



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PRODUCCION DE SUERO HIPERINMUNE CONTRA
Salmonella gallinarum EN POLLOS LIBRES DE
PATOGENOS ESPECIFICOS (SPF).**

T E S I S

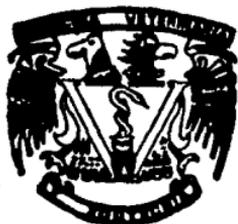
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
LYDIA HUERTA ASCENCIO

ASESOR PRINCIPAL: DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ
COASESORES: DR. JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ
DR. FRANCISCO SUAREZ GUEMES

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





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 está 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

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	12
III.	MATERIALES Y METODOS	13
	AVES	13
	CEPAS BACTERIANAS	13
	MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	13
	CURVAS DE CRECIMIENTO	14
	CONTEO DE UFC	15
	PREPARACION DE INOCULOS	15
	EXAMEN BACTERIOLOGICO	16
	OBTENCION DE SUEROS	16
	INOCULACION DE POLLOS	16
	ANALISIS ESTADISTICO	17
IV.	RESULTADOS	18
	EXAMEN BACTERIOLOGICO PREINOCULACION	18
	CURVAS DE CRECIMIENTO	18
	CONTEO DE COLONIAS	23
	EXAMEN BACTERIOLOGICO	23
V.	DISCUSION	26
VI.	CONCLUSION	30
VII.	LITERATURA CITADA	31

RESUMEN

Se obtuvieron sueros hiperinmunes contra *Salmonella gallinarum* a partir de pollos *SPF* (*Specific Pathogen free*), infectados experimentalmente por vía oral, con una dosis única de 10^7 y 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC), de una cepa de *S. gallinarum* de referencia de la *American Type Culture Collection* (ATCC) No. 9184, una de campo FVB323; 10^8 y 10^9 UFC de *S. pullorum* ATCC No. 10398 y *S. gallinarum* 9R (vacunal).

Los pollos se sangraron de la vena radial del ala antes de su inoculación y a los 14, 21, 28 y 35 días postinoculación.

Los sueros producidos se emplearon para la estandarización de un inmunoensayo enzimático "TA-ELISA" (Tifoidea aviar-Enzyme-linked immunosorbent assay), en el cual se utilizaron preparaciones de proteínas de la membrana externa (pPME) como antígeno de captura.

Por otra parte se determinó la colonización en órganos, mediante el examen bacteriológico de hígado, bazo, tonsila cecal, sangre, médula ósea e hisopo cloacal, durante un periodo de 5 semanas. En la mayoría de los lotes de pollos no se logró aislar a la bacteria, sin embargo, la cepa de campo de *S. gallinarum* FVB323 se aisló de hígado y bazo de pollos inoculados con 10^7 y 10^8 UFC. El aislamiento de salmonela en órganos pudo afectarse por factores de resistencia natural, por ejemplo, la resistencia genética de las líneas de aves ligeras, la edad de inoculación de los pollos, así como el empleo de cepas de *Salmonella* conservadas en medios de cultivo, en los cuales pierden su patogenicidad.

INTRODUCCION

La avicultura es una de las áreas de producción pecuaria más dinámica y tecnificada. En 1984, la industria avícola registraba una inversión de aproximadamente \$383,089 millones de pesos, y la dependencia económica de 59,247 familias por dicha actividad (67). En 1992, la producción de huevo fue de 1'187,748 toneladas y la de pollo de 1'345,653 toneladas (82). Es importante considerar que la avicultura proporciona la proteína de origen animal a precios más bajos en el mercado Nacional. Los consumos *PER cápita* estimados en 1992 fueron de 14 Kg de huevo y 16 Kg de carne de pollo al año (82).

La avicultura no es solo una de las áreas pecuarias más importantes, sino también una de las más susceptibles a pérdidas económicas por problemas sanitarios. En este aspecto, las bacterias del género *Salmonella* son de los agentes etiológicos que mayores pérdidas ocasionan a esta industria, a la vez que representan graves problemas de salud para el público consumidor.

Salmonella es uno de los 21 géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (47). Estudios recientes mediante hibridaciones de DNA, sugieren que hay solamente una especie de *Salmonella* (*S. choleraesuis*) con seis subespecies (42). Este género comprende aproximadamente 2,200 serotipos (41), de los cuales, los de interés en la industria avícola pueden ser divididos en dos principales grupos: el de las salmonelas inmóviles, que no producen infección en el humano, representado por *S. gallinarum* productora de la "Tifoidea aviar" (TA), y *S. pullorum* productora de la "Pulorosis"; y el de las salmonelas móviles, las cuales producen la "Paratifoidea" en las aves. En este rubro, las especies que presentan mayor incidencia son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, las cuales producen "Salmonelosis" o envenenamiento por alimento en el humano (57).

En México se reportan principalmente problemas de TA, la cual ha venido ocasionando grandes pérdidas económicas a la avicultura a través de los años. Por ejemplo, Mosqueda en 1984, reportó pérdidas anuales por 3,573 millones de pesos en pollo de engorda (53). En otro estudio realizado por Ramírez en 1987, el impacto económico anual por TA en gallinas reproductoras pesadas, se calculaba en alrededor de 80,000 millones de pesos; considerando que en el país existían 4 millones de aves, de las cuales el 40% estaban infectadas, produciendo hasta

200 millones de huevos infectados, y dejando de producir 120,000 toneladas de carne anuales (65). En México se reporta un incremento de la enfermedad, al igual que en países de África, Centro y Sudamérica; a diferencia de Canadá, USA y algunos países europeos que reportan baja incidencia o ausencia total de la enfermedad (45, 68).

ESPECIES SUSCEPTIBLES

La enfermedad fue originalmente encontrada en la gallina doméstica y reportada en el faisán y perdiz (37). Ocurren brotes naturales en la gallina, pavo, gallina de guinea, pavo real, codorniz, perdiz y faisán (61). Los reportes sobre la susceptibilidad de palomas y patos son muy variables. Kaupp y Dearstyne (34) y Johnson y Anderson (32) observaron brotes de la enfermedad en el pato. Lucet (44) en cambio reportó que patos, gansos y pichones no eran susceptibles. Klein (37), no tuvo éxito con la inoculación subcutánea del cultivo en las palomas; pero Moore (52) observó la muerte de palomas en 8 días, con 2 ml de cultivo. También se ha reportado su aislamiento en algunas aves silvestres (89).

AGENTE ETIOLOGICO

S. gallinarum fue aislada originalmente por Klein (37) en Inglaterra, es un bacilo corto, Gram-negativo, inmóvil, que no forma esporas ni contiene cápsula, es aerobio o anaerobio facultativo (37, 61). Posee el antígeno "O" (somático) 1, 9, y 12, y parece ser que no existe variación en el antígeno 12 como en *S. pullorum* (5, 10, 18, 88). Perteneció al grupo "D" en la clasificación serológica de Kauffmann y White; y no posee los antígenos "H" (flagelar), ni "Vi" (capsular) (43).

RESISTENCIA A AGENTES QUIMICOS Y FISICOS

Este microorganismo muere en 10 min a 60°C. Conserva su viabilidad en la oscuridad durante 20 días en agua, pero muere en 24 horas expuesto a la luz solar (34). Muere por la acción del fenol al 0.1% y del permanganato de potasio al 1% en tres min, y de la formalina al

2% en un mín. La patogenicidad de los cultivos se conserva mejor en estado liofilizado o congelado. Los cultivos en medios artificiales pierden rápidamente su patogenicidad, por lo que se recomienda dar varios pases en pollos, antes de probarla. Este microorganismo puede encontrarse en su estado virulento en la médula ósea de pollos, hasta tres meses después de haber muerto por TA (61).

Parece ser que *S. gallinarum* no sobrevive mucho tiempo después de abandonar el cuerpo del ave; Hall et al. (29), demostraron que hay escaso peligro de iniciar un brote en aves susceptibles, que se albergaron en un gallinero contaminado con el agente de la TA, una semana o más, después de haber retirado a las aves enfermas.

Smith (71) encontró que el tiempo de sobrevivencia media de *S. gallinarum* en heces de pollos infectados, fue de 10.9 días en corrales cerrados y dos días menos en corrales abiertos.

La persistencia de salmonela en cama se encuentra fuertemente influenciada por el contenido de humedad y el pH de la cama (80).

Orr y Moore (56) observaron que este microorganismo conservó su viabilidad hasta 43 días, sometido diariamente a congelación y descongelación, y sobrevivió dos semanas en hígado infectado naturalmente a 7°C y 148 días a -20°C.

TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD

Un aspecto de suma relevancia es la forma de transmisión de la enfermedad. Esta es de tipo vertical o transovárica, y de tipo horizontal o a través de cualquier vector. Las aves enfermas de TA y las portadoras, son la fuente de infección más importante, y las que perpetúan y difunden la enfermedad. Estas aves infectan no sólo a su propia generación, sino también a generaciones sucesivas, en virtud de la transmisión a través del huevo. Las aves silvestres, moscas y ratas, pueden ser vectores mecánicos importantes (61). Badi et al. (2), aislaron *Salmonella* en el 17% de ratas que atraparon en el área de cuatro granjas de gallinas productoras de huevo, el 84% de estos aislamientos fueron de *S. gallinarum*.

Un ave en la fase aguda de la enfermedad, es capaz de excretar la bacteria en las secreciones de la boca, oculares, nasales y por las heces, por lo que pueden contaminar rápidamente alimento, agua y cama, convirtiéndolos en fuentes de infección y favoreciendo así

la rápida diseminación de la enfermedad. Las aves que se recuperan y entran a la fase crónica, eliminan a la bacteria a través del huevo, debido a la predilección que tiene el microorganismo por el ovario (29, 58). Beaudette (8, 9) y Beach y Davis (6), demostraron la transmisión a través del huevo.

Rao et al. (66), recuperaron *S. gallinarum* en el 36% de huevos provenientes de una parvada con TA. Los huevos infectados transováricamente, pueden ser la fuente de infección que inicie nuevos brotes de la enfermedad en las parvadas ponedoras (29).

La eliminación de la bacteria por heces de aves infectadas experimentalmente por vía oral, ocurre entre el tercer y décimo día postinfección (58, 80). Aunque puede variar ampliamente, Jordan (33), obtuvo resultados poco consistentes al intentar el aislamiento de la bacteria a partir de heces e hisopos cloacales de aves en fase aguda de la enfermedad, y no logró aislar a la bacteria en heces de aves recuperadas; concluyendo que podía deberse a que las heces eran muy fluidas y con poca materia fecal. Sin embargo, Padrón (58) obtuvo buenos resultados utilizando una cepa de *S. gallinarum* ácido nalidíxico resistente (nal^r), eliminando así la posibilidad del crecimiento de bacterias coliformes contaminantes. Jordan (33) además observó que la eliminación de *S. gallinarum* a través de heces se incrementó notablemente justo antes de morir el ave. Las muestras de heces fueron positivas al aislamiento en el 31.9% y los hemocultivos en el 93.6% de los casos (33).

Gordeuk et al. (26), demostraron que *S. gallinarum* puede ser transmitida por cohabitación, a partir de aves infectadas artificialmente a aves susceptibles, presentándose una mortalidad del 60% en el grupo de aves susceptibles.

PATOGENIA

La infectividad de *S. gallinarum* está determinada fuertemente por la susceptibilidad genética y la edad de los pollos (23, 59, 62, 69, 70). La infección oral con *S. gallinarum* conduce a la colonización cecal y a la excreción por heces, así como a la colonización en hígado, bazo e intestino (30, 58, 69, 70).

En la TA aguda se presenta anemia hemolítica severa con pérdida de más del 70% de los eritrocitos circulantes originales (1). *S. gallinarum* posee una endotoxina que provoca cambios

hematológicos y serológicos (74). Se piensa que los eritrocitos modificados por la endotoxina son eliminados por el sistema reticuloendotelial (SRE), conduciendo a una anemia hemolítica (1). Cuando el SRE tiene problemas para continuar con la detoxificación y la eritrofagocitosis, se aumenta la susceptibilidad a la endotoxina, produciéndose rápidamente la muerte del ave (1).

Barrow et al. (4) estudiaron la contribución de un plásmido grande (85 Kilobases) de *S. gallinarum* en la virulencia de TA. Ellos observaron que la inoculación de aves con la cepa tipo silvestre provocó una mortalidad del 90 al 100%, y cuando se eliminó el plásmido grande produjo una mortalidad de 0 a 50% (4).

Aunque la TA se considera una enfermedad de aves adultas, se ha demostrado que las aves de todas las edades son susceptibles (6, 8, 38, 46, 50).

PERIODO DE INCUBACION

El período de incubación de la enfermedad es de 4 a 5 días, aunque puede variar de acuerdo con la virulencia del microorganismo. El curso de la enfermedad es aproximadamente de 5 días, prolongándose por 2 a 3 semanas y con tendencia a recurrir (66).

SIGNOS

En pollos jóvenes o recién nacidos que provienen de huevos infectados transováricamente, se observan algunos muertos o moribundos cuando se retiran de las charolas de la nacedora; algunos muestran somnolencia, pobre crecimiento, debilidad, inapetencia y empastamiento fecal en la cloaca, o bien un excremento blanquecino rico en uratos debido a un proceso de deshidratación. Puede observarse respiración forzada o jadeo (61).

En aves en crecimiento o maduras, durante la fase aguda de la enfermedad, se observa un súbito descenso en el consumo de alimento, decaimiento, cresta pálida y doblada, diarrea verdosa o amarillenta, renuencia a moverse. La temperatura corporal aumenta 1-3°C en los primeros 2 a 3 días y permanece así hasta unas horas antes de su muerte. En las aves gravemente enfermas cesa la producción de huevo, debido a la infección ovárica (61).

La muerte ocurre entre 5 a 10 días después de la infección y puede presentarse de 10 a

50% o más de mortalidad (29, 36).

Al igual que la Pulorosis, la TA produce mortalidad desde el momento del nacimiento, pero a diferencia de aquella, la muerte por TA continúa en la edad de postura (61).

LESIONES

Las lesiones que produce *S. gallinarum* en aves jóvenes son indistinguibles de aquellas producidas por *S. pullorum* (75).

En la fase aguda de la enfermedad, se observa poco o ningún cambio en los tejidos. En la fase subaguda o crónica, puede observarse aumento de volumen y congestión del hígado, bazo y riñón. Hígado de color café verdoso o bronceado. Focos blanco-grisáceos en el hígado, y miocardio. Ovarios hemorrágicos, deformes, pálidos, y algunas veces se presenta ruptura del ovario, pericarditis y peritonitis por ruptura de foliculos ováricos. Inflamación mucosa de los intestinos, pudiendo observarse placas blanquecinas con engrosamiento de la mucosa intestinal, debido a una hiperplasia linfocitaria. La musculatura pectoral moderadamente congestionada a consecuencia de la fiebre (61).

En pollos jóvenes algunas veces se observan focos blanco-grisáceos en pulmones, corazón y molleja, como en la Pulorosis aviar, así como retención y descomposición del saco vitelino (61).

RESISTENCIA DEL HOSPEDADOR

Los factores que intervienen en la resistencia del hospedador a TA, son principalmente la resistencia genética de algunas líneas de aves a la infección de *S. gallinarum* (25, 39). Se ha observado que las aves *White Leghorn* (WL) son más resistentes a la TA que otras líneas de aves pesadas y semipesadas (63, 69, 70).

Las WL desarrollan menor título de anticuerpos que las *Rhode Island Reds* (RIR), cuando se inoculan con cepas vivas o muertas. Esto indica que no hay relación directa entre la resistencia a *S. gallinarum* y la capacidad para producir niveles altos de anticuerpos. Si las WL infectadas oralmente no pueden desarrollar alto título de anticuerpos, es evidente que existen mecanismos

de resistencia actuando a nivel digestivo (23).

Se ha reportado que la lisozima y enzimas proteolíticas afectan la habilidad de *S. gallinarum* para multiplicarse y establecer infección (62, 63).

La lisozima de extracto de páncreas e intestino inhibe a *S. gallinarum*, y su acción es más prolongada y más potente en las aves WL que en las RIR. La actividad bactericida del extracto de intestino delgado (que contiene ribonucleasa, enzimas proteolíticas, tripsina y lisozima) es mayor en WL, que en RIR (63).

Las líneas de aves que muestran resistencia a *S. typhimurium*, también muestran resistencia a *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis*, esto sugiere que puede haber un mecanismo general de resistencia que puede aplicarse a todos los serotipos de *Salmonella* en pollos (13).

La edad es un factor importante en la resistencia a TA, Prince y Garren (63), encontraron que después de las dos semanas de edad se incrementa la resistencia a TA en aves. La actividad de la lisozima y de las enzimas proteolíticas también se incrementa con la edad (63).

La nutrición puede tener influencia sobre la resistencia a TA en pollos, debido al cambio que pueden producir algunos alimentos en el pH del contenido intestinal, aunque esto no se ha utilizado intensivamente en la práctica para el control de TA (60).

DIAGNOSTICO

Los signos y lesiones de la enfermedad, así como las pruebas serológicas, son de utilidad para el diagnóstico, sin embargo, solo el aislamiento y la identificación de *S. gallinarum* son definitivos para el diagnóstico de la enfermedad (61).

S. gallinarum puede aislarse de la mayoría de los órganos viscerales, principalmente de hígado y bazo que son órganos de preferencia para su aislamiento, así como de ovario; en pollitos se puede aislar además a partir de saco vitelino (58, 61). Gauger (24), reportó por primera vez el aislamiento de *S. gallinarum* en testículos de gallo.

Silva et al. (69), aislaron más frecuentemente *S. gallinarum* a partir de hígado, que de sangre, bazo, heces e intestino. Padrón (58) la aisló con mayor frecuencia de ovario que de recto, hígado y bazo.

Las pruebas serológicas para detectar la respuesta inmune humoral son: la aglutinación con sangre completa, con suero en placa, estándar en tubo, y la microaglutinación (55).

La prueba de microantiglobulina ha demostrado ser más sensible en la detección de anticuerpos, que las pruebas de aglutinación con sangre completa, en tubo y microaglutinación (69).

Todos los pollos vacunados con la cepa 9R tienen menor título de anticuerpos que aquellos infectados con cepas lisas. Esta diferencia en títulos podría ser útil para distinguir pollos vacunados de los infectados naturalmente. Sin embargo, algunas aves vacunadas desarrollan anticuerpos que producen reacciones en pruebas serológicas para TA y Pulorosis (69).

Con respecto a la prueba de aglutinación, se observan los siguientes problemas: si las aves fueron previamente vacunadas con 9R, algunas presentarán una reacción positiva. Así mismo, se presentan reacciones cruzadas con diferentes bacterias como *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Proteus*, *E.coli*, *Citrobacter*, así como salmonelas móviles, por lo cual se hace necesaria la realización del examen bacteriológico (64). Sin embargo, es importante considerar que para la realización de dicho examen se requiere de 72 horas, a partir de que la muestra llega al laboratorio, esto implica uno o dos días más, lo cual puede representar que la infección se difunda en toda la parvada, con las consecuentes pérdidas económicas. En resumen, la repercusión económica y sanitaria hace evidente la necesidad de contar con una prueba diagnóstica eficiente, accesible y rápida que permita la detección y el control de infecciones generalizadas.

Actualmente en México, cuando se presenta una infección a nivel de progenitoras, la parvada debe ser eliminada por completo. En el caso de gallinas reproductoras, se debe muestrear el 100% de las aves, y eliminar a las rectoras positivas. Además se emplea el tratamiento masivo con antibióticos, y la vacunación sobre brote con la vacuna 9R. En muchas ocasiones, la culminación de todos los esfuerzos por controlar el brote ya presente, es el envío de la parvada al rastro (54).

INMUNIZACION

Se han evaluado vacunas muertas y vivas modificadas, así como la cepa viva, rugosa, avirulenta "9R" de *S. gallinarum* para proteger a los pollos contra la TA. Los reportes confirman que la vacuna 9R genera mejor protección que las vacunas inactivadas (27, 69, 72).

En parvadas altamente susceptibles a TA expuestas a una cepa virulenta, la protección contra la mortalidad que confiere 9R, puede ser severamente limitada. La vacunación con 9R no protege contra la colonización intestinal subsecuente con *S. typhimurium* o *S. infantis* (69).

No se ha demostrado que la cepa 9R afecte la producción de huevo. Sin embargo, las aves vacunadas son capaces de transmitir la bacteria a través del huevo (69).

Bouzoubaa et al. (12) y Bouzoubaa (11) demostraron que proteínas de membrana de *S. gallinarum* inducen mejor protección que la bacterina de células completas inactivada con formalina y que la vacuna viva 9R. La proteína en dosis de 400 µg/100g de peso vivo en aves, produjo 100% de protección contra el desafío oral con *S. gallinarum*. La vacuna de proteínas de membrana con adyuvante oleoso, redujo a cero la transmisión en huevo, en un grupo de ponedoras infectadas experimentalmente a las tres semanas postvacunación, manteniéndose estable; mientras que el grupo control no vacunado tenía 25-36% de transmisión a través del huevo (11, 12).

TRATAMIENTO

La administración de sulfaquinoxalina y nitrofuranos (furazolidona) han mostrado ser efectivos en el tratamiento y en la profilaxis de la TA (61), aunque se han observado cepas de *S. gallinarum* resistentes a furazolidona (28, 73, 76, 77).

Silva et al. (70) reportaron que la microflora intestinal nativa de pollos protegidos contra Paratifoidea, mostró ser parcialmente protectora contra *S. gallinarum*; redujo el número de portadores intestinales y acortó el tiempo de excreción en pollos WL. Pero el bajo nivel de protección previsto por la exclusión competitiva, parece no ser muy útil en el control práctico de TA (70).

PREVENCION

Indudablemente, la manera más efectiva de iniciar un programa preventivo contra TA, es la adquisición de aves libres de *S. gallinarum*, someténdolas a programas sanitarios estrictos para impedir la infección horizontal, realizando las pruebas serológicas y bacteriológicas necesarias para el control de la enfermedad (70).

Los trabajos enfocados en el diagnóstico, se han realizado con diferentes estrategias, por ejemplo, mediante el mejoramiento de los medios de cultivo (79). Moore et al. (51) utilizaron una prueba *in vitro* en el que *S. gallinarum* y *S. pullorum*, atraen al moho *Physarum polycephalum* sobre agar y este es repelido por otras diez especies de *Salmonella* incluyendo a *S. enteritidis* y *S. typhimurium*. A través del mejoramiento de métodos de inmunodiagnóstico, por ejemplo, Chart et al. (17) mediante las técnicas de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) y electroinmunotransferencia, detectaron anticuerpos de la clase IgG dirigidos contra el antígeno "O" del lipopolisacárido (LPS) de *S. enteritidis*, en el 74% de los sueros de aves infectadas naturalmente. Este mismo grupo, Chart et al. (15) mediante la prueba de aglutinación rápida en placa, encontraron que utilizando el antígeno comercial de *S. pullorum* (K polivalente), se puede detectar un 74% de positividad a *S. enteritidis*, en comparación a la utilización de la técnica de electroinmunotransferencia. Chart et al. (16) también utilizó pruebas de aglutinación con el antígeno comercial de *S. pullorum* y sangre completa (de aves infectadas con *S. enteritidis*), pero lisando los eritrocitos con saponinas, observaron 80% de positividad con respecto a sueros considerados positivos por aglutinación, que a la vez correspondían al 70% por electroinmunotransferencia. Con las pruebas descritas se logró detectar, con una eficiencia mediana, anticuerpos mas bien inespecíficos, por lo tanto los resultados no sugieren la utilización de dichas pruebas (15, 16, 17).

Con una técnica de ELISA indirecta se lograron distinguir infecciones causadas por *S. enteritidis*, de aquellas causadas por *S. gallinarum* y *S. pullorum*, utilizando LPS como antígeno de captura (3).

Se utilizó una prueba de ELISA con discos impregnados de sangre para detectar anticuerpos contra el antígeno "O" 9 de *Salmonella* para detectar las gallinas serológicamente

ocultas para *S. gallinarum* y otras infecciones por salmonelas del grupo "D", en la prueba convencional de aglutinación de suero en tubo (48, 49).

Recientemente en México, Verdugo-Rodríguez et al. (1993) desarrollaron un procedimiento para obtener un reactivo antigénico, basado en preparaciones de proteínas de la membrana externa PME de *S. typhi*, que es utilizado con éxito para la detección de anticuerpos séricos específicos para *S. typhi* en sueros de humanos contra fiebre tifoidea, mediante ELISA (86, 87).

OBJETIVOS

Producir sueros específicos contra *S. gallinarum* en pollos SPF con la finalidad de utilizarlos posteriormente en la estandarización de una técnica de diagnóstico mediante ELISA utilizando proteínas de membrana externa como antígenos de captura.

Definir la colonización en órganos de preferencia con diferentes dosis de *S. gallinarum*.

MATERIALES Y METODOS

AVES

Se incubaron embriones de aves libres de patógenos específicos (ALPES) "*Specific Pathogen Free*" (SPF), hasta su nacimiento. Los pollitos fueron alojados en baterías con piso de rejilla hasta el momento de su inoculación (5 semanas), y después en corrales en piso con cama de aserrín, en cuartos de aislamiento previamente lavados y fumigados. Las aves se alimentaron con una ración de iniciación hasta las 5 semanas de edad y una de crecimiento hasta el final del experimento, con un alimento peletizado (MALTA), no medicado. Se realizaron cultivos bacteriológicos para determinar la ausencia de *Salmonella spp* en órganos de pollos preinoculados, así como de cama, agua y alimento.

CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron tres cepas de *S. gallinarum*: una de campo FVB323, una de referencia de la *American Type Culture Collection (ATCC)* No. 9184 y la cepa vacunal 9R; y una cepa de *S. pullorum* de referencia de la *ATCC* No. 10398.

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

CALDO MEDIO "A" (Medio nutritivo)

Caldo nutritivo (Difco, Detroit Mich., USA)	7.0 g
Extracto de levadura (Difco)	1.0 g
Glicerol	2.0 ml
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)	3.1 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	1.3 g
c.b.p. 1,000 ml de agua destilada	

Los ingredientes se disolvieron y se filtraron (filtro millipore 1.2 μ m), se distribuyeron en tubos con 10 ml y en matraz de klett con 50 ml. Se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 Lb

de presión, durante 15 min.

Los medios de cultivo en caldo utilizados, además del descrito, se prepararon de la misma forma.

AGAR MEDIO "A"

Se agregó 1.5% de agar, al medio "A" en caldo; se calentó para disolver y se esterilizó en autoclave. Se dejó enfriar a 45°C aproximadamente y se distribuyó en cajas de petri.

Los medios de cultivo en agar utilizados, además del descrito, se prepararon de la misma forma, disolviendo el agar en agua destilada.

AGAR MAC CONKEY

Se diluyó 5.0% de agar Mac Conkey (BIOXON, México), en agua destilada.

CALDO GN HAJNA

Se diluyó 6.9% de caldo GN Hajna (BIOXON), en agua destilada.

AGAR VERDE BRILLANTE

Se diluyó 5.8% de agar Verde Brillante (BIOXON), en agua destilada.

SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA FOSFATADA 10x (PBS 10x)

Cloruro de sodio (NaCl)	80.0 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	6.1 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	2.0 g
Cloruro de potasio (KCl)	2.0 g

c.b.p. 1,000 ml de agua destilada

Se disolvieron los ingredientes y se ajustó el pH a 7.4 con hidróxido de sodio 10N, se filtró y esterilizó en autoclave.

PBS 1x: Se diluyó 1 ml de PBS 10x en 9 ml de agua destilada estéril.

SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA (SSF)

Se disolvió 0.85% de cloruro de sodio en agua destilada, se filtró y esterilizó en autoclave

CURVAS DE CRECIMIENTO

Los siguientes pasos se hicieron por duplicado y con controles negativos. Al final de la incubación de cada cultivo, se resembró en agar medio "A" y agar Mac Conkey para confirmar

la pureza. Cada cepa, previamente identificada por pruebas bioquímicas, se sembró en agar medio "A" y agar Mac Conkey, para aislar colonias.

CULTIVO PRIMARIO. Se sembraron tres colonias bacterianas en 10ml de caldo medio "A" y se incubaron a 37°C con agitación a 220rpm, durante 12 a 18 horas.

CULTIVO SECUNDARIO. En un matraz de klett con 50 ml de caldo medio "A", se inocularon 100 µl del cultivo primario, y se incubó a 37°C con agitación a 220 rpm.

CURVA DE CRECIMIENTO. Las lecturas se hicieron a cada hora del cultivo secundario, obteniendo los valores de absorbancia en unidades klett, en un fotoelectrocolorímetro de Klett (Klett-Summerson modelo 800-3, con filtro rojo 540-620 nm), y graficándolos para obtener las curvas de crecimiento. En el caso de la cepa FVB323, la curva de crecimiento se realizó obteniendo los valores de absorbancia, en un lector de ELISA (Microplate Reader, con filtro 540 nm), utilizando un volumen de 100 µl/pozo del cultivo secundario.

CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Cuando la curva de crecimiento alcanzó la fase logarítmica tardía, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos *ependorf* de 1.5 ml, se centrifugaron para lavar 3 veces con PBS o SSF estéril, y se hicieron diluciones de 10^6 , 10^7 , y 10^8 . Se platearon 100 µl de cada dilución en 2 placas de agar Medio "A" y 2 de agar Mac Conkey; se incubaron a 37°C durante 24 horas, para hacer el conteo de las UFC por ml.

PREPARACION DE INOCULOS

Conociendo las UFC de cada cepa en la fase logarítmica tardía, las dosis de los inóculos fueron preparadas concentrando o diluyendo el cultivo secundario, previamente lavado (3 veces) y resuspendido en SSF estéril. Las dosis fueron contenidas en 100 µl de inóculo, y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización (1-2 horas).

EXAMEN BACTERIOLOGICO A LA NECROPSIA

Los órganos fueron removidos asepticamente con tijeras y pinzas estériles, a partir de aves sacrificadas por dislocación cervical. Se maceraron en forma individual: hígado, bazo y tonsila cecal en morteros de porcelana estériles, y se cultivaron en un medio de enriquecimiento para enterobacterias: caldo GN Hajna (10 ml), incubándose durante 24 horas, a temperatura ambiente; para después ser resembrados en forma de aislamiento en agar Mac Conkey y agar Verde Brillante; identificando las colonias sospechosas de *Salmonella* (lactosa negativas), por las siguientes pruebas bioquímicas: triple azúcar hierro (TSI), urea, citrato, malonato, lactosa, manitol, ácido sulfhídrico (H₂S), indol, lisina descarboxilasa (LD) y motilidad. Así como, por aglutinación de la bacteria con antisuero de salmonela Grupo "D", antígeno somático 9 (BIGAUX). Las muestras de hisopo cloacal, sangre y médula ósea se cultivaron directamente en 10 ml de caldo GN Hajna, siguiéndose el mismo método descrito para los demás órganos.

OBTENCION DE SUEROS

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de la vena radial del ala, con jeringas estériles de 5 ml y agujas 23 x 25, en tubos de vidrio sin anticoagulante. Se dejó formar el coágulo durante la noche a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el coágulo, y los sueros se centrifugaron a 3000 rpm en una centrifuga refrigerada (DAMON/IEC, modelo CENTRA-7R), a 0°C durante 10 min, para eliminar los glóbulos rojos que estuvieran presentes. Los sueros ya limpios se conservaron en tubos *ependorf* de 1.5 ml, en congelación.

INOCULACION DE POLLOS

Las aves *SPF* de 5 semanas de edad, se distribuyeron en grupos de 50 individuos, por cada una de las cepas a inocular (4 grupos), utilizando un cuarto de aislamiento para cada grupo. Los pollos fueron inoculados con una dosis única, por vía oral en todos los casos. Los pollos controles negativos fueron inoculados con 100 µl de SSF estéril por la misma vía.

Cada grupo se dividió en tres lotes:

Lote A: 20 pollos infectados con la dosis más baja.

Lote B: 20 pollos infectados con la dosis más alta.

Lote C: 10 pollos como controles negativos no infectados (NI).

GRUPO I (cepa FVB323)

Lote A: 10^7 UFC

Lote B: 10^8 UFC

Lote C: NI

GRUPO II (cepa ATCC-9184)

Lote A: 10^7 UFC

Lote B: 10^8 UFC

Lote C: NI

GRUPO III (cepa 9R)

Lote A: 10^8 UFC

Lote B: 10^9 UFC

Lote C: NI

GRUPO IV (cepa ATCC-10398)

Lote A: 10^8

Lote B: 10^9

Lote C: NI

Dos pollos por dosis y uno control, fueron retirados para su examen bacteriológico a las 24, 48 y 72 hr y a los 4, 7, 14, 21, 28 y 35 días postinoculación (PI).

Todas las aves fueron sangradas antes de su inoculación, y a los 14, 21, 28 y 35 días PI.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó análisis de Ji cuadrada para determinar diferencia estadística significativa en las tasas de infección de *S. gallinarum* entre grupos (90).

Se utilizaron las pruebas estadísticas de desviación estándar, media y coeficiente de variación para analizar las curvas de crecimiento duplicadas.

RESULTADOS

EXAMEN BACTERIOLOGICO PREINOCULACION

El aislamiento a salmonela fue negativo a partir de los órganos muestreados: hígado, bazo, vesícula biliar, pulmón, cloaca, tonsila cecal, médula ósea y sangre de pollos preinoculados; así como de agua, cama y alimento. Se aisló *Escherichia coli* de intestino de pollos preinoculados.

CURVAS DE CRECIMIENTO

La curva de crecimiento de la cepa FVB323, alcanzó la fase logarítmica tardía a las 7 horas de crecimiento aproximadamente, como se observa en la figura 1. Solo esta curva de crecimiento se obtuvo con los valores de densidad óptica (DO) en absorbancia A_{540} en el lector de ELISA. Se hicieron cultivos duplicados obteniendo un coeficiente de variación de 5.23% entre las dos muestras.

La curva de crecimiento de la cepa ATCC-9184, alcanzó la fase logarítmica tardía a las 6 horas de crecimiento aproximadamente (figura 2).

La curva de crecimiento de la cepa 9R, alcanzó la fase logarítmica tardía a las 7 horas de crecimiento aproximadamente, con un coeficiente de variación de 4.34% en las muestras duplicadas (figura 3).

La curva de crecimiento de la cepa ATCC-10398, alcanzó la fase logarítmica tardía a las 5 horas de crecimiento aproximadamente, con un coeficiente de variación de 0.30% en las muestras duplicadas (figura 4).

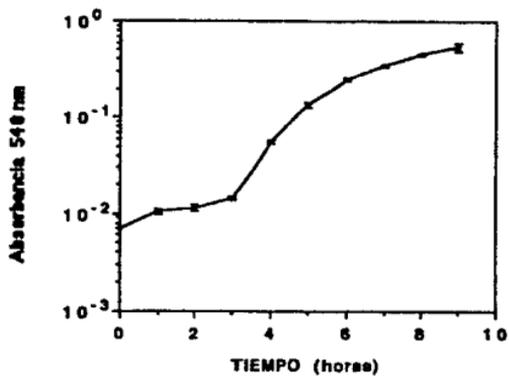


FIGURA 1. Curva de crecimiento de *S. gallinarum* FVB323. Cada punto representa la media de la DO en absorbancia (A_{540}), \pm la desviación estándar de cultivos duplicados.

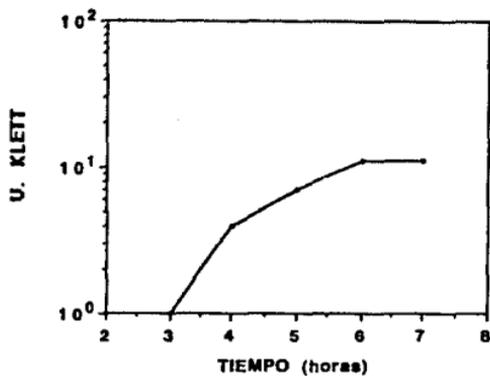


FIGURA 2. Curva de crecimiento de *S. gallinarum* ATCC-9184. Cada punto representa la media de las unidades Klett, \pm la desviación estándar de cultivos duplicados.

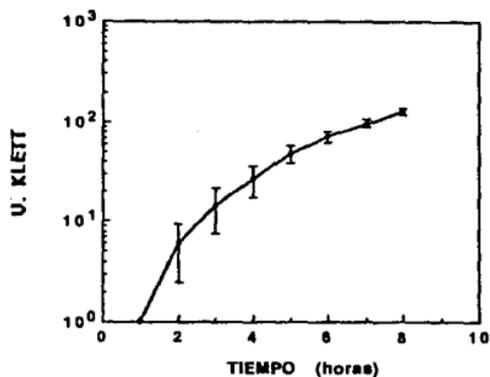


FIGURA 3. Curva de crecimiento de *S. gallinarum* 9R. Cada punto representa la media de las unidades Klett, \pm la desviación estándar de cultivos duplicados.

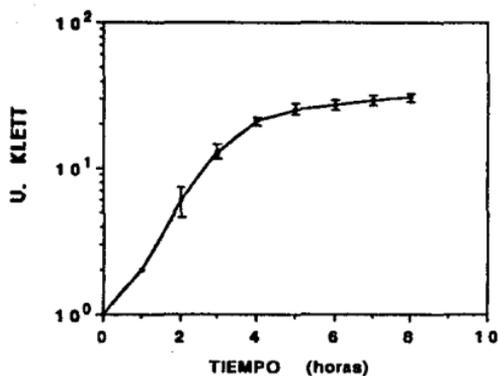


FIGURA 4. Curva de crecimiento de *S. pullorum* ATCC-10398. Cada punto representa la media de las unidades Klett, \pm la desviación estándar de cultivos duplicados.

CONTEO DE COLONIAS

El conteo de UFC se realizó a partir del cultivo secundario en la fase logarítmica tardía. En esta fase de crecimiento se obtuvieron los valores de DO en absorbancia A_{540} en el lector de ELISA.

La cepa FVB323 presentó 7.8×10^8 UFC/ml a las 7 horas de crecimiento, con una absorbancia de 0.355 en el lector de ELISA.

La cepa ATCC-9184 presentó 3.2×10^8 UFC/ml a las 6 horas de crecimiento, con una absorbancia de 0.068 en el lector de ELISA.

La cepa 9R presentó 2.2×10^9 UFC/ml a las 7 horas de crecimiento, con una absorbancia de 0.312 en el lector de ELISA.

La cepa ATCC-10398 presentó 1.0×10^9 UFC/ml a las 5 horas de crecimiento, con una absorbancia de 0.088 en el lector de ELISA.

EXAMEN BACTERIOLOGICO

Los pollos inoculados con la cepa FVB323, presentaron a la necropsia: palidez y presencia de focos blanquecinos en hígado, esplenomegalia y hepatomegalia, desde los 4 días PI hasta el final del experimento.

Se aisló *Salmonella* en los pollos inoculados con 10^8 UFC de la cepa FVB323, como se muestra en la figura 5, a partir de bazo a los 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días PI; de hígado a los 4, 14 y 28 días PI, y de sangre a los 4 días PI. En los pollos inoculados con 10^7 UFC, se aisló *Salmonella* de hígado y bazo a los 4 y 28 días PI.

De acuerdo con los resultados obtenidos con la prueba de Ji cuadrada se encontró que no hubo diferencia estadísticamente significativa, entre los grupos de pollos inoculados con 10^7 y 10^8 UFC de *S. gallinarum* FVB323, y entre los pollos inoculados y los controles (P 0.05).

DOSIS 10⁷ UFC

Días PI	Hígado	Bazo	Sangre	M. Osea	Cloaca	T. Cecal
3	1	1	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
28	1	1	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0

DOSIS 10⁸ UFC

Días PI	Hígado	Bazo	Sangre	M. Osea	Cloaca	T. Cecal
3	1	1	1	0	0	0
7	0	1	0	0	0	0
14	1	1	0	0	0	0
21	0	1	0	0	0	0
28	1	1	0	0	0	0
35	0	1	0	0	0	0

Figura 5. Aves positivas (de dos muestreadas) al aislamiento de *S. gallinarum* FVB323.

Los resultados de esta cepa de salmonela en la prueba bioquímica son los siguientes:

TSI	reacción # 3	LD	positivo
Citrato	positivo	Lactosa	negativo
Urea	negativo	Manitol	positivo
Índol	negativo	H ₂ S	positivo
Malonato	negativo	Motilidad	negativo

Aglutinación positiva (antisero de salmonela grupo "D")

Los pollos (de los grupos II, III y IV) inoculados con las cepas ATCC-9184, 9R y ATCC-10398, no presentaron signos ni lesiones de la enfermedad, y no se logró aislar *Salmonella* en órganos.

No se aisló *Salmonella* de tonsila cecal, cloaca ni médula ósea en ninguno de los grupos de pollos infectados.

DISCUSION

El objetivo principal de esta tesis fue producir sueros con anticuerpos específicos contra varias cepas de *S. gallinarum* en pollos SPF, con la finalidad de utilizarlos posteriormente para estandarizar una técnica de diagnóstico mediante ELISA con preparaciones de proteínas de la membrana externa (pPME) de *S. gallinarum*, como antígenos de captura.

Las PME juegan un papel importante en la respuesta inmune humoral. Diversos grupos han demostrado que los anticuerpos séricos de pacientes con fiebre tifoidea (FT), son capaces de reconocer dichas proteínas (7, 14, 86, 87). Así mismo, se ha demostrado que las PME de *S. enteritidis* son útiles para diagnosticar infección en pollos infectados experimentalmente (35). Por otra parte, se ha observado que las PME de *S. typhi* y de *S. typhimurium*, en el modelo del ratón son capaces de inducir una respuesta inmune protectora (31, 81), con lo cual se sugiere que las PME pueden ser utilizadas en el desarrollo de técnicas de diagnóstico o en la preparación de vacunas.

Las pruebas serológicas comúnmente utilizadas no son suficientes para el diagnóstico definitivo de la TA, por lo que la utilización de las PME son una alternativa en el desarrollo de métodos de detección de anticuerpos.

En México se han realizado estudios con el empleo de PME en especies de *Salmonella*. Verdugo-Rodríguez et al. (1993) diseñaron un inmunoensayo enzimático (FT-ELISA) para la detección de anticuerpos séricos en pacientes con FT utilizando preparaciones de PME de *S. typhi* como antígeno de captura (86, 87). Basándose en el mismo principio, Vázquez et al. (1993) estandarizaron un inmunoensayo enzimático (TA-ELISA) con preparaciones de PME de *S. gallinarum* para detectar anticuerpos séricos, utilizando los sueros de pollos infectados experimentalmente, producidos en este trabajo (83, 84, 85).

Los sueros producidos fueron útiles para estandarizar el TA-ELISA.

Los sueros se obtuvieron a partir de pollos con las siguientes características:

1. Pollos SPF que fueron criados en unidades de aislamiento para evitar que se infectaran con otros patógenos. De esta manera se evitaría el contacto con agentes infecciosos inmunodepresores, que pudieran afectar la respuesta inmune humoral, y al mismo tiempo se eliminaría la probabilidad de que el suero generara, de manera importante, anticuerpos contra

otros agentes infecciosos que pudieran tener reacciones cruzadas con *Salmonella* (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Aerobacter*) (64), y que pudieran interferir con la estandarización del ELISA.

2. Se pretendía obtener sueros de aves que fueran inoculadas por una vía natural de infección de *S. gallinarum*, esto es por vía oral.

3. Los pollos se inocularon a las 5 semanas de edad, tiempo en el que adquieren mayor resistencia a la enfermedad (63).

4. Las aves fueron inoculadas con un cultivo bacteriano en fase de crecimiento logarítmica tardía, con base en estudios realizados en los que se observa que la fase de crecimiento afecta los mecanismos de adherencia e invasividad de las salmonelas. Por ejemplo, *S. choleraesuis* mostró su nivel máximo de invasividad cuando se encontraba en fase logarítmica tardía, y perdió su invasividad en células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) en fase estacionaria de crecimiento, lo mismo ocurrió con *S. typhimurium* y *S. typhi* (40). Ernst et al. (19) observaron que *S. typhimurium* pierde su capacidad invasiva cuando se encuentra en fase estacionaria y aumenta su invasividad en células HEP-2 (línea celular de carcinoma epidermoide derivado de laringe humano), en fase logarítmica tardía. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Francis et al. (22), en donde *S. typhimurium* es menos eficiente para penetrar las células HEP-2 y MDCK II cuando se encuentra en fase estacionaria. Lee y Falkow (40) y Francis et al. (22) observaron que *S. choleraesuis* y *S. typhimurium* en fase estacionaria, se adherían menos eficientemente y perdían su capacidad invasiva, sin embargo, Tartera y Metcalf (78) observaron que *S. typhi* no fue capaz de penetrar células Hente 407 (línea celular de intestino de humano), debido a que perdió su capacidad de adherencia; e incrementó su capacidad invasiva en fase logarítmica, alcanzando un nivel óptimo en fase logarítmica tardía.

La invasividad bacteriana puede verse afectada en algunos cultivos celulares debido a que la interacción del microorganismo con las células varía en las diferentes líneas de cultivo celular, sin embargo, se ha observado que la invasividad de *Salmonella* ha sido similar en los diferentes cultivos celulares utilizados.

Se pensaba que las bacterias penetraban las células hospederas en fase estacionaria, debido a que ésta es la fase de crecimiento en que comúnmente se encuentran en el ambiente, cuando infectan a su hospedero a través de alimento o agua contaminada (40). Sin embargo, Tartera y

Metcalf (78) sugieren que la *Salmonella* puede experimentar una serie de multiplicación celular en el intestino, antes de adaptarse fisiológicamente para adherirse y penetrar óptimamente las células hospederas.

Ernst et al. (19) sugieren que los rangos más altos de invasividad observada en las células en crecimiento logarítmico puede reflejar la necesidad de llevar a cabo la síntesis protéica en niveles lo suficientemente altos para que se induzcan nuevas proteínas necesarias para el proceso de invasión.

En este trabajo experimental las células bacterianas se inocularon cuando se encontraban en fase logarítmica tardía de crecimiento, aumentando así la posibilidad de que la *Salmonella* penetrara las células y colonizara los órganos de elección para TA.

A pesar de ésto, no se logró comprobar la colonización en órganos por medio del aislamiento, de pollos inoculados con *S. gallinarum* ATCC-9184 y 9R; y de *S. pullorum* ATCC-10398. Esto puede deberse a varios factores:

1. La resistencia genética que presentan las líneas de aves ligeras a la TA (25, 39). Bumstead y Barrow (13) observaron que las líneas de aves que son resistentes a *S. typhimurium*, también son resistentes a *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis*, lo cual sugiere que puede haber un mecanismo general de resistencia que puede aplicarse a todos los serotipos de *Salmonella* en aves.
2. La edad de los pollos es un mecanismo de resistencia natural a la TA. A partir de las dos semanas de edad se incrementa la resistencia a la enfermedad, esto puede ser debido a que la actividad de la lisozima y de enzimas proteolíticas, que poseen actividad bactericida, se incrementa con la edad (63).
3. Los cultivos de *Salmonella* pierden rápidamente su patogenicidad en medios artificiales (61). Si consideramos que las cepas empleadas fueron conservadas en medios de cultivo artificiales, y no se hicieron pases de crecimiento en aves o embriones, antes de ser utilizadas para infectar a los pollos, es posible que estas cepas hubiesen perdido su patogenicidad. Posiblemente este fue el factor más importante que determinó el aislamiento negativo de *Salmonella* en órganos.

Todos estos factores actuaron conjuntamente afectando la colonización en órganos y por consiguiente el aislamiento de salmonela a partir de órganos de pollos infectados experimentalmente con TA.

A pesar de no haber aislado salmonela a partir de órganos en la mayoría de los lotes, sí se logró aislarla de pollos inoculados con la cepa FVB323.

El aislamiento de *S. gallinarum* FVB323 a partir de hígado y bazo, concuerda con los resultados obtenidos en otras investigaciones (30, 58, 69, 70). Sin embargo, no se logró aislar a partir de hisopo cloacal o tonsila cecal.

El hecho de que no se haya aislado *Salmonella* en hisopo cloacal y tonsila cecal no indica que no se haya eliminado la bacteria a través de heces (33), sin embargo, en el grupo de pollos inoculados con *S. gallinarum* FVB323, no se aisló *Salmonella* en ninguno de los pollos del lote control negativo.

CONCLUSIONES

Los sueros producidos fueron suficientes para estandarizar el TA-ELISA.

La cepa de campo de *S. gallinarum* FVB323 logró aislarse de pollos inoculados con 10^7 y 10^4 UFC, demostrando así, que la inoculación oral de *Salmonella*, conduce a la colonización en órganos, principalmente hígado y bazo.

El aislamiento negativo de *S. gallinarum* en la mayoría de los grupos de pollos inoculados, posiblemente se debió a factores de resistencia natural.

Otra estrategia para inocular, podría consistir en que los cultivos de *S. gallinarum* recibieran pases de crecimiento en aves o embriones, antes de ser utilizados en estudios de patogenia, debido a que la *Salmonella* pierde rápidamente su patogenicidad en medios de cultivo artificiales.

La utilización de una cepa de *S. gallinarum* nat' podría favorecer el aislamiento de *Salmonella* a partir de heces o hisopos cloacales, debido a que se elimina la posibilidad del crecimiento de bacterias coliformes contaminantes (58).

El suero hiperinmune contra *S. gallinarum* producido en pollos SPF puede ser empleado posteriormente en pruebas de expresión de PME, la cual se ve afectada por factores ambientales.

Las curvas de crecimiento de las cepas son diferentes, de igual forma el aislamiento de las cepas, lo cual sugiere una variabilidad genotípica y fenotípica, que debe estudiarse posteriormente.

LITERATURA

1. Assoku, R.K.G. and Penhale, W.J.: The pathogenesis of fowl typhoid: The influence of anaemia and erythrocyte clearance on the susceptibility of the fowl to bacterial endotoxin. *J. Comp. Pathol.*, 84:443-453 (1974).
2. Badi, M.A., Iliadis, N. and Sarris, K.: Natural and experimental infection of rodents (*Rattus norvegicus*) with *Salmonella gallinarum*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 105:264-267 (1992).
3. Barrow, P.A., Berchieri, A.Jr. and al Haddad, O.: Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum*-*S. pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.*, 36:227-236 (1992).
4. Barrow, P.A., Simpson, J.M., Levell, M.A. and Binns, M.M.: Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun.*, 55:388-392 (1987).
5. Bassiouni, A., Rifai, M. and Abbasi, K.: The influence of the somatic factor O-1 on the agglutination reactions for detecting *Salmonella gallinarum-pullorum* infections. *Vet. Med. J. Giza.*, 12:369-376 (1966).
6. Beach, J.R. and Davis, D.E.: Acute infection of chicks and chronic infection of the ovaries of hens caused by the fowl-typhoid organism. *Hilgardia.*, 2:411-424 (1927).
7. Beasley, W.J., Joseph, S.W. and Weiss, E.: Improved serodiagnosis of *Salmonella* enteric fevers by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 13:106-114 (1981).
8. Beaudette, F.R.: The possible transmission of fowl typhoid through the egg. *J. Am. Vet. Med. Assn.*, 67:741-745 (1925).
9. Beaudette, F.R.: Fowl typhoid and bacillary white diarrhea. *Proc. 11th Int. Vet. Congr.* 3:705-723 (1930).
10. Blaxland, J.D., Sojka, W.J. and Smither, A.M.: A study of *S. pullorum* and *S. gallinarum* strains isolated from field outbreaks of disease. *J. Comp. Pathol. Ther.*, 66:270-277 (1956).

11. Bouzoubaa, K.: Membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for protection against fowl typhoid. PhD Thesis. Institute of Agronomy and Veterinary Medicine, Hassan II, Rabat, Morocco. (1988).
12. Bouzoubaa, K., Nagaraja, K.V., Newman, J.A. and Pomeroy, B.S.: Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.*, 31:699-704 (1987).
13. Bumstead, N. and Barrow, P.: Resistance to *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. enteritidis* in inbred lines of chickens. *Avian Dis.*, 37:189-193 (1993).
14. Calderón, L., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H. and Mora G.C.: Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.*, 52:209-212 (1986).
15. Chart, H., Rowe, B., Baskerville, A. and Humphrey, T.J.: Serological tests for *Salmonella enteritidis* in chickens. *Vet. Rec.* 6:20 (1990).
16. Chart, H., Rowe, B., Baskerville, A. and Humphrey, T.J.: Serological tests for *Salmonella enteritidis* in chickens. *Vet. Rec.* 27:92 (1990).
17. Chart, H., Rowe, B., Baskerville, A. and Humphrey, T.J.: Serological response of chickens to *Salmonella enteritidis* infection. *Epidemiol. Infect.*, 104:63-71 (1990).
18. Edwards, P.R., Bruner, D.W., Doll, E.R. and Hermann, G.S.: *Salmonella* infections of fowls. *Cornell. Vet.*, 38:257-262 (1948).
19. Ernst, R.K., Dombroski, D.M. and Merrick, J.M.: Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 58:2014-2016 (1990).
20. Finlay, B.B., Gumbiner, B. and Falkow, S.: Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *J. Cell. Biol.*, 107:221-230 (1988).
21. Finlay, B.B., Heffron, F. and Falkow, S.: Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science*, 243:940-943 (1989).

22. Francis, C.L., Starnbach, M.N. and Falkow, S.: Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.*, 6:3077-3087 (1992).
23. Garren, H.W. and Hill, C.H.: Agglutinating antibody titers of young White Leghorns and Rhode Island Reds following inoculation with live and inactivated *Salmonella gallinarum* cultures. *Poult. Sci.*, 38:918-922 (1959).
24. Gauger, H.C.: A chronic carrier of fowl typhoid with testicular focalization. *J. Am. Vet. Med. Assn.*, 84:248-251 (1934).
25. Gavora J.S. and Spencer, J.L.: Breeding for genetic resistance to disease: specific or general. *World's Poult. Sci. J.*, 34:137-148 (1978).
26. Gordeuk, S., Glantz, P.J., Callenbach, E.W. and Thorp, W.T.S.: Transmission of fowl typhoid. *Poult. Sci.*, 28:385-391. (1949).
27. Gupta, B.R.: Comparative studies of various live and killed vaccines against fowl typhoid. *Indian J. Poult. Sci.*, 9:65 (1974).
28. Hall, C.F. and Cartrite, H.T.: Observations on strains of *Salmonella gallinarum* apparently resistant to furazolidone. *Avian Dis.*, 5:382-392 (1961).
29. Hall, W.J., Legenhausen, D.H. and Mac-Donald, A.D.: Studies on fowl typhoid. I. Nature and dissemination. *Poult. Sci.*, 28:344-362 (1949).
30. Hassan, J.O., Porter, S.B. and Curtiss, R., III.: Effect of infective dose on humoral immune responses and colonization in chickens experimentally infected with *Salmonella typhimurium*. *Avian Dis.*, 37:19-26 (1993).
31. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J.: Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.*, 56:2953-2959 (1988).
32. Johnson, E.A. and Anderson, G.W.: An outbreak of fowl typhoid in guinea fowls (*Numida meleagris*). *J. Am. Vet. Med. Assn.*, 82:258-259 (1933).

33. Jordan, F.T.W.: The occurrence of *S. gallinarum* in the feces in fowl typhoid. *Poult. Sci.*, 35:1026-1029 (1956).
34. Kaupp, B.F. and Dearstynne, R.S.: Chronic carriers in fowl typhoid. *J. Am. Vet. Med. Assn.*, 64:329-333 (1924).
35. Kim, C.J., Nagaraja, K.V. and Pomeroy, B.S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 52:1069-1074 (1991).
36. Kim, C.S. and Hill, C.H.: The effect of dietary *Sargassum natans* and *Ascophyllum nodosum* on *Salmonella gallinarum* infection in chicks. *Poult. Sci.*, 47:454-455 (1968).
37. Klein, E.: Über eine epidemische Krankheit der Hühner, verursacht durch einer Bacillus-Bacillus gallinarum. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt. I Orig.*, 5:689-693 (1889).
38. Komarov, A.: Fowl typhoid in baby chicks. *Vet. Rec.*, 12:1455-1457 (1932).
39. Lambert, W.V. and Knox, C.W.: The inheritance of resistance to fowl typhoid in chickens. *J. Sci.*, 2:179-187 (1928).
40. Lee, C.A. and Falkow, S.: The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4304-4308 (1990).
41. Le Minor, L. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by: Kreig, N.R. and Holt, J.G. 2:427-458. *Williams and Wilkins*, Baltimore, 1984.
42. Le Minor, L., Vernon, M., and Popoff, M.: Proposition pour une nomenclature des *Salmonella*. *Ann. Microbiol. (Paris)* 133B:245-254 (1982).
43. Leong, P.L.: Diagnostic uses of monoclonal antibodies to *Salmonella*. In: *Monoclonal antibodies against bacteria*. Edited by: Macario, A.J.L., Conway, E.M. Academic Press, Inc. (1986).
44. Lucet, A.: Dysenterie épizootique des poules et des dindes. *Ann. de l'Inst. Past.*, 5:312-331. (1891).

45. Lucio, B., Padrón, M. y Mosqueda, A.: Fowl typhoid in Mexico. In: G.H. Snoeyenbos (ed.), Proc Int Symp *Salmonella*, pp 382-383. Am. Assoc. Avian Pathol., Kennett Square, PA. 1984.
46. Martinaglia, G.: A note on *Salmonella gallinarum* infection on ten-day old chicks and adult turkeys. *J. So. Africa Vet. Med. Ass.*, 1:35-36 (1929).
47. Miller, J.M.: New genera and species of Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol. Newsl.*, 6:149-153 (1983).
48. Minga, U.M. and Wray, C.: A disc ELISA for detection of *Salmonella* group D antibodies in poultry. *Res. Vet. Sci.*, 52:384-386 (1992).
49. Minga, U.M., Wray, C. and Gwakisa, P.S.: Serum, disc and egg ELISA for the serodiagnosis of *Salmonella gallinarum* and *S. enteritidis* infections in chickens. *Scand. J. Immun.*, 36:157-159 (1992).
50. Moore, E.N.: The occurrence of fowl typhoid. *Del. Agric. Exp. Stn. Bull.*, 19:20 (1946).
51. Moore, R.W., Scanlan, C.M., Belyavskiy, M., Saver, H.W. and Hargis, B.M.: Research note: differential chemotaxis of *Physarum polycephalum* to *Salmonella gallinarum* and *S. pullorum*. *Poult. Sci.*, 72:752-754 (1993).
52. Moore, V.A.: Infectious leukemia in fowls-a bacterial disease frequently mistaken for fowl cholera. USDA BAI 12th, 13th Annu Rep, pp 185-205 (1895).
53. Mosqueda, T. A.: Análisis y perspectivas de la patología aviar en México. VII Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura, México, (1984) 7-20.
54. Mosqueda, T.A.: Medidas sanitarias para prevenir la tifoidea aviar. VII Curso sobre control y erradicación de la tifoidea aviar. Monterrey, N.L, México, (1987) 22-32.
55. Mosqueda, T.A. y Lucio, M.B.: Enfermedades comunes de las aves domésticas. FMVZ, UNAM, México, 1985.
56. Orr, B.B. and Moore, E.N.: Longevity of *S. gallinarum*. *Poult. Sci.*, 32:800-805 (1953).

57. Padrón, M.: Generalidades sobre pulorosis y tifoidea aviar. VII Congreso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, (1987) 13.
58. Padrón, M.N.: Infección por *Salmonella gallinarum* en aves semipesadas: excreción de la bacteria por heces y su control por medio de la desinfección de cama. *Avirama* (1989).
59. Pevzner, I.Y., Trowbridge, C.L., Nordskog, A.W. and Crittenden, L.B.: Mortality differences associated with divergent selection for immune response to *Salmonella gallinarum* within B Blood Group genotypes in chickens. *Poult. Sci.* 57:1180 (1978).
60. Pomeroy, B.S.: Fowl typhoid. In: Diseases of Poultry. Edited by: Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, Jr., H.W., 79-91. *Iowa State University Press*, Ames, 1984.
61. Pomeroy, B.S. and Nagaraja, K.V.: Fowl typhoid. In: Diseases of Poultry. Edited by: Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, Jr., H.W., 87-98. *Iowa State University Press*, Ames, 1991.
62. Prince, W.R.: The *in vitro* inhibition of *Salmonella gallinarum* by pancreatic intestinal extracts from chickens exposed to fowl typhoid. *Poult. Sci.*, 50:1069-1071 (1971).
63. Prince, W.R. and Garren, H.W.: An investigation of the resistance of White Leghorn chicks to *Salmonella gallinarum*. *Poult. Sci.*, 45:1149-1153 (1966).
64. Quintana, J.A. y Mosqueda, T.A.: Prevención, control y erradicación de la tifoidea aviar. Asociación Americana de la Soya. ASA/México A.N. No. 70 (1987)
65. Ramírez, J.H.: Repercusiones económicas de la tifoidea aviar en reproductoras pesadas. VII Congreso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, (1987) 33-39.
66. Rao, S.B.V., Narayanan, S., Ramnani, D.R. and Das, J.: Avian Salmonellosis: Studies on *S. gallinarum*. *Indian J. Vet. Sci.*, 22:199-208 (1952).
67. Rizo, Q.N.: Cómo está integrada la avicultura nacional. VII Congreso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, (1987) 2-12.

68. Silva, E.N.: The *Salmonella gallinarum* problem in Central and South America. In: G.H. Snoeyenbos (ed.), Proc Int Symp *Salmonella*, pp 150-156. Am. Assoc. Avian Pathol., Kennett Square, PA. 1984.
69. Silva, E.N., Snoeyenbos, G.H., Weinack, O.M. and Smyser, C.F.: Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis.*, 25:38-52 (1981a).
70. Silva, E.N., Snoeyenbos, G.H., Weinack, O.M. and Smyser, C.F.: The influence of native gut microflora on the colonization and infection of *Salmonella gallinarum* in chickens. *Avian Dis.*, 25:68-73 (1981b).
71. Smith, H.W.: The longevity of *Salmonella gallinarum* in the faeces of infected chickens. *J. Comp. Pathol. Ther.*, 65:267-270 (1955).
72. Smith, H. Williams.: The use of live vaccines in experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens with observation on their interference effect. *J. Hyg.*, 54:419-432 (1956).
73. Smith, H.W., Tucker, J.F. and Lovell, M.: Furazolidone resistance in *Salmonella gallinarum*: The relationship between *in vitro* and *in vivo* determinations of resistance. *J. Hyg. (Camb)*, 87:71:81 (1981).
74. Smith, I.M., Licence, S.T. and Hill, R.: Haematological, serological and pathological effects in chicks of one or more intravenous injections of *Salmonella gallinarum* endotoxin. *Res. Vet. Sci.*, 24:154-160 (1978).
75. St. John-Brooks, R. and Rhodes, M.: The organisms of the fowl typhoid group. *J. Pathol. Bacteriol.*, 26:433-439 (1923).
76. Stuart, E.E., Keenum, R.D. and Bruins, H.W.: Experimental studies on an isolate of *Salmonella gallinarum* apparently resistant to furazolidone. *Avian Dis.*, 7:294-303 (1962).
77. Stuart, E.E., Keenum, R.D. and Bruins, H.W.: The emergence of a furazolidone-resistant strain of *Salmonella gallinarum*. *Avian Dis.*, 11:139-145 (1967).
78. Tartera, C. and Metcalf, E.S.: Osmolarity and growth phase overlap in regulation of

Salmonella typhi adherence to and invasion of human intestinal cells. *Infect. Immun.*, 61:3084-3089 (1993).

79. Tate, C.R., Miller, R.G., Mallinson, E.T., Douglass, L.W. and Johnson, R.W.: The isolation of *Salmonellae* from poultry environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. *Poult. Sci.*, 69:721-726 (1990).
80. Tucker, J.F.: Survival of *Salmonellae* in built-up litter for housing of rearing and laying fowls. *Br. Vet. J.*, 123:92-103 (1967).
81. Udhayakumar, V. and Muthukkarupan, V.R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55:816-821 (1987).
82. Unión Nacional de Avicultores. Boletín 10:1-4 México, 1993.
83. Vázquez, N.J., Huerta, L., Suárez, F., Quintana, J.A., Puente, J.L., Calva, E. y Verdugo-Rodríguez, A.: Utilización de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* en ELISA para el diagnóstico de tifoidea aviar. IV Jornada Médico Avícola, FMVZ, UNAM. México, D.F. (1993) 263-267.
84. Vázquez, N.J., Suárez, G.F., Huerta, A.L., Quintana, L.J.A., Puente, J.L., Calva, E. y Verdugo-Rodríguez, A.: Estandarización de un inmunoensayo enzimático utilizando proteínas de la membrana externa (PME) de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Guadalajara, Jal., México. (1993) 234.
85. Vázquez, N.J., Suárez, G.F., Quintana, L.J.A., Puente, J.L., Calva, E. y Verdugo-Rodríguez, A.: Proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum*: variabilidad electroforética y potencial en diagnóstico. XVIII Convención Nacional ANECA. Cancún, Q.R., México, (1993) 342-345.
86. Verdugo-Rodríguez, A., Lay-Harn Gam, S.D., Koh, C.I., Puthucheary, S.D., Calva, E. and Pang, T.: Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparation in typhoid fever patients. *Asian Pac. J. Allergy Immun.*, 11:45-52 (1993)
87. Verdugo-Rodríguez, A., López-Vidal, Y., Puente, J.L., Ruiz-Palacios, G.M. and Calva,

- E.: Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 4:248-254 (1993).
88. Williams, J.E. and Harris, M.E.: Antigenic studies using ammonium sulfate. IV. The sedimentation effect of ammonium sulfate on *Salmonella gallinarum*. *Am. J. Vet. Res.*, 17:535-537 (1956).
89. Wilson, J.E. and Mac Donald, J.W.: *Salmonella* infections in wild birds, *Br. Vet. J.*, 123:212 (1967).
90. Zar, J.: Biostatistical analysis. 2nd. ed. Prentice Hall Inc. Englood Cliffs, N.J. (1984).

ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA