



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

INMUNIDAD PASIVA POR VIA ORAL
EN RATONES LACTANTES CON ANTI-
CUERPOS HETEROLOGOS CONTRA
Salmonella Typhimurium.

T E S I S

Que para obtener el Título de :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Fernando Ramos Reyes

México, D. F.

1983.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	págs.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
MATERIAL Y METODOS	17
RESULTADOS	30
DISCUSION Y CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFIA	56

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas gastrointestinales siguen siendo un grave problema de salud en nuestro país, debido al gran índice de morbilidad y mortalidad que causan en la población infantil (1, 2) y en las crías de algunas especies animales de interés pecuario (3).

Entre las formas de solucionar este problema, se pueden mencionar: a) mejorar las condiciones de vida de las personas, así como los sistemas de producción de las especies pecuarias y b) modificar los mecanismos de defensa inmunológicos de los individuos; es a este último aspecto al que haremos referencia (4, 5, 6).

La resistencia específica de los individuos hacia ciertas enfermedades infecciosas, está dada por el aparato inmunocompetente y en el caso de las enfermedades gastrointestinales, por el sistema inmune secretor (7); a este nivel, juegan un papel muy importante las inmunoglobulinas, en especial la IgA secretora (8) y el sistema T celular. Sin embargo, en los recién nacidos existen algunas condiciones del sistema inmunocompetente, que los hacen más susceptibles a las enfermedades infecciosas (9).

Una forma natural de mejorar los mecanismos de defensa de los recién nacidos, es por medio de la inmunidad pasiva, que se adquiere a través de las inmunoglobulinas, que la madre da al hijo durante el embarazo y/o después del parto, durante la lactancia (10); sin embargo,

estos mecanismos de defensa, no parecen ser suficientes para hacer frente a los desafíos de agentes infecciosos en el tracto gastrointestinal.

Los métodos de estimulación del sistema inmune secretor, mediante el uso de vacunas, no han dado resultados del todo satisfactorios (11, 12), debido a que la protección que inducen no es permanente. Por otra parte, la inmunidad pasiva artificial durante la lactancia, ha dado algunos resultados satisfactorios en animales, al disminuir el número de muertes causadas por enfermedades infecciosas gastrointestinales (13); estos experimentos, sugieren que la inmunoglobulina G (IgG) es capaz de realizar funciones protectoras a nivel intestinal.

Uno de los problemas de la inmunidad pasiva adquirida en forma artificial, es la posible sensibilización de los receptores a los sueros o anticuerpos administrados si son heterólogos, lo cual se traduce en daño y perjuicio para los mismos.

El objetivo de este trabajo es evaluar si anticuerpos séricos de conejo, específicos contra Salmonella typhimurium, son capaces, al ser administrados a ratones por vía oral, de permanecer en el lumen intestinal e interactuar con los agentes patógenos, impidiendo su actividad nociva. Asimismo, estudiar la influencia de la ruta, oral en la sensibilización de un individuo hacia proteínas heterólogas.

GENERALIDADES

De acuerdo a censos y estadísticas, las enteritis y enfermedades diarreicas en el hombre, han sido desde 1920 hasta la actualidad, una de las primeras causas de muerte en nuestro país (Cuadro No 1), afectando principalmente a la población infantil (Cuadro No 2).

El número de defunciones debidas a las enfermedades gastrointestinales, ha disminuido en relación con años anteriores, sin embargo, éstas siguen siendo elevadas (Cuadro No 3); por ejemplo, en 1976 hubo 51 235 muertes por estas causas, contra 47 340 en 1977 y 39 872 en 1978, con tasas respectivas de 82.2, 74.2 y 60.5 por cada 100 000 habitantes.

Los índices de morbilidad causados por las enfermedades gastrointestinales en el hombre, también son elevados; en 1979 el I.M.S.S. notificó 9 654 040 casos de enfermedades transmisibles entre sus derechohabientes, siendo las enteritis y las enfermedades diarreicas la segunda causa más frecuente, con un total de 2 106 367 casos, para una tasa de 10 573.1 por cada 100 000 derechohabientes (14)(Cuadro No4). Esta misma institución notificó en 1980, 2 358 147 casos de enteritis y enfermedades diarreicas con una tasa de 10 438.6, y en 1981, 2 526 031 casos para una tasa de 9 732.2.

Los datos del cuadro No 4 nos muestran que el número de enteritis y enfermedades diarreicas por año va en aumento, aun cuan-

C U A D R O N o 1
 PRINCIPALES CAUSAS DE MUERTE EN MEXICO
 1 9 2 2 - 1 9 7 8

	1922	1930	1940	1950	1960	1970	1975	1978
1	Neumonías	Diarreas y enteritis	Diarreas y enteritis	Diarreas y enteritis	Diarreas y enteritis	Influenza y neumonías	Influenza y neumonías	Enfermedades del corazón
2	Diarreas y enteritis	Neumonías	Neumonías	Neumonías	Neumonías	Enteritis y enf.diarreicas	Enteritis y enf.diarreicas	Influenza y neumonías
3	Paludismo	Paludismo	Paludismo	Enf.de la 1ª infan.	Enf.de la 1ª infan.	Accidentes	Enfermedades del corazón	Enteritis y enf. diarreicas
4	Tosferina	Tosferina	Accidentes	Accidentes	Accidentes	Enf. del corazón	Accidentes	Accidentes
5	Viruela	Accidentes	Enf.de la 1ª infan.	Paludismo	Enf. del corazón	Causas perinatales	Tumores malignos	Tumores malignos

Fuente: Secretaría de Salubridad y Asistencia
 Unidad de Información
 Compendio de Estadísticas Vitales de México.

C U A D R O N° 2

NUMERO DE DEFUNCIONES POR EDADES DE ALGUNAS INFECCIONES DEL TUBO DIGESTIVO
1 9 7 8

	Menores de 1 año	1-4	5-14	15-44	45-64	65 y ma yores	No espe cificada	Todas las edades	Tasa *
Enteritis y enf.diarrei.	22 821	7 742	1 538	1 605	1 622	4 315	229	39 872	60.56
Disentería bacilar y ambiasis	514	275	82	259	354	527	24	2 035	3.09
Fiebre tifoidea	309	203	164	281	136	231	12	1 336	2.03
Fiebre parati foidea y otras salmonelosis	161	107	94	201	95	183	8.	849	1.29
Total	23 805	8 327	1 878	2 346	2 207	5 256	273	44 092	66.96
%	53.99	18.89	4.26	5.32	5.00	11.92	0.59	100	

Fuente: Secretaría de Salubridad y Asistencia
Unidad de Información
Compendio de Estadísticas Vitales de México 1978

* tasa por cada 100 000 habitantes

CUADRO N° 3
 PRINCIPALES CAUSAS DE MUERTE EN MEXICO, NUMERO DE DEFUNCIONES Y TASA
 1977 - 1978

Orden	1977			1978		
	Causa	Número de defunciones	Tasa*	Causa	Número de defunciones	Tasa*
1	Influenza y Neumonías	49 878	78.2	Enfermedades del corazón	46 990	71.4
2	Enteritis y otras enf. diarreicas	48 360	76.8	Influenza y Neumonías	43 258	65.7
3	Enfermedades del corazón	47 340	74.2	Enteritis y otras enf. diarreicas	39 872	60.5
4	Accidentes	25 558	40.0	Accidentes	26 417	40.1
5	Tumores malignos	24 035	37.7	Tumores malignos	24 269	36.9

Fuente: Secretaría de Salubridad y Asistencia
 Unidad de información
 Compendio de Estadísticas Vitales de México

* tasa por cada 100 000 habitantes

C U A D R O N° 4

CASOS NOTIFICADOS DE GASTROENTERITIS EN EL I.M.S.S. DURANTE
LOS ÚLTIMOS AÑOS

Año	Número de Casos de Enf. Transmisibles	Número de Casos de Enteritis	Tasa *
1979	9 654 340	2 106 367	10 573.1
1980	12 251 548	2 358 147	10 438.6
1981	13 403 650	2 526 031	9 732.2

Fuente: Instituto Mexicano del Seguro Social

Boletín Epidemiológico Semanal de los Estados y del
Valle de México, V 4, N° 52, 1981.

* tasa por cada 100 000 derechohabientes

do las tasas han disminuido; además, hay que tomar en cuenta, que un sector considerable de la población carece de servicios médicos y por lo tanto, no son notificados los casos de diarrea. Los microorganismos que con más frecuencia causan este tipo de padecimientos son: - Escherichia coli enteropatógena, Salmonella sp., Shigella sp., rotavirus y Endamoeba histolytica (4, 5).

Algunas especies animales de interés pecuario, también son afectadas por las enfermedades gastrointestinales; en el cerdo, alrededor del 25% de los lechones muere antes del destete, observándose la frecuencia más alta durante los primeros 6 días de edad, siendo la colibacilosis la principal causa (3). El porcentaje exacto de muertes, debido a este tipo de padecimientos varía de un lugar a otro dependiendo de las condiciones de crianza.

La morbilidad y mortalidad de las infecciones gastrointestinales en el hombre, está asociada a factores socioeconómicos como son la pobreza, la desnutrición, el bajo nivel educativo de la población en general, la falta de servicios como agua potable y drenaje, etc. (4, 5, 6). Todos estos factores están íntimamente relacionados y generalmente, son consecuencia del primero, la pobreza.

En base a lo mencionado anteriormente, una de las formas consideradas para evitar o disminuir las infecciones gastrointestinales, es la solución de los problemas socioeconómicos de la población. Esto, traería como consecuencia el mejoramiento de las condiciones de vida de las personas y por lo tanto, la disminución en la morbilidad y mortalidad causada por las enfermedades gastrointestinales. Los -

resultados obtenidos de esta forma, independientemente del costo que representaría, no se podrían obtener según algunos autores, antes de 2 generaciones (4). Sin embargo, las enfermedades gastrointestinales son un problema actual y no es posible esperar a que el desarrollo general del país resuelva en su punto de origen los problemas de la miseria. Es por esto, que se están ideando y aplicando nuevos métodos tendientes a solucionar los problemas gastrointestinales; entre estos métodos está el influjo que se puede hacer sobre los mecanismos de defensa inmunológicos de las personas; pero para poder ejercer algún efecto sobre el aparato inmunocompetente es necesario conocer ciertos aspectos de su funcionamiento.

Una de las funciones del aparato inmunocompetente es la de proteger al organismo, en contra de agentes patógenos y/o sus productos. La resistencia a las enfermedades infecciosas que afectan las mucosas, como las infecciones gastrointestinales, está a cargo del sistema inmune secretor (7) y no muestra relación con el título de anticuerpos en circulación, sino con el título de anticuerpos presentes en las secreciones (8).

El sistema inmune secretor es un conjunto de tejido linfoide, que se encuentra disperso por debajo del epitelio de las mucosas y secreta anticuerpos hacia el exterior. Secreciones como la leche, saliva, líquido intestinal, etc. presentan gran cantidad de anticuerpos procedentes la mayoría, de este sistema. En las secreciones es posible encontrar todas las clases de inmunoglobulinas aunque su concentración es diferente de la que normalmente se encuentra en circulación(7).

La principal inmunoglobulina, en las secreciones es la inmunoglobulina A secretora (IgA S); excepciones a esto, son el calostro de todos los animales y la leche de los rumiantes, en donde esta inmunoglobulina es desplazada por la IgG (10). La IgA S tiene un peso molecular aproximado de 400 000 y es un dímero de la IgA que se encuentra en mayor cantidad en el suero. Además, la IgA S posee una cadena J y una pieza o componente secretor; la cadena J, se supone funciona induciendo la polimerización de los monómeros de IgA y la pieza secretora interviene en el transporte del dímero de IgA a las secreciones y en la resistencia de la molécula a la proteólisis. También, es posible encontrar IgA monomérica en las secreciones, pero en muy pequeña cantidad.

La inmunoglobulina M (IgM) de las secreciones, proviene de células plasmáticas localizadas en las mucosas; se encuentra principalmente, en forma de pentámero y se ha visto que la pieza secretora es capaz de unirse a esta molécula (7). Después de la IgA S, la IgM es la inmunoglobulina que se encuentra en mayor cantidad en las secreciones, en ausencia de procesos inflamatorios.

En las secreciones, la IgG se encuentra en pequeñas cantidades y proviene tanto de la síntesis local, como de la trasudación del suero. Se ha visto que en procesos inflamatorios que afectan las membranas, aumenta la trasudación del suero y por lo tanto, aumenta la cantidad de IgG en las secreciones (10).

La inmunoglobulina E (IgE) en las secreciones, se encuentra en una mayor proporción de la que se puede explicar por la trasuda--

ción del suero; en la lámina propia del intestino, alrededor del 4% de las células plasmáticas producen IgE, lo cual contrasta con el bazo y ganglios linfáticos, en donde menos del 1% de las células plasmáticas producen IgE (7). Esta inmunoglobulina, se ha asociado con la inmunidad a enfermedades causadas por helmintos que afectan el tubo digestivo (10).

La inmunidad mediada por células, es muy importante en la resistencia a ciertas enfermedades infecciosas y algunos hechos sugieren su participación en la protección de las mucosas. Por ejemplo, gran cantidad de células T y macrófagos han sido encontrados en la lámina propia del intestino. En el ratón, la mayoría de las células presentes en el tejido linfoide del intestino, son células T; además, la falla en el desarrollo de los centros germinales de las placas de Peyer, debido a la falta de células T, está asociada con la falta de células plasmáticas intestinales productoras de IgA (7), lo que significa que en ausencia de células T, los linfocitos portadores de IgA no pueden ser estimulados. Ciertos estudios demuestran que la expulsión de algunos parásitos del intestino, está asociada a la inmunidad celular (15). Se ha sugerido también, la participación de linfocitos T en algunos procesos inmunológicos que lesionan el intestino (16).

El aparato inmunocompetente del recién nacido, presenta ciertas diferencias con respecto al del adulto, que lo hacen más susceptible a enfermedades infecciosas. Los órganos linfoides secundarios, que se empiezan a formar en una etapa tardía de la vida fetal, en el momento del nacimiento no se han desarrollado completamente, ya que para es

to requieren de estímulos antigénicos de los cuales está exento el feto durante un embarazo normal (10). Ciertos componentes séricos como el complemento, se encuentran disminuidos en el recién nacido. Además, la respuesta de los neutrófilos a señales quimiotácticas se encuentra alterada y la de los monocitos, a ciertas linfocinas, está modificada por la posible existencia de factores inhibitorios (9, 17).

Los métodos utilizados, con el fin de modificar los mecanismos inmunológicos de defensa, en contra de las infecciones gastrointestinales, han sido muy variables y no han dado resultados del todo satisfactorios. La inmunización activa utilizando bacterias o antígenos de éstas, administrados por vía parenteral, produjeron altos títulos de anticuerpos en la circulación de los animales inmunizados; estos animales, fueron capaces de sobrevivir a desafíos con determinada cantidad del microorganismo patógeno, administrado por vía parenteral (18, 19, 20, 21). Sin embargo, esta forma de infección no es la que ocurre en la naturaleza y como se mencionó anteriormente, los anticuerpos en circulación no necesariamente brindan protección a nivel intestinal. Algunos autores lograron proteger a ratones en contra de salmonela administrada por vía oral, mediante vacunas de aplicación parenteral (22, 23); empero, es probable que este tipo de vacunas, sea de poco valor frente a microorganismos que causen daño local y no sean invasores.

Porter y colaboradores, lograron estimular el sistema inmune secretor, que se encuentra a lo largo del tubo digestivo del lechón, mediante grandes dosis de antígenos de E. coli, administrados por vía oral (11, 24); pero, la duración de la respuesta, después de haber supri

mido los estímulos antigénicos, fue muy corta y nuevos estímulos originaban respuestas similares a la primera, lo que hizo pensar, que el sistema inmune secretor carecía de memoria (25). En niños lactantes, se probó una vacuna polivalente de aplicación oral en contra de E. coli, Salmonella sp. y Shigella sp. con resultados alentadores, ya que la frecuencia de casos de diarrea y la gravedad de éstos, fue menor en el grupo vacunado que en el grupo control (26). No obstante, en el grupo experimental se presentaron reacciones indeseables por la administración de la vacuna, siendo posiblemente manifestaciones de una reacción tipo Schwartzman, que tiene cierta similitud con la reacción de Arthus, solo que en este caso, las lesiones son provocadas por las endotoxinas de las bacterias gram (-) y no parece que sea fundamental la participación de un mecanismo inmunológico (27).

La administración de bacterias en dosis subletales o bacterias atenuadas por vía oral a ratones, da resultados positivos en la protección contra posteriores desafíos con el microorganismo patógeno (23), pero se llegan a presentar efectos desagradables; además, se corre el riesgo de que las bacterias atenuadas sufran mutaciones y se tornen patógenas causando graves problemas. Por otra parte, se han obtenido resultados interesantes, al hacer pruebas de protección en ratones previamente inmunizados por vía oral y desafiados con toxina colérica (28).

En algunas especies animales, la estimulación del sistema inmune secretor a nivel intestinal, ha tenido éxito después de esquemas de inmunización bastante drásticos. Por ejemplo, en ratas, el aumento

de células plasmáticas en la lámina propia del intestino, conteniendo anticuerpos específicos de la clase IgA, en contra del antígeno administrado, fue posible después de una dosis intraperitoneal con adyuvante completo de Freund y un refuerzo por vía oral, de toxoide colérico (29). Métodos de inmunización iguales al descrito anteriormente, lograron la estimulación de las células productoras de IgA a nivel intestinal, en contra de E. coli y S. typhimurium, en lechones y corderos respectivamente (12, 30). Estos 2 últimos casos, estuvieron asociados a la disminución de las pérdidas, debidas a colibacilosis entéricas, en los lechones y a la protección de los corderos, en contra de desafíos con bacterias enteropatógenas. En ratones, fue posible aumentar el nivel de anticuerpos séricos y coproanticuerpos, después de varias dosis por vía oral, seguidas de dosis intravenosas de Vibrio cholera vivo (31).

La vacunación de la madre, con el fin de aumentar el título de anticuerpos en el calostro y leche y así suministrar anticuerpos específicos a los lactantes en forma pasiva, ha dado diversos resultados. En ovejas, la inmunización de la madre por vía intramuscular, con rotavirus tratados con formol, aumentó el título de anticuerpos en circulación y en el calostro. Después del parto, el título de anticuerpos en la leche disminuyó en forma pronunciada (32), debido a que el transporte de IgG del suero a la glándula mamaria se redujo en gran medida. Además, la mayoría de los anticuerpos en la leche, provienen de las células plasmáticas que se encuentran en la glándula mamaria y no necesariamente son estimuladas mediante antígenos administrados por vía intramuscular.

Al variar la forma de inmunizar a la madre en gestación, se ha conseguido estimular la secreción de la IgA en la glándula mamaria y aumentar el título de anticuerpos en la leche. Lechones amamantados por cerdas que habían sido inmunizadas en las glándulas mamarias, con antígenos de E. coli antes del parto, sobrevivieron a desafíos con cepas enteropatógenas de este microorganismo (33). En bovinos, la inmunización con antígenos de salmonela por vía intramuscular y refuerzos en la glándula mamaria, elevaron el título de anticuerpos locales asociados a la IgA (34).

Algunos autores consideran que el sistema inmune secretor del intestino y de la glándula mamaria, están relacionados y por lo tanto, creen que es posible activar la producción de anticuerpos en la glándula mamaria, por medio de estímulos a nivel intestinal (10). Esto no ha sido probado aún, pero algunos experimentos lo sugieren como el realizado por Stevens y Blackburn (35), en donde se reportó la mejoría en los cuadros de diarrea en lechones de 3 semanas, cuando se alimentó a la madre antes de parir con una cepa patógena de E. coli, aunque hay que aclarar que este suceso no fue estudiado a fondo. Otros autores demostraron la protección de lechones durante la lactancia, en contra de virus GET, cuando las madres fueron expuestas al virus alrededor de los 35 días antes del parto (36).

La inmunidad pasiva adquirida en forma artificial, es otro método que se ha empleado para disminuir la frecuencia de algunas enfermedades infecciosas. Se vio que el suministro de suero de cerdo normal, por vía oral a lechones, se reflejaba en disminución de la mor-

talidad y aumento de la ganancia en peso de estos animales (37); estudios posteriores, demostraron que la fracción del suero asociada a estos hechos era la de las gamma globulinas (38).

En corderos, fue posible disminuir los cuadros diarreicos, - causados por desafíos con rotavirus, mediante el suministro por vía - oral, del calostro proveniente de ovejas con menos de 6 horas de haber parido y que tenían anticuerpos séricos contra el rotavirus (13); efecto similar produjo el suministro por vía oral del suero hiperinmune de - ovejas, en contra del agente infeccioso. La administración a lechones del calostro proveniente de vacas, con anticuerpos en contra de rotavirus, durante 10 días comenzando 2 días antes del desafío con el agente patógeno, produjo una disminución en el número de muertes y en la se-veridad del cuadro clínico causado por el virus (39).

Uno de los problemas de la inmunidad pasiva artificial, es la sensibilización de los receptores hacia el suero o los anticuerpos administrados: un ejemplo típico es la enfermedad del suero, que se presenta después que un individuo ha recibido suero de alguna especie animal diferente a él, por vía parenteral, con el fin de prevenir o curar alguna enfermedad. Aparentemente, es poco probable la sensibilización de un organismo a través del tracto gastrointestinal ya que éste está en contacto continuo con gran variedad de compuestos extraños, frente a los cuales generalmente no responde; sin embargo, en ocasiones los individuos llegan a responder en contra de estos compuestos extraños y -- pruebas de esto son la presencia de isoanticuerpos en el hombre y en los animales y las alergias de algunas personas a ciertos alimentos(40).

MATERIAL Y METODOS

Diseño Experimental. Se utilizaron camadas de ratones cepa CD-1, de 9 a 11 días de edad. El experimento se dividió en 2 partes; en la primera se ocuparon 7 camadas y en la segunda 6. En todos los casos, la administración de bacterias, gamma globulinas y solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) fué por vía oral, mediante una cánula de plástico que se les introdujo a los ratones hasta el estómago.

Primera parte. Seis camadas de ratones se dividieron en 3 grupos, de 2 camadas cada uno (Cuadro No 5). Cada grupo fue desafia

CUADRO N° 5
DISEÑO EXPERIMENTAL, PRIMERA PARTE

Administración previa de	Cantidad de Bacterias Administradas(*)			
	0	2.2×10^4	2.2×10^5	2.2×10^6
Gamma globulinas(+)	$\frac{1}{2}$ **	1*	1**	1**
PBS (++)	$\frac{1}{2}$ **	1**	1**	1**

* el volumen total de bacterias en todos los casos fue de 0.1 ml

** número de camadas usadas

+ 0.1 ml de gamma globulinas de conejo, 20 mg/ml

++ 0.1 ml de PBS

el número de animales por camada fué de 5 a 13

do con una dosis diferente de Salmonella typhimurium St 3 - PCU 252 - (2.2×10^6 , 2.2×10^5 y 2.2×10^4 bacterias), 2 horas después de haberles administrado: a) 0.1 ml de PBS, a una de las camadas de cada grupo y b) 0.1 ml de gamma globulinas de conejo, en contra de salmonela (20.0 mg/ml), a la otra camada de cada grupo. Otra camada de ratones se dividió en 2 subgrupos; al primero se le dio PBS y al segundo - gamma globulinas, en la misma forma y cantidad que a las camadas anteriores. Sin embargo, esta última camada no se desafió con el microorganismo patógeno. Posteriormente, se registró el número de muertes por camada, durante los 10 días siguientes al desafío.

La camada que no fue desafiada con el microorganismo patógeno, se utilizó para determinar si los ratones se sensibilizaron a las gamma globulinas administradas, mediante pruebas de hipersensibilidad cutánea y transformación blastoide de las células de bazo, al incubarlas con el antígeno. Para esto, se repitió a los ratones la dosis de PBS y gamma globulinas a los días 2, 14 y 23 después de la primera administración; 7 días después de la última dosis, se hicieron los ensayos para ver si los ratones se habían sensibilizado a las gamma globulinas administradas.

Segunda parte. Cada camada, de un total de 4, se dividió en 2 grupos (cuadro No 6); al primer grupo, de cada camada, se le administró 0.1 ml de PBS y al segundo 0.1 ml de gamma globulinas de conejo, en contra de salmonela (20.0 mg/ml). Dos horas después, cada camada se desafió con una dosis diferente de Salmonella typhimurium St 3 - PCU 252 (10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 bacterias). Otras 2 camadas recibie

C U A D R O N° 6
DISEÑO EXPERIMENTAL, SEGUNDA PARTE

Administración previa de	Cantidad de bacterias administradas (*)				
	0	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵
Gamma globulinas(+)	1**	$\frac{1}{2}$ **	$\frac{1}{2}$ **	$\frac{1}{2}$ **	$\frac{1}{2}$ **
PBS (++)	1**	$\frac{1}{2}$ **	$\frac{1}{2}$ **	$\frac{1}{2}$ **	$\frac{1}{2}$ **

* el volumen total de bacterias en todos los casos fue de 0.1 ml

**número de camadas usadas

+ 0.1 ml de gamma globulinas de conejo, 20 mg/ml

++ 0.1 ml de PBS

el número de animales fue de 4 a 7 por camada

ron respectivamente PBS y gamma globulinas de conejo, en contra de salmonella, en la misma cantidad y de la misma forma que las anteriores, pero no fueron desafiadas con el microorganismo patógeno. Se registró el número de muertes por camada y por grupo, durante los 10 días siguientes al desafío.

A las camadas que no se desafiaron con el microorganismo patógeno, se les repitió la dosis de PBS y gamma globulinas los días 2, 14, 16, 18, 21, 23 y 25 después de la primera administración. Siete días después de la última dosis, se hicieron pruebas de hipersensibilidad cutánea en las patas traseras de estos ratones.

Animales. Se utilizaron: a) 18 ratones hembras jóvenes ce-

pa CD-1, de 20±2 g de peso, procedentes del bioterio del propio Instituto, con el fin de caracterizar la cepa de Salmonella typhimurium; b) 16 camadas de ratones cepa CD-1, procedentes del bioterio del propio Instituto y de los Laboratorios Corfisan, para el desarrollo del experimento y caracterizar la cepa de salmonea y c) un conejo Nueva Zelanda, macho, de aproximadamente 2 kg de peso, procedente de la Granja Tepopixca, para la obtención de anticuerpos.

Los ratones adultos, se mantuvieron en grupos de 6 por jaula y las camadas de ratones, en jaulas individuales, cada camada en una jaula. Todos los animales se conservaron con agua y alimento especial ad libitum.

Bacterias. Se ocuparon: a) una cepa de Escherichia coli JM 1452 - PCU 252, donada por el Dr. Guillermo Alfaro, de el mismo Instituto; b) 2 cepas de Salmonella typhimurium causantes de casos clínicos de gastroenteritis en niños, aisladas en el Hospital Infantil de México e identificadas en el laboratorio con el siguiente sistema: St 1 y St 3 y c) una cepa de Salmonella typhimurium St 3 - PCU 252, obtenida por conjugación de las cepas JM 1452 - PCU 252 y St 3.

Conjugación. Se efectuó una conjugación entre las cepas de Salmonella typhimurium St 3, que crece en medio mínimo y es sensible a la ampicilina y la cepa de Escherichia coli JM 1452 - PCU 252, que no crece en medio mínimo, pero tiene un plásmido que le confiere resistencia a la ampicilina.

Cada cepa se desarrolló en forma independiente, en 5 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), durante 4 horas a 37°C; después, un tubo conteniendo 5 ml de BHI fue sembrado, con 0.1 ml de cada uno de los cultivos anteriores y la mezcla se incubó a 37°C, durante toda la noche. Del cultivo de toda la noche, se seleccionaron las conjugantes - utilizando placas de agar-medio mínimo-ampicilina (50 ug amp/ml de medio), y se incubaron a 37°C durante 48 horas; las colonias que crecieron en las placas fueron resembradas y se les hicieron frotis y pruebas bioquímicas para su identificación. La bacteria obtenida de esta forma se denominó Salmonella typhimurium St 3 - PCU 252.

Pruebas Bioquímicas. Se hicieron pruebas bioquímicas a la cepa bacteriana con que se inoculó a los ratones, así como a la que se aisló de los animales enfermos (41); las pruebas utilizadas y los resultados que dio la cepa de S. typhimurium St 3 - PCU 252 fueron:

descarboxilación de la lisina	+	citrato	+
producción de H ₂ S	+	malonato	-
glucosa	+	ureasa	-
lactosa	-	rojo de metilo	+
producción de gas	+	V.K.	-
indol	-	gelatina	-
movilidad	+	ampicilina	+

Cultivo de Bacterias. Un matraz que contenía 100 ml de BHI se inoculó con 1 ml de un cultivo de toda la noche de salmonela (St 3 -

PCU 252) y se incubó a 37°C con agitación; 3 horas más tarde, las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 7 000 g durante 15 minutos a 4°C, en una centrífuga Sorvall RC-5B. El paquete bacteriano se resuspendió en solución salina isotónica estéril (10 ml) y a partir de esta suspensión se hicieron diluciones, para inocular a los ratones y para sembrar en placas, con el fin de determinar el número de bacterias vivas administradas. Una aproximación muy útil es el considerar, que una suspensión de 10^8 bacterias por mililitro, da una densidad óptica de 0.20 a una longitud de onda de 550 nanómetros; para esto, se utilizó un espectrofotómetro Carl Zeiss PQ-MII.

Obtención de Antígenos. El método que se utilizó para la obtención de antígenos de salmonella fue el descrito por Tato y colaboradores (42). Seis litros de Caldo Caso (caldo peptona de caseína y soya) fueron sembrados con 100 ml de un cultivo de toda la noche de Salmonella typhimurium St 1 y se incubaron a 37°C por 4 horas. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación, a las mismas constantes mencionadas en el cultivo de bacterias; posteriormente, las bacterias se lavaron suspendiéndolas en solución salina isotónica estéril y centrifugándolas nuevamente, a las mismas constantes. El paquete bacteriano se resuspendió en 30 ml de acetona fría, previamente deshidratada con cloruro de calcio y se mantuvo en agitación durante 10 minutos. La suspensión de bacterias se centrifugó a 7 000 g durante 20 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y al sedimento se le agregó nuevamente acetona; este último paso se repitió 2 veces. Después de la última

centrifugación, el sedimento se pasó a una caja Petri, se dispersó y se mantuvo a 4°C hasta que se evaporó la acetona. El producto obtenido, - polvo acetónico, se disolvió en 30 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M de pH 7, conteniendo sacarosa 0.25 M, $MgCl_2$ 0.012 M, KCl 0.1 M y desoxicolato de sodio al 0.4%; se agregó desoxirribonucleasa y se mantuvo en agitación a 37-38°C en un baño María durante una hora. Posteriormente, se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M de pH 7, conteniendo KCl 0.1 M, con cambios frecuentes. El material dializado se centrifugó a 36 000 g durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sedimento y el sobrenadante se esterilizó por filtración con filtro de membrana de 0.22 μm . El filtrado se dividió en alícuotas de 2 ml y se liofilizó. Por último, se determinó la cantidad de proteínas totales por el método de Lowry (43) y se guardó en refrigeración hasta su utilización.

Obtención de anticuerpos. Se inmunizó un conejo macho Nueva Zelanda de aproximadamente 2 Kg de peso, con los antígenos de salmonela. Se le dieron 4 dosis a intervalos de 15 días, con 500 μg de proteína cada vez. Las 2 primeras administraciones fueron con adyuvante completo de Freund (v/v), en el cojinete plantar y las 2 últimas sin adyuvante, por vía intramuscular. Siete días después de la última inmunización, el conejo fue sangrado a blanco por punción cardiaca; el suero se separó de la sangre coagulada por centrifugación, a 1 500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos en una centrífuga clínica.

Las inmunoglobulinas se obtuvieron del suero por precipita

ción con sulfato de amonio, a una concentración del 33% de su saturación (44). Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas por el método de Kjeldahl modificado (45) (desarrollo de color con el reactivo de Nessler) y el título de anticuerpos, por aglutinación de bacterias.

Agglutinación de Bacterias. Para determinar el título de anticuerpos, se hicieron diluciones seriadas de 1:2 de las gamma globulinas de conejo en contra de salmonela, con PBS y se preparó una suspensión de bacterias en solución salina isotónica, conteniendo aproximadamente 10^9 bacterias por mililitro. Una gota de la suspensión bacteriana y una gota de la dilución de las gamma globulinas de conejo, se colocaron en un portaobjeto y se mezclaron mediante un aplicador de madera; la mezcla se mantuvo en movimiento oscilatorio durante 2 minutos y se observó si presentaba aglutinación macroscópica. El inverso de la última dilución, que presentó aglutinación en este tiempo, se consideró como el título de anticuerpos. Finalmente, las gamma globulinas de conejo se dividieron en alícuotas de 2 mililitros y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Inmunoelectroforesis. Se hizo una inmunoelectroforesis, con los antígenos de salmonela y los anticuerpos de conejo contra salmonela, para ver si el antígeno obtenido tenía las propiedades descritas en la literatura (42). Se ocupó agarosa al 1%, en una solución amortiguadora de barbituratos 0.05 M de pH 8.6. Se colocaron 10 ul del antígeno,

con una concentración de 30 mg/ml, en el pozo del gel y la electroforesis se corrió durante 2 horas, con una intensidad de corriente de 1.5 mA por portaobjeto. Posteriormente, se llenó el canal con las gamma globulinas de conejo (200 ul) y se dejó en una cámara húmeda a temperatura ambiente, para que difundiera durante 24 horas; el gel se lavó con solución salina isotónica, se secó y se tiñó con amido negro al 1%, en ácido acético al 10%, eliminando el exceso de colorante con ácido acético al 10% (44, 45).

También se hicieron inmunoelectroforesis, con algunos de los sueros de las madres de cada camada de ratones; en estos casos se utilizó el suero de los ratones como anticuerpo.

Dosis Letal Cincuenta. Se determinó la dosis letal cincuenta (DL₅₀) de la cepa de Salmonella typhimurium St 3 - PCU 252, en ratones adultos y lactantes, con el fin de estimar su virulencia, de acuerdo al método de Reed y Muench (27).

Dieciocho ratones hembras adultos, CD-1, de 20±2 g de peso, se dividieron en 3 grupos de 6 ratones cada uno, manteniendo cada grupo separado de los demás. Cada grupo de ratones fue infectado con una dosis diferente de salmonela (1.4×10^6 , 1.4×10^5 y 1.4×10^4 bacterias vivas), administrada por vía intraperitoneal en un volumen total de 0.1 ml, utilizando solución salina como vehículo. Se registró el número de muertes por grupo, durante los 10 días siguientes a la inoculación.

Para la determinación de la DL₅₀ de la cepa de salmonela

en ratones lactantes, se utilizaron 3 camadas de ratones cepa CD-1, - de 5 días de edad. Cada camada se infectó con una dosis diferente de salmonela (10^6 , 10^5 y 10^4 bacterias vivas respectivamente), administrada por vía oral mediante una cánula de plástico, que se les introdujo hasta el estómago; en este caso como en el anterior, se utilizó solución salina como vehículo y el volumen total administrado a cada raton, fué de 0.1 ml. Se registró el número de muertes por camada, durante los 10 días siguientes a la infección.

Transformación Blastoide. La búsqueda de células de bazo, sensibilizadas a las gamma globulinas de conejo, se hizo determinando la transformación blastoide de estas células, cuando fueron cultivadas en presencia del antígeno durante 48 horas (46). Para evaluar esta transformación y multiplicación celular, se determinó la cantidad de timidina radiactiva (^3H , tritio) que éstas últimas incorporaron, habiendo agregado al sistema 18-24 horas antes de la cosecha.

A los ratones que recibieron gamma globulinas, se les extrajo el bazo en forma estéril y éstos se procesaron al mismo tiempo, pero en forma individual. Cada bazo se colocó en una caja Petri que contenía 5 ml de solución salina balanceada (SSB), se trituró con pinzas y el macerado se pasó a un tubo de ensaye, colocado en un baño de hielo, donde se dejó por 10 minutos para que las partículas gruesas sedimentaran; las células que se encontraban en el sobrenadante, se pasaron a otro tubo y se lavaron por medio de centrifugaciones, a 1 000 rpm durante 10 minutos a 5°C , en una centrífuga Damon CRU-5 000, y re-

suspensiones en SSB, las veces que fué necesario para que el sobrenadante quedara libre de hemoglobina. Después de la última centrifugación, el paquete celular se resuspendió en 5 ml de RPMic-1640 (Gibco) y se ajustó el número de linfocitos viables a 5×10^6 por mililitro. El número de células viables se determinó por tinción con azul tripano y observación al microscopio, en una cámara de New Bauer (47).

A continuación, 0.1 ml de la suspensión de células mencionada anteriormente, conteniendo 5×10^5 linfocitos viables, se colocaron en cada pozo de placas de cultivo de tejido y se cultivaron con cada una de las siguientes sustancias, para ver su efecto:

- a) 0.1 ml de RPMic-1640
- b) 0.1 ml de gamma globulinas de bovino (Milles), 1 mg/ml en RPMic-1640.
- c) 0.1 ml de gamma globulinas de conejo en contra de salmonela, 1 mg por mililitro en RPMic-1640
- d) 0.1 ml de lipopolisacarido de Escherichia coli (Difco), 200 ug/ml - en RPMic-1640
- e) 0.1 ml de Concanavalina A (Sigma), 2 ug/ml en RPMic-1640

Las pruebas se hicieron por cuadruplicado. Después, las placas se incubaron 48 horas a 37 C, en una atmósfera con 5% de humedad y 5% de CO₂; transcurrido este tiempo, a cada pozo se le agregó 1 uCi de timidina-³H (0.05 ml de una dilución 1:50 en RPMic-1640 de: timidina-³H, 1 mCi/ml, 6.7 Ci/mM; New England Nuclear Corp., Boston, Mass.). Posteriormente, las placas se incubaron nuevamente en las mismas condiciones indicadas anteriormente, durante 18 horas.

La cantidad de timidina-³H incorporada por las células, se determinó midiendo las cuentas por minuto (cpm) de el material nuclear, después de haber lavado y lisado las células y posteriormente retenido el ADN en papel de fibra de vidrio, mediante un colector de células Brandel 24 V. Los pedazos de papel de fibra de vidrio en el que quedó retenido el material nuclear, se cortaron y se colocaron en frascos viales conteniendo 3 ml de líquido de centelleo y después se metieron en un contador de centelleo Mark III, Searle Inc., con el programa 1 (³H).

La concentración de Concanavalina A utilizada se determinó experimentalmente, viendo que concentración inducía una mayor transformación blastoide, en las células de bazo de ratón. La técnica utilizada fué la misma que se describió anteriormente, sólo que se probaron diferentes concentraciones de Concanavalina A (0.2, 1, 2, 5 y 10 ug/ml).

Hipersensibilidad Cutánea. Los ratones procedentes de las camadas que recibieron continuamente gamma globulinas o PBS por vía oral, se utilizaron para realizar pruebas de hipersensibilidad cutánea, 7 días después de la última dosis. A estos ratones, se les inyectó 0.05 ml de PBS estéril, en el cojinete plantar de la pata izquierda y 0.05 ml de gamma globulinas de conejo contra salmonela (46 ug/ml), también estéril, en el cojinete plantar de la pata derecha. Tanto el PBS como las gamma globulinas se esterilizaron por filtración en un filtro de membrana de 0.22 um. Se vigiló la aparición de máculas y 48 horas después de haberlos inyectado, se midió el diámetro de las -

patas con un vernier, con el fin de determinar la magnitud de la reacción inflamatoria, en los grupos control y experimental.

RESULTADOS

Conjugación. El cultivo de la mezcla de Escherichia coli JM 1452 - PCU 252 y Salmonella typhimurium St 3, dió como resultado una recombinante, que de acuerdo a pruebas bioquímicas y su capacidad de crecer en medio mínimo, es salmonea, con la propiedad adicional de ser resistente a ampicilina, una de las características de la cepa de E. coli. Esta propiedad fué transferida desde la cepa de E. coli a la de S. typhimurium, a través de un plasmido, por medio de conjugación.

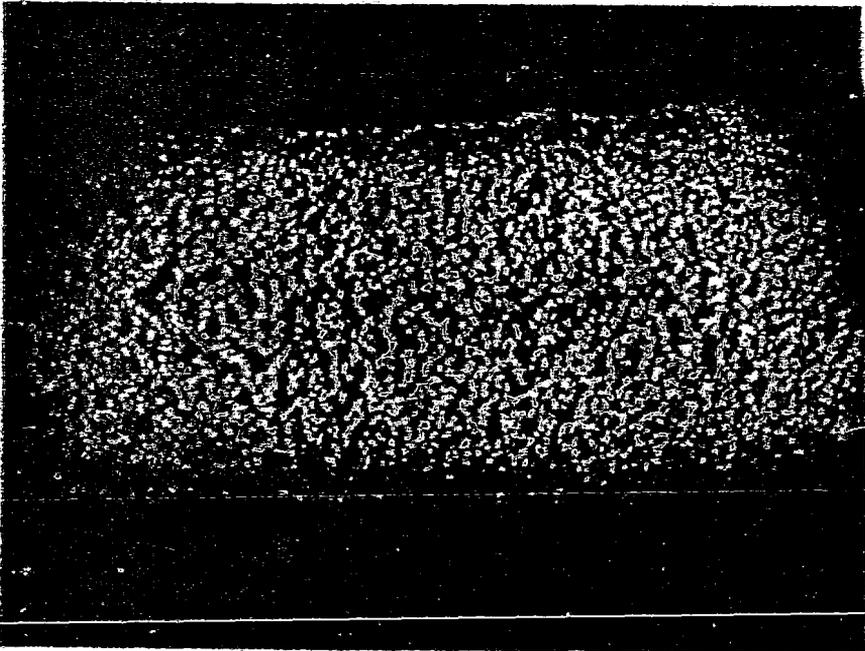
Aglutinación e Inmunoelectroforesis. Los antígenos de salmonea, obtenidos por el método descrito anteriormente, tuvieron un 45% de proteínas de acuerdo al método de Lowry. Los anticuerpos que indujeron estos antígenos en conejo, resultaron con un título de aglutinación de bacterias de 1:256, a una concentración de 9.8 mg/ml (Fig. No 1); además, en inmunoelectroforesis formaron 23 bandas de precipitación, al reaccionar con los antígenos que los indujeron (Fig. No 2).

Dosis Letal Cincuenta. El porcentaje de muertes de ratones adultos, a los 10 días de haberles administrado diferentes dosis de salmonea por vía intraperitoneal, está representado en el cuadro No 7 y Fig. No 3. Puede verse que la DL_{50} es de 1.4×10^4 bacterias y que una dosis 10 veces mayor es, capaz de matar al 100% de los ratones.

FIGURA Nº 1

AGLUTINACION DE SALMONELA CON ANTICUERPOS

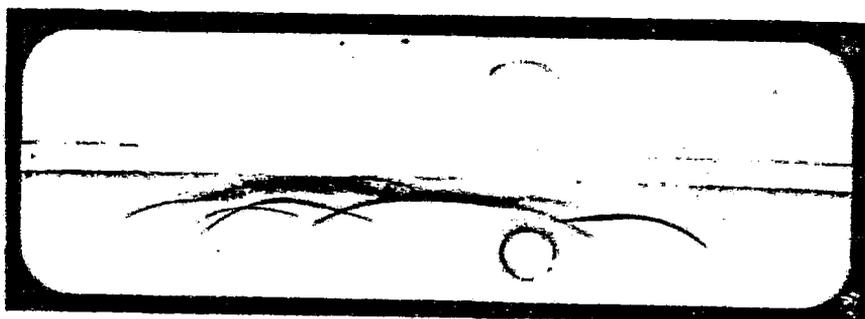
ESPECIFICOS DE CONEJO



La aglutinación se llevó a cabo colocando en un portaobjeto: una gota de la suspensión de salmonela en solución salina y una gota de las gamma globulinas de conejo contra salmonela; las gotas se mezclaron mediante un aplicador de manera y la mezcla se mantuvo en movimiento oscilatorio durante 2 minutos. Puede verse que los anticuerpos de conejo tenían la capacidad de aglutinar a Salmonella typhimurium.

FIGURA Nº 2

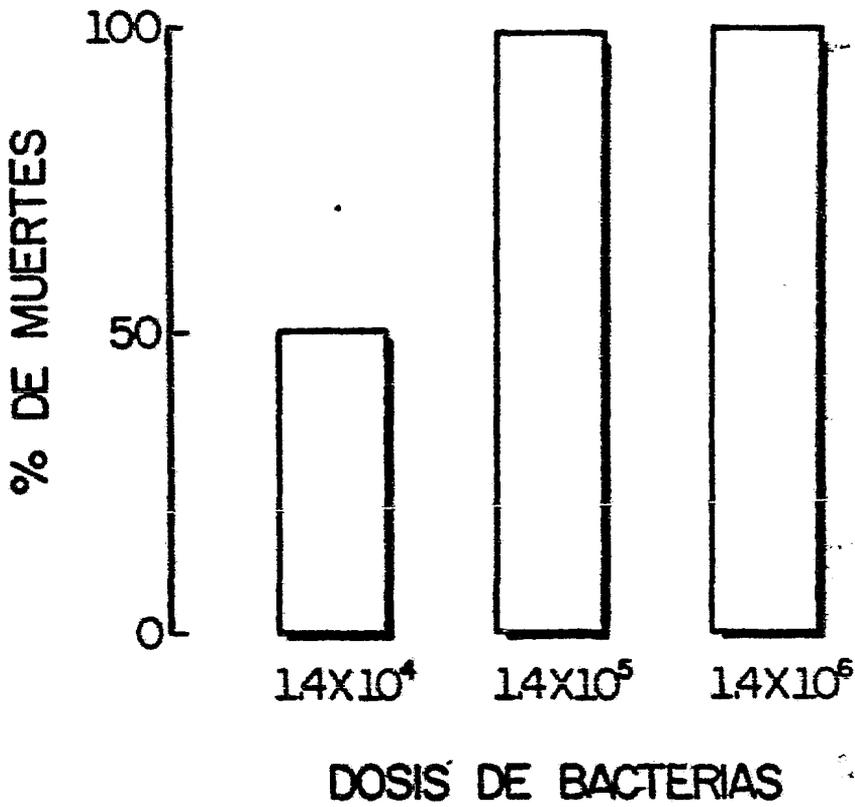
INMUNOELECTROFORESIS DE LOS ANTIGENOS DE
SALMONELA Y LOS ANTICUERPOS DE CONEJO



La inmunoelectroforesis se realizó en agarosa al 1% en solución amortiguadora de barbituratos 0.05 M, pH 8.6; se colocaron 10 ul del antígeno en el pozo (30 mg/ml) y se puso una corriente de - 1.5 mA por portaobjeto durante 2 horas; el canal se llenó con - 200 ul de gamma globulinas de conejo (14mg/ml); se pueden observar 23 bandas de precipitación, lo cual habla de la complejidad de los componentes antigénicos presentes en el extracto preparado de la forma descrita en material y métodos.

FIGURA Nº 3

PORCENTAJE DE MUERTES DE RATONES ADULTOS A LOS 10 DIAS DE HABERLES ADMINISTRADO SALMONELA POR VIA INTRAPERITONEAL



C U A D R O N º 7

DL_{50} DE Salmonella EN RATONES ADULTOS

Cantidad de bacterias administradas *	Relación muertos/total	% de mortalidad
1.4×10^4	3/6	50
1.4×10^5	6/6	100
1.4×10^6	6/6	100

* el volumen total de bacterias administrado a cada ratón
 fué de 0.1 ml por vía intraperitoneal

En el cuadro No 8 y figura No 4 está representado el porcentaje de muertes de ratones lactantes, a los 10 días de haberlos infectado por vía oral, con diferentes dosis de salmonela; en este caso, los ratones fueron infectados cuando tenían 5 días de edad. La dosis de 10^6 bacterias mató al 100% de los ratones, la dosis de 10^5 mató al 83% de éstos y la dosis de 10^4 al 43%. Los datos en el cuadro No 8 se encuentran ordenados para poder calcular la DL_{50} , de la cepa de salmonela en ratones lactantes, de acuerdo al método de Reed y Muench (27, 49). Puede verse que la DL_{50} se encuentra entre las dosis de 10^5 y 10^4 bacterias y realizando los calculos adecuados, se encuentra que es de 1.7×10^4 bacterias.

Desafío. Los resultados del primer experimento, en donde se retó a ratones con dosis diferentes de salmonela, previa administración de gamma globulinas o PBS, están representados en el cuadro No 9 y figura No 5. Los datos obtenidos sugerían la presencia de anticuerpos en algunas madres, por lo que se decidió comprobarlo mediante inmunoelectroforesis; para esto, se utilizaron los antígenos de salmonela y el suero de cada una de las madres. Los resultados obtenidos mostraron, que la madre de la camada que recibió gamma globulinas y fue desafiada con 2.2×10^5 bacterias y la madre de la camada que recibió PBS y fue desafiada con 2.2×10^6 bacterias, poseían anticuerpos en circulación, capaces de formar una banda de precipitación muy tenue en ensayos como inmunoelectroforesis (cuadro No 9 y figura No 6).

CUADRO N° 8
DL₅₀ DE Salmonella EN RATONES LACTANTES

Cantidad de bact. *	Relación de Mort.	Número Muertes (%)	Supervi- vientes	Valores Acumulados			
				Total Muertos	Total Vivos	Relación de Mort.	% Mort.
10 ⁶	7/7	7(100)	0	15	0	15/15	100
10 ⁵	5/6	5 (83)	1	8	1	8/9	89
10 ⁴	3/7	3 (43)	4	3	5	3/8	37

* el volumen total de bacterias administrado a cada ratón fué de 0.1 ml por vía oral

CUADRO N° 9
PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DEL EXPERIMENTO 1

Grupo	Cantidad de bacterias	Camadas que recibieron		P (+)
		PBS	Igs conejo	
1	0	100	100	1
2	2.2 X 10 ⁴	0 *	70	0.003
3	2.2 X 10 ⁵	38	100 **	0.025
4	2.2 X 10 ⁶	66 **	8	0.003

+ prueba de X²

* las crías de esta camada murieron por un accidente, pero en todas se aisló Salmonella typhimurium del hígado

** las madres de estas camadas poseían anticuerpos contra salmonela en circulación

FIGURA Nº 4

PORCENTAJE DE MUERTES DE RATONES LACTANTES A LOS 10 DIAS DESPUES DE HABERLOS DESAFIADO CON SALMONELA ADMINISTRADA POR VIA ORAL

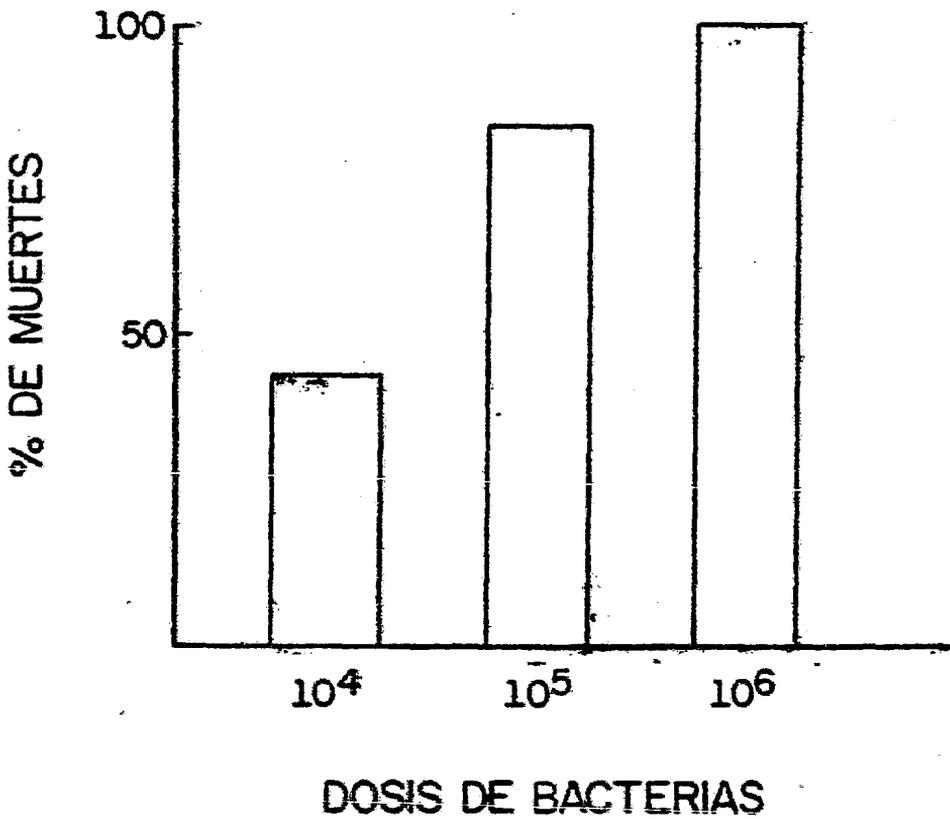
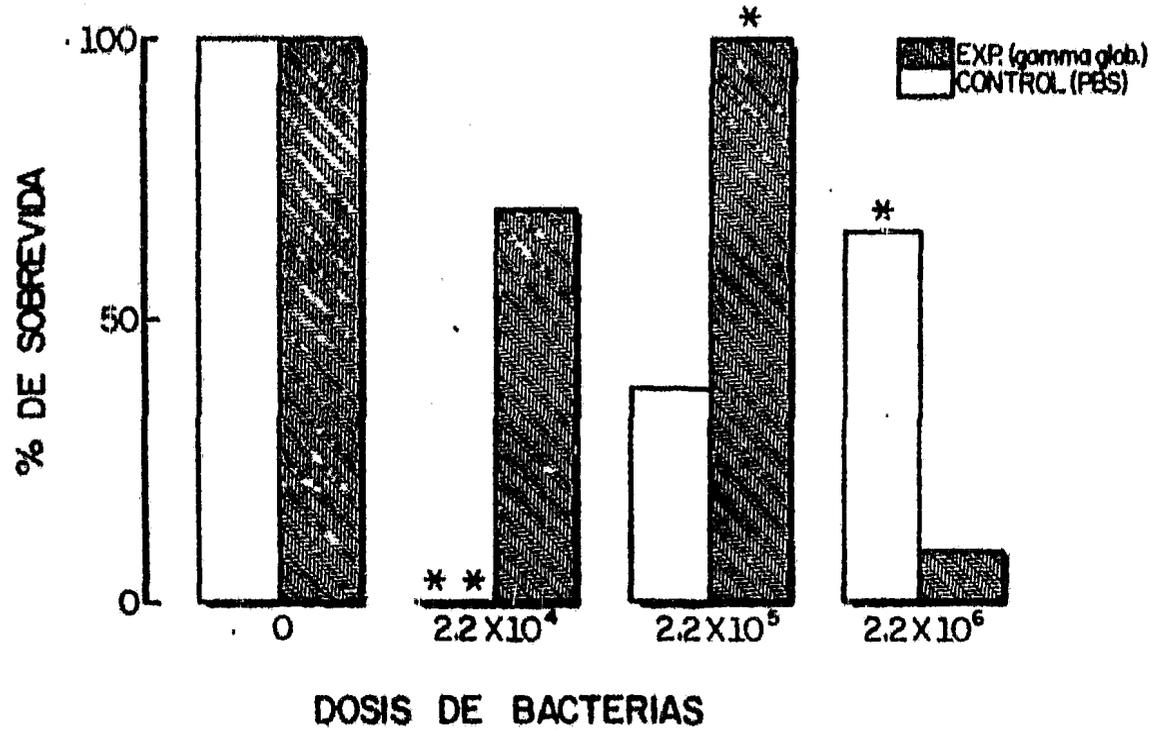


FIGURA Nº 5

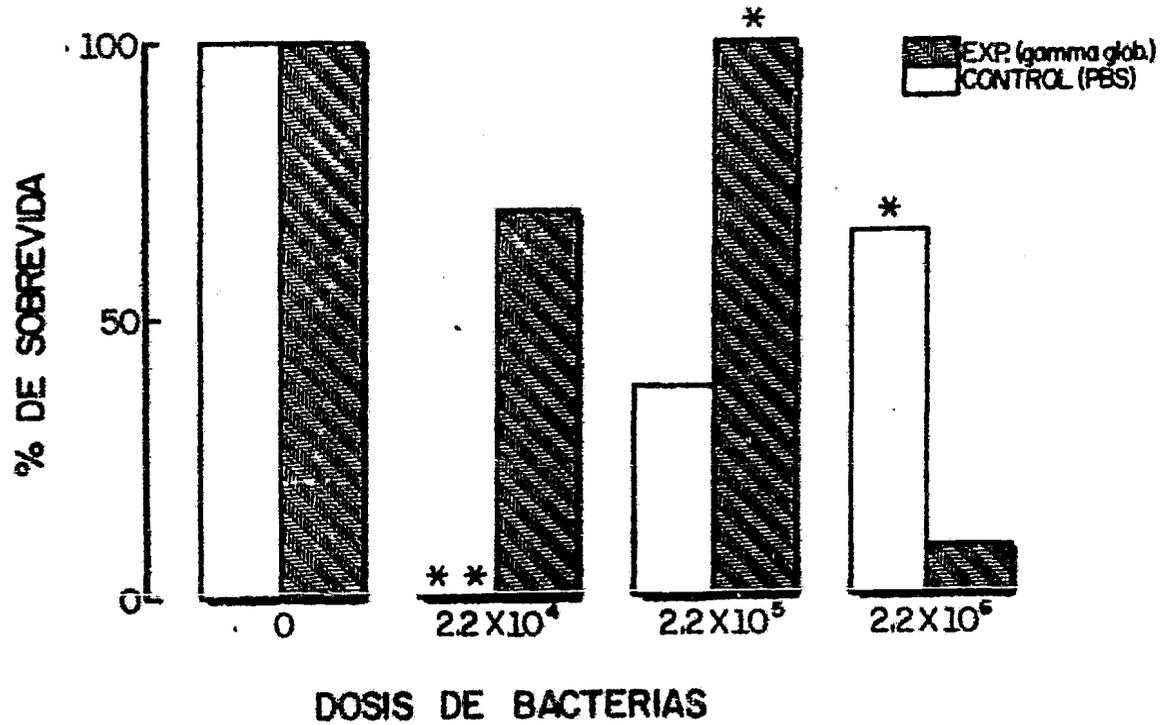
PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LAS CAMADAS DESAFIADAS CON DIFERENTES DOSIS DE SALMONELA POR VIA ORAL, PREVIA ADMINISTRACION DE PBS O GAMMA GLOBULINAS (EXP.1)



* las madres tenían anticuerpos contra salmonela en circulación
** la camada sufrió un accidente

FIGURA Nº 5

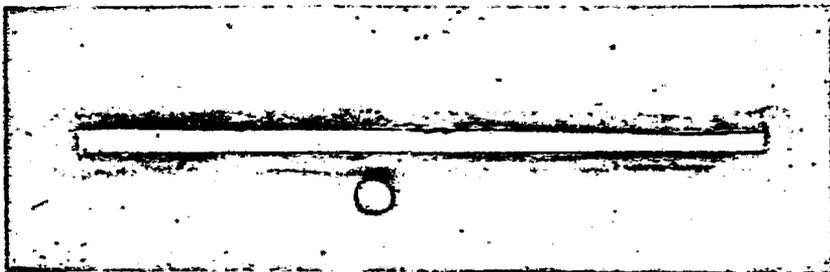
PORCENTAJE DE SOBREVIDA DE LAS CAMADAS DESAFIADAS CON DIFERENTES DOSIS DE SALMONELA POR VIA ORAL, PREVIA ADMINISTRACION DE PBS O GAMMA GLOBULINAS (EXP.1)



* las madres tenían anticuerpos contra salmonela en circulación
** la camada sufrió un accidente

FIGURA N° 6

INMUNOELECTROFORESIS DE LOS ANTIGENOS DE
SALMONELA Y EL SUERO DE RATON



El suero proviene de la madre de la camada desafiada con 2.2×10^5 bacterias, previa administración de gama globulinas de conejo. Puede verse una pequeña - banda de precipitación.

Algunos accidentes durante el curso del experimento, fueron causa de que la camada que recibió PBS y fué infectada con una dosis de 2.2×10^4 bacterias, muriera: esto nos impidió establecer con exactitud, la causa de muerte de los miembros de esta camada. Sin embargo, fué posible aislar Salmonella typhimurium del hígado de todos los cadáveres.

En base a que en el experimento anteriormente mencionado, se presentaron problemas, como el que algunas madres tenían anticuerpos contra salmonela en circulación, en concentraciones elevadas ya que se manifestaban en inmunoelectroforesis, y accidentes en los que se moría una camada a un tiempo, se decidió volver a efectuar el experimento; pero, primero se determinó si las madres de cada una de las camadas que se iban a ocupar, tenían anticuerpos en circulación contra salmonela, mediante pruebas de aglutinación. Para esto, 3 días antes de la fecha programada de parto, los ratones gestantes fueron sangrados de la vena ocular y el suero obtenido, por centrifugación de la sangre, se utilizó en las pruebas de aglutinación. Los resultados mostraron que ninguna madre poseía anticuerpos contra salmonela, antes del parto.

En el segundo experimento, cada camada se dividió en 2 grupos, el control que recibió PBS y el experimental que recibió gamma globulinas; posteriormente, cada camada fue desafiada con una dosis diferente de salmonela. Los resultados se encuentran representados

tados en el cuadro No 10 y figuras No 7 y No 8. La camada desafiada con 10^4 bacterias no aparece en estos registros, debido a que sufrió un accidente durante el experimento. Puede verse que el 100% de los ratones sobrevivió a desafíos con 10^3 bacterias, se les hayan o no dado anteriormente gamma globulinas. Con dosis de 10^6 bacterias, murió el 100% de los ratones, también, hayan o no recibido gamma globulinas. El grupo que recibió PBS, de la camada desafiada con 10^5 bacterias, - mostró un 34% de sobrevivencia, mientras que el grupo experimental de esta misma camada, mostró un 50% de sobrevivencia. Es obvio que la DL_{50} en el grupo experimental es de 10^5 bacterias, mientras que la DL_{50} en el grupo control, calculada de acuerdo al método de Reed y Muench, es de 5.6×10^4 bacterias (cuadro No 11). La diferencia observada en el número de muertes entre el grupo control y el grupo experimental, de desafiados con 10^5 bacterias, no es estadísticamente significativa, de acuerdo a la prueba de X^2 , ya que $P > 0.7$ (cuadro No 10) (48).

Hipersensibilidad Cutánea. Los resultados de las pruebas de hipersensibilidad cutánea, están expresados en el cuadro No 12, como el promedio del diámetro de las patas, tanto del grupo control como del experimental, a las 48 horas de haber recibido PBS y gamma globulinas por vía intradérmica, en el cojinete plantar. La figura No 9 -- muestra las patas traseras de un ratón del grupo experimental, después de 48 horas de haber recibido: a) 0.05 ml de PBS en la pata izquierda y b) 0.05 ml de gamma globulinas de conejo (2.3 ug) en la pata derecha; como puede verse, no hay diferencia aparente entre las 2 patas. -

C U A D R O N° 10
 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DEL EXPERIMENTO 2

Camada	Cantidad de bacterias	Grupo que recibió		P *
		PBS	Igs conejo	
1	0	100	100	1
2	10 ³	100	100	1
4	10 ⁵	34	50	0.7
5	10 ⁶	0	0	1

* prueba de χ^2

C U A D R O N° 11
 MORTALIDAD DEL GRUPO CONTROL EN EL EXPERIMENTO 2

Cantidad de bact.	Relación de Mort.	Número Muertes (%)	Supervivientes	Valores Acumulados			
				Total Muertos	Total Vivos	Relación de Mort.	% Mort.
10 ⁶	4/4	4(100)	0	6	0	6/6	100
10 ⁵	2/3	2 (66)	1	2	1	2/3	66
10 ³	0/2	0 (0)	2	0	3	0/3	0

C U A D R O N° 12

DIAMETRO PROMEDIO DE LAS PATAS DE LOS RATONES CONTROL Y EXPERIMENTAL
A LAS 48 HORAS DE HABER RECIBIDO PBS Y GAMMA GLOBULINAS DE CONEJO POR
VIA INTRAPERITONEAL EN EL COJINETE PLANTAR

Grupo	Administración pre- via por vía oral de	Administración por vía intradérmica	Diámetro	P ***
1	PBS +	PBS ++	2.11	
2	PBS +	Gamma glob. **	2.12	0.99
3	Gamma glob. *	PBS ++	1.93	
4	Gamma glob. *	Gamma glob. **	2.00	0.95

+ 8 dosis de PBS, de 0.1 ml cada una

++ 0.05 ml de PBS estéril

* 8 dosis de gamma globulinas de conejo contra salmonela de 0.1 ml cada una (20 mg/ml)

** 0.05 ml de gamma globulinas de conejo contra salmonela, estéril, 46 ug/ml

*** prueba de X^2

FIGURA Nº 7

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LAS CAMADAS DESAFIADAS CON DIFERENTES DOSIS DE SALMONELA POR VIA ORAL, PREVIA ADMINISTRACION DE PBS O GAMMA GLOBULINAS (EXP. 2)

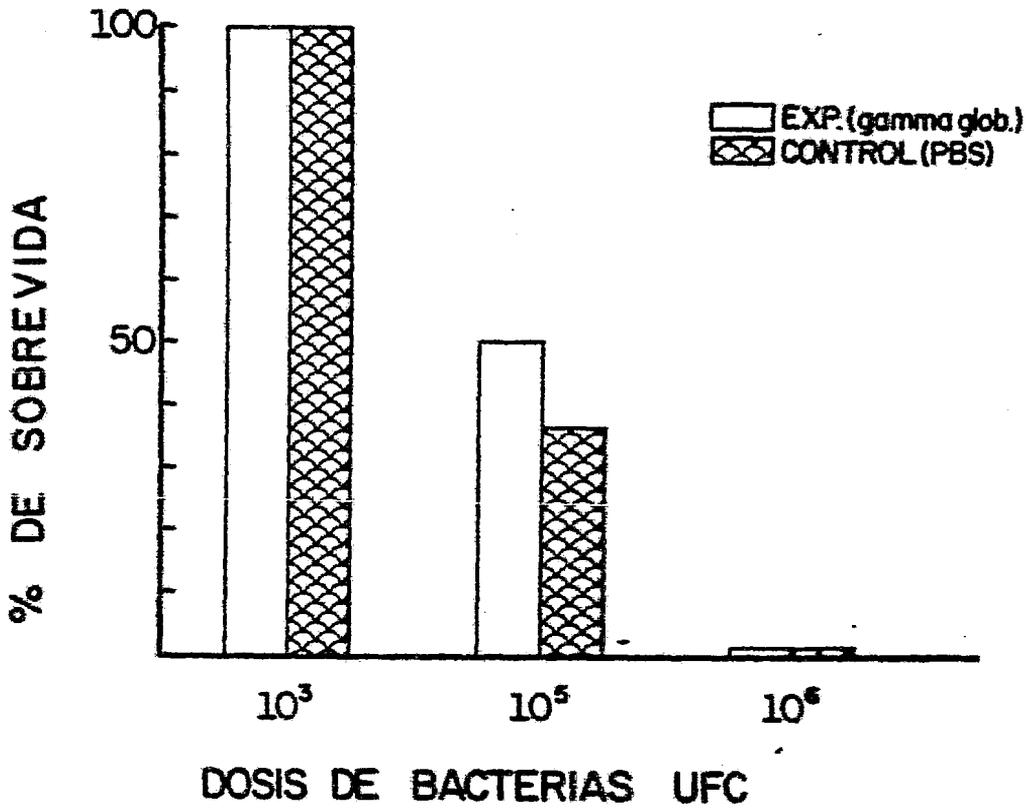


FIGURA Nº 8

MORTALIDAD DE RATONES CON DIFERENTES DOSIS DE SALMONELA Y DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL (EXPERIMENTO 2)

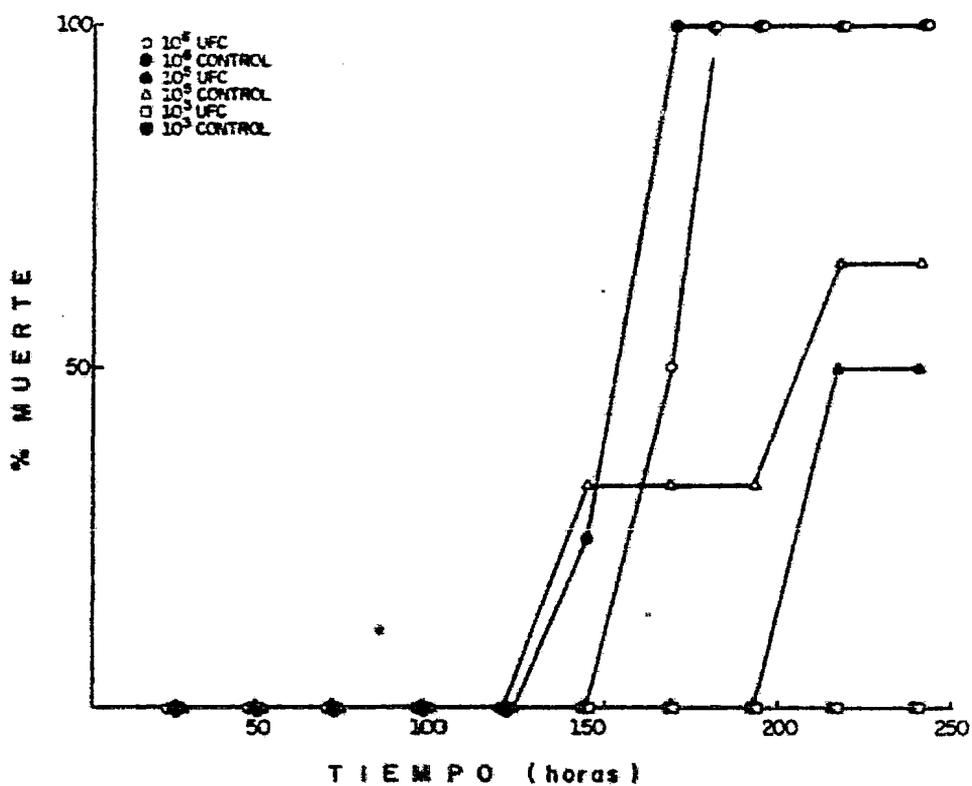
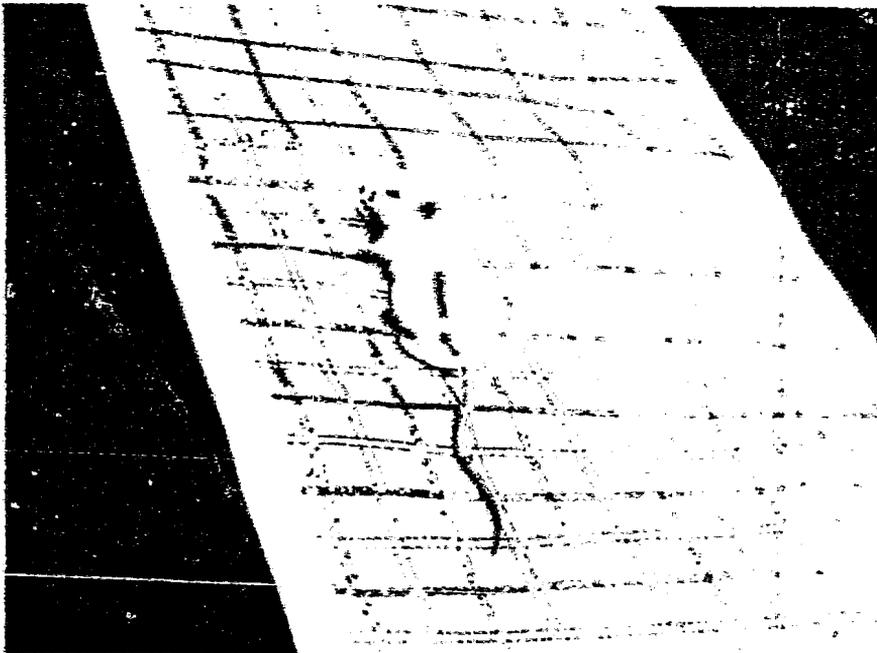


FIGURA Nº 9

HIPERSENSIBILIDAD CUTANEA



Patas traseras de un ratón que recibió gamma globulinas de conejo por vía oral, a las 48 horas de haberle administrado 0.05 ml de PBS en la pata izquierda y 0.05 ml de gamma globulinas de conejo (46 ug/ml) en la pata de recha.

El diámetro de las patas fue medido con un vernier y la diferencia encontrada, entre el diámetro promedio de los grupos control y experimental, no es estadísticamente significativa (P 0.8).

Transformación Blastoide. La búsqueda de linfocitos a nivel sistémico, sensibilizados hacia el antígeno administrado por vía oral, se hizo mediante la transformación blastoide de los linfocitos de bazo, ante diversos estímulos (cuadro No 13): un grupo control, se incubó solamente con RPMIc; un control negativo, se incubó con una proteína similar a la utilizada como antígeno por vía oral (gamma globulina de bovino); el grupo experimental se incubó con el antígeno utilizado (gamma globulinas de conejo) y finalmente, se utilizaron 2 controles positivos (uno incubado con Concanavalina A y el otro con lipopolisacárido de E. coli), para comprobar que las células estaban vivas y en condiciones de multiplicarse, ante un estímulo blastogénico. Como se puede observar, las cpm en los grupos 2 y 3, incubados con el antígeno y una proteína similar, mostraron una incorporación de timidina incluso menor que el grupo control 1, mientras que los grupos 4 y 5, controles positivos, demostraron que las células estuvieron en condiciones de responder a estímulos blastogénicos inespecíficos.

La concentración de Concanavalina A utilizada se determinó experimentalmente, viendo que concentración induce una mayor transformación blastoide de las células de bazo de ratón. Los resultados obtenidos están representados en la figura No 10 y se ve que la concentración de 2 ug/ml es la que provocó una mayor estimulación.

C U A D R O N° 13

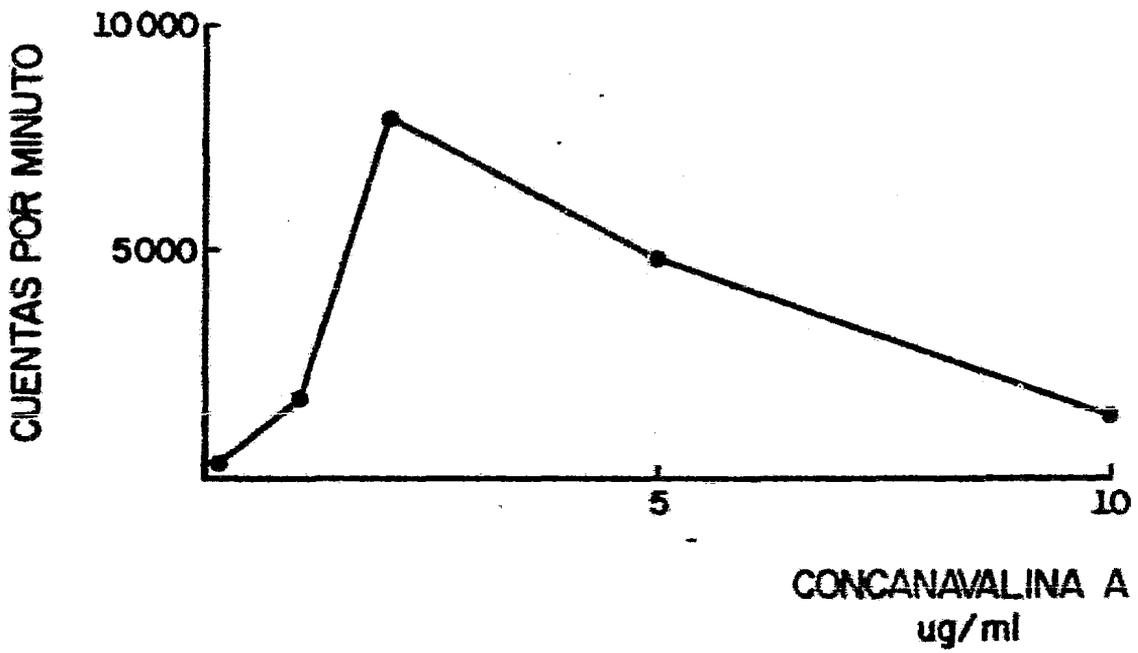
TRANSFORMACION BLASTOIDE DE LAS CELULAS DE SAZO DE LOS RATONES
QUE RECISIERON INMUNOGLOBULINAS POR VIA ORAL

Grupo	Substancia agregada	cpm *
1	RPMIc	574
2	Igs de bovino	95
3	Igs de conejo	70
4	Concanavalina A	5 339
5	Lipolisacarido	1 612

* promedio de 3 ratones

FIGURA Nº 10

ESTIMULACION DE CELULAS DE BAZO CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE CONCAVALINA A



DISCUSION Y CONCLUSIONES

La conjugación bacteriana de la cepa de Salmonella typhimurium St 3 con la de Escherichia coli JM 1452 - PCU 252, se realizó con éxito, logrando obtener una cepa de salmonela resistente a ampicilina. El tener una cepa de salmonela resistente a ampicilina, era con el fin de poder administrar este antibiótico a los ratones lactantes, para destruir la flora normal y permitir así, la colonización más fácil de la salmonela. Sin embargo, en el ensayo de DL₅₀ (datos no reportados) no se observó diferencia significativa en la mortalidad de los ratones, administrándoles o no ampicilina; pero, esta resistencia nos fue muy útil como marcador, para identificar nuestra cepa en los aislamientos del bazo e hígado, durante el curso del experimento.

Los resultados del experimento fueron erráticos. Entre los posibles factores que contribuyeron a ello, se pudo explorar la presencia de anticuerpos en las madres de los ratones lactantes utilizados. Se encontró que 2 madres, la del grupo experimental 3 y la del grupo control 4 (cuadro No 9), tenían anticuerpos séricos, en concentración suficiente como para ser detectados en una prueba de precipitación (IEF). Se sabe que durante la producción de calostro, parte de las inmunoglobulinas séricas pueden pasar de la madre al feto (9, 10, 49) y que el intestino de los recién nacidos es permeable a macromoléculas

(10, 25), en las primeras horas después del nacimiento; estos hechos, - se pueden utilizar como argumento, para explicar la sobrevivida tan alta que se observó en las camadas en cuestión, que fué incluso mayor, que la observada en las camadas que recibieron dosis menores de salmonela. Sin embargo, no se comprobó que este fuera el caso, ya que para -- explorar la presencia de anticuerpos se sacrificó a las madres; además, el fenómeno se observa sobre todo, en la producción de calostro (primeras horas después del parto).

Otro factor que explica en parte estos resultados, fue el accidente ocurrido al grupo control 2, en donde murieron todos los animales sin poder conocer claramente la causa de muerte. Aunque se pudo aislar salmonela de todos los hígados, no se puede decir que esto haya sido la causa de muerte, o en que grado influyó en ésta.

En el segundo experimento, los resultados son más congruentes, en el sentido que el porcentaje de muertes es directamente proporcional a la dosis de bacterias administradas. Desafortunadamente, no se observaron diferencias significativas, entre el porcentaje de sobrevivida de los grupos experimental y control (cuadro No 10). Las razones - pueden ser varias, entre las que se puede mencionar, que probablemente la dosis de inmunoglobulinas no fue lo suficientemente grande como para poder observar diferencias (quizá sea la explicación más pertinente). No obstante, tampoco se puede descartar la posibilidad de que los anticuerpos inducidos por los antígenos utilizados, no sean protectores, a pesar de demostrar capacidad aglutinante y precipitante (figuras No 1

y No 2) o que las inmunoglobulinas de origen sérico, se hayan destruido en el tracto gastrointestinal, dado el pH y las enzimas presentes en el mismo, pero no fue posible explorar la influencia de estos factores.

Las 2 últimas observaciones resultan falsas, cuando los animales de experimentación son cerdos (50), en donde los recién nacidos fueron protegidos de un desafío con Salmonella choleraesuis, previa administración de anticuerpos séricos. En ese trabajo, el método usado para obtener los antígenos fue el mismo que se utilizó aquí.

Un aspecto muy importante del estudio, es el referente a la búsqueda de hipersensibilidad sistémica, en los ratones que recibieron inmunoglobulinas séricas de conejo desde el nacimiento. No se encontró hipersensibilidad celular y humoral in vitro, ni in vivo. En los sitios de las patas inyectadas no se observó, hasta las 48 horas, enrojecimiento, aparición de pápula ni edema. Asimismo, no se logró detectar en el bazo la presencia de células sensibilizadas al antígeno, ya -- que el cultivo de las mismas con este antígeno, no estimuló su multiplicación, mientras que la Concanavalina A y el lipopolisacárido sí, demostrando con esto la capacidad de estas células para hacerlo.

Algunos resultados, como las cpm encontradas en el material nuclear de las células incubadas con el antígeno, son muy interesantes, ya que fueron menores incluso, que el control que se incubó exclusivamente con el medio de cultivo (RPMIc); entre las causas que pueden explicar este fenómeno, está el hecho de que algunos autores han observado tolerancia a nivel sistémico, hacia ciertos antígenos, cuando se -

han administrado por primera ocasión por vía oral (40, 51, 52), de manera que la respuesta inmune intestinal parece inhibir una respuesta inmune a nivel sistémico. Sin embargo, como el diseño del experimento no fue con el fin de demostrar tal fenomenología, no se puede aseverar que este sea el caso.

Es necesario dejar claro, que el modelo del ratón recién nacido, técnicamente resultó muy problemático, ya que la canalización del estómago a pesar de usar una cánula muy flexible, con mucha frecuencia ocasionó lesiones en esófago o estómago, que fueron causantes de la muerte: por tal motivo, las necropsias de los animales tuvieron que realizarse de manera muy cuidadosa, para poder discriminar la causa real de muerte. Las necropsias siempre se acompañaron del cultivo de bazo e hígado y en el caso de aislar salmonela, de la identificación del fenotipo por pruebas bioquímicas y resistencia a antibióticos.

Para concluir, podemos decir que no se logró demostrar -- que las inmunoglobulinas séricas de conejo, en contra de S. typhimurium, administradas por vía oral a ratones lactantes, pudieran evitar en forma significativa la presentación de la enfermedad. A pesar de eso, se observó que el inicio de la enfermedad es más rápido en los animales que no recibieron inmunoglobulinas y hay una pequeña diferencia en el porcentaje de mortalidad entre el grupo control y el grupo experimental; ambos hechos nos hacen pensar, en la posibilidad de que se

trató únicamente de diferencias en la concentración de inmunoglobulinas y número de bacterias, por lo que se presentó la enfermedad. Por otra parte, no se observó sensibilización a nivel sistémico en los animales experimentales y los datos obtenidos, nos parecen más relacionados con los fenómenos de tolerancia descritos por otros autores. Estos hechos contrastan con los fenómenos de hipersensibilidad, que se presentan en ciertos individuos, después de la ingestión de algunos alimentos (40); además, determinados autores reportan, que la administración de antígenos por vía oral está asociada con la aparición de anticuerpos en circulación (53, 54). Podemos decir, en base a los resultados obtenidos, que la administración oral de inmunoglobulinas séricas heterólogas, a ratones recién nacidos, no induce fenómenos de hipersensibilidad que limiten su uso, aunque queda por demostrar en este modelo, su utilidad para prevenir la infección con S. typhimurium.

Los éxitos obtenidos en algunas especies animales, por la administración oral de inmunoglobulinas séricas a recién nacidos, con la finalidad de protegerlos contra desafíos con agentes patógenos, resulta muy interesante desde el punto de vista pecuario, ya que si se lograra de esta manera, disminuir la frecuencia de las enfermedades gastrointestinales, se evitarían pérdidas económicas considerables (50). En el humano, la posibilidad de administrar inmunoglobulinas, específicas contra los agentes patógenos más frecuentes, introduciéndolas en las leches preparadas, podría ser de valor incalculable en la prevención de las enfermedades gastrointestinales en los lactantes. Ya que

se cuenta con la metodología adecuada, para la producción de anticuerpos específicos a gran escala, su uso no está limitado.

La falta de sensibilización hacia las inmunoglobulinas séricas heterólogas, administradas por vía oral, es un factor importante para la utilización de esta tecnología, por lo que es necesario explorarla en otras especies animales. Asimismo, es necesario realizar más estudios, para conocer los mecanismos que intervienen en la respuesta inmune a nivel intestinal, debido a que aún no se conocen claramente.

BIBLIOGRAFIA

- 1 . - Instituto Mexicano del Seguro Social. 1981. Boletín Epidemiológico Semanal de los Estados y del Valle de México. V 4, 52.
- 2 . - Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1978. Compendio de Estadísticas Vitales de México.
- 3 . - Uruchurtu, A., Méndez, D., Doporto, J.M., Romero, R.M., Lopez, J., Sanchez, F.. 1976. Un estudio sobre la mortalidad de lechones en México. Vet.Mex. 7:111-123.
- 4 . - Fernandez de Castro, Jorge. 1979. Vacunas entéricas. Sal. Pub. - Mex. 21: 307-319.
- 5 . - Mizrahi, L.. Infecciones entéricas. El Manual Moderno S.A.. México, 1980. pags: 7-10.
- 6 . - Carrada Bravo, Teodoro. 1981. La fiebre tifoidea y la vacunación antitifoidea. Sal. Pub.Mex. 23(2): 103-158.
- 7 . - Fudenberg, H., Stites, D. P., Caldwell, J. L., Wills, J. V.. Manual de inmunología clínica. 2a ed. El Manual Moderno S.A.. México, 1980. Cap. 19.
- 8 . - Murray, M.. 1973. Local immunity and its role in vaccination. - Vet.Rec. 93: 500-504.
- 9 . - Kretschmer, R.. 1977. Inmunidad en el recién nacido. Gac.Med. Mex.113(3): 133-138.
10. - Tizard, I. R.. An introduction to veterinary immunology. W.B. -

- Saunders Co., Philadelphia, 1977. Cpts. 5, 9, 10 y 14.
11. - Porter, P., Kenworthy, R., Holme, W., Horsfield, S.. 1973. E. coli antigens as dietary additives for oral immunisation of pigs: trials with pig creep feeds. Vet. Rec. 92: 630-636.
 12. - Husband, A. J.. 1978. An immunisation model for the control of infectious enteritis. Res. vet. Sci. 25: 173-177.
 13. - Snodgrass, D. R., Wells, P. W.. 1978. The immunoprophylaxis of rotavirus infections in lambs. Vet. Rec. 102: 146-148.
 14. - Instituto Mexicano del Seguro Social. 1979. Boletín Epidemiológico Anual.
 15. - Dineen, J. K., Ogilvie, B. M., Kelly, J. D.. 1973. Expulsion of Nippostrongylus brasiliensis from the intestine of rats. Immunology 24: 467-475.
 16. - Rabin, B. S.. 1980. Immunologic model of inflammatory bowel disease. Ammer. J. Path. 99(1): 253-256.
 17. - Kretschmer, R. R., Stewardson, P. B., Papierniak, C. K., Gotoff, S. P.. 1976. Chemotactic and bactericidal capacities of human newborn monocytes. J. Immunol. 117 (4): 1303-1307.
 18. - Molinari, J. L., Romero, R. M.. 1971. Inmunización experimental con fracción ribosomal de E. coli 055. Rev. lat-amer. Microbiol. 13: 233-238.
 19. - Molinari, J. L., Flisser, A., Cabrera, R.. 1975. Inmunidad inducida con fracción ribosomal obtenida de S. typhi Ty2 contra diversas cepas de S. typhi. Rev. lat-amer. Microbiol. 17: 149-156.
 20. - Kita, E., Kashiba, S.. 1980. Immunogenicity of the ribosomal -

- fraction of Salmonella typhimurium: analysis of humoral immunity. *Infec. Immun.* 27 (1): 197-203.
21. - Angerman, C. R., Eisenstein, T. K.. 1980. Correlation of the duration and magnitude of protection against Salmonella infections - afforded by various vaccines with antibody titers. *Infec. Immun.* 27 (2): 435-443.
22. - Molinari, J. L., Gavilanes, M., Tato, P.. 1976. Vacuna ribosomal obtenida de Salmonella typhimurium probada contra el desafío del microorganismo virulento administrado por vía bucal. *Arch. Invest. Med.* 7 (3): 127-135.
23. - Collins, F. M., Carter, P. B.. 1972. Comparative immunogenicity of heat-killed and living oral Salmonella vaccines. *Infec. Immun.* 6 (4): 451-458.
24. - Porter, P., Kenworthy, R., Allen, D.. 1974. Effect of oral immunisation with E. coli antigens on post weaning enteric infection in the young pig. *Vet. Rec.* 95: 99-104.
25. - Porter, P.. 1973. Intestinal defence in the young pig. A review of the secretory antibody systems and their possible role in oral immunisation. *Vet. Rec.* 92: 658-664.
26. - Hernandez Valenzuela, R., Calderon, S.. 1976. Vacunación de lactantes contra infecciones entéricas microbianas. *Gac. Med. Mex.* III (1): 25-41.
27. - Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, W. B., McCarty, M.. *Tratado de Microbiología*. 2a ed. Salvat - Editores S.A.. México, 1978. págs. 569, 661, 686-687.

28. - Svennerholm, A.M., Lange, S., Holmgren, J. . 1980. Intestinal immune response to cholera toxin: dependance on route and -- dosage of antigen for priming and boosting. *Infec. Immun.* 30(2) :337-341.
29. - Pierce, N., Gowans, J. L. . 1975. Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. *J. Exp. Méd.* - 142:1550-1563.
30. - Husband, A. J., Seaman, J. T. . 1979. Vaccination of piglets against E. coli enteritis. *Aust. Vet. J.* 55:435-436.
31. - Rowley, D. . 1977. The problems of oral immunisation. *Aust. J. - Exp. Biol. Med. Sci.* 55:1-18.
32. - Wells, P. W., Snodgrass, D. R., Herring, J. A., Dawson, A. . -- 1978. Antibody titres to lamb rotavirus in colostrum and milk of vaccinated ewes. *Vet. Rec.* 103:46-48.
33. - Rutter, J.M., Jones, G.W. . 1973. Protection against enteric disease caused by E. coli.- A model for vaccination with a virulence determinant? *Nature* 242:531-532.
34. - Watson, D. L., Lascelles, A. K. . 1975. The influence of systemic immunisation during mammary involution on subsequent antibody production in the mammary gland. *Res. Vet. Sci.* 18:182-185.
35. - Stevens, A. J., Blackburn, P. W. . 1967. An unorthodox approach to piglet scours. *Vet. Rec.* 80:637-638.
36. - Bohl, E.H., Gupta, P., Olgun, F., Saif, L. J. . 1972. Antibody - responses in serum, colostrum and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infec.*

- Immun. 6(3):289-301.
37. - Quiros, J., Olguín, F., Garza, J.. 1975. Anticuerpos adquiridos pasivamente en relación con mortalidad e incremento de peso de lechones. Vet.Mex. 6: 84-91.
38. - Kurczyn, G., Garza, J., Olguín, F., Quintana, F.. 1976. Efecto de la adición al calostro del suero sanguíneo, albumina y gamma globulinas en lechones. Vet.Mex. 7:124-131.
39. - Bridger, J.C., Brown, J.F.. 1981. Development of immunity to porcine rotavirus in piglets protected from disease by bovine - colostrum. Infec. Immun. 31(3): 906-910.
40. - Asquith, P.. Immunology of the gastrointestinal tract. Churchill Livingstone. New York, 1979.
41. - Frankel, S., Reifman, S., Sonnerwirth, A.C.. Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 7a ed.. The C.V. Mosby Co.. Saint Louis, 1970.
42. - Tato, P., Flisser, A., Gavilanes. M., Molinari, J. L.. 1979. -- Immunogenic complexes obtained from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* Ty2 by the bacterial acetone powder method. Ann.Microbiol. (Inst. Past.) 130A: 47-60.
43. - Layne, E.. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzimology V 3:448.
44. - Cambell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N., Sussdorf, D.H.. -- Methods in immunology. 2a ed.. W.A. Benjamin Inc.. New = York, 1970.
45. - Williams, C.A., Chase, M.W.. Methods in immunology and --

- immunochemistry. Vol. II. Academic Press. New York, 1968.
46. - Ling, N.R., Kay, J.E.. Lymphocyte stimulation. North Holland. Amsterdam, 1975.
47. - Boyse, E.A., Old, L.J., Chouroulinkov.. 1964. Citotoxic test for demonstration of mouse antibody. Meth.Med.Resch. 10:39-47.
48. - Bancroft, H.. Introducción a la bioestadística. Traducido del inglés por Naum Mittelman. 8a ed. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Argentina, 1960. Capítulo 12.
49. - Gitlin, D., Kumate, J., Urrusti, J., Morales, C.. 1964. Plasma proteins from mother to fetus. J.clin.Invest. 43:1938-1951.
50. - Barbosa, H., Guevara, R., Ramos, F., López, J., Lobo, J., Larralde, C.. Passive immunity to Salmonella cholerasuis in suckling piglets by oral administration of homologous serum, In press.
51. - Kagnoff, M.F.. 1978. Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. J.immunol. 120(5):1509-1513.
52. - André, C., Heremans, J.F., Vaerman, J.P., Cambiaso, C.L.. 1975. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. J.Exp.Med. - 142:1509-1519.
53. - Rothberg, R.M., Kraft, S.C., Michalek, S.M.. 1973. Systemic immunity after local antigenic stimulation of the lymphoid tissue of the gastrointestinal tract. J.immunol. III(6):1906-1913.
54. - Crabbé, P.A., Nash, D.R., Bazin, H., Eyssen, H., Heremans, J.. 1969. Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral or parenteral immunization with ferritin. J.exp.Med. 130:723-738.