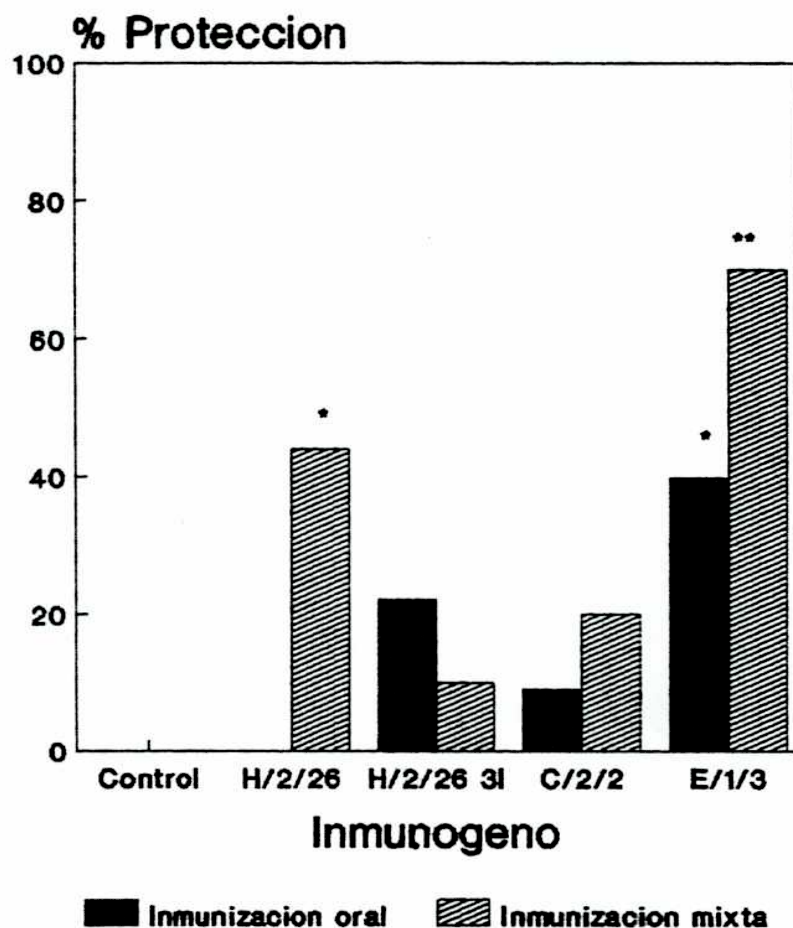


Figura 11. Protección inducida luego de la inmunización oral o mixta contra un desafío oral con 240 DL50 de la cepa virulenta. Grupos de 8 a 10 animales fueron inmunizados como se describe en la metodología. Las proporciones de sobrevivida resultaron diferentes a la del grupo control con : * $p < 0.05$ y ** $p = 0.001$.

Los animales inmunizados p.o. con la cepa H/2/26 no resultaron protegidos contra el desafío. En cambio una inmunización mixta (p.o. + i.p.) con la misma mutante, protegió al 44% de los animales. La tasa de sobrevida (N° de sobrevivientes/ N° inoculados) fue diferente al grupo control ($p=0.02$), pero no fue diferente a la sobrevida de los animales inmunizados p.o. con H/2/26. La inmunización oral con la cepa C/2/2 no resultó efectiva. Las proporciones de sobrevida luego de la inmunización p.o. o mixta con C/2/2 no fueron diferentes a la del grupo control. El 40% de los animales inmunizados p.o. con la cepa E/1/3, sobrevivieron al desafío con la cepa parental. La proporción de sobrevivientes resultó diferente al grupo control con un $p<0.05$. La inmunización mixta con esta mutante incrementó la protección a un 70%, la proporción de sobrevida fue diferente a la del grupo control ($p=0.01$), pero no resultó diferente a la proporción de sobrevida del grupo inmunizado p.o.

6.2. Estudios de protección utilizando la ruta i.g. para la inmunización.

La inoculación de los animales se realizó como se describió en la metodología. El esquema de inmunización implementado consistió en la administración de una ó dos dosis de 10^{10} UFC/animal espaciadas por 7 días. A los 21 días de la última inmunización se realizó el desafío p.o. administrando una dosis equivalente a 100 DL50 de la cepa virulenta.

El 30% de los animales inmunizados con una dosis de H/2/26 sobrevivió el desafío (Figura 12), sin embargo esta diferencia no fue significativa. La inoculación de dos dosis inmunizantes con esta cepa indujo un 14% de protección.

Cuando se utilizó a la cepa C/2/2 como inmunógeno ninguno de los animales inmunizados sobrevivió al desafío.

La inmunización con una dosis de E/1/3 indujo un 70% de protección, siendo en este caso la proporción de sobrevida diferente a la del grupo control($p=0.001$). Dos inmunizaciones i.g. con E/1/3 confirieron una protección del 90% de los animales; la proporción de sobrevida fue diferente a la del grupo control ($p=0.0001$).

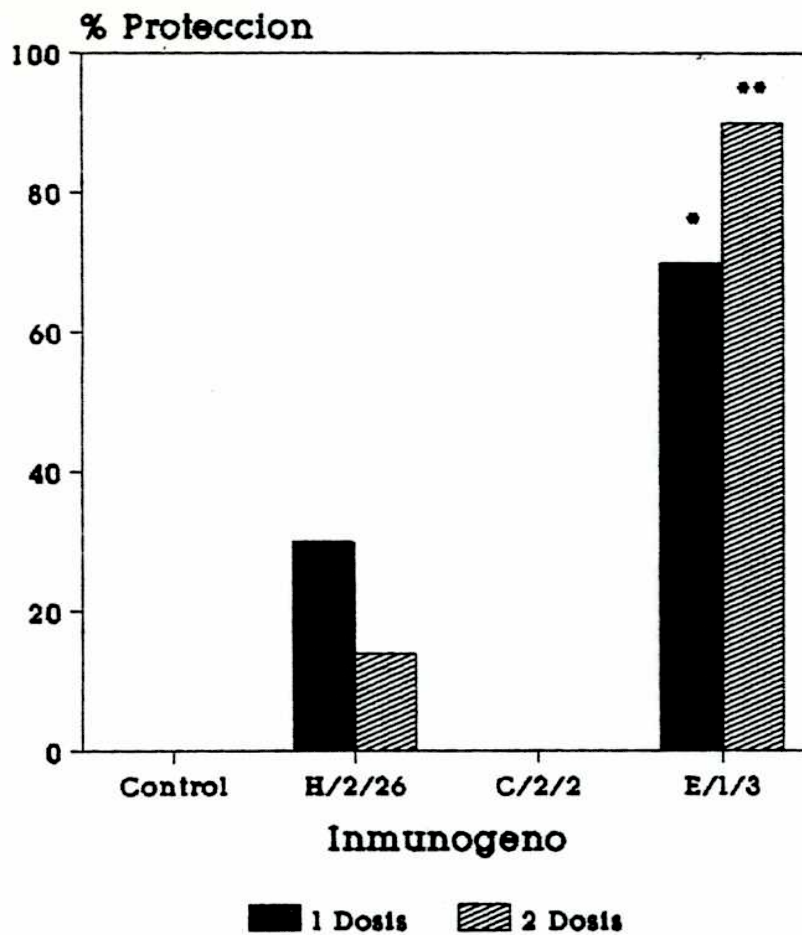


Figura 12 Protección en contra del desafío oral con la cepa *S enteritidis* salvaje, luego de la inmunización i.g. con las mutantes ts H/2/26, C/2/2 o E/1/3. La proporción de sobrevivida (N° de sobrevivientes/N° total de animales) fue diferente de la del grupo control: (*) $p = 0.001$ y (**) $p = 0.0001$.

6.3. Inmunidad humoral específica post-inoculación i.g.

6.3.1. Determinación de anticuerpos a los 6 días de la inmunización.

Anticuerpos circulantes:

Las tres mutantes indujeron una respuesta humoral sistémica. A los 6 días de la

inmunización i.g. la inmunoglobulina específica presente en mayor cantidad fue la IgG, también se detectaron IgA e IgM (Fig. 13).

Anticuerpos locales:

También se determinaron anticuerpos locales en fluidos intestinales. Las tres mutantes indujeron la producción de IgA específica local. Los animales inmunizados con C/2/2 presentaron IgG, mientras que aquellos inmunizados con E/1/3 también presentaron IgM.

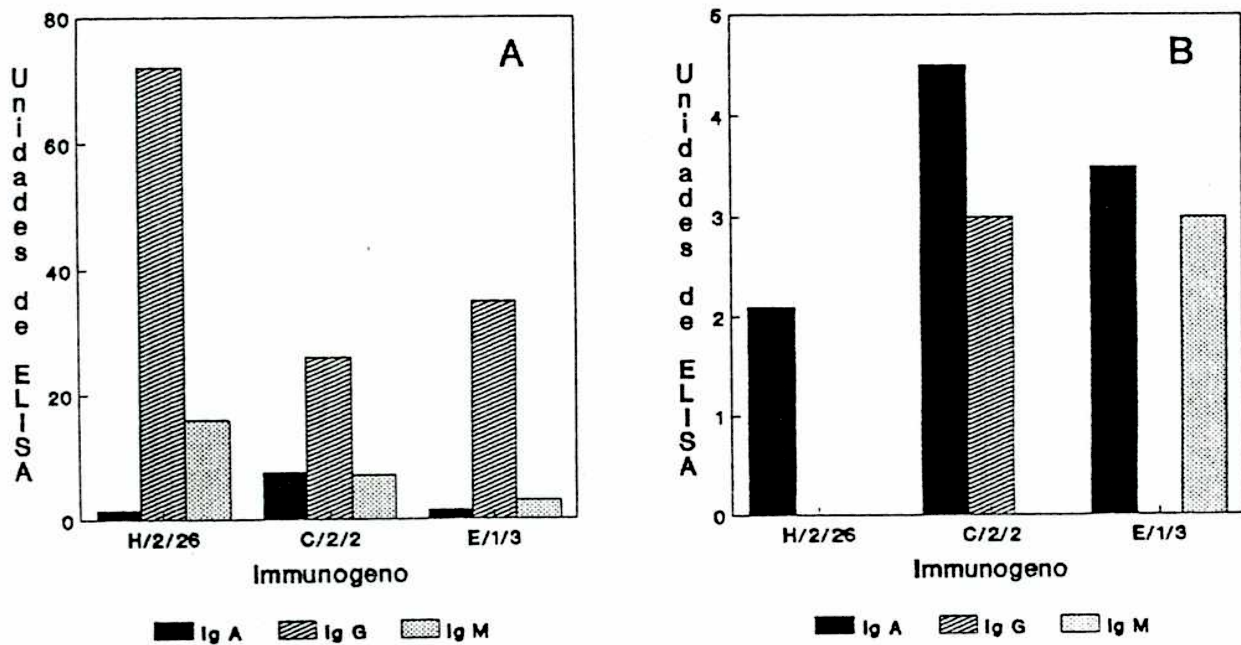


Figura 13. Niveles de IgA, IgG e IgM circulantes (A) y locales (B) luego de la inmunización i.g. con mutantes ts de *S enteritidis*. Las muestras de plasma y lavados intestinales se obtuvieron a los 6 días de la última inmunización. Las muestras provenientes de un mismo grupo se combinaron. Las unidades de ELISA se definieron como la absorbancia a 405 nm x dilución⁻¹.

6.3.2. Cinética de aparición de anticuerpos sistémicos específicos en animales inmunizados i.g. con la cepa ts E/1/3.

Se analizó la respuesta de anticuerpos específicos circulantes, a los 7, 14 y 21 días de comenzado el plan de inmunización i.g. con la mutante E/1/3. Las determinaciones se realizaron combinando las muestras provenientes de animales de un mismo grupo. En la Figura 14 se observan los niveles de IgA, IgM e IgG específicos detectados en plasma.

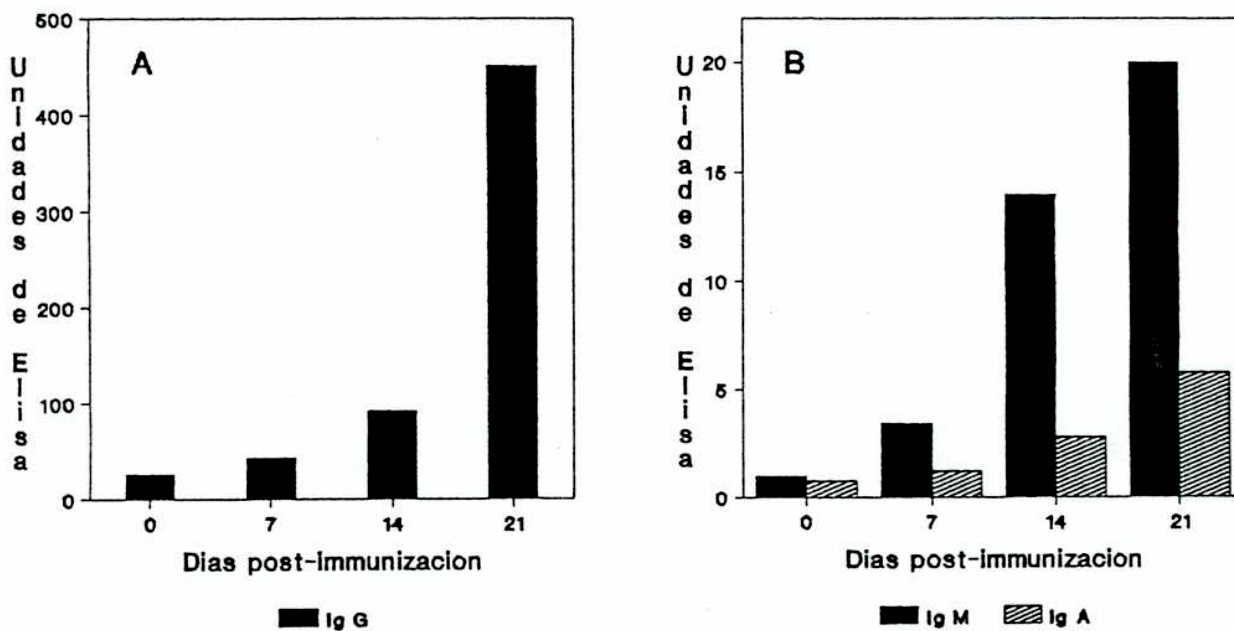


Figura 14. Niveles de IgG (A), IgA e IgM (B) circulantes anti-*S enteritidis*, luego de la inmunización i.g. con la cepa E/1/3. Los animales recibieron 10^{10} UFC/ml de la mutante en los días 0 y 7. Las unidades de ELISA se definieron como la absorbancia a 405 nm x dilución⁻¹.

Las tres inmunoglobulinas mostraron un aumento apreciable al día 21 respecto a los niveles previos a la inmunización. Se observó un incremento de diecisiete y siete veces en los niveles de IgG e IgA específicos con respecto a los niveles basales de estos anticuerpos. Por otro lado, la IgM mostró un aumento de 14 veces al día 14 y de 20 veces al día 21.

6.4. Células productoras de anticuerpos específicos.

A los 6 días de la inmunización i.g. con la mutante E/1/3, se determinó la presencia de células productoras de anticuerpos (ASC) en ganglio mesentérico y bazo. Los resultados se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12. Células productoras de anticuerpos específicos, luego de la inmunización i.g. con la mutante ts E/1 3.

Origen de las células	Inmunoglobulina	Control	Inmunizado
Ganglio mesentérico	IgA	0.7 ^a	33
	IgG	0.1	159
	IgM	0.1	0.2
Bazo	IgA	1620	4100
	IgG	5320	7600
	IgM	90	10

^aNúmero de ASC/10⁶ células analizadas.

Conclusiones parciales:

En base a los resultados de los estudios de permanencia post-inoculación oral, se diagramó un plan de inmunización tal que se prolongase la permanencia de las cepas en los ganglios linfáticos asociados al intestino (placas de Peyer).

Al implementar tanto un plan de inmunización oral como mixto la inoculación de la cepa E/1/3

indujo una protección significativa (40% y 70% respectivamente).

La inoculación i.g. de las mutantes aumentó la permanencia de las cepas en los diferentes órganos. Este aumento en la colonización y permanencia de las mutantes ts, se correlacionó en el caso de la cepa E/1/3 con un incremento en la protección conferida.

A los 6 días de la inmunización i.g. con cualesquiera de las cepas utilizadas, se detectaron anticuerpos específicos en los lavados intestinales y en circulación. En los animales inmunizados con la cepa E/1/3, se determinaron células productoras de anticuerpos en ganglios linfáticos mesentéricos y en bazo.

Estos resultados coinciden con los ensayos de protección i.p, en los que como en este caso la mutante con un mayor N° de generaciones a 37°C (E/1/3), confirió la mayor protección. Las experiencias desarrolladas hasta aquí, permiten definir a la mutante ts E/1/3, cuyo fenotipo es de replicación extendida, como la cepa más adecuada para la construcción de una vacuna atenuada en base a mutaciones ts.

Estudios tendientes a la construcción de la cepa que se utilizará como vacuna

Objetivo 7

Estudios de transferencia de mutaciones ts seleccionadas al genoma salvaje mediante la transducción con el fago HTP22.

Los estudios descriptos previamente se llevaron a cabo con las cepas ts obtenidas directamente de la mutagénesis. En el caso de utilizar una cepa con fines vacunales sería conveniente que la mutación ts se encontrara en un genoma libre de otras posibles mutaciones.

7. Transducción de las mutaciones ts al genoma de la cepa patógena original.

7.1. Mutación ts H/2/26.

La obtención del lisado transductor se realizó como se describe en la metodología, el lisado con mayor título se obtuvo al utilizar una m.o.i de 0.1 UFP/UFC. El título del lisado transductor utilizado fue de 5×10^9 UFP/ml. Las m.o.i utilizadas resultaron ser de 18 UFP/UFC y 180 UFP/UFC. Para la menor m.o.i la proporción de transductantes halladas fue aproximadamente de 12.5%, mientras que para una m.o.i de 180 esta proporción se incrementó a un 33%.

7.2. Mutación ts C/2/2.

El lisado transductor tuvo un título de 2×10^{10} UFP/ml, las m.o.i fueron de 2.5 UFP/UFC y 25 UFP/UFC. En este experimento el tiempo transcurrido entre el cambio de la temperatura de incubación y el agregado del antibiótico fue de 4.5 hs. Antes de agregar el antibiótico se hizo una dilución de los cultivos con medio fresco a 37°C tal que la D.O de los cultivos fuese cercana a 0.2. En este caso el número de transductantes detectados en el screening disminuyó con respecto al anterior experimento siendo encontrándose el fenotipo ts en un 1% de colonias analizadas, trabajando con la mayor m.o.i.

7.3. Mutación ts E/1/3.

Dado el prolongado tiempo de crecimiento residual de la mutante E/1/3 la transferencia de la mutación ts se realizó con algunas variantes en base a los esquemas descritos anteriormente. En el paso I la incubación se realizó a 37°C durante 8 hs, este tiempo es igual al tiempo de crecimiento residual de la mutante E/1/3 a 37°C. En consecuencia, luego de dicha incubación se debieron diluir los cultivos tal que la DO de los mismos estuviese alrededor de 0.2. El título del lisado transductor utilizado fue de 2.8×10^{10} UFP/ml, a partir de este se realizó una dilución 1/5, y la m.o.i utilizada resultó ser igual a 10 UFP/UFC. Un 8% de las transductantes analizadas resultó ts.

7.4. Características de las cepas ts transductantes.

Las mutantes ts "limpias" fueron analizadas para determinar si se conservaban las características de crecimiento de las cepas ts originales. Las curvas de crecimiento se realizaron como se describe en la metodología. En las figuras 14, 15 y 16 se hallan las curvas de cada una de las transductantes ts y de las respectivas cepas ts originales. En la Tabla 13 se resumen los resultados de los estudios de caracterización.

Las transuctantes ts obtenidas mediante transducción generalizada con el fago HTP22 seguirían manteniendo, sin grandes diferencias las características de las cepas ts originales.

TABLA 13. Características del crecimiento en medio líquido de las transductantes ts y las cepas ts originales.

CEPA	TMG (min)	TCR (hs)	ID	IR
C/2/2	55	4.25	3	2×10^{-7}
C/2/2 L	50	4.25	3	1.5×10^{-7}
H/2/26	60	0	0	2×10^{-8}
H/2/26 L	60	0.25	0	1.8×10^{-8}
E/1/3	70	7.5	5	1.5×10^{-7}
E/1/3 L	65	6	4	

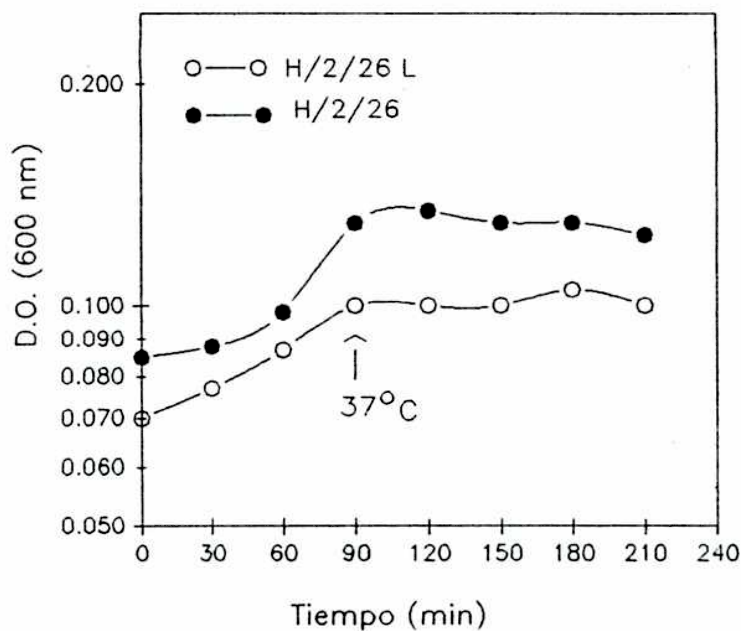


Figura 14. Curvas de crecimiento de la mutante H/2/26 y de la transductante H/2/26 L. A los tiempos indicados se midió la turbidez del cultivo. En el tiempo indicado con la flecha se cambió la temperatura de incubación del cultivo de 28°C a 37°C.

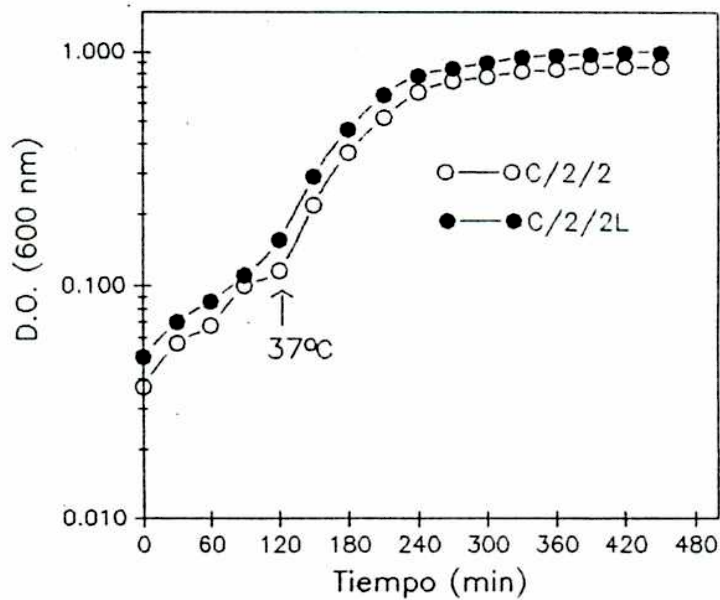


Figura 15. Curvas de crecimiento de la mutante C/2/2 y de la transductante C/2/2 L. A los tiempos indicados se midió la turbidez del cultivo. En el tiempo indicado con la flecha se cambió la temperatura de incubación del cultivo de 28°C a 37°C.

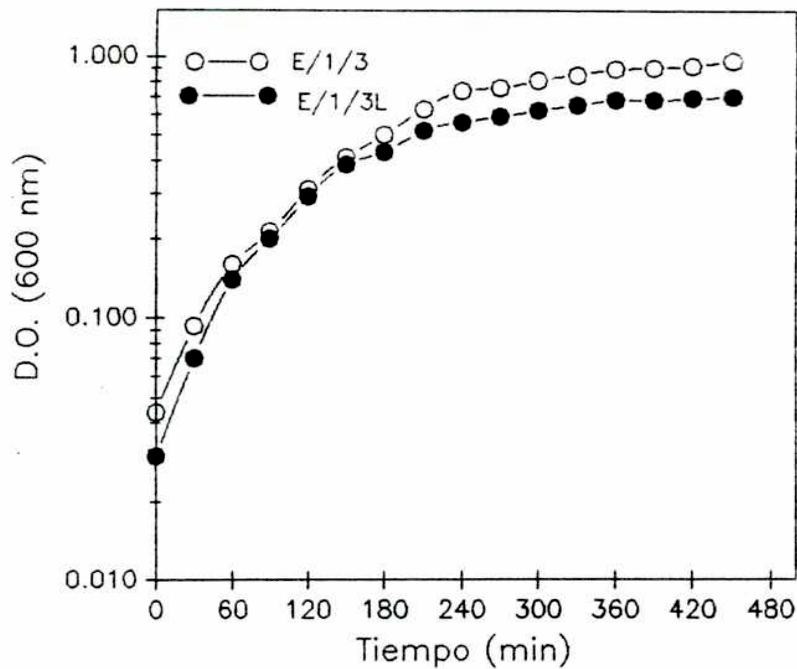


Figura 16. Curvas de crecimiento de la mutante E/1/3 y de la transductante E/1/3 L. A los tiempos indicados se midió la turbidez del cultivo. La temperatura de incubación del cultivo fue de 37°C.

6.5. Evaluación de la protección otorgada por las mutantes ts transductantes, transferidas al genoma salvaje.

El objetivo de estos experimentos fue determinar si se seguía manteniendo la inmunidad protectora otorgada por las mutaciones ts una vez transferidas al genoma salvaje original.

El esquema de inmunización consistió en la administración de dos dosis i.g. de cada una de las cepas, espaciadas por una semana. A los 21 días de la última inmunización se realizó el desafío oral con 100 DL50. Los resultados se detallan en la Tabla 14.

TABLA 14. Protección conferida por las cepas ts transductantes*.

CONTROL	H/2/26L	C/2/2L	E/1/3L	E/1/3
Exp N°1 0/7 (0%) ^b	3/6 (50%)	0/7 (0%)	5/8 [*] (62.5%)	6/7 ^{**} (90%)
Exp N°2 0/8 (0%)	2/8 (25%)	ND	4/8 [*] (50%)	6/7 ^{**} (90%)

*Sobrevida registrada a los 30 días del desafío (N° de ratones vivos/N° total de ratones desafiados)

^b(N° de ratones vivos/N° total de ratones desafiados) x 100

Diferencias significativas con respecto al control con: (*) p < 0.05 y (**) p < 0.01, calculadas mediante la prueba de Fisher's.

Conclusiones parciales:

Al transferir las mutaciones ts al genoma original, las transductantes ts obtenidas siguieron manteniendo las características de crecimiento tanto en medio sólido como líquido de las cepas ts originales. La transductante E/1/3L presentó un ID=4 a diferencia de la cepa E/1/3 original la que presenta un ID=5.

La protección otorgada por las mutantes H/2/26L y C/2/2L coincidió con lo obtenido con las mutantes "sucias" pero no ocurrió lo mismo con la cepa E/1/3L. A pesar que la sobrevivida de los animales inmunizados con E/1/3L resultó significativa con respecto al control el porcentaje de protección fue menor al otorgado por la cepa ts original.

Objetivo 8

Incorporación de una segunda mutación atenuada en el genoma de la mutante E/1/3, con el fin de incrementar la inocuidad de la cepa.

8.1. Obtención de cepas thy-.

La cepa ts E/1/3 confirió una adecuada protección en todos los estudios realizados. Por este motivo es que se la consideró propicia para ser utilizada como vacuna. Con el fin de incrementar la inocuidad de esta cepa, es que se decidió incorporar en esta mutante y en su transductante una segunda mutación, que disminuiría la virulencia en el caso de que ocurriese la reversión de la mutación ts.

En la Tabla 15 se describen los resultados. Las frecuencias de aparición de mutantes resistentes al trimetoprim variaron entre $1 - 5 \times 10^{-6}$. De las colonias resistentes al agente selectivo, tanto de la cepa salvaje *S. enteritidis* como de la cepa E/1/3L, 1 de cada 5 fue auxotrofa para timidina.

Al analizar las colonias resistentes al trimetoprim provenientes de la cepa E/1/3, 3 de cada 5 colonias fueron auxotrofas para timidina.

TABLA 15. Obtención de cepas auxotrofas para timidina.

CEPA	FREC TRIMET ^a	FREC THY- b
<u>S. enteritidis</u>	5×10^{-6}	0.2
E/1/3 L	1×10^{-6}	0.2
E/1/3	5×10^{-6}	0.6

^a Frecuencia de aparición de colonias resistentes al trimetoprim

^b Proporción de colonias resistentes al trimetoprim que son thy-(crecimiento en medio mínimo suplementado con timidina y falta de crecimiento en medio mínimo, sin suplemento)

8.2. Cálculo de los índices de reversión para cada una de las mutaciones en forma independiente y para las dos conjuntamente.

En estos experimentos se analizó la frecuencia de reversión de las mutaciones *ts* y *thy*-, en las cepas E/1/3 y E/1/3L, aisladas en el punto anterior, que acarrean las dos mutaciones. Por un lado se estudió la reversión individual de cada una de las mutaciones y por otro lado se investigó la aparición revertantes para las dos mutaciones. El pocedimiento utilizado se describe en la metodología. En la Tabla 16 se resumen los resultados obtenidos.

TABLA 16. Índice de reversión de las mutaciones *thy*-^a y *ts*^b, en las distintas cepas.

CEPA	IR THY-	IR <i>ts</i>	IR <i>ts</i> y THY- ^c
E/1/3 THY-	4 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷	< 10 ⁻¹⁰
E/1/3L THY-	5 x 10 ⁶	2 x 10 ⁷	< 10 ⁻¹⁰
SENT THY-	4 x 10 ⁶	-	-

^aEl índice de reversión de la mutación *thy*- se calculó sembrando un alto número de colonias en placas de medio mínimo que se incubaron a 37°C (Sent *thy*-) o 28°C (E/1/3 *thy*- y E/1/3L *thy*-).

^bLa reversión de la mutación *ts* se realizó como se describió en los experimentos de índice de reversión.

^cLa reversión de las mutaciones *ts* y *thy* se calculó sembrando un alto número de colonias en placas de medio mínimo que se incubaron a la temperatura restrictiva (37°C).

8.3. Inocuidad de la doble mutante E/1/3L *thy*-.

El objetivo de este experimento fue el de verificar la atenuación de la doble mutante. Para tal fin se utilizó la vía i.p. inoculando a un grupo de 5 animales con una dosis de 2 x 10⁷ UFC/animal. Los animales estuvieron en observación durante 45 días, en este período los animales no presentaron signos de enfermedad y la sobrevida de los mismos fue del 100%

8.4. Inocuidad de la mutante *S. enteritidis* thy-.

La atenuación de la mutación thy- se determinó calculando la DL50 i.p. de la cepa *S. enteritidis* thy-. Se inocularon grupos de 5 animales con dosis graduadas de la cepa. La sobrevivencia se midió a los 30 días de la infección de los ratones. La DL50 por vía i.p. de la cepa *S. enteritidis* thy- en ratones de la cepa *S. enteritidis* Swiss fue 3.2×10^2 UFC/animal. Teniendo en cuenta que la DL50 de *S. enteritidis* 5694 es < 10 UFC/animal, la mutación thy- habría conferido a la cepa *S. enteritidis* una atenuación 320 veces mayor que la cepa virulenta.

Conclusiones parciales:

La frecuencia de reversión de las mutaciones ts y thy- individualmente fue del orden de 5×10^{-6} y 2×10^{-7} por lo tanto, la reversión de ambas mutaciones tendría que estar en el orden de 10^{-12} (coincidiría con los datos experimentales de dan un IR $< 10^{-10}$). El haber disminuido la reversión al fenotipo salvaje virulento de la cepa E/1/3 a una proporción de 10^{-12} la habilitaría para ser utilizada como cepa vacuna.

Al analizar la atenuación de la cepa doble mutante, se vio que la alta inocuidad presentada por la cepa ts E/1/3, se siguió conservando al incorporarle una segunda mutación al genoma. En el caso de que ocurriese la reversión de la mutación ts, la cepa seguiría conservando la mutación thy-, en cuyo caso teniendo en cuenta que la DL50 de *S. enteritidis* 5694 es < 10 UFC/animal, la mutación thy- por si sola conferiría a la cepa *S. enteritidis* una atenuación > 320 con respecto a la cepa virulenta.

Estudio de los mecanismos de inmunidad en la salmonelosis mediante la utilización de cepas ts con diferentes propiedades.

Objetivo 9

Papel de la respuesta inmune humoral local y sistémica, luego de la inmunización i.g. con mutantes ts con diferente capacidad protectora.

Los siguientes estudios se llevaron a cabo con el fin de precisar el rol de los anticuerpos, en especial los sintetizados a nivel local (intestinal), en la inmunidad protectora otorgada por cepas ts de *S. enteritidis*.

9.1. Inmunógenos y esquema de inmunización empleado.

Las cepas bacterianas utilizadas como inmunógenos fueron la mutante C/2/2, que no confirió protección en los ensayos de desafío, la mutante E/1/3 que protegió al 90% de los animales en un experimento tipo de desafío, y la cepa parental muerta por calor (SMC). Se inmunizó en forma i.g. a un grupo de 20 animales, administrando dos dosis de 10^{10} UFC/ml espaciadas por una semana, de cada uno de los inmunógenos, según se describe en la metodología.

9.2. Obtención de las muestras y evaluación de anticuerpos específicos.

A los 7, 14, y 21 días de finalizado el plan de inmunización a 5 animales de cada uno de los grupos se les tomó muestras de plasma y se les hicieron lavados intestinales. En estos experimentos las muestras fueron procesadas en forma individual.

9.2.1. Anticuerpos específicos locales anti-*Salmonella*.

En la Figura 15 se hallan los niveles de IgA local específica anti-*S enteritidis*. A los 7 días de haber finalizado el plan de inmunización, sólo los animales inmunizados con la cepa C/2/2 presentaron niveles de IgA local específica diferentes a los hallados en el grupo control ($p < 0.01$), aumentados dos veces con respecto al control. Al día 14 en los animales inmunizados tanto con la cepa E/1/3 como C/2/2, se detectaron niveles significativos ($p < 0.01$) de IgA local específica que fueron 7 y 4 veces superiores al nivel basal del grupo control. A día 21 la inmunización con C/2/2 indujo niveles de anticuerpos específicos significativos ($p < 0.01$) semejantes a los detectados en el día 7. En los animales inmunizados con SMC, sólo se detectaron al día 21 valores de absorbancia superiores a los del grupo control, pero que no resultaron en una diferencia significativa.

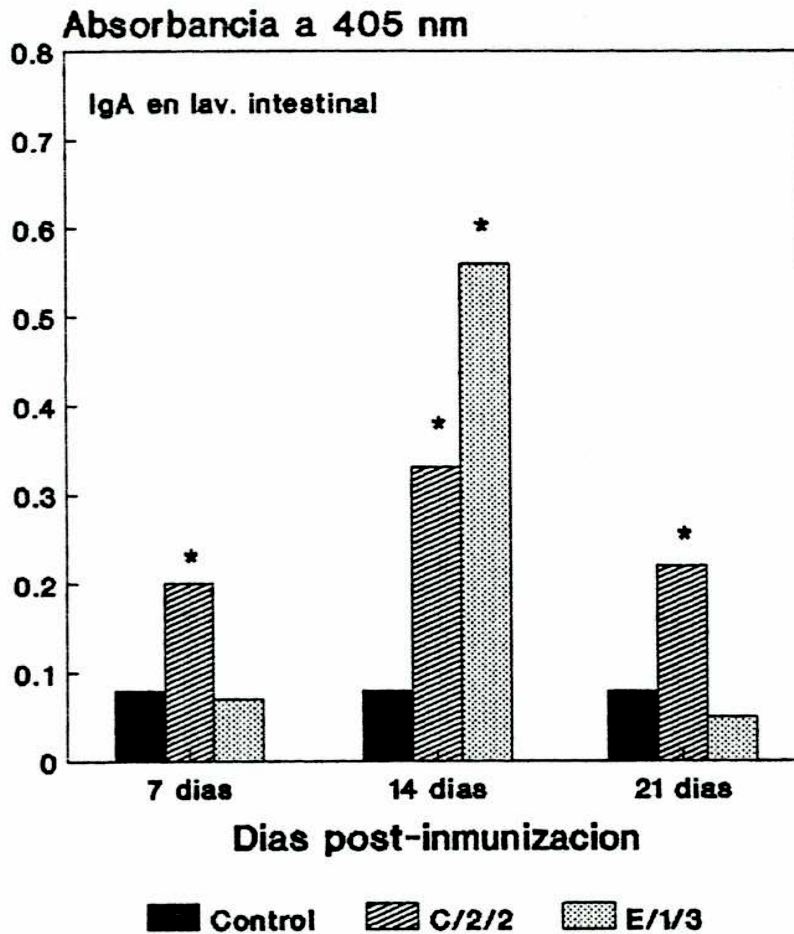


Figura 15. Niveles de IgA local a los 7, 14 y 21 días de la inmunización i.g. con E/1/3 y C/2/2. A los tiempos indicados se tomaron muestras de lavado intestinal de 3 a 5 animales, las que se procesaron en forma individual. Los valores representan los promedios de las absorbancias obtenidas para las muestras individuales. *: Diferencias significativas con un $p < 0.01$, analizadas con el test T de Student.

9.2.2 Anticuerpos específicos circulantes anti-*Salmonella*.

A los 7, 14 y 21 días post-inmunización se determinó la presencia de anticuerpos específicos en el plasma de los animales a los que se les realizaron los lavados intestinales. Se encontraron Ig específicas de los tipos IgA, IgM e IgG en aquellos animales inmunizados con cualquiera de los mutantes, en cambio los que fueron inmunizados con SMC sólo presentaron anticuerpos IgG específicos (Figura 16).

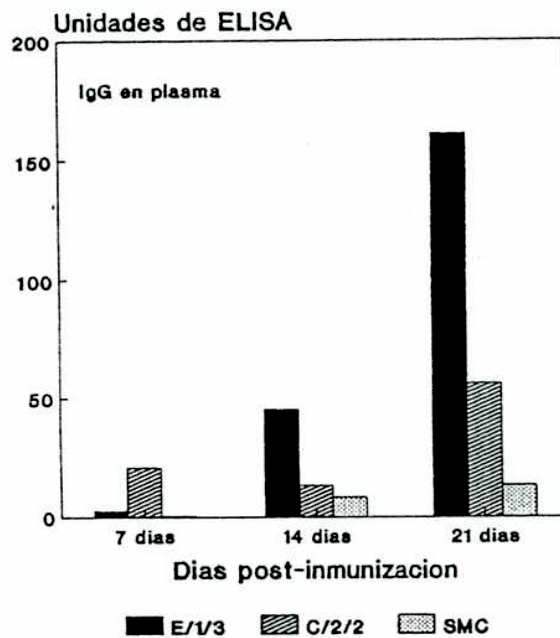
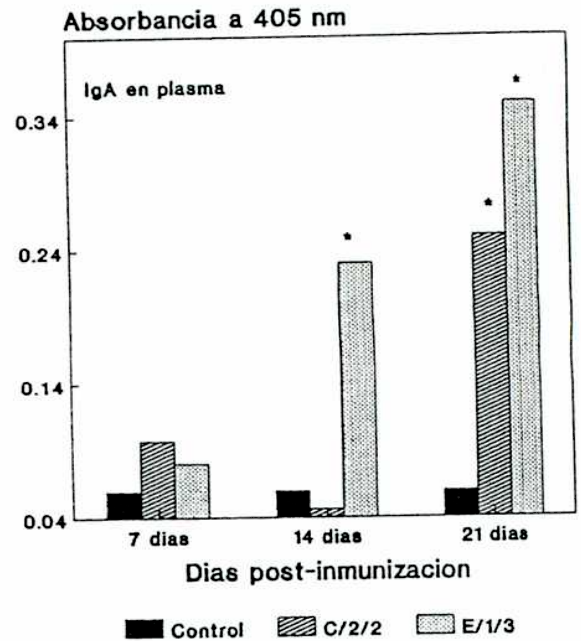
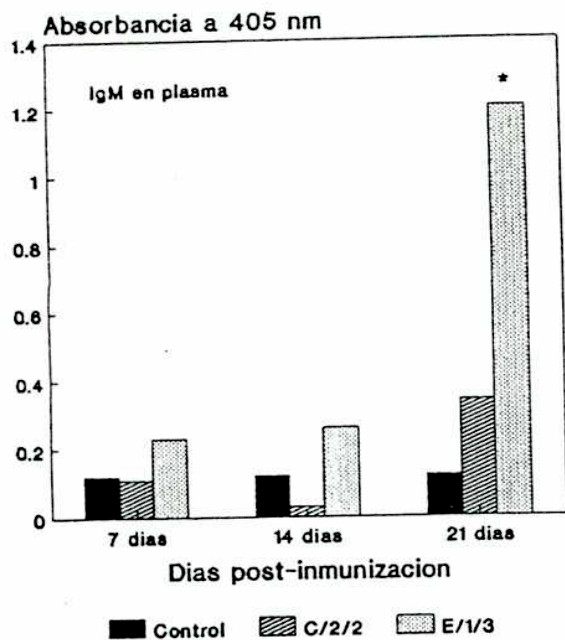


Figura 16. Niveles de IgM (1), IgA (2), e IgG (3) en plasma a los 7, 14 y 21 días de la inmunización i.g. con E/1/3 y C/2/2. A los tiempos indicados se tomaron muestras de plasma de 3 a 5 animales, las que se procesaron en forma individual. Los valores representan los promedios de las absorbancias obtenidas para las muestras individuales. *: Diferencias significativas con un $p < 0.01$, analizadas con el test T de Student.

A los 14 días de la inmunización se detectaron niveles significativos de IgA circulante específica en los animales inmunizados con la cepa C/2/2 mientras que a los 21 días estos se hallaron en los animales inoculados con las cepas E/1/3 y C/2/2.

Solamente la cepa E/1/3 indujo niveles significativos de IgM específicos al día 21 post-inmunización. Al analizar la presencia de IgG específica en circulación, se observó tanto en los animales inmunizados con la cepa C/2/2 como con la E/1/3, un incremento de los niveles en función del tiempo.

A los 21 días de la inmunización se detectó la mayor cantidad de IgG, estos niveles resultaron significativos tanto en los animales inmunizados con la mutante C/2/2 como en aquellos inmunizados con E/1/3. Los valores hallados al día 21 resultaron mayores al utilizar como inmunógeno a la cepa E/1/3. En los animales inmunizados con SMC se pudo detectar IgG específica aunque los niveles hallados resultaron notablemente menores con respecto a los hallados en aquellos inoculados con las mutantes.

9.3. Evaluación del grado de colonización esplénica post-desafío oral con la cepa virulenta.

Al día 21, 5 animales de cada uno de los grupos inmunizados y grupos controles, fueron desafiados p.o. con 80 a 100 DL₅₀ de la cepa parental. A los 5 días del desafío se determinó el grado de colonización esplénica (como una medida de la protección otorgada por las mutantes) tanto de los animales inmunizados como de los controles. En la Figura 17 se grafican las medianas del número de UFC/bazo hallados en los animales de los diferentes grupos. La mediana del número de UFC/bazo del grupo inmunizado con E/1/3, resultó significativamente diferente ($p=0.001$), ya sea respecto del grupo control como de los grupos inmunizados con la cepa C/2/2 ó SMC.

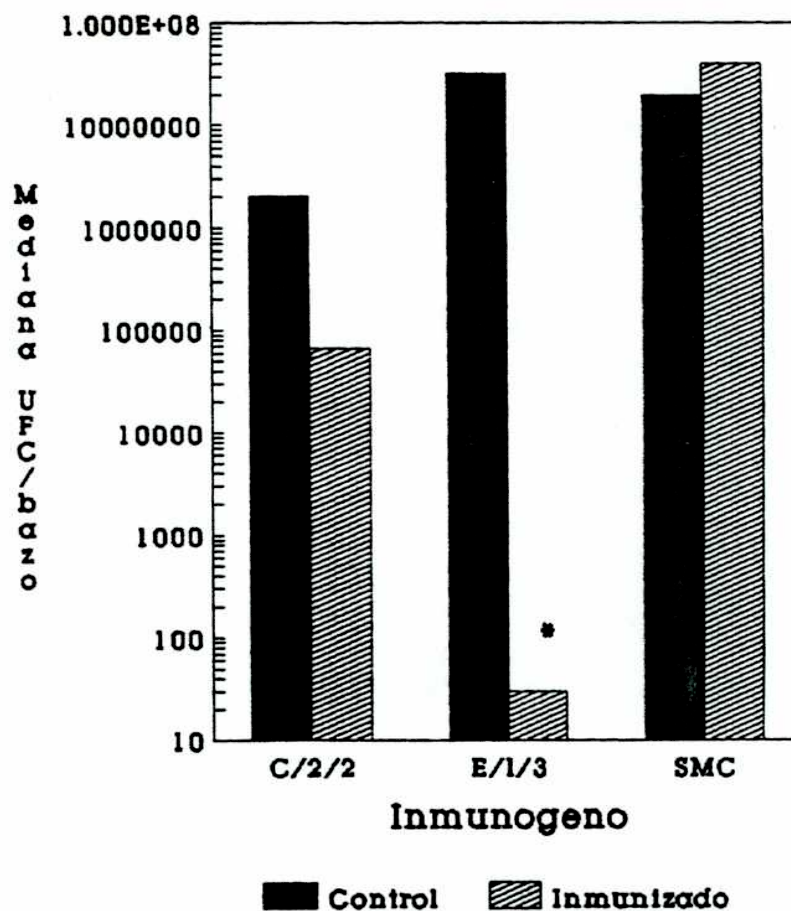


Figura 17. Colonización del bazo 5 días posteriores al desafío oral con la cepa virulenta. Se representan los valores de las medianas de los números de UFC/bazo hallados en 4 a 5 animales de cada uno de los grupos. * Diferencias significativas con respecto al grupo control con $p=0.03$, determinadas por el Rank Sum test.

Conclusiones parciales:

Se detectaron niveles significativos de IgAs en los animales inmunizados con la cepa C/2/2, siete catorce y veiniún días posteriores a la finalización del plan de inmunización. La mutante E/1/3, indujo niveles significativos de IgAs sólo a los 14 días de la inmunización. A diferencia de la anterior determinación de anticuerpos locales descrita en ,no se detectaron IgG o IgM en los lavados intestinales. Esta descrito que las concentraciones de IgG e IgM intestinales pueden resultar muy variables debido a su susceptibilidad a enzimas proteolíticas, y

pasado un mes de almacenamiento es muy difícil su detectarlas (Panosian y col., 1985).

Solamente la cepa E/1/3 indujo niveles significativos de IgM circulante los que se hallaron al día 21 post-inmunización.

Las dos mutantes produjeron una respuesta IgG específica circulante, cuyos niveles aumentaron con el tiempo detectándose los niveles más altos en el día 21, resultando mayores en los animales inmunizados con la mutante E/1/3.

Objetivo 10

Evaluación de la inmunidad celular específica otorgada por cepas ts que otorgan diferente inmunidad tanto protectora como humoral.

10.1. Ensayos de proliferación celular

10.1.1 Inmunización con la cepa E/1/3.

Se inmunizaron en forma i.g. con la cepa E/1/3, a grupos de 6 animales. A los 21 y 28 días post-inmunización se analizó en grupos de 3 animales la proliferación celular específica de células provenientes de bazo y ganglio mesentérico.

En la Tabla 17 se describen los resultados de las experiencias de proliferación celular, la que se calculó en base a los índices de estimulación, (cpm incorporadas por células + Ag ó Con A/ cpm incorporadas por las células + medio RPMI). Se analizó la estimulación de las células provenientes del bazo y ganglio mesentérico de animales controles e inmunizados, al enfrentarse ya sea con el antígeno específico SMC y otro no relacionado como *Pseudomonas aeruginosa* muerta por calor (PMC) (control negativo). También se enfrentaron las células con un mitógeno para células T como la Con A (control +). Sólo cuando las células estuvieron frente al antígeno específico es que los índices de estimulación (S.I.) de las células de bazo y ganglio mesentérico de los animales inmunizados fueron diferentes a los de los animales controles.

En la Tabla 18 se observa que los S.I. de las células provenientes de animales inmunizados

al estar frente al antígeno específico fueron significativamente diferentes con respecto a los S.I. de las mismas células frente al antígeno no específico PMC.

TABLA 17. Proliferación celular calculada en base a los índices de estimulación [cpm (cél + Ag)/(cpm cél + rpmi)]

BAZO CONT.	BAZO INMUN.	GANGLIO CONT.	GANGLIO INMUN.
SMC: 1.85	5.98(p=0.006)	2.5	9.3 (p=.042)
PMC: 1.45	2.16	1.23	1.18
ConA: 27	20	14.3	16

TABLA 18. Comparación de los índices de estimulación de las células provenientes de bazo y ganglio mesentérico de animales inmunizados (B.I. y G.I.) frente a SMC y PMC.

B.I. + SMC	B.I. + PMC	G.I. + SMC	G.I. + PMC
5.98	2.16	9.3	1.2
*P = 0.02		P = 0.006	

*Diferencia calculada en base a la comparación del índice de estimulación de las células de bazo de animales inmunizados frente a SMC con respecto a PMC.

10.1.2. Inmunización con la cepa C/2/2.

Se inmunizaron en forma i.g. con la cepa C/2/2, a grupos de 6 animales. A los 21 y 28 días post-inmunización se analizó en grupos de 3 animales la proliferación celular específica de células provenientes de bazo y ganglio mesentérico.

En la Tabla 19 se comparan los S.I. de las células de animales inmunizados al estar enfrentados

con SMC o con PMC. En este caso, no se observaron diferencias significativas.

TABLA 19. Comparación de los índices de estimulación de las células provenientes de bazo y ganglio mesentérico de animales inmunizados (B.I. y G.I.), frente a SMC y PMC.

B.I. + SMC	B.I. + PMC	G.I. + SMC	G.I. + PMC
1.46	1.3	3.16	3.3
*P = 0.55		P = 0.67	

*Diferencia calculada en base a la comparación del índice de estimulación de las células de bazo de animales inmunizados frente a SMC con respecto a PMC.

10.2. Determinación de la producción de IFN- γ .

Se evaluó la producción de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos de células originados a partir de animales inmunizados con la cepa E/1/3 (descritos en el punto 10.1.1.).

Los niveles basales de IFN- γ producidos por las células de bazo o ganglio mesentérico en contacto con el medio de cultivo variaron entre <100 pg/ml y 250 pg/ml. Al enfrentar las células provenientes de animales controles al antígeno específico (SMC), los valores de IFN- γ , producidos variaron entre 200-500 pg/ml. En los sobrenadantes de las células originarias de ratones inmunizados, los valores de IFN- γ fueron mayores a 4000 pg/ml, tanto en los sobrenadantes de las células de bazo como de ganglio mesentérico.

Conclusiones parciales:

La inmunización i.g. con la mutante E/1/3 indujo una respuesta celular de memoria, que se evidenció por la proliferación celular in vitro frente al antígeno específico.

Los índices de estimulación de las células provenientes de bazo y ganglio mesentérico de

animales inmunizados con la cepa E/1/3 resultaron significativamente mayores, con respecto a los de los animales controles.

Al inmunizar los animales con la cepa C/2/2, la células tanto de ganglio mesentérico como de bazo presentaron índices de estimulación que no presentaron diferencias cuando se enfrentaron con el antígeno específico con respecto a otro antígeno no relacionado.

En presencia del antígeno específico, los sobrenadantes de las células provenientes de animales inmunizados con E/1/3 se detectaron altos niveles de IFN- τ (>4100 pg/ml), comparados con los de los animales controles (200-500 pg/ml).

4. Discusión

Se estima que las enfermedades diarreicas son las responsables de hasta un cuarto de las muertes de niños de países del tercer mundo. Cada año ocurren entre 3.7 - 4.6 millones de muertes innecesarias (Black, R.E., 1993) Este tipo de enfermedades se ubican dentro de las cinco primeras causas de muerte en Latinoamérica. La diarrea causada por infecciones entéricas bacterianas es también la enfermedad más común experimentada por los viajeros internacionales.

Dentro de los agentes bacterianos causantes de diarreas, la salmonelosis ha cobrado una gran importancia en los últimos años. Su incidencia a nivel mundial ha llegado a su nivel más alto en 1979 y a partir de ahí no decreció (Fernández M.C., y col., 1991). Mientras que el número de casos de fiebre tifoidea disminuye en la población de las grandes ciudades, el de las infecciones alimentarias provocadas por *Salmonella* aumenta, debido principalmente al cambio de hábitos nutricionales, al comercio mundial de alimentos y a deficiencias en su elaboración, almacenamiento y distribución (Eiguer T. y col., 1990). En los E.E.U.U. los aislamientos de *Salmonella typhi* se redujeron de 5500 en 1942 a menos de 500 en 1991. Por otro lado otros serotipos de *Salmonella* se han aislado en una proporción que va en aumento desde menos de 500 en 1942 hasta 10.000 a 60.000 casos en 1985 (Shipman L., 1990). Desde 1986 se ha evidenciado un notable incremento en la incidencia de las infecciones causadas por la serovariedad enteritidis, que hasta ese momento se aislaba esporádicamente en Argentina. Dicho fenómeno coincidió a nivel internacional, llamando la atención las infecciones alimentarias colectivas ocurridas en diversos países, además de la Argentina como, Francia, Gales, España y E.E.U.U. (Bol. Microbiol. España, 1985; Bulletin épidemiologique, 1987; Coyle E.F., y col., 1988).

S. enteritidis tiene un amplio rango de huésped, hay algunas evidencias de que algunas cepas están desarrollando una predilección por las aves de corral. Está bien documentada la transmisión vertical (desde gallinas a su progenie o huevos) para *S. enteritidis*. Este tipo de transmisión aumenta rápidamente la incidencia de la enfermedad en el ganado avícola.

Los síntomas de la infección por *S. enteritidis* incluyen diarrea, cefalea, dolor abdominal, náuseas, fiebre y vómitos. La proporción global de casos fatales es menor al 1% pero esta proporción se ve aumentada al 8% en personas de edad avanzada (St. Louis M.E., y col., 1990).

Esta cepa de *Salmonella* tiene la capacidad de invadir órganos fuera del tracto intestinal, más comúnmente que otras variedades. Debido a estas características es que pueden surgir complicaciones, tales como artritis reactiva crónica en un 2% de los pacientes y más comúnmente infecciones focales en varios órganos (Guthrie R.F., 1992).

Mientras que para la prevención de la fiebre tifoidea existen en la actualidad diversas vacunas de uso comercial, no ocurre lo mismo para la prevención de la salmonelosis en animales de consumo humano.

El objetivo general de este trabajo fue el de desarrollar un prototipo de vacuna atenuada de *S. enteritidis*. Los estudios de inmunidad y protección se realizaron utilizando un modelo animal murino. En un futuro se planea utilizar a la cepa E/1/3 para la prevención de la salmonelosis en animales de granja.

Los mecanismos de inmunidad contra la salmonelosis invasiva, todavía esta en discusión, en particular con respecto a los roles relativos de la inmunidad celular con respecto a la humoral en la protección. Por otro lado, los mecanismos por los cuales las vacunas atenuadas confieren inmunidad no están del todo claros, como tampoco se conocen la naturaleza de los inmunógenos protectivos, siendo desconocidos los requerimientos de una cepa para ser una buena vacuna viva (Hormaeche C.E. y col., 1991). La obtención de mutantes ts con diferentes características en cuanto a inmunidad y permanencia en el huésped sirvió como herramienta para el estudio de estos mecanismos.

Cuando se ha comparado la mejor protección otorgada por vacunas atenuadas de *Salmonella* con respecto a la generada por preparaciones celulares muertas, se la ha justificado por la propiedad de las primeras de poder sostener una estimulación antigénica sostenida. Las mutantes ts de fenotipo replicante son capaces de sostener una replicación limitada in vivo, esto permite una estimulación prolongada del sistema inmune.

Se obtuvieron mutantes ts de diferentes fenotipos, con índices de duplicación que variaron

entre 0 y 7. Se pudo observar que las cepas ts mantuvieron las principales características de la cepa salvaje.

Estudios desarrollados con vacunas de *Salmonella* han demostrado que la presencia de la cadena polisacáridica antigénica O, es un requisito importante para otorgar protección (Lindbeg A.A., y col., 1983). La conservación de los antígenos de superficie en las cepas ts se evidenció por la presencia in vitro de los factores 9 y 12.

Por otro lado, los estudios de inmunización i.p. infieren la conservación de una buena parte de los antígenos protectivos, ya que la vacunación con dichas mutantes otorgó protección, que en el caso de E/1/3 fue del 100%, contra el desafío con la cepa virulenta. Asimismo en los animales inmunizados con las mutantes ts, se pudo detectar niveles importantes de Ac específicos contra *S. enteritidis*, lo que indica la conservación de gran parte de los Ag en las cepas ts.

El fenotipo termosensible in vitro se mantuvo, independientemente del medio utilizado para el crecimiento de las cepas mutantes; esto también se mantuvo in vivo, donde las mutantes no pudieron restaurar el fenotipo salvaje a pesar de encontrarse en un medio tan rico como la cavidad del peritoneo. Esto último reflejaría que las lesiones de las cepas ts obtenidas afectan funciones esenciales, y que su reversión es independiente del medio en el que se encuentren.

La cepa parental *S. enteritidis* 5694 resultó sumamente virulenta en el modelo murino utilizado, (DL50 i.p. <10 UF/animal, DL50 p.o. 5×10^5 UFC/animal). Al inocular los animales con dosis i.p. de hasta 10^7 UFC/animal de diferentes cepas ts (equivalente a $>10^6$ DL50/animal de la cepa virulenta) la sobrevivencia de los mismos fue de un 100%. Las cepas ts, también resultaron inocuas al ser inoculadas por la ruta de infección natural de *Salmonella*. Todas las mutantes ts analizadas fueron avirulentas cuando se inocularon vía p.o. ó i.g. en dosis equivalentes a 2×10^4 DL50 de la cepa parental, sin mostrar los animales inoculados ningún signo de enfermedad. Estos resultados denotan la elevada avirulencia de las mutantes, además de demostrar que las frecuencias de reversión in vivo de las cepas ts a la cepa salvaje, son similares a las que se determinaron in vitro (menos de 10 revetantes podrían haber matado al

50% de los animales al utilizar la vía i.p.).

La dosis inmunizante que otorgó una protección más adecuada contra el desafío i.p. fue de 10^7 UFC/animal, el haber administrado dos dosis i.p. no incrementó la inmunidad protectora otorgada por una sola inmunización. Asimismo al inocular los animales con 10^8 UFC/animal de las distintas cepas ts se registraron diferentes porcentajes de muerte, por lo que el plan de inmunización i.p. más apropiado resultó la administración de una sola inoculación i.p. de 10^7 UFC/animal. La inmunización con las mutantes ts de fenotipo replicante E/1/3 y C/2/2, indujo una protección significativa contra el desafío i.p. La colonización esplénica luego de la administración i.p. de la cepa salvaje es un factor determinante de la sobrevivencia de los animales (Muotiola A. , y col., 1989). La colonización esplénica de la cepa virulenta cuatro días posteriores al desafío, se relacionó en forma inversa con la inmunidad protectora inducida en los grupos que recibieron los distintos inmunógenos. Es importante destacar que en el momento del desafío de los animales no se aisló ninguna de las cepas ts del bazo de los animales inmunizados. Es sabido que algunas vacunas vivas atenuadas pueden llegar a persistir durante largos períodos de tiempo en bazo e hígado post-inmunización sistémica, estimulando de esta forma mecanismos de defensa no específicos (Killar L.M., Eisenstein T.K., 1985).

Los experimentos de permanencia realizados con la cepa parental permitieron determinar por un lado, las condiciones óptimas para realizar las experiencias con las cepas mutantes y además tener un mayor conocimiento acerca del ciclo de infección de la cepa parental en el modelo murino utilizado. La permanencia de la cepa salvaje *S. enteritidis* 5694 en ratones Swiss, fue similar a la permanencia de esta cepa en ratones CD-1 (Carter P.B. y Collins F.M., 1974).

La ruta de administración de un microorganismo puede determinar el grado de permanencia del mismo (Nnalue N.A., 1992). La colonización de las PP y bazo fue de diferente magnitud dependiendo de la vía de inoculación, no obstante los patrones de permanencia se conservaron para cada una de las mutantes. Cuando se utilizó la ruta i.g., el número de mutantes ts colonizantes en PP y bazo se incrementó y a su vez la permanencia se prolongó en el tiempo. El menor número de bacterias halladas en los tejidos post-inoculación p.o. con respecto a las encontradas luego de la administración i.g., podría ser debido a la adherencia de

microorganismos a las superficies mucosas y a la inactivación parcial por los mecanismos de defensa de las regiones nasofaríngeas y del tracto gastrointestinal (Wood W.B. y Davis B.D., 1980). Carter y sus colaboradores (Carter P.B., y col., 1975) han demostrado la participación de agregados linfoides asociados con el esófago y el tracto respiratorio, luego de la ingestión de altas dosis de *Salmonella*.

Los estudios de permanencia de las mutantes ts, inoculadas oralmente determinaron que en promedio, la permanencia de las diferentes cepas ts en las placas de Peyer fue de 4 días. En base a estos resultados se diagramó un plan de inmunización tal que se prolongase la permanencia de las cepas en los ganglios linfáticos asociados al intestino (placas de Peyer). El plan de inmunización oral confirmó una protección significativa en los animales inmunizados con la cepa E/1/3. El implementar un esquema de inmunización mixta, con un refuerzo i.p. una semana antes al desafío, incrementó la protección conferida por dicha mutante. Esto último no es sorprendente ya que se ha reportado una elevación de la inmunidad local al realizar un refuerzo parenteral luego de una inmunización local (Hohmann A., y col., 1979).

La ruta de administración i.g. aumentó tanto el grado de colonización como la permanencia de las cepas ts en los tejidos, esto se correlacionó con un aumento en la protección conferida por la cepa E/1/3 y no así con las cepas H/2/26 y C/2/2. No está del todo claro si la falta de inducción de protección por parte de la cepa C/2/2 es debido a su incapacidad para colonizar el bazo. Sería improbable que la mutante C/2/2 tuviera una incapacidad de sobrevivir dentro de las células fagocíticas del bazo, ya que esta cepa colonizó el bazo de los animales inoculados en forma i.p., en el mismo grado que las otras dos cepas ts analizadas. La ausencia de la colonización del bazo luego de la inoculación i.g ó p.o. podría ser explicada por la incapacidad de la cepa C/2/2 de llegar al bazo desde las PP. Se ha sugerido que en la salmonelosis murina la esplenomegalia está relacionada con los mecanismos que inducen una inmunidad protectora (O'Callaghan D., y col., 1988; Killar L.M. y Eisenstein T.K., 1985). Sin embargo, las mutantes pho p de *S. typhimurium* luego de ser inoculadas p.o. no colonizaron el bazo de los animales, pero aparentemente protegieron a los mismos contra un desafío oral (Galán J.E. y Curtiss III R., 1989). Se han observado resultados similares con mutantes gal E de *S. typhimurium* (Collins L.V. y col., 1991). La mutante H/2/26, por el contrario estableció una

colonización esplénica transitoria, pero no fue capaz de inducir protección.

Son varias las cepas atenuadas de *Salmonella* capaces de conferir altos niveles de inmunidad contra desafíos con cepas virulentas en modelos murinos. Se considera recomendable que una vacuna viva de *Salmonella* sea totalmente avirulenta pero además retenga la capacidad de crecimiento restringido en los tejidos del huésped (Collins F.M., 1968). Además una vacuna oral debe ser capaz de tener crecimiento en PP, así como en nódulos linfáticos y en el bazo (Fierer J., y col., 1988).

Se ha hipotetizado que la eficacia de las vacunas vivas está determinada en gran parte por su habilidad de permanecer en los tejidos del huésped, sin embargo esta suposición ha sido ampliamente discutida (Sigwart D.F., y col., 1989; O'Callaghan D., y col., 1988). O'Callaghan y col. al estudiar mutantes auxotrofas no revertantes de *S. typhimurium*, mostraron claramente que la permanencia por sí sola no es suficiente para conferir inmunidad. Análogamente, los resultados obtenidos por Hormaeche y sus colaboradores indicaron que el nivel de protección otorgada por una vacuna viva depende de otros factores además de la permanencia de la cepa vacunal en el huésped y de la virulencia de la cepa del desafío (Hormaeche C.E. y col., 1991). La cepa E/1/3 se detectó luego de 15 días en las PP y en el bazo en bajos números (menos de 50 colonias). Esta escasa permanencia en los tejidos, sin embargo, fue suficiente para conferir protección contra un desafío oral. Esto último estaría de acuerdo con los resultados encontrados por otros (Fahey K.J. y Cooper R.G., 1970). El haber inducido inmunidad protectora con una limitada permanencia de las mutantes ts, representa un hecho ventajoso, ya que una prolongada sobrevida de bacterias en los tejidos del huésped puede ser adverso y además no hay garantía de una eliminación total de las cepas vacunales del huésped (Stabel, T.J. y col., 1990; Ohta M., y col., 1987).

A pesar de estar muy difundido el concepto de que la inmunidad protectora contra la salmonelosis está primariamente mediada por células, las vacunas no viables que inducen solamente una respuesta humoral confieren ciertos grados de protección contra subsiguientes desafíos (Herzberg M.P., y col., 1972). Es sabido que en las fases tardías de la salmonelosis murina, tanto las ramas humoral como celular del sistema inmune, jugarían roles importantes

(Dunlap N. E., y col., 1991). La respuesta celular B sería importante presumiblemente en controlar la bacteriemia en los estadios tardíos de la infección murina por *Salmonella*. Los anticuerpos circulantes ejercerían su acción protectora inactivando los microorganismos extracelulares antes de que accedan al medio intracelular (Groisman E.A. y col., 1990).

La inmunización i.g. con cualquiera de las cepas ts indujo respuestas humorales tanto locales como sistémicas. A los 6 días de la inmunización i.g. con cualquiera de las cepas ts estudiadas se detectó IgA específica en los fluidos intestinales, independientemente del patrón de colonización de la cepa o de su capacidad protectora. También se detectaron en circulación Ig específicas del tipo IgG, IgM e IgA. Luego de la inmunización i.g. con la cepa E/1/3 se detectaron altos niveles de IgM específica en circulación. Este es un hecho significativo ya es sabido que anticuerpos específicos del tipo IgM efectúan la principal contribución tanto para la remoción de *Salmonella* de circulación como para que estas bacterias sean tomadas por el sistema reticuloendotelial (Saxen H., 1984). Para varios investigadores, la expresión de inmunidad celular adquirida es vista como una función celular asistida por anticuerpos, más que una habilidad de los macrófagos inmunes de inactivar *Salmonella* (Hsu H.S., 1989; Whitby .L., 1959).

Se sabe que células IgA de memoria son inducidas en tejidos linfoides asociados a la mucosa, probablemente en PP. Estas células luego van a migrar a través de todo el sistema linfoide y pueden ser reestimulados por un nuevo contacto con el antígeno para convertirse en células plasmáticas. A los seis días de la inmunización con E/1/3, se pudieron detectar células secretoras de anticuerpos en nódulos linfáticos mesentéricos y en bazo.

En el estudio de las enfermedades entéricas está ampliamente aceptado que la eficacia de una vacuna depende de la inducción de una inmunidad intestinal local (Euro reports, 1982). El rol más destacado de los anticuerpos de las mucosas, especialmente IgAs, sería el de la exclusión inmune. Mediante este mecanismo de defensa se evitaría el contacto del patógeno con el epitelio intestinal previniendo la posterior colonización e infección del huésped (Holmgren J., 1991). Sin embargo, en el caso de la salmonelosis no se ha podido establecer claramente la importancia relativa de los anticuerpos locales intestinales en la protección contra la infección (Edelman R., y col, 1986). Estudios recientes (Michetti y col., 1992; Shope S.R., 1991)

sugieren un papel protector de para IgA local en las infecciones causadas por *Salmonella*, aunque estos resultados no son concluyentes. En el trabajo realizado por Michetti y sus colaboradores el sistema utilizado fue relativamente artificial analizando el rol protector de anticuerpos IgAs monoclonales secretados por hibridomas subcutáneos en ratones, además las dosis de desafío empleadas fueron equivalentes a sólo 10 DL50. En el trabajo de Shope y col., debido al modelo de inmunización pasiva que utilizan no queda claro si la leve protección observada se puede atribuir a IgAs o a anticuerpos séricos del tipo IgG.

El desarrollo de vacunas efectivas en contra de enfermedades infecciosas requiere de la existencia de mediciones inmunológicas que se correlacionen significativamente con el grado de protección otorgado por las mismas. Un problema difícil de resolver es el de relacionar los marcadores de inmunidad de fácil determinación con la eficacia de las vacunas. En muchos casos se supone una eficacia sin que hayan pruebas fehacientes de la correlación entre el título de anticuerpos y la eficacia de las vacunas (Levin J.H. y col., 1993).

Actualmente, en las pruebas de campo que se realizan en humanos con la vacuna atenuada *Salmonella typhi* Ty21a, se evalúa la inmunogenicidad de la misma, en base a mediciones directas o indirectas de una respuesta humoral local (Forrest, B.D., 1992; Forrest B.D., 1993). No existen estudios contundentes que avalen la presencia de IgA local como una medida predictiva de inmunidad protectora contra *Salmonella*.

Asimismo otros autores (Tacket C.O. y col., 1992; Olanratmanee y col., 1992) examinan la inmunogenicidad de vacunas atenuadas de *Salmonella typhi* en base a respuestas séricas de IgG, haciendo referencia a pruebas de campo realizadas en Chile. En estos estudios se vió una correlación entre seroconversión de IgG y eficacia de la vacuna para una de las formas en que se administró la vacuna, en cambio para otras formulaciones de la vacuna a pesar de haber seroconversión entre los individuos la eficacia fue limitada (Levine M.M y col., 1989).

Cuando se compararon los patrones de anticuerpos inducidos por cepas ts que confieren distintos grados de inmunidad protectora, tanto la cepa C/2/2, como la E/1/3 indujeron niveles de sIgA significativos. En el caso de la mutante no protectora se encontraron niveles

significativos de IgAs en los tres tiempos analizados, mientras que en los animales inmunizados con la cepa protectora éstos se detectaron sólo a los 14 días de la inmunización. Estos resultados sugieren que al menos en el modelo que se ha utilizado, la presencia de IgA específica local no es un parámetro indicativo de la protección otorgada.

En cuanto a los anticuerpos inducidos a nivel sistémico, en los animales que recibieron la cepa E/1/3 se detectaron altos niveles de IgM. Estos valores se fueron incrementando a lo largo del tiempo, siendo mayores en el día del desafío, en cambio en la cepa no protectora estos niveles resultaron no significativos. Otros autores han demostrado la capacidad protectora de anticuerpos del tipo IgM contra *Salmonella*. En un trabajo reciente (Watson y col., 1992), la inmunización de ratones con polisacáridos O-específicos conjugados a proteínas protegió a los animales induciendo anticuerpos específicos de serogrupo. Cuando estos autores realizaron experimentos de inmunización pasiva con los sueros inducidos por los conjugados, observaron que los anticuerpos IgM resultaron más protectivos que los del tipo IgG; lo que coincidiría con los hallazgos realizados por otros (Robbins, J. B. y col., 1965; Saxén, H.O., 1984).

No todas las vacunas vivas contra *Salmonella* han resultado ser efectivas, las razones por las que han fallado son desconocidas. Varios autores, aunque no todos, suponen que la superioridad de las vacunas vivas es el resultado de la habilidad de éstas para desarrollar inmunidad mediada por células. Sin embargo, todavía no se ha demostrado claramente la importancia relativa de los mecanismos celulares versus los humorales en la protección. Recientes hallazgos indicarían que tanto la inmunidad mediada por células como los anticuerpos serían necesarios en la inmunidad protectora contra la salmonelosis en un modelo murino. Las investigaciones tendientes a caracterizar la inmunidad protectora inducida por LPS asociado a porinas (Muthukkumar S., 1993) se demuestra que la inmunización pasiva con células T y el suero de los animales inmunizados confiere los mayores niveles de protección. La contribución dada por las células T específicas podría relacionarse con la activación de macrófagos o la lisis de células blanco. Además de la activación de macrófagos, otros mecanismos de defensa mediados por factores solubles como el interferón gama secretado por células T, tales como bacteriolisis dependiente de anticuerpos y fagocitosis podrían jugar un papel importante en la

inactivación de las bacterias ingeridas.

Los resultados presentados por Mastroeni, demuestran que tanto anticuerpos como las células T son necesarios para la inmunidad contra el desafío oral con *Salmonella* en ratones susceptibles (Mastroeni P. y col.,1993). Los mecanismos por los cuales operan las ramas inmunes humoral y celular en una infección secundaria con *Salmonella* se desconocen aún. En estudios recientes se ha propuesto que los fagocitos contribuirían en la resistencia en infecciones primarias subletales con especies de *Listeria*, *Francisella* y *Salmonella* lisando hepatocitos infectados (Conlan J. W., y col, 1992). Si la lisis de las células infectadas también tuviera importancia en la inmunidad contra una infección secundaria oral, la resistencia en este caso también requeriría la participación de anticuerpos circulantes. Estos facilitarían la toma de las bacterias por fagocitos con una actividad microbicida aumentada promovida por células T (Mastroeni P. y col.,1993).

En nuestro modelo pudimos observar que la cepa E/1/3 indujo altos niveles de anticuerpos circulantes IgM e IgG.

En cambio en los animales inmunizados con la cepa C/2/2, no protectora, los niveles de IgG específica no resultaron tan altos como en los que recibieron a la cepa E/1/3, aunque fueron significativos con respecto al control. Sin embargo los niveles de IgM específica no fueron significativos. Es conocida la propiedad de los anticuerpos IgM de poseer una capacidad opsonizante 10 veces más activa que anticuerpos del tipo IgG (Robbins y col., 1965; Saxén H., 1984), es probable que esta diferencia estuviera contribuyendo a la inmunidad protectora encontrada en los ratones inmunizados con la mutante E/1/3.

Los ensayos de proliferación celular indicarían que la inmunización con la cepa E/1/3 fue capaz de inducir una respuesta inmune celular específica de memoria. En cambio los ensayos realizados con células provenientes de animales inmunizados con la cepa C/2/2, indicarían una incapacidad de la cepa C/2/2 para montar una respuesta celular de memoria. Se ha sugerido que tanto la habilidad para inducir anticuerpos opsonizantes como inmunidad mediada por células serían dos factores importantes para la inducción de una protección óptima por vacunas de *Salmonella*. Estas dos capacidades fueron demostradas por la cepa E/1/3.

El interferón gama (IFN- γ), citoquina inmunoregulatoria clave, ha mostrado tener un papel preponderante en la defensa del huésped en contra de varios patógenos intracelulares, entre ellos *Salmonella*. La protección otorgada por IFN- γ , en estas infecciones se cree que estaría dada principalmente por su habilidad de activar macrófagos (Kagaya K., 1989).

La activación de macrófagos mediante la acción de citoquinas, sin embargo, no sería el único mecanismo. En estudios recientes sobre defensas en contra de patógenos intracelulares como *Leishmania major* y *Mycobacterium bovis*, se ha descubierto un nuevo mecanismo de activación de macrófagos que involucra el contacto directo entre linfocitos T CD4+ y los macrófagos infectados. Se sugiere que éste sería un mecanismo de defensa importante en las infecciones intracelulares en general (Sypek J.P., y col., 1993).

Son numerosos los trabajos que indican el rol del IFN- γ , en la defensa del huésped en contra de *Salmonella typhimurium*, se ha demostrado la habilidad de esta citoquina administrada en forma i.p. para inducir protección en contra de un desafío endovenoso con una cepa virulenta de *Salmonella typhimurium* (Sonnenfeld G., y col., 1987; Matsumura H., y col., 1990). También se ha documentado el aumento de la susceptibilidad murina a la salmonelosis al administrar anticuerpos anti-IFN- γ (Muotiola A., 1990). Se ha comprobado que luego de la infección natural con *Salmonella typhimurium* tanto el tejido linfoide asociado al intestino como el bazo producen IFN- γ , mostrándose que jugaría un papel esencial en la resistencia a las infecciones del tracto gastrointestinal por *Salmonella* (Ramarthinam L., 1991).

El IFN- γ participaría en la protección de animales inmunizados i.v. con la cepa aro A y desafiados oralmente con la cepa patógena (Mastroeni P., y col., 1992).

En este trabajo las células provenientes de ganglio mesentérico y bazo de los animales inmunizados con la cepa E/1/3 produjeron in vitro al estar frente al antígeno específico altos niveles de IFN- γ .

Con el desarrollo de cepas de *Salmonella* avirulentas pero inmunogénicas, ha sido posible suministrar por la ruta oral antígenos heterólogos al sistema inmune mucoso y sistémico. El uso potencial de diversas cepas de *Salmonella* como vehículos de antígenos heterólogos ha

sido ampliamente explorado (Schodel F., 1990). La primer mutante de *S. typhi* utilizada para administrar antígenos foráneos fue la cepa Ty 21a, que llevaba una plásmido que codificaba para antígenos somáticos del grupo D de Shigella (Formal S.B., 1981). También se ha expresado la subunidad B, no tóxica de la enterotoxina termolábil de *Esherichia coli*, en cepas aro A de *S. dublin* y *S. typhimurium* (Clements J.D. y col., 1986; Maskell D.J. y col., 1987).

Asimismo se han expresado genes para proteínas de membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* (Duchene M., y col., 1989), el gen codificante de la proteína M de *Streptococcus pyogenes* (Poirier T.P., y col., 1988), genes de proteínas de parásitos (Sadoff J.C., y col., 1988; Yang S.M., y col., 1990), y también genes codificantes de antígenos virales (Schodel F., y col., 1989).

Los experimentos realizados en este estudio con la cepa C/2/2, revelaron que la inmunización i.g. no indujo una protección adecuada contra el desafío oral con la cepa virulenta de *S. enteritidis*, sin embargo estimuló una respuesta inmune humoral local significativa. Luego de la inmunización i.g. la cepa C/2/2 fue la que se encontró en mayor número en las PP por lo menos en los primeros días posteriores a la inmunización. En estudios recientes se ha observado que el evento más importante para el desarrollo de una respuesta inmune en contra de un antígeno foráneo es la cantidad de antígeno inicial que impacta el tejido linfoide asociado al intestino y no la permanencia de la cepa vacuna en los tejidos (Cárdenas L., y Clements J.D., 1993). Estos resultados alientan el posible uso de esta cepa como vehículo de antígenos heterólogos.

Los estudios de inmunogenicidad por vía i.p., oral e i.g. indicaron a la mutante E/1/3 como la más indicada para ser utilizada como cepa vacuna. El índice de reversión de esta mutación se corresponde con el de una mutación puntual estando en el orden de 10^{-7} , estos valores de reversión hacen que el uso de la misma en pruebas de campo no sea adecuado. Para garantizar la estabilidad de su atenuación se le incorporó a su genoma una segunda mutación (thy-) con conocido efecto atenuante. Estudios anteriores en los que se utilizó una cepa doble mutante Thy- Ts- de *Shigella flexneri*, indicaron que resultó segura y protectora tanto en conejos

como en monos (Ahmed y col., 1990). Es conocida la estabilización de las cepas vivas mediante la introducción de dos o más marcadores de atenuación (Linde K., y col., 1990; Mitov I., y col., 1992).

El índice de reversión teórico de la doble mutante al fenotipo salvaje estaría dentro del orden de 10^{-14} (coincidiría con los datos experimentales de un IR $< 10^{-10}$). El haber disminuído la reversión al fenotipo salvaje virulento de la cepa E/1/3 la habilitaría para ser utilizada como cepa vacunal, en animales.

La alta inocuidad presentada por la cepa ts E/1/3, se conservó al incorporarle una segunda mutación al genoma.

En el caso de ocurrir la reversión de la mutación ts, la cepa seguiría conservando la mutación thy-, en cuyo caso teniendo en cuenta que la DL50 de *S. enteritidis* 5694 es < 10 UFC/animal, la mutación thy- por sí sola conferiría a la cepa *S. enteritidis* una atenuación 320 veces mayor con respecto a la cepa virulenta.

Conclusiones:

De los resultados obtenidos a partir de este trabajo surgen las siguientes conclusiones:

De dos experimentos de mutagénesis se obtuvieron un total de setenta y nueve colonias con características de termosensibilidad en su crecimiento, lo que representó en promedio un 4 % del total de las colonias sembradas.

Se caracterizaron veintiún mutantes para estudios de crecimiento en medio líquido. De estos se hallaron mutantes de diferentes fenotipos, con índices de duplicación que variaron entre cero y siete. Las cepas ts descritas mantuvieron las características de la cepa salvaje analizadas. El fenotipo termosensible resultó independiente del crecimiento de las cepas en diferentes medios.

Las mutantes ts E/1/3 y C/2/2 fueron capaces de otorgar una protección significativa contra el desafío, al ser inoculadas por vía i.p. La colonización esplénica de la cepa virulenta cuatro días posteriores al desafío, se relacionó en forma inversa con la inmunidad protectora inducida en los grupos que recibieron los distintos inmunógenos por vía i.p.

Las tres mutantes ts, analizadas con respecto a su relación con el huésped post-inoculación p.o. o i.g., presentaron diferentes patrones de permanencia en los diferentes órganos. La administración de los microorganismos por la vía i.g., incrementó el grado de colonización así como la permanencia de las distintas cepas ts. Sin embargo la distribución de las diferentes mutantes en los distintos órganos del huésped fue similar para las dos vías de inoculación ensayadas.

La inoculación i.g. de las mutantes aumentó la permanencia de las cepas en los diferentes órganos. Este aumento en la colonización y permanencia de las mutantes ts, en el caso de la cepa E/1/3, se correlacionó con un incremento de la protección otorgada.

La cepa ts que confirió una protección adecuada al ser administrada por la vía i.g. es capaz de colonizar tanto las PP como el bazo, en cambio a las otras dos cepas ts se las detectó en PP o en el bazo solamente.

Al implementar tanto un plan de inmunización oral como mixto la inoculación de la cepa E/1/3 indujo una protección significativa de cuarenta y setenta por ciento respectivamente.

A los 6 días de la inmunización i.g. con cualesquiera de las cepas ts utilizadas, se detectaron anticuerpos específicos en los lavados intestinales y en circulación. En los animales inmunizados con la cepa E/1/3, se detectaron células productoras de anticuerpos en ganglios linfáticos mesentéricos y en bazo.

Al transferir las mutaciones ts al genoma original, las transductantes ts obtenidas siguieron manteniendo las características de crecimiento tanto en medio sólido como líquido de

las cepas ts originales.

La protección otorgada por las mutantes H/2/26L y C/2/2L coincidió con lo obtenido con las mutantes "sucias" pero no ocurrió lo mismo con la cepa E/1/3L. A pesar que la sobrevivencia de los animales inmunizados con E/1/3L resultó significativa con respecto al control el porcentaje de protección fue menor al otorgado por la cepa ts original.

Se incorporó una segunda mutación atenuada al genoma de la cepas E/1/3L y E/1/3. Al analizar la atenuación de la cepa doble mutante, se vio que la alta inocuidad presentada por la cepa ts E/1/3, se siguió conservando al incorporarle una segunda mutación al genoma.

Se detectaron niveles significativos de IgAs en los animales inmunizados con la cepa C/2/2, siete catorce y veintiún días posteriores a la finalización del plan de inmunización. La mutante E/1/3, indujo niveles significativos de IgAs sólo a los 14 días de la inmunización.

Solamente la cepa E/1/3 indujo niveles significativos de IgM circulante los que se hallaron al día 21 post-inmunización.

Las dos mutantes produjeron una respuesta IgG específica circulante, cuyos niveles aumentaron con el tiempo detectándose los niveles más altos en el día 21, resultando mayores en los animales inmunizados con la mutante E/1/3.

La inmunización i.g. con la mutante E/1/3 indujo una respuesta celular de memoria, que se evidenció por la proliferación celular in vitro frente al antígeno específico.

Los índices de estimulación de las células provenientes de bazo y ganglio mesentérico de animales inmunizados con la cepa E/1/3 resultaron significativamente mayores, con respecto a los de los animales controles.

Al inmunizar los animales con la cepa C/2/2, la células tanto de ganglio mesentérico

como de bazo presentaron índices de estimulación que no presentaron diferencias cuando se enfrentaron con el antígeno específico con respecto a otro antígeno no relacionado.

En presencia del antígeno específico, los sobrenadantes de las células provenientes de animales inmunizados con E/1/3 presentaron altos niveles de IFN- τ (> 4100 pg/ml), comparados con los de los animales controles (200-500 pg/ml).

En resumen, a partir de este trabajo se obtuvieron y caracterizaron mutantes ts de diferentes fenotipos, de las cuales la cepa E/1/3 de fenotipo replicante confirió la protección más adecuada. Esta cepa luego de la inoculación i.g. fue capaz de colonizar tanto las PP como el bazo de los animales inoculados. Esta cepa indujo una respuesta humoral tanto local como sistémica. Es de destacar la respuesta humoral del tipo IgM como IgG que se detectó en los animales que recibieron a la cepa protectora. A su vez la mutante E/1/3 indujo una respuesta celular de memoria evidenciada por la proliferación celular frente al antígeno específico como por la producción de IFN- τ . Para poder utilizar esta cepa en un futuro en pruebas de campo, es que se le adicionó una segunda mutación que disminuiría la virulencia de la cepa en el caso de que ocurriese la reversión de la mutación ts.

Futuro:

Los próximos estudios que se planean llevar a cabo, incluyen por un lado pruebas de protección en animales de consumo humano, como el ganado avícola, utilizando como inmunógeno a la cepa doble mutante E/1/3.

A su vez dado que los mecanismos de inmunidad protectivos en salmonelosis no están del todo dilucidados, se continuará analizando a los diversos los componentes del sistema inmune celular en relación con su importancia en la protección otorgada por vacunas vivas atenuadas.

Asimismo se profundizarán los estudios de inmunidad humoral local y sistémica utilizando otras cepas atenuadas que confieren protección, en nuestro modelo animal, con el fin de poder relacionar la presencia de un mismo patrón de inmunoglobulinas con inmunidad protectora.

5. Resumen

Las infecciones entéricas que derivan en enfermedades diarreicas representan uno de los principales problemas de la salud mundial. En los países del tercer mundo, ocurren por lo menos mil millones de casos por año, resultando en 5 a 10 millones de muertes. Muchas de estas infecciones son transmitidas por alimentos contaminados, dentro de las cuales está la salmonelosis.

El género *Salmonella* comprende a bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos, agentes etiológicos de diferentes enfermedades referidas colectivamente como salmonelosis.

La salmonelosis representa un importante problema de salud en todas partes del mundo. A diferencia de lo que ocurre en humanos no se dispone de una vacuna comercial contra *Salmonella* para uso animal.

Las mutantes bacterianas termosensibles (ts), en su crecimiento son una herramienta promisoría para la producción de vacunas vivas contra enfermedades bacterianas. La atenuación de estas cepas se basa en la característica de las mutantes de poder replicarse a bajas temperaturas (26°C/ 28°C) pero de cesar su duplicación a la temperatura corporal (37°C). La sensibilidad a la temperatura como método de atenuación ofrecería la ventaja sobre otras atenuaciones de ser aplicable, en principio, para cualquier patógeno de mamíferos.

En este trabajo se obtuvieron mutantes ts de diferentes fenotipos. Las mutantes analizadas en los estudios in vivo presentaron características bien diferenciadas, en cuanto a sus propiedades inmunogénicas y en cuanto a sus patrones de permanencia en el huésped. La administración de los microorganismos por la vía i.g., incrementó el grado de colonización así como la permanencia de las distintas cepas ts. Sin embargo la distribución de las diferentes mutantes en los distintos órganos del huésped fue similar para las dos vías de inoculación ensayadas.

La cepa ts que confirió una protección adecuada al ser administrada por la vía i.g. fue capaz de colonizar tanto las PP como el bazo, en cambio las otras dos cepas ts se las detectó en PP o en el bazo solamente.

La inmunización i.g., tanto con la cepa protectora E/1/3 como con la mutante C/2/2, que no otorgó una inmunidad protectora adecuada, indujeron IgA en intestino. Solamente la cepa E/1/3 indujo niveles significativos de IgM circulante los que se hallaron al día 21 post-inmunización. Las dos mutantes produjeron una respuesta IgG específica circulante, cuyos

niveles aumentaron con el tiempo detectándose los niveles más altos en el día 21, resultando mayores en los animales inmunizados con la mutante E/1/3.

La inmunización i.g. con la mutante E/1/3 indujo una respuesta celular de memoria, que se evidenció por la proliferación celular in vitro frente al antígeno específico. Al inmunizar los animales con la cepa C/2/2, la células tanto de ganglio mesentérico como de bazo presentaron índices de estimulación que no fueron diferentes cuando se enfrentaron con el antígeno específico con respecto a otro antígeno no relacionado. En presencia del antígeno específico, los sobrenadantes de las células provenientes de animales inmunizados con E/1/3 presentaron altos niveles de IFN- τ (>4100 pg/ml), comparados con los de los animales controles (200-500 pg/ml).

Tanto en los estudios de inmunización sistémica, p.o., o i.g. la mutante E/1/3 confirió la protección más adecuada, por este motivo es que se seleccionó a esta cepa como posible cepa vacuna. Se incorporó una segunda mutación atenuada al genoma de la cepas E/1/3L y E/1/3. Al analizar la atenuación de la cepa doble mutante, se vió que la alta inocuidad presentada por la cepa ts E/1/3, se siguió conservando al incorporarle una segunda mutación al genoma. El índice de reversión de las dos mutaciones en forma conjunta, resultó menor a 10^{-10} , niveles tan bajos de reversión propiciarían a esta cepa para ser utilizada como vacuna en animales de consumo.


MARIA CRISTINA CERQUETTI
DOCTORA EN BIODIVERSIDAD



6. Bibliografía

Ahmed Z. U., Sarker M. R. and Sack D. A. Protection of adult rabbits and monkeys from lethal shigellosis by oral immunization with a thymine requiring and temperature - sensitive mutant of *Shigella flexneri* Y. *Vaccine* 8:153-158, 1990.

Bacon G.A., Burrows T.A. and Yates M. The effects of biochemical mutation on *Bacterium typhosum*: the loss of virulence of certain mutants. *Br. J. Exp. Pathol.* 32:85-96, 1951.

Barow P.A. and Lovell M.A. The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella pullorum*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2307-2316, 1988.

Barrow P.A., Simpson M.A., Lovell M.A. and Binns M.M. Contribution of *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* 55:388-392, 1987.

Black R.E. Epidemiology of traveller's diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev. Infect. Dis.* 12:573, 1990.

Bol. Microbiol. Semanal. Dirección General de Salud Pública. Madrid. España. "Salmonellas causantes de brotes diarreicos. 18:8, 1985.

Boletines epidemiológicos nacionales. Sistema nacional de vigilancia de las enfermedades. Anuales :1990, 1991, 1992. Ministerio de Salud y Acción Social.

Brandtzaeg, P. Overview of the mucosal immune system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146: 13-25, 1989.

Bulletin épidémiologique hebdomaire. Francia. Les infections á *S. enteritidis* en 1987. 26:101, 1988.

Butcher E.C. The regulation of lymphocyte traffic. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 128:85, 1986.

Cárdenas L. and Clements J.D. Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vectors. *Vaccine* 11:126-135, 1993.

Carter P.B., and Collins F.M. The route of enteric infection in normal mice. J. Exp. Med. 139:1189-1203, 1974.

Carter P.B., Woolcock J.B. and Collins F.M. Involvement of the upper respiratory tract in orally induced salmonellosis in mice. J. Infect.Dis. 131:570-574, 1975.

Centers for Disease Control. *Salmonella* surveillance report 1990. Atlanta, GA: United States Department of Health and Human Services. Public Health Service, 1991.

Cerquetti, M.C., Gherardi M.M. and Sordelli D.O. Evaluation of different temperature-sensitive mutant phenotypes of *S. enteritidis* as vaccine potentials. Current Microbiol. 21:225-228, 1990.

Clements J.D. Use of attenuated mutants of *Salmonella* as carriers for delivery of heterologous antigens to the secretory immune system. Pathol. Immunopathol. Res. 6:137-146, 1987.

Collins F.M., and Mackaness G.B. Delayed hypersensitivity and Arthus reactivity in relation to host resistance in *S. enteritidis* infected mice. J. Immunol. 101:830-845, 1968.

Collins L.V., Attridge S., and Hackett J. Mutations at *rfc* or *pmi* attenuate *S. typhimurium* virulence for mice. Infect. Immun. 59:1079-1985, 1991.

Collins, F.M. Cross-protection against *Salmonella enteritidis* infection in mice. J. Bacteriol. 95:1343-1349, 1968.

Conlan J.W., and North R.J. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocitogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. Infect. Immun. 60:5164-5171, 1992.

Coyle E.F., Ribeiro C.D., Howard A.J., Rowe B., Palmer S.R., Jones H.I., Ward L. *S. enteritidis* phage type 4 infection association with hen's eggs. Lancet 1295-1297., 1988.

Curtiss III R. and Kelly, S.M. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic amp receptor protein are avirulent and immunogenic. Infect. Immun. 55: 3035-3043, 1987.

Curtiss III R. and Kelly S.M. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* 55:3035-3037, 1987.

Czerkinsky C. C, Nilsson L., Nygren H., Ouchterlony O. and Tarkowsky A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody secreting cells. *J. Immunological Methods* 65:109-121, 1983.

Czerkinsky C., Rusell M., Lycke N., Lindblad M. and Holmgren J. Oral administration of streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.* 57:1072-1077, 1989.

D'Aoust J.Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *Int. J. of Food Microbiol.*, 12:17-21, 1991.

David R.W. y col. *Advanced Bacterial Genetics. A manual for genetic engineering.* Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratories, 1980.

Dorman C.J., Chatfield S., Higgins C. F., Hayward C. and Dougan G. Characterization of porin and ompR mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: ompR mutants attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 57:2136-2140, 1989.

Duchene M., Barron C., Schweizer A., Spetch B.U. Domdey H. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein I gene: molecular cloning, sequence and expression in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 171: 4130-4137, 1989.

Eiguer T., Caffer M.I., Fronckowsky G.B. Importancia de la *S. enteritidis* en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Argentina, años 1988-1990. *Rev. Arg. Microbiol.* 22:41-46, 1990.

Elson Charles O, Eading W. and Lefkowitz Jerry. *J. Immunol. Methods* 67: 101-108

Elson C.O., Eading W. and Lefkowitz J. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. *J. Immunol. Methods* 67:101-108, 1984.

Fahey, K.J. and Cooper, G.N. Oral immunization against experimental salmonellosis. I. Development of temperature sensitive mutant vaccines. *Infect. Immun.* 1: 263-270, 1970.

Fernández M.C. y Frade, A.H. Salmonelosis. *Infectología y Microbiología Clínica*, Vol 3 N° 3, 1991.

Fields P.I., Groisman E. and Heffron F. A *Salmonella* locus that controls the resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243:1059-1061, 1989.

Fierer J., Chikami G., Hatlen L., Hefferman E.J., and Guiney D. Active immunization with LD842, a plasmid-cured strain of *Salmonella dublin*, protects mice against group D and group B *Salmonella* infection. *J.Infect.Dis.* 158:460-463, 1988.

Finlay B.B. and Falkow S. A comparison of microbial invasion strategies of *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia* species. En: M.A. Horwitz (Ed), *Bacteria-Host Cell interaction*, Alan R. Liss, New York, NY, 227-230, 1988.

Finlay B.B. and Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbial Rev.* 53: 210-230, 1989.

Formal S.B., Baron L.S., Kopecko D.J. Powell C. Life C.A. Construction of a potential bivalent vaccine strain: introduction of *S.sonnei* form I antigen genes into the gal E *Salmonella typhi* Ty21a typhoid vaccine strain. *Infect. Immun.* 34:746-750, 1981.

Freter R. Association of enterotoxigenic bacteria with the mucosa of the small intestine: mechanisms and pathogenic implications. En Outcherlony O, Holmgren J. (eds): *Cholera and related diarrheas*. Basel, Karger, pág:155, 1980.

Galán, J.E. & Curtiss, R. III. Virulence and vaccine potential of pho P mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microbial Pathogenesis* 6:433-443, 1989.

Germanier R., and Furer E. Isolation and characterization of galE mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. *J.Infect. Dis.* 131:553-558, 1975.

Germanier R., and Furer E. Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence of galE mutants of *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* 4:663-673, 1971.

Germanier R. Typhoid fever. En: *Bacterial vaccines*. R Germanier (ed). Academic Press, Inc., New York, 1984.

Griffin P. M., Tauxe R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol.Rev.* 13:60-98, 1991.

Groisman E.A., Fields P.A., and Heffron F. Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. En: *The Bacteria. A Treatise on Structure and Function. Volume XI. molecular Basis os Bacterial Pathogens.* (Eds Eglewski, B.H.and Clark, V.L.) Academic Press, San Diego, California, pág:251-271, 1990.

Guthrie R.K. *S. enteritidis* in eggs. En: *Salmonella*, capítulo 7, pág 117, . CRC Press, 1992.

Hanson L.A., Brandtzeq P. The mucosal defense system. En: *Immunological disorders in infants and children.* Stiehm E.R., Ed.) tercer ed., pág:116-155, 1989.

Herzbeq M.P., Nash P. and Hino S. Degree of immunity induceed by killed vaccines to expeerimental salmonellosis in mice. *Infect. Immun.* 5:83-90, 1972.

Hohmann, A., Schmidt, G. & Rowley, D. Intestinal and serum antibody responses in mice after oral immunization with *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Salmonella-Escherichia coli* hybrids strains. *Infect. and Immun.* 25:27-33, 1979.

Holmgren J., Lindberg A., Molby R (eds): *Development of vaccines and drugs against diarrhea.* Lund, Studentlitteratur, 1986.

Holmgren J. and Svennerholm A.M. Bacterial enteric infections and vaccine development. *Mucosal Immunology II: Clinical applications* 21 (2):283-302, 1992.

Hormaeche C.E., Joysey, H.S., Deilva L., Izhar M., and Stocker B.A.D. Immunity conferred

by aro-*Salmonella* live vaccines. Microb. Pathog. 10:149-158, 1991.

Hornick R.B. *Salmonella* infections other than typhoid fever. En J.B. Wyngaarden and L. H. Smith(eds). Libro de texto de medicina, WB. Saunders, Philadelphia,PA, pág:1643-1646, 1988.

Hosieth S. K. and Stocker B.A.D. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. Nature (London) 291:238-239, 1981.

Hsu, H.S. Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. Microbiol. Rev. 53:390-409, 1989.

Humphrey T.J. Baskerville A., Mawer S., Rowe B., Hopper S. *S. enteritidis* phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. Epidemiol. Infect. 103:415-23, 1989.

Iwarson S., and Larsson P. Intradermal versus subcutaneous immunization with typhoid vaccine. J. Hygh. 84:11-15, 1980.

Jacobson A. and Gillespie D. Screening of *Escherichia coli* temperature-sensitive mutants by pretreatment with glucose starvation. J. Bacteriol. 95:41-50, 1968.

Johnson W.D. and Pape J.W. Salmonellosis (other than typhoid fever). En: H.F. Conn (Ed.), Current Therapy, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, pág:65-67, 1983.

Kagaya K., Watanabe k., Fukazawa Y. Capacity of rIFN- τ , to activate M0 for *Salmonella typhimurium* infection. Microb. Pathogen. 8:135-41, 1989.

Killar L.M., and Eisenstein T.K. Immunity to *Salmonella typhimurium* infection in C3H/Hej and C3H/HeNCr1BR mice: studies with aromatic-dependent live *S. typhimurium* strain as a vaccine. Infect.Immun. 47:605-612, 1985.

Klugman K.P., Gilbertson I.T., Koornhof H.J. Vaccination Advisory Committee. Protective efficacy of Vi capsular polysaccharide against typhoid fever. Lancet 2:1185, 1987.

Lindberg A.A., Robertson J.A. *Salmonella typhimurium* infection in calves: cell mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. *Infect.Immun.* 41:751-757, 1983.

Linde K., Beer J. and Bondarenko V. Stable *Salmonella* live vaccine strains with two or more attenuating mutations and any desired level of attenuation. *Vaccine* 8:278-282, 1990.

Lycke N. and Holmgren J. Adoptive transfer of gut mucosal antitoxin memory by isolated B cells 1 year after oral immunization with cholera toxin. *Infect. Immun.* 57:1137-1141, 1989.

Madara J.L. and Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J. Clin Invest.* 83:724-727, 1989.

Maskell D.J., Sweeney K.J., O'Callaghan D., Hormaeche C.E., Liew F.Y., Dougan G. *Salmonella typhimurium* aro A mutants as carriers of the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit to the murine secretory and systemic immune systems. *Microb. Pathog.* 2:211-221, 1987.

Mastroeni P., Villarreal-Ramos, and Hormaeche C.E. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible Balb/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect. Immun.* 61:3981-3984, 1993.

Mastroeni P., Villarreal-Ramos B. and Hormaeche C.E. Role of T cells, TNF and IFN- γ in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro- salmonella vaccines. *Microb. Pathogen.* 13:477-491, 1992.

Matsumura H., Onozuka K., Terada Y., Nakano Y., Nakano M. Effect of murine recombinant IFN- γ in the protection of mice against *Salmonella*. *Int. J. Immunopharmac.* 12:49-56, 1990.

Mayoral C., Pagani M.R., Procopio M.E., y Beltramino J.C. Aislamiento de *Shigella* y *Salmonella* en el Hospital de niños R.Gutiérrez de Santa Fé durante el período 1981-1990. *Infectología y Microbiología Clínica* 4 (3):68-72, 1992.

Mc Ghee J.R., Mestecky J., Elson C.O. and Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.* 9:175-199, 1989.

Mc Farland, W.C. & Stocker, B.A.D. Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse virulence of a Vi- positive strain of *S.dublin* and two strains of *S. typhimurium*. Microb. Pathogen. 3:129-41, 1987.

Mitov I., Denchev V. and Linde K. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of *Salmonella typhimurium*: auxotrophic mutants with two attenuating markers. Vaccine 10 (1):61-66, 1992.

Morris Hooke A, Arroyo PJ, Oeschger MP, Bellanti JA. Temperature-sensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: isolation and preliminary immunological evaluation. Infect. Immun 38:136-140, 1982.

Muotiola A., Hovi M., Makela P.H. Protective immunity in mouse salmonellosis: comparison of smooth and rough live and killed vaccines. Microb. Pathogen. 6:51-60, 1989.

Muotiola A., Makela H.P. The role of IFN- γ in murine *Salmonella typhimurium* infection. Microb. Pathogen. 8:135-141, 1990.

Muthukkumar S. and Muthukkaruppan V.R. Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. Infect. Immun. 61:3017-3025, 1993.

National Foundation for Infectious Diseases, NIFD revises top ten priorities for research funding, The Double Helix, 14 (3):4, 1989.

National Foundation for Infectious Diseases, Top 10 infectious diseases, The Double Helix, 13 (3):4-5, 1988.

Nnalue N.A., Shnyra A., Hultenby K., and Lindberg A.A. *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella typhimurium* associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are localized mainly in Kupffer cells and multiply intracellularly. Infect. Immun. 60:2758-2768, 1992.

O'Callaghan D., Maskell D., Liew F.Y. Easmon C.S.F., and Dougan G. Characterization of aromatic dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. Infect.Immun. 56:419-423, 1988.

O'Callaghan, D., Maskell, D., Liew, F.Y., Easmon, C.S.F. & Dougan, G. Characterization of aromatic and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence and ability to induce protective immunity in BALB/mice. *Infect. and Immun.* 56: 419-423, 1988.

Ohta, M., Kido, N., Yasuaki, F., Arakawa, Y., Komatsu, T. & Kato, N. Temperature-sensitive growth mutants against experimental murine salmonellosis. *Microbiology and Immunology* 31 (12):1259-1265, 1987.

Padula E.A., Cotella O.J., Fernandez Pascua C.A., Lopez Gomez E., Maurel D.A. y Vega M. E. Brote de enterocolitis por salmonellas. Resúmenes del V Congreso Argentino de Microbiología A3, 1988.

Panosian C. B. and Gorbach L.S. Infections diseases of the gasrointestinal tract. En: Gallin J.I. and Fauci A.S.(ed). *Mucosal Immunity*. Raven Press, New York. pág. 165-187, 1985.

Pavia A.T., Shipman L.D., Wellls J.G., Puhr N. D., Mc Kinley T. W. and Tauxe R.V. Epidemiologic evidence that prior antimicrobial exposure decreases resistance to infection by antimicrobial-sensitive *Salmonella*. *J.Infect. Dis.* 161:255-260, 1990.

Poirier T.P., Kehoe M.A., Beachey E.H. Protective immunity evoked by oral administration of attenuated aro A *Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein. *J. Exp. Med.* 168: 22-32, 1988.

Potter, M.E. The Changing face of foodborne disease. *JAVMA*, Vol 201, No 2, 1992.

Programa Nacional de Enfermedades Endémicas. Diarreas de la infancia. Temas prioritarios por líneas de investigación. Programación presupuesaria SeCyT, 1986.

Quiding M. Nordstrom I., Kilander A., Anderson G. Intestinal immune responses in human. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. *J. Cli. Invest.* 88:143-148, 1991.

Ramarathinam L., Shaban R.A., Niesel D.W. and Klimpel G.R. Interferon gamma production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *Salmonella typhimurium* challenge. *Microb. Pathogen.* 11:347-356, 1991.

Robbins J.B., Kenny K. and Suter E. The isolation and biological activities of rabbit IgM and IgG anti-*Salmonella typhimurium* antibodies. J. Exp. Med. 122:385-401, 1965.

Rodrigue D.C., Tauxe R.V., Rowe B. International increase in *S. enteritidis*: a new pandemic?. Epidemiol. Infect. 105:21-7, 1990.

Sadoff J.C., Ballou W. R., Baron L.S., Majarian W. R. Brey R.N., Hockmeyer W.T., Young J.F., Cryz S.J., Ou J., Lowell G.H. Chulay J.D. Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. Science 250:336, 1988.

Saxen, H. (1984). Mechanism of the protective action of anti-*Salmonella* IgM in experimental mouse salmonellosis. Journal of General Microbiology 130, 2227-2283.

Schodel F. Oral vaccination using recombinant bacteria. Seminars in Immunology, 2: 341-349, 1990.

Schodel F., Weimer T., Will H., Milich D. Recombinant hepatitis B virus (HBV) core particles carrying immunodominant B cell epitopes of the HBV pre-S(2) region. En Vaccines 90 (Brown F., eds) 193-198. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

Sedgwick J.D. and Holt P.G. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. J. Immunological Methods 57:301-309, 1983.

Shipman L., presentado para *S. enteritidis* Regional Work conference Central Region Kansas City, M.O., 1990.

Snyder J., Merson M. The magnitude of global problem of acute diarrhoeal: a review of surveillance data. Bull W.H.O. 60:603-612, 1982.

Sonnenfeld G., Gould C.L. Effect of treatment with IFN- and concanavalin A on the course of infection of mice with *Salmonella typhimurium*. J. Interferon Res. 7:255-66, 1987.

Sordelli, D.O., Rojas, R.A., Cerquetti, M.C., Morris Hoocke, A, Degnan, P.J. & Bellanti, J.A.

Enzyme-linked immunosorbent assay antibody responses to a temperature-sensitive mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 50: 324-327, 1987.

St. Louis M.E., Morse D.L., Potter M.E., De Melfi T.M., Guzewick J.J., Tauxe R.V., Blake P.A. The emergence of Grade A eggs as a major source of *S. enteritidis* infections. *JAMA* 259: 2103, 1990.

Stabel, T.J., Mayfield, J.E., Tabatai, L.B. & Wannemuehler, M.J. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* containing a recombinant plasmid which codes for production of a 31-kilodalton protein of *Brucella abortus*. *Infect. and Immun.* 58: 2048-2055, 1990.

Suphabphant W., York M.D. and Pomperoy B.S. Use of two vaccines (live G30D or killed RW16) in the prevention of *Salmonella typhimurium* infection in chickens. *Avian Dis.* 27:602-615, 1983.

Sypeck J.P., Jacobson S., Vorys A., and Wyler D.J. Comparison of gamma interferon, tumor necrosis factor, and direct cell contact in activation of antimycobacterial defense in murine macrophages. *Infect.Immun.* 61:3901-3906, 1993.

Tacket C.O., Hone D.M., Curtiss R.III, Kelly S.M., Losonsky G., Guers L., Harris A.M., Edelman R., and Levine M. M. Comparison of the safety and immunogenicity of delta-aroC delta-aroD and delta cya delta crp *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect. Immun.* 60:536-541, 1992.

Tauxe R., Lee L., Rodrigue D., Farmer J.J. III, Blake P.A. *S. enteritidis* outbreaks in the United States 1985-1989: the epidemic expands. Abstracts of the 30th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. Atlanta G.A.: American Society for Microbiology: 914, 1990.

Telzak E.E. Budnick I.D., Greenberg M.S.Z., Blum S., Shayegani M., Benson C.E. A nosocomial outbreak of *S. enteritidis* infection due to the consumption of raw eggs. *N. Engl. J. Med.* 323:394-7, 1990.

Vidal P., Schembri G., Fonckowsky B., Caffer M.I., Eiguer T. y Lozada L. Resúmenes del V Congreso de Microbiología A26, 1988.

Wahdan m.H., Seria C., Ceriser Y., y col. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: Three year results. J.Infect. Dis. 145:292, 1982.

Whitby, J.L. and Rowley, D. The role of macrophages in the elimination of bacteria from murine peritoneum. Br. J. Exp. Pathol. 40:358-370, 1959.

Williams P.H., Roberts M., and Hinson G. Stages in bacterial invasion. J. Appl. Bacteriol. 65: 131S-147S, 1988.

Wood, W.B. & Davis, B.D. Host-parasite relations in bacterial infections. In Microbiology pág. 552-571 Edited by Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. & Ginsberg, H.S. Harper & Row, Philadelphia, 1980.

World Health Organization. Report of a WHO consultation on epidemiological emergency in poultry and egg salmonellosis, 1989.

World Health Organization. Salmonellosis control: the rol of animaland product higiene. Report of a WHO Expert Comittee. Technical Report Series 774. World Health Organization, Geneva 1988.

Yang S.M., Fairweather N., Button L.L., Mc Master W.R., Kahl L.P., Liew F.Y. Oral *Salmonella typhimurium* (aro A-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63)preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. J. Immunol 7:2281-2285, 1990.

Liu S.L., Miura H., Matsui K. and Yabuuchi E. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. Infect. Immun. 56:1967-1973, 1988.

Jones B.D., Lee C.A. and Falkow S. Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. Infect. Immun. 60:2475-2480, 1992.

Zinsser, Joklik, Willet, Amos, Wil Fert. En Zinsser Microbiology, Enterobacteriaceae: *Salmonella* and *Shigella*, intestinal pathogens. pág. 556-565, 1992.