

## Niveles de IgA fecal en ratones inoculados con cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium

### Fecal IgA levels in mice inoculated with attenuated strains of *Salmonella* Typhimurium

Christian Changanquí<sup>1</sup>, Luis Luna E.<sup>1</sup>, Dennis Carhuaricra H.<sup>1</sup>,  
Lenin Maturrano H.<sup>1,2</sup>, Raúl Rosadio A.<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad inmunogénica de tres cepas vivas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium aislados de cuy, mediante la evaluación de la excreción de IgA fecal en ratones. El estudio se realizó con 28 ratones hembra de la cepa Balb/c de cuatro semanas de edad, divididos en cuatro grupos (siete ratones por grupo): cepa 1, cepa 2, cepa 3 y grupo control (PBS). Cada ratón fue inoculado con  $10^9$  UFC/100  $\mu$ l de las cepas atenuadas por vía oral mediante el uso de una sonda orogástrica. Se recolectaron muestras de heces frescas a los días 1, 9, 15 y 21 días pos-inmunización. La cuantificación de IgA fecal fue realizada mediante una prueba de ELISA *in house* indirecto. Los resultados indican que los ratones inoculados con las cepas 1 y 2 presentaron una mayor actividad inmunogénica (IgA fecal) frente al grupo control.

**Palabras clave:** cepa atenuada, *Cavia porcellus*, inmunogenicidad, inmunoglobulina A, *Salmonella* Typhimurium

<sup>1</sup> Grupo de Investigación SANIGEN, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> E-mail: amaturranoh@unmsm.edu.pe

Recibido: 8 de marzo de 2021

Aceptado para publicación: 5 de mayo de 2022

Publicado: 29 de junio de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the immunogenic activity of three life attenuated strains of *Salmonella* Typhimurium isolated from guinea pig, by evaluating the excretion of faecal IgA in mice. The study was carried out with 28 four-week-old female mice of the Balb/c strain, distributed into four groups (seven mice per group): strain 1, strain 2, strain 3 and control group (PBS). Each mouse was inoculated with  $10^9$  CFU/100  $\mu$ l of the attenuated strains using an orogastric probe. Fresh stool samples were collected at days 1, 9, 15 and 21 post-immunizations. The quantification of faecal IgA was carried out by an indirect in-house ELISA test. The results indicate that the mice inoculated with strains 1 and 2 presented a higher immunogenic activity (faecal IgA) compared to the Control group.

**Key words:** attenuated strain, *Cavia porcellus*, immunogenicity, immunoglobulin A, *Salmonella* Typhimurium

## INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*) es un roedor mamífero que cuenta con una población de 17.4 millones de individuos en el Perú, según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) (2018), siendo el Perú uno de los principales exportadores de carne de cuy en Sudamérica. Sin embargo, esta actividad pecuaria sufre grandes pérdidas económicas a causa de problemas sanitarios causados por la salmonelosis, siendo el serovar Typhimurium el reportado con mayor frecuencia en anteriores investigaciones (Zuñiga *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2017).

El ingreso de *Salmonella* en el cuy se da a través del tracto intestinal, de allí que la respuesta inmune de mucosas juega un rol importante frente a dicho patógeno. La inmunoglobulina A (IgA) es la inmunoglobulina más abundante en las mucosas, siendo reconocida como la primera línea de defensa (He *et al.*, 2007; Brandtzaeg, 2010; Boyaka, 2017). Bajo un enfoque preventivo, el uso de vacunas puede ser importante para disminuir el impacto de la salmonelosis en los cuyes. Dentro de los tipos de vacunas que se cono-

cen, las cepas atenuadas son muy convenientes porque simulan una infección sin ocasionar sintomatología clínica, suficiente para estimular una respuesta inmune a nivel de mucosa entérica (Chatfield *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 2012). Por otro lado, Kiros *et al.* (2012) destacan la importancia del uso de modelos animales para el desarrollo de vacunas con el propósito de determinar la calidad y cantidad de la respuesta inmune a la vacunación.

En el Perú no se dispone de información respecto a una vacuna comercial efectiva para la prevención de la salmonelosis en los cuyes, tampoco de ensayos en el desarrollo de una vacuna lo cual es necesario para conocer su capacidad de protección, por lo que su desarrollo, evaluación y comercialización es de imperiosa necesidad. Por ello es necesario realizar evaluaciones previas de los candidatos vacunales en animales de experimentación a fin de conocer su real capacidad de generar una respuesta inmune. Es por tal motivo que el presente estudio tuvo por objetivo evaluar la actividad inmunogénica de tres cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium sobre los niveles de excreción de IgA fecal en ratones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Ejecución

El ensayo experimental se llevó a cabo en el bioterio del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), en Lima, Perú.

### Animales

Se utilizaron ratones albinos hembras de cuatro semanas de edad de la cepa BALB/c, adquiridos de Instituto Nacional de Salud (INS). Los animales fueron colocados aleatoriamente en jaulas metálicas (una caja por grupo) de 40 cm<sup>2</sup> (piso) x 15 cm de altura. Fueron alimentados *ad libitum* con alimento peletizado formulado específicamente para crianza de ratones de laboratorio. Los ratones fueron sometidos a un periodo de acondicionamiento y cuarentena de 14 días. El proyecto consideró las normas del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y aprobado según constancia *CEBA 2020-6*.

### Cepas Atenuadas de *Salmonella* Typhimurium

Se utilizaron tres cepas vivas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium, que se mantuvieron en congelación de -80 °C y que previamente se había comprobado que carecían de capacidad patogénica e invasiva. La cepa 1 carecía de capacidad para la síntesis de aminoácidos esenciales, la cepa 2 había perdido la capacidad de supervivencia en macrófagos y la cepa 3 carecía de capacidad de invasión.

### Grupos Experimentales

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales, cada uno con siete animales. Los tratamientos (A,

B y C) correspondieron ratones inoculados con una cepa viva atenuada de *S. Typhimurium* (cepa 1, cepa 2 y cepa 3, respectivamente) y un grupo control (inoculado con PBS estéril).

### Preparación del Inóculo

Para la reactivaciones de las cepas atenuadas, se tomó una alícuota de 50 µl que fue inoculada en un tubo conteniendo 10 ml de caldo Luria Bertani (LB) e incubado por 18 horas a 37 °C. Posteriormente, se transfirió todo el cultivo a frascos conteniendo 500 ml de caldo LB y fue incubado por 18 h a 37 °C en agitación constante usando una incubadora de agitación orbital (MaxQ™ 4450, Thermo Scientific). Luego se homogenizó el caldo LB y se dispensó en tubos estériles cónicos de 50 ml. Los tubos fueron centrifugados a velocidad media (5000 g) en una centrífuga Multifuge X3R (Thermo Scientific), se descartó el sobrenadante y el material sedimentado fue resuspendido en 2 ml de solución de glucosa al 20% hasta llegar a una concentración de 10<sup>9</sup> UFC/100 µl de solución. La concentración fue obtenida mediante medición por espectrofotometría en un espectrofotómetro Genesys 10uv a 600 nm usando, además, un control de concentración conocida.

### Inoculación de Ratones

Después del periodo de cuarentena y adaptación al ambiente del bioterio (1 semana), los ratones correspondientes a los grupos tratamiento (Grupos A, B y C) fueron inoculados con 100 µl de la cepa atenuada con 10<sup>9</sup> UFC/animal vía oral utilizando una sonda orogástrica 18G de 2.5 cm de longitud y 2 mm de diámetro (Sigma Aldrich), siguiendo las recomendaciones descritas en la guía «Manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón» del Instituto Nacional de Salud (INS, 2008). De igual manera se procedió a administrar 100 µL PBS por vial oral a los animales correspondientes al grupo control.

## Muestras y Extracción de IgA Fecal

Se recolectaron muestras fecales los días 1, 9, 15 y 21 pos-inoculación de la cepa atenuada colocando a los ratones en cajas metálicas desinfectadas. Las muestras fueron colocadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y procesadas mediante extracción de proteínas fecales para la medición y lectura de IgA contra *Salmonella Typhimurium* mediante un ELISA indirecto *in house*.

Para la extracción de IgA se colocó 100 mg de heces en un tubo de microcentrífuga que contenía 1 ml de PBS y 50  $\mu$ l de un inhibidor de proteasas Sigma Fast™. Luego se homogenizó en un vórtex durante 15 min, para luego colocar en una centrífuga refrigerada a 4 °C y 10000 g durante 10 min. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C para su posterior procesamiento.

## ELISA Indirecto *in house*

El desarrollo de la prueba de ELISA indirecto *in house* se realizó con base a los protocolos descritos por Ledesma *et al.* (2017) y Moreno *et al.* (2018).

Para la obtención del antígeno para la prueba de ELISA se reactivó una cepa de *S. Typhimurium* del banco de cepas de laboratorio, el cual se encontraba conservado a -80 °C en caldo TSA (Agar Tripton-Soja) con glicerol al 25%, procediéndose a tomar una alícuota de 50  $\mu$ l y colocarlo en 5 ml de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón), y dejándose por 18 horas a 37 °C. El cultivo resultante se transfirió a un frasco conteniendo 100 ml caldo BHI y se incubó por 18 horas a 37 °C en agitación constante (80 RPM) en un incubadora de agitación orbital (MaxQ™ 4450, Thermo Scientific). Posteriormente el contenido del caldo fue transferido a tubos de plástico cónicos estériles de 50 ml y se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4 °C, eliminando el sobrenadante. El pellet bacteriano resultante de cada tubo se homo-

genizó en 10 ml de PBS estéril. Se procedió a lisar las células del pellet bacteriano para obtener el antígeno usando un sonicador (Sonicador SFX250, Branson Ultrasonics) aplicando 7 pulsos de 10 s, con intervalo de 10 s. Se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C recuperándose el sobrenadante. Se midió la concentración de proteína total de la muestra usando un fluorómetro Qubit (Invitrogen™).

Se usó 100  $\mu$ l de proteína total de *Salmonella Typhimurium* a una concentración de 35  $\mu$ g/ml obtenido en el procedimiento anterior para tapizar placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc Maxisorp® 96 well plate), incubándose a 37 °C durante 1 h. Posterior a ello, se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ l de solución de Buffer fosfato salino con Tween como Buffer de Lavado (PBS-T). Para bloquear los pocillos se usó 200  $\mu$ l de BSA 3% a 4 °C durante 16 h. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T para agregar, por duplicado, las muestras problemas a una concentración de 100  $\mu$ l/pocillo y a una dilución de 1/200.

Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 1 h. Luego se realizaron tres lavados con PBS-T y se adicionaron 100  $\mu$ l del anticuerpo Anti-IgA de ratón marcado con HRP a una dilución 1/20000. Las muestras fueron nuevamente incubadas a 37 °C durante 1 h para luego realizar tres lavados más con PBS-T antes de añadir 100  $\mu$ l de sustrato cromógeno (TMB). Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente (Ledesma *et al.*, 2017; Moreno, 2018). Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) de las muestras usando una longitud de onda de 650 nm en un lector de microplacas Modelo 680 Bio-Rad.

## Análisis Estadístico

Se realizaron curvas de excreción de IgA durante el tiempo de estudio, cuyos datos obtenidos fueron comparados estadísticamente día por día. Primero se aplicó la prue-

ba de Normalidad Shapiro Wilk ( $p > 0.05$ ), lo que indica que siguen una distribución normal. Luego se aplicó el análisis de varianza y la prueba de Tukey con una significancia de 0.05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La IgA es el principal anticuerpo secretado en las mucosas y juega un rol fundamental en la protección y regulación homeostática del epitelio de la mucosa intestinal separando el ambiente exterior del interior del cuerpo, lo que se conoce como exclusión inmune que es un proceso que evita que los patógenos ingresen al organismo (Corthésy, 2013). Chen *et al.* (2018) demostró que la cepa atenuada de delección *Ácrp* (carece de capacidad para la transcripción de ADN) de *S. Typhimurium* al ser administrada por vía oral en ratones en dosis única era capaz de inducir altos títulos de IgA en mucosa e IgG sérica.

Los grupos vacunados con las cepas atenuadas mostraron una respuesta significativamente mayor a partir de la Semana 1 en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ), resultados que fueron similares a los obtenidos por Chen *et al.* (2018). La cepa 1 destacó con relación a las otras, pues con el paso de las semanas se evidencia una tendencia a mayores DO relacionado con la excreción de IgA de la mucosa. La cepa 2 evidenció una diferencia significativa de DO frente al grupo control a partir de la Semana 4, aunque no tan marcada como la cepa 1 (Figura 1). Los resultados se deberían a la naturaleza de la candidata vacunal, pues al ser una cepa atenuada tiene potencial inmunogénico. Por otro lado, la cepa 3 presentó una pobre respuesta, posiblemente debido a una pérdida total de la capacidad de colonización, invasión y replicación en el hospedero.

Haneda *et al.* (2011) también obtuvieron niveles altos de IgA con una cepa mutante *slyA* de *S. Choleraesuis*. La administración oral de la candidata vacunal en ratones demostró una alta inmunogenicidad y expresión de IgA fecal a partir de la tercera semana. También demostró ser eficaz para proteger a los animales frente al desafío con la cepa silvestre. Asimismo, Evora *et al.* (2016) con cepas mutantes *ÄlppAB* y *ÄlppAB ÄmsbB* encontraron niveles altos de IgA, especialmente con la segunda cepa.

La diferencia de DO entre la cepa 1 y la 2 puede deberse a la naturaleza de las cepas atenuadas, ya que la cepa 2 es defectuosa en la supervivencia y replicación en las células fagocíticas y es incapaz de generar una respuesta completa al estrés generado por el hospedero, mientras que la cepa 1 es defectuosa en la síntesis de aminoácidos esenciales provocando un defecto en la pared celular que lo vuelve más sensible e incapaz de replicarse en las células fagocíticas. En suma, se podría decir que la cepa 2 tiene mayor grado de atenuación que la cepa 1.

Los animales del grupo control que fueron inoculados con PBS presentaron IgA fecal durante todo el experimento, a pesar de que fueron negativos a la presencia de *Salmonella* spp durante el monitoreo de cuarentena. Esto se podría explicar porque para la técnica de ELISA indirecto «*in house*» se utilizó proteína total de *Salmonella* Typhimurium en el tapizado de la fase sólida, por lo que antígenos comunes de distintos microorganismos entéricos serían captados por los anticuerpos tipo A circulante.

Finalmente, fue evidente la estimulación de las cepas vivas atenuadas de *S. Typhimurium* en la excreción de IgA específica, siendo esta una buena evidencia de que pueden

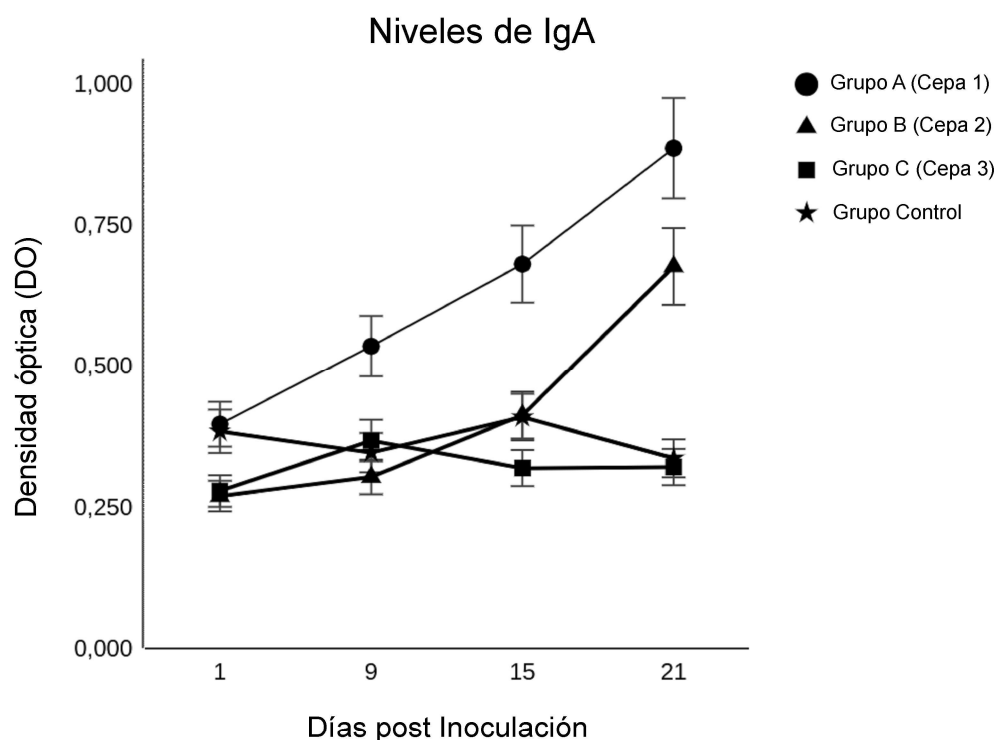


Figura 1. Resultados del ELISA para los niveles de IgA fecal (DO<sub>650</sub>) en los días 1, 9, 15 y 21 post-inoculación de 10<sup>9</sup> UFC/100 µl de tres cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium. Los puntos representan las medias y las barras de error a errores estándares (SE)

ser buenos candidatos a vacuna para prevenir la infección severa por *S. Typhimurium*. Los futuros estudios por realizarse deberán verificar la eficacia de estos anticuerpos en generar una respuesta protectora contra la colonización y/o invasión de cepas patógenas de *S. Typhimurium*, ya sea bloqueando o disminuyendo la adherencia de la bacteria en el tracto intestinal y previniendo o disminuyendo la severidad de las lesiones causadas por la infección natural.

### CONCLUSIÓN

Dos de las tres cepas atenuadas (Cepas 1 y 2) tuvieron actividad inmunogénica, incrementando los niveles de excreción de IgA fecal en ratones.

### Agradecimientos

La presente investigación ha sido financiada por el Proyecto Concytec - Banco Mundial «Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica» 8682-PE, a través de su unidad ejecutora PROCENCIA Contrato N.º 135-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV

### LITERATURA CITADA

1. **Brandtzaeg P. 2010.** Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunol Invest* 39: 303-355. doi: 10.3109/08820131003-680369

2. **Boyaka P. 2017.** Inducing mucosal IgA: a challenge for vaccine adjuvants and delivery systems. *J Immunol* 199: 9-16. doi: 10.4049/jimmunol.1601775
3. **Chatfield S, Strugnell R, Dougan G. 1989.** Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. *Vaccine* 7: 495-498.
4. **Chen S, Liao C, Zhang C, Cheng X. 2018.** Roles of the *crp* and *sipB* genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in protective efficacy and immune responses to vaccination in mice. *Can J Vet Res* 82: 102-105.
5. **Corthésy B. 2013.** Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol* 4: 185. doi: 10.3389/fimmu.2013.00185
6. **Evora T, Kirtley M, Fitts E, Ponnusamy D, Baze W, Andersson J, Cong Y, et al. 2016.** Protective immunity elicited by oral immunization of mice *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Braun Lipoprotein (Lpp) and Acetyltransferase (MsbB) Mutants. *Front Cell Infect Mi* 6: 148. doi: 10.3389/fcimb.2016.00148
7. **Haneda T, Okada N, Kikuchi Y, Takagi M, Kurotaki T, Miki T, Arai S, Danbara H. 2011.** Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Choleraesuis *slyA* mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. *Comp Immunol Microb* 34: 399-409. doi: 10.1016/j.cimid.2011.07.001
8. **He B, Xu W, Santini P, Polydorides A, Chiu A, Estrella J. 2007.** Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A (2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26: 812-826. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.014
9. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2018.** Encuesta Nacional Agropecuaria 2017. [Internet]. Disponible en: [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1593/](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1593/)
10. **[INS] Instituto Nacional de Salud. 2008.** Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. [Internet]. Disponible en: [www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA\\_ANIMALES\\_-RATON.pdf](http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_-RATON.pdf)
11. **Kiros T, Levast B, Auray G, Strom S, Van Kessel J, Gerdts V. 2012.** The importance of animal models in the development of vaccines. *Innov Vaccinol* 29: 251-264. doi: 10.1007/978-94-007-4543-8\_11
12. **Ledesma MM, Díaz AM, Barberis C, Vay C, Manghi MA, Leoni J, Castro MS, et al. 2017.** Identification of *Lama glama* as reservoirs for *Acinetobacter lwoffii*. *Front Microbiol* 8: 278. doi: 10.3389/fmicb.2017.00278
13. **Morales S. 2017.** Patógenos bacterianos y parasitarios más frecuentes en cuyes de crianza familiar-comercial en tres distritos de la provincia de Bolognesi, departamento de Ancash en época de seca. Tesis de Magíster. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
14. **Moreno G. 2018.** Evaluación de la inmunogenicidad *in vivo* de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* aislada de un brote de neumonía aguda en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 87 p.
15. **Simon R, Tennant S, Galen J, Levine M. 2011.** Mouse models to assess the efficacy of non-typhoidal *Salmonella* vaccines: revisiting the role of host innate susceptibility and routes of challenge. *Vaccine* 29: 5094-5106. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.022.Mouse
16. **Zuñiga J, Tur J, Milocco S, Piñeiro R. 2001.** Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. España: Interamericana. 682 p.