

Martínez JH¹, Pico RJT¹, Gómez CJ¹, Juárez RM¹, Martínez-Chavarría LC¹

(1) Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad De México, México.

INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica serovar Typhimurium es un patógeno de humanos y animales. La mayoría de los genes necesarios para su virulencia se encuentran en regiones genómicas conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs). Las SPI más estudiadas son SPI-1 y SPI-2. Los genes de SPI-1 permiten que la bacteria invada el intestino, mientras que los genes de SPI-2 son importantes para la supervivencia y replicación intracelular. Los pollos como modelo experimental permiten observar las dos manifestaciones clínicas de *S. Typhimurium*; en pollos de un día de edad provoca enfermedad sistémica, mientras que en pollos de mayor edad causa enfermedad intestinal. Estudios que han evaluado los efectos de SPI-1 y SPI-2 no han podido aclarar el papel de estas islas in vivo.

OBJETIVOS

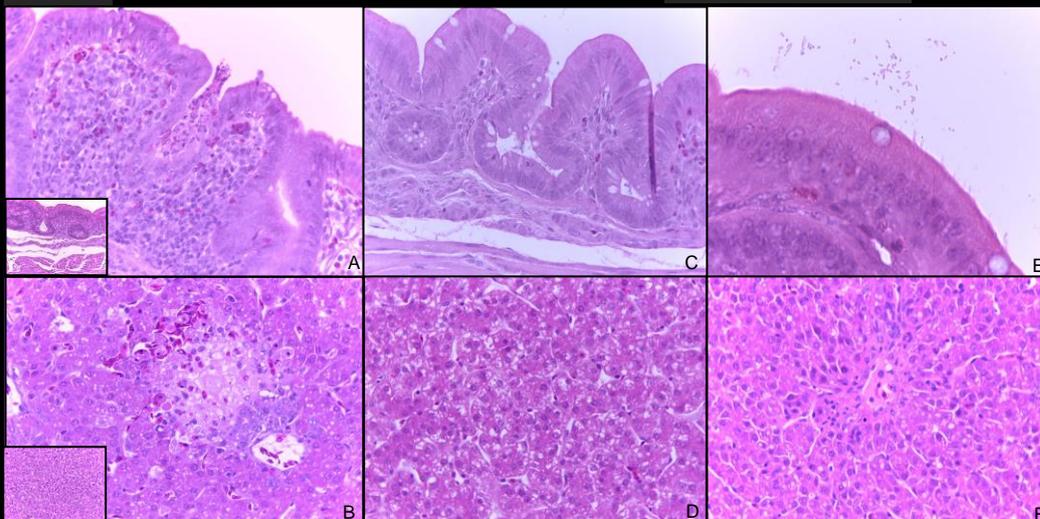
Evaluar el efecto de la inactivación de los genes de SPI-1 y SPI-2 en el desarrollo de lesiones histopatológicas en los pollos infectados. Realizar el conteo bacteriano en los órganos obtenidos en el estudio *post mortem* y evaluar la capacidad de las mutantes para diseminarse a otros órganos

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Cepas bacterianas:** WT SL1344, Δ SPI-1::kan, Δ SPI-2::kan. Todas las cepas se crecieron en medio LB adicionado con antibióticos (estreptomicina 100 μ g/ml o kanamicina 20 μ g/ml).
- **Animales de experimentación, estudio *post-mortem* e histopatología:** Se emplearon grupos de 15 pollos libres de patógenos específicos (SPF) que fueron inoculados vía oral con 10^{10} UFC de la cepa WT y las mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2. Se aplicó la eutanasia a las 24, 48 y 72 hpi y se realizó el examen *post-mortem* para tomar muestras de ciego e hígado, éstas se fijaron por 24h en formalina al 10% y se tiñeron con hematoxilina y eosina.
- **Conteo de UFC'S:** Muestras de hígado y ciego se maceraron y homogeneizaron en solución PBS 1x estéril para elaborar diluciones décuples seriadas que fueron sembradas en medio LB con kanamicina o estreptomicina. Se incubaron a 37° C durante 24h.

RESULTADOS

Figura 1.



En la evaluación histopatológica de los órganos inoculados con la cepa WT se encontraron lesiones asociadas a *Salmonella* (Figuras 1 A-B, ver pie de figura) tanto en el ciego como en el hígado. Las bacterias observadas fueron identificadas como *Salmonella* mediante PCR empleando ADN extraído de los órganos embebidos en parafina. En los grupos infectados con SPI-1 (Figuras 1 C-D) o SPI-2 (Figuras 1 E-F) no se encontraron lesiones.

En el conteo de UFC's se obtuvieron bacterias de los grupos inoculados con la cepa WT, mientras que las mutantes no fueron recuperadas en ningún tiempo con excepción del grupo SPI-1 a las 24 hpi, indicando que su capacidad para invadir y diseminarse a otros órganos disminuyó drásticamente (Figura 2).

Figura 1. Histopatología de pollos inoculados. Grupo infectado con la cepa WT, (A) el ciego presenta abundante infiltrado mononuclear y granulocítico, el epitelio muestra cambios degenerativos así como lesiones en aspecto de volcán, (B) el hígado muestra necrosis multifocal, acompañada de escasos heterófilos, hemorragia y edema submucoso. Grupo Δ SPI-1, el ciego (C) e hígado (D) carecían de lesiones. Grupo Δ SPI-2, (E) se observan bacilos intraluminales en el ciego sin evidencia de lesiones (estas resultaron negativas a PCR), (F) el hígado no presentó cambios patológicos.

Figura 2.

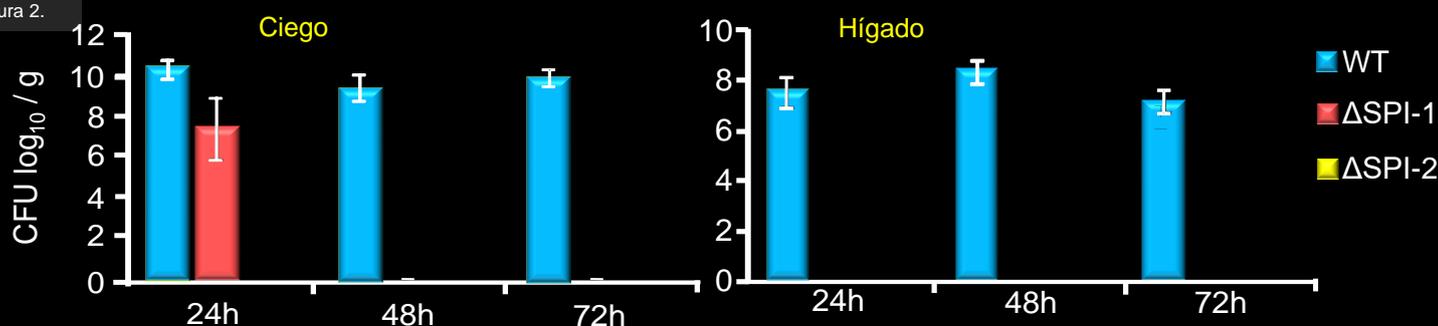


Figura 2. UFC's recuperadas de órganos infectados. En los grupos infectados con la cepa WT se recuperaron colonias de ambos órganos en todos los periodos de tiempo; mientras que de los grupos inoculados con las mutantes, solo se obtuvieron colonias del grupo SPI-1 a las 24 hpi.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los genes que se encuentran en SPI-1 y SPI-2 juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad sistémica y la colonización intestinal.

Referencias:

- Addwebi TM, Call DR, Shah DH. Contribution of *Salmonella* Enteritidis virulence factors to intestinal colonization and systemic dissemination in 1-day-old chickens. *Poult Sci*. 2014 Apr;93(4):871-81. doi: 10.3382/ps.2013-03710. PMID: 24706964.
- Jones MA, Hulme SD, Barrow PA, Wigley P. The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol*. 2007 Jun;36(3):199-203. doi: 10.1080/03079450701264118. PMID: 17497331.
- LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Apr;13(4):191-205. doi: 10.1038/nrmicro3420. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25749450; PMCID: PMC5074537.