

01657
1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
División de Estudios de Posgrado

FALLA DE ORIGEN

PREPARACIONES DE PROTEINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA, DE *Salmonella gallinarum* PARA EL DIAGNOSTICO DE LA TIFOIDEA AVIAR

T E S I S

Que para obtener el grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

(económica al pneumocion animal)
p r e s e n t a

MVZ. JESUS VAZQUEZ NAVARRETE

Asesorado por:

Director:

MVZ. M. en C. Dr. Antonio Verdugo Rodriguez

Codirector:

MVZ. M. en C. Ph. D. Francisco Suárez Güemes



México, D. F.

1995



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.

Este trabajo se realizó en forma conjunta entre el Laboratorio del Dr. Edmundo Calva Mercado, del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. México, Departamento de Microbiología e Inmunología y Departamento de Producción Animal:Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y el CENID-Microbiología Veterinaria del INIFAP, SAGAR.

Asesorado por:

Director: MVZ. M. en C. Dr. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

Codirector: MVZ. M. en C. Ph. D. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

Este trabajo fue apoyado parcialmente por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), proyecto IN301691-UNAM y PAPIIT-506294.

Dedico esta tesis:

A mis hijos y esposa: Maximiliano

Irina

Beatríz

Arcelia

A mis padres: Juventino Vázquez Camacho

Soledad Montesinos Navarrete

A todos mis hermanos

***In memoriam* a mi maestro:**

Maximiliano Ruíz Castañeda

**Por enseñarme que es importante
hacer del oficio un arte.**

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco la oportunidad que me brindaron los doctores:

Antonio Verdugo Rodríguez, Francisco Suárez Güemes, Diodoro Batalla Campero y Everardo González Padilla, para que este trabajo se realizara.

Al MVZ. M en C. Marcelino E. Rosas García

Por su colaboración desinteresada en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros del:

Departamento de Microbiología e Inmunología, Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia e Instituto de Biotecnología de la UNAM, por todo el apoyo que me brindaron durante la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo del: CENID-Microbiología,

A todos mis amigos y compañeros del:

Instituto de Alergias y Autoinmunidad, Dr. Maximiliano Rufz Castañeda.

ÍNDICE

Resumen

CAPITULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Panorama de la avicultura en México	1
1.2. Bacteriología	3
1.2.1. Taxonomía	3
1.2.2. Morfología	3
1.2.3. Características bioquímicas	4
1.3. Estructura de la membrana externa	5
1.3.1. Fosfolípidos	5
1.3.2. Lipopolisacáridos	6
1.3.3. Antígeno "O" (somático)	6
1.3.4. Antígeno "H" (flagelar)	7
1.3.5. Antígenos capsulares	7
1.3.6. Proteínas de la membrana externa (PME)	8
1.4. Epidemiología	10
1.5. Patogénesis y virulencia	11
1.6. Inmunología	14
1.7. Diagnóstico	15
1.7.1. Bacteriológico	15
1.7.2. Serológico	16

2. OBJETIVOS.	17
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos específicos.	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Cepas bacterianas	18
3.2. Pollos "SPF"	19
3.3. Preparación de sueros hiperinmunes	19
3.4. Preparaciones de proteínas de la membrana externa (α PME)	23
3.5. Cuantificación de α PME.	23
3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS para el análisis de proteínas (SDS-PAGE)	24
3.7. Estandarización del TA-ELISA	25
3.8. Análisis estadístico	26
4. RESULTADOS	28
4.1. Cuantificación	28
4.2. Perfil electroforético de las PME.	28
4.3. Estandarización del TA-ELISA	32
4.4. Evaluación del TA-ELISA	36
4.4.1. Primera fase experimental	36
4.4.2. Segunda fase experimental	39
4.4.3. Lesiones macroscópicas a la necropsia	46
4.4.4. Aislamiento bacteriológico	46

5. DISCUSIÓN	48
6. CONCLUSIONES	54
7. APENDICE	55
7.I. Trabajos derivados del proyecto de tesis	55
8. LITERATURA CITADA	56

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla I	21
Tabla II	22
Tabla III	29
Tabla IV	42
Tabla V	43
Tabla VI	44
Tabla VII	47
FIGURAS	
Figura 1	27
Figura 2	30
Figura 3	31
Figura 4	33
Figura 5	34
Figura 6	35
Figura 7	38
Figura 8	41

RESUMEN

Se utilizaron preparaciones de proteínas de la membrana externa (ρ PME) de *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis* con la finalidad, de diseñar y estandarizar un inmunoensayo enzimático para diagnosticar la tifoidea aviar (TA-ELISA), así como comparar sus perfiles electroforéticos. El TA-ELISA fue estandarizado utilizando como antígeno ρ PME (3 μ g/ml) de *S. gallinarum* FVB-323, observando que, con una dilución del suero 1:9,375 y un tiempo de reacción enzima-sustrato de 35 min, se logró diferenciar a los pollos infectados experimentalmente de los no infectados. Se determinó un punto de corte del 60% para el TA-ELISA, ya que diferenció pollos infectados de no infectados, y este se estableció con base en los valores de absorbancia. El TA-ELISA mostró una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98.5% en suero de pollos infectados y no infectados ($p < 0.05$). Con 7 grupos de pollos "SPF", infectados experimentalmente en dos etapas con *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis*, se evaluó el TA-ELISA. En 5 grupos se observó mayor sensibilidad y especificidad que en la prueba convencional de aglutinación en placa con antígeno k-polivalente, usada para el diagnóstico de la tifoidea y pulorosis aviar; mientras que en dos grupos los resultados obtenidos mediante el TA-ELISA y la prueba de aglutinación fueron iguales. Así mismo, el TA-ELISA fue más sensible y específico para detectar anticuerpos en la primera semana posinfección en pollos infectados con *S. gallinarum*, mientras que la prueba de aglutinación presentó porcentajes similares de seropositividad a partir de la segunda semana posinfección ($P < 0.001$). Por otra parte, la mayoría de las cepas estudiadas mostraron un perfil común de PME principales (45, 37.5, 37, 36, 35 y 18 kDa), y únicamente mostraron variaciones menores, dependiendo de la osmolaridad del medio de cultivo utilizado.

SUMMARY

Outer membrane proteins preparations (OMP_p) from *Salmonella gallinarum*, *S. pollorum* and *S. enteritidis*, were used as capture antigen in a enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of fowl typhoid (FT-ELISA), their electroforetic profiles were also compared. Micro ELISA titer plates were coated with OPM_p (3 mg/ml) from *S. gallinarum* FVB-323, obtaining a significant difference between experimentally infected and non infected chickens (specific pathogen free), using a serum dilution of 1:9,375 and an enzyme-substrate reaction time of 35 min. FT-ELISA showed 97% in sensitivity and 98.5% in specificity ($p < 0.05$) for non infected and infected animals (bacterial isolation). FT-ELISA was evaluated with 9 chicken groups, inoculated two times with *S. gallinarum*, *S. pollorum* and *S. enteritidis* phago/type 13, detecting in five groups a higher sensitivity and specificity that was compared with the plate agglutination test, using the commercial K-polivalent antigen. The results were similar for the two tests in the last 4 groups. On the other hand FT-ELISA detected specific antibodies to *S. gallinarum* at the first week after inoculation, in contrast, plate agglutination test showed the same positive percentage in the second week post-inoculation ($p < 0.001$). Finally, all the strains were similar in their electroforetic characteristics, showing the same major OMP (45, 37.5, 37, 36, 35 and 18 kDa), and minor differences based in the osmolarity of the selected culture media.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PANORAMA DE LA AVICULTURA EN MÉXICO.

Dentro de las diferentes áreas de la producción pecuaria, la avicultura es la más dinámica y con mayor desarrollo tecnológico. En este contexto, México, siendo un país deficitario e importador de carne y huevo de gallina en la década de los 50's, pasó en los 60's a ser un país que cubre sus necesidades, llegando inclusive a presentar en la misma década una crisis de sobreproducción (Modernización del campo, 1990). Sin embargo, la avicultura en México debe considerarse como una industria en proceso de maduración, ya que tiene algunos problemas como la dependencia del extranjero para la adquisición de animales mejorados genéticamente, la adquisición de vacunas y de manera importante, la falta de control sobre algunas enfermedades ya erradicadas o controladas en los países desarrollados (Rizo, 1988). En 1994, la avicultura nacional representó el 54% de la producción pecuaria siendo un 28% la destinada a producir pollo, 25% a la producción de huevo y 1% a la producción de pavo. La parvada nacional actual es de 286,639,093 aves constituida por progenitoras y reproductoras de líneas ligera y pesada, aves destinadas a postura de huevo para plato y pollo de engorda para consumo, así como guajolotes. En este mismo año, la producción de huevo fue de 1,461,150 t, pollo 1,364,375 t y pavo 9,600 t representando un valor en millones de pesos de N\$ 3,974,328.00 para huevo, N\$ 6,003,250.00 y N\$ 100,800.00 para pavo. El consumo *percapita*, en este mismo año, fue de 14.6 kg para huevo, y de 15.1 kg para pollo (UNA, 1994). Es importante considerar que la avicultura genera la proteína de origen animal, que es la de mayor demanda, a los precios más bajos en el mercado nacional.

El interés por incrementar el consumo de productos pecuarios libres de agentes microbianos potencialmente patógenos para el hombre, obliga a la adopción de prácticas de producción que en consecuencia generan productos libres de *Salmonella*. La avicultura no es sólo una de las áreas de la producción pecuaria más importante, sino también una de las más susceptibles a problemas sanitarios. En este sentido, la tifoidea aviar (TA) ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria avícola, por ejemplo, en 1984 tan sólo en pollo de engorda existieron pérdidas por 3,573 millones de pesos; en 1987, el impacto económico anual por la TA en gallinas reproductoras pesadas se calculó en 80,000 millones de pesos (Rizo, 1987). Debido a que la TA en México tiene un impacto económico significativo entre los avicultores, su control ha pasado a ser una prioridad sanitaria avícola, de tal forma que existe una NORMA Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993: Campaña nacional contra la salmonelosis aviar, la cual incluye a los guajolotes (Diario Oficial, 1994).

Reportes sobre la incidencia de gastroenteritis causada por salmonelas móviles en humanos (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*), indican un incremento dramático en muchas partes del mundo durante la última década. En México se desconoce el costo de la salmonelosis humana causada por estos serotipos, sin embargo, su repercusión económica puede ser alta. Las investigaciones epidemiológicas realizadas en muchos países han involucrado al huevo crudo o carne de consumo contaminada, lo cual, ha generado un severo "estrés" económico en la industria avícola (Gast, 1994).

1.2. BACTERIOLOGÍA

1.2.1. Taxonomía.

La clasificación del género *Salmonella* ha sido motivo de controversias en los últimos años. El esquema antigénico propuesto por Kauffmann y White para el género *Salmonella* considera especie a cada tipo antigénico, existiendo siete subespecies y 46 grupos (Rowe y Hall, 1989). Mientras que Edwards y Ewing (1972) proponen que salmonela sólo se clasifique en tres especies: *S. cholerae-suis*, *S. typhi* y *S. enteritidis*, siendo el resto serotipos de *S. enteritidis* (Bergey's, 1990). Las salmonelas se clasifican en más de 2,200 serotipos (serovariedades) dependiendo de su fórmula antigénica, según el esquema clásico de Kauffmann-White, basado en el antígeno "O" (somático) y en la fase antigénica "H" (flagelar). *S. gallinarum* y *S. pullorum* se encuentran dentro del grupo D₁ ("O":1, 9, 12).

Recientemente se han propuesto varias modificaciones al esquema de clasificación del género *Salmonella*. Dicha clasificación divide al género en dos especies; *S. enterica* y *S. bongori*, con *S. enterica* subdividida en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica*, and *houtenae*. Estas seis subespecies se distinguen por ciertas características bioquímicas y algunas corresponden a los subgeneros de Kauffmann (Clarke y Gyles, 1993).

1.2.2. Morfología.

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos relativamente gruesos (1.5 X 4.0 µm) y su envoltura no se diferencia morfológicamente de otras enterobacteriáceas. A excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, la mayoría tienen

flagelos peritricos lo cual les permite llevar a cabo funciones de locomoción (25 a 30 μm por segundo) y quimiotaxis (Freeman, 1990). Por lo general, no son capsuladas y su envoltura celular está constituida por una membrana externa y una interna subyacente, de aproximadamente 7.5 nm de espesor cada una, ambas capas tienen un grosor que varia de 10 a 15 nm. Entre la superficie de la membrana externa e interna se encuentra una capa fina de peptidoglicano. Las membranas están constituidas por una bicapa de fosfolípidos con proteínas espaciadas y contienen de un 50 a 75% de proteína y de 20 a 35% de lípidos, constituyendo el 10% del peso seco de la bacteria. La estructura asimétrica de la membrana externa juega un papel importante ya que funciona como una barrera para un gran número de agentes químicos (Nikaido y Nakae, 1979; Jacques, 1985).

1.2.3. Características bioquímicas.

Las salmonelas son bacterias aerobias y anaerobias facultativas, que no fermentan lactosa. Producen H_2S a partir de tiosulfato, y gas de la fermentación de la glucosa, son negativas a las siguientes pruebas bioquímicas: malonato, ureasa, indol, Voges-Proskauer, ONPG (Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), y positivas a la descarboxilasa de la lisina y deshidrolasa de la arginina. En lo concerniente a la degradación de carbohidratos *S. gallinarum* y *S. pullorum* son negativas a lactosa, adonitol, inositol, salicín y sacarosa. Por otro lado, son positivas a la arabinosa, manitol, ramnosa, trehalosa y xilosa. Siendo dulcitol y glicerol los que diferencian a ambos serotipos (Cowan y Steel's, 1982). La mayoría de los serotipos del grupo D, son móviles a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*.

El género *Salmonella* es capaz de tolerar concentraciones relativamente altas de bilis, lo cual se ha aprovechado para diseñar medios de cultivo específicos para su aislamiento. El hecho de que las salmonelas no fermenten la lactosa trae como consecuencia la necesidad de utilizar medios diferenciales, con sustancias inhibidoras de selectividad diversa, como el agar XLD (Xilosa-lisina-desoxicolato), MacConkey, agar-citrato-desoxicolato, agar *Salmonella-Shigella*, y los de selectividad intensa como, agar verde-brillante, que inhibe algunas salmonelas y a la mayor parte de las enterobacterias (Dunn y Martin, 1971; Balley y Scott's, 1990).

1.3. Estructura de la membrana externa.

1.3.1. Fosfolípidos.

Se han analizado los fosfolípidos de la membrana externa de células, desarrolladas en medio de cultivo conteniendo (H)-2-glicerol, encontrando fosfatidil etanolamina, glicerol fosfatidil y cardiolipina en relación de 81, 17, y 1.6 por ciento, respectivamente (Jacques, 1985). La superficie celular está cubierta por moléculas de fosfolípidos con una distribución de $5.9 \mu\text{m}^2$, calculado con base en el área de superficie del fosfatidil etanolamina, siendo 0.54 nm^2 , que es equivalente al 98% de la superficie celular. Estos estudios se realizaron en *S. typhimurium* y han sido asumidos para el género *Salmonella* (Taiji, 1985). La distribución topológica de los fosfolípidos en la membrana externa de las salmonelas fue estudiada por acoplamiento de cianógeno activado con bromuro (incapaz de atravesar la membrana externa), sugiriendo que los fosfolípidos están localizados exclusivamente en el interior de la membrana externa (Nikaido y Nakae, 1979; Freeman, 1990).

1.3.2. Lipopolisacárido.

El lipopolisacárido (LPS) es un componente estructural y funcional de la superficie celular y constituye aproximadamente el 45% de la membrana externa (Nikaido y Nakae, 1979). El LPS es uno de los principales componentes antigénicos de superficie (contiene al antígeno somático "O") y es responsable de la actividad endotóxica de las células gramnegativas. Este complejo de alto peso molecular tiene tres regiones: una porción lipídica (lípidos "A"), un núcleo o *core*, y una región polisacárida (cadena-O-específica) constituida por cadenas repetidas de azúcares que protege a la célula de la acción de los anticuerpos y el complemento para impedir su contacto íntimo con la membrana externa (Freeman, 1990). Se considera que la región del lípido "A" es responsable de la actividad endotóxica del LPS bacteriano, y está orientada hacia la zona hidrofóbica de la membrana externa. Existe variación en la concentración de LPS en bacterias del género *Salmonella*, por ejemplo en *S. typhimurium* constituye el 20% de la membrana externa. El número de moléculas de LPS expresada en las células es de 3.4×10^4 , por lo cual ocupa $2.7 \mu\text{m}^2$ de la superficie de la membrana. La localización en la superficie para las moléculas de LPS ha sido demostrada por oxidación enzimática de los residuos de la galactosa para el LPS en las células intactas por adición exógena de oxidasa galactosa (Nikaido y Vaara, 1985).

1.3.3. Antígeno "O" (somático).

Los distintos antígenos "O" se designan con subíndices (por ejemplo: O₁, O₂, O₃, etc.). Teniendo en cuenta las estrechas relaciones de algunas *Salmonellae*, se colocan en grupos designados como tipos A, B, C, D, etc. Una sola especie puede tener más de un antígeno "O". *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum* poseen el antígeno O_{1,9,12} al igual que muchas

especies del grupo "D" (Merchant, 1980). La obtención de antisueros específicos para la serotipificación de grupo se realiza mediante pruebas de absorción con cepas heterólogas (Rowe y Hall, 1989; Freeman, 1990). En *S. gallinarum* y *S. pullorum* la mutación de cepas lisas a rugosas, produce la pérdida de ciertos componentes celulares esenciales para la integridad del antígeno "O" (Merchant, 1980).

1.3.4. Antígeno "H" (flagelar).

El antígeno "H" lo constituyen los flagelos y son bifásicos. Las dos fases se designan con los nombres de *fase I (específica)* y *fase II (inespecífica)*. La *fase I* se designa con letras minúsculas (*a, b, c, etc.*) y la *fase II* con una combinación de letras minúsculas y números, la mayoría de las salmonelas poseen las dos fases (Merchant, 1980). En estudios realizados en clonas, se ha encontrado que la primera y la segunda fase predominan con una frecuencia alternante de 10^{-3} a 10^{-5} , es decir, que una célula aislada es monofásica, pero el genotipo y, por lo tanto, la población son bifásicas. Sólo pocas salmonelas, como por ejemplo *S. typhi* y *S. enteritidis*, poseen un antígeno flagelar y son por eso exclusivamente monofásicas. *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum* no poseen ninguna de las dos fases del antígeno flagelar (Rowe y Hall, 1989; Bailey y Scott's, 1990).

1.3.5. Antígenos capsulares.

Contrariamente a muchas cepas de *E. coli*, el género *Salmonella* carece de cápsula por definición. Una excepción de importancia diagnóstica, es la presencia de un polisacárido (antígeno VI) en varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*: *S. typhi*, *S. paratyphi C*, *Citrobacter freundii* y a veces *S. dublin* (Freeman, 1990).

El polisacárido Vi, de *S. typhi* y *C. freundii*, es una línea de homopolímeros variables de alfa-D (1-4) GalNAcA O-acetilado en la posición C3. *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum* carecen del antígeno Vi (Balley y Scott's, 1990).

1.3.6. Proteínas de la membrana externa (PME).

Salmonella gallinarum, como todas las bacterias Gram-negativas, está cubierta por una membrana externa, la cual protege a dichas células de agentes nocivos deteniendo su penetración. Al mismo tiempo, los nutrimentos y los productos de desecho deben atravesar esta membrana, y ésto es posible mediante la presencia de varias proteínas de transporte (Nikaido y Nakae, 1979). Estas proteínas pueden dividirse en tres clases: no específicas o porinas generales; canales específicos; y sistemas de transporte dependientes de energía, de alta afinidad (Nikaido y Vaara, 1985). De éstas, las porinas OmpC y OmpF, que se conforman triméricamente, así como OmpA (monomérica), son las más abundantes en la membrana externa, presentándose cada una en aproximadamente 10^5 moléculas por célula. Así mismo, se han observado más de veinte proteínas menores, de las cuales algunas se expresan preferencialmente bajo condiciones ambientales específicas (Nikaido y Nakae, 1979).

Las proteínas principales de la membrana externa (PME) de *E. coli* fueron descritas por Schnaltman, (1974). La nomenclatura de las PME sigue el nombre del gen que codifica las proteínas. En *E. coli* se han encontrado tres PME principales (36 kDa, 35 kDa y 34 kDa). Con estos estudios se demostró que las PME están expuestas al exterior de la membrana externa (Schnaltman, 1974).

La superficie de la bacteria esta cubierta por las PME constituyendo un 30% del total de la membrana incluyendo ambas partes de la membrana. Las PME más abundantes

se expresan en alrededor de 10^5 copias por célula (Nikaído y Vaara, 1985).

Las proteínas principales, se denominan porinas (OmpC, OmpF, OmpE). Las PME atraviesan el espacio periplásmico al exterior de la membrana externa y ésto involucra transporte transmembranal de solutos.

Permeabilidad de la membrana externa: La membrana externa forma una barrera contra agentes peligrosos, protegiendo el interior de la célula. Las células incorporan nutrimentos y otras sustancias esenciales para mantener su desarrollo (Nikaído y Vaara, 1985).

Con respecto a PME y su papel en la respuesta inmune humoral, diversos grupos han demostrado que los anticuerpos séricos de humanos infectados con *S. typhi* son capaces de reconocer dichas proteínas (Calderon *et al.*, 1986). Así mismo, 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 (Isibasi *et al.*, 1988).

Se han demostrado diferentes papeles de algunas porinas en el proceso de patogenia, tales como efectos inflamatorios, en la liberación de citocinas, activación de complemento, daño renal y cardiovascular, entre otros (Galdiero *et al.*, 1984, 1990; Tufano *et al.*, 1989). Es importante señalar que tradicionalmente, estos efectos se han adjudicado a la presencia del LPS. En el laboratorio de biología molecular del Instituto de Biotecnología, Verdugo-Rodríguez *et al.*, (1989, 1993a, 1993b, 1993c) diseñaron un inmunoensayo enzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando preparaciones de PME (μ PME) de *S. typhi* como antígeno de captura, con la finalidad de detectar anticuerpos específicos contra dichas μ PME, en suero de pacientes con fiebre tifoidea, positivos por hemocultivo, obteniendo una alta sensibilidad (100%) y una alta especificidad (94-100%).

1.4. EPIDEMIOLOGÍA.

El hábitat de las salmonelas es normalmente el tracto intestinal del hombre y los animales. La vía de contagio puede ser directa de un animal a otro o indirecta a través de un medio contaminado a consecuencia de la eliminación de gérmenes. De los más de 2,200 serotipos de salmonela existentes, sólo pocas tienen especificidad para un huésped determinado; por ejemplo *S. typhi*, *S. paratyphi* (hombre), *S. gallinarum* y *S. pullorum* (aves), *S. dublin* (bovinos), *S. abortusovis* (ovinos), *S. cholerae-suis* (cerdos), *S. abortusequi* (equinos), y en sentido amplio, *S. typhimurium* (Acha, 1989).

Los serotipos *S. gallinarum* y *S. pullorum*, están adaptados a las aves domésticas, no son patógenas para el hombre, aunque se han descrito salmonelosis en niños debido a estos serotipos (Acha, 1989).

La pulorosis o diarrea blanca bacilar, es adquirida por los pollos principalmente cuando el huevo viene infectado desde el ovario. Los embriones pueden morir dentro de él, o poco después de la eclosión. El contagio a otros pollos se produce a través del aire que circula en las incubadoras o por medio de la cama contaminada. Padecen la infección, preferentemente pollos de 3 a 5 días de edad, con diarrea (cloaca pastosa), trastornos del estado general y alta mortalidad. La bacteria se puede localizar en ovarios, testículos y órganos parenquimatosos.

Salmonella gallinarum causa una infección aguda tanto en aves jóvenes como adultas, hay infiltración leucocitaria del hígado y otros tejidos parenquimatosos. El curso crónico conduce a la degeneración de los folículos, peritonitis, y eliminación entérica (Bouzobaa et al., 1987). *Salmonella enteritidis* también afecta a las gallinas, pero tiene la característica de pasar inadvertida, quedando las gallinas como portadoras, lo cual encubre el diagnóstico serológico de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, además de que los

animales infectados y sus productos pueden ser un problema grave de salud pública (Gast, 1994). En Europa y en los Estados Unidos se han reportado los fagotipos 4, 6, 8, 13, 13_a y 14_b, siendo de gran importancia el 4 y 8 para la salud pública (Kim, *et al.*, 1991; van Zijderveld *et al.*, 1992). En México, Mancera y Vázquez (1995), han reportado 14 cepas de *S. enteritidis* del fagotipo 4, y 30 cepas del fagotipo 8, aisladas de granjas avícolas de ocho estados del país.

1.5. PATOGÉNESIS Y VIRULENCIA

Salmonella gallinarum y *S. pullorum* ocasionan en las gallinas y los pollos una bacteremia denominada tifoidea aviar (TA) y pulorosis, respectivamente. Las gallinas adquieren la infección principalmente por ingestión de alimento o agua contaminada con heces de animales infectados. Existen dos formas clínicas de la Salmonelosis: La primera es gastroentérica, es principalmente una infección del intestino caracterizado por una brusca elevación de la temperatura corporal, y diarrea que se manifiesta entre 8 y 24 h después de la ingestión del microorganismo. Clínicamente, la enteritis puede ser aguda, subaguda o crónica. Estas infecciones se caracterizan por septicemia, endotoxemia y localización en órganos internos. La invasión y colonización de la mucosa intestinal implica factores de adherencia y quimiotaxis. Las salmonelas se adhieren a las microvellosidades de las células del intestino delgado y grueso, el bacilo penetra a través de las células "M" de las placas de Peyer, donde son ingeridas por los macrófagos sin destruirlas y son transportadas por el sistema retículo endotelial. Las bacterias se multiplican y propagan por todo el organismo, colonizando principalmente los nódulos linfáticos, mesentéricos, bazo, hígado, gónadas, médula ósea, riñones (Gast, 1994).

Las bacterias se encuentran normalmente en vacuolas rodeadas de una membrana dentro de las células epiteliales y eventualmente migran a la base de las células. La proliferación bacteriana dentro de las células epiteliales es muy limitada (Gast, 1994). Las bacterias son capaces de pasar entre las células epiteliales adyacentes en su migración hacia la lámina propia, donde las bacterias son fagocitadas por los heterófilos o por los macrófagos. La mayor parte de las bacterias fagocitadas por los heterófilos son destruidas, mientras que las bacterias fagocitadas por los macrófagos pueden ser destruidas o multiplicarse intracelularmente y eventualmente destruir al macrófago.

Algunos factores de virulencia como el LPS le permiten a la bacteria sobrevivir intracelularmente. Se ha encontrado que la pérdida de las cadenas específicas laterales disminuyen la virulencia, mientras que la variación de los antígenos "O" de una serovariante pueden cambiar significativamente su virulencia (Gast, 1994).

Se ha encontrado experimentalmente que algunos plásmidos confieren virulencia a *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. typhimurium*, para colonizar el tracto intestinal de pollos, donde se ha mostrado que el DNA de dichos plásmidos en estas bacterias son homólogos al ser estudiados por técnicas de hibridación (Barrow y Lovell, 1989). Los plásmidos le permiten a la bacteria sobrevivir y multiplicarse en células del sistema retículo endotelial. Los plásmidos de *S. gallinarum* y *S. pullorum* están involucrados en invasiones *in vivo* (Barrow y Lovell, 1989). Las cepas libres de plásmidos de *S. gallinarum* son inmunogénicas y una mutante rugosa resistente al ácido nalidíxico, produce protección en pollos desafiados con cepas virulentas de *S. gallinarum* y no induce la producción de anticuerpos aglutinantes en suero. La virulencia de los plásmidos no es esencial para la invasión por parte de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. Esto hace suponer que un determinante cromosomal puede estar involucrado (Barrow y Lovell, 1989).

En gallinas de postura de la raza *Leghorn*, inoculadas experimentalmente por vía oral con una dosis 1×10^9 de *S. enteritidis* fagotipo 13a, se encontró un 83% de cultivos positivos por hisopos cloacales y en aves expuestas por contacto se encontró que un 14% fueron positivas a *S. enteritidis* a la primer semana posinoculación. Durante las primeras cinco semanas posinfección se recuperó *S. enteritidis* a partir del 60% de los ciegos, 53% de los hígados, el 49% de los bazo, el 19% de los ovarios, y el 17% de los oviductos muestreados de las gallinas inoculadas. En las gallinas expuestas por contacto se aisló *S. enteritidis* del 43% de los ciegos, 36% de los hígados, 36% de los bazo, 7% de los ovarios y el 21 % de los oviductos de las gallinas expuestas (Gast, 1994).

Muchas aves refractarias excretan *S. gallinarum* por un periodo de tiempo variable, y algunas son portadoras de por vida, persistiendo en grandes cantidades en bolsa de Fabricio de pollos infectados (Gast, 1994). Hassan y Curtiss (1994), encontraron una marcada depresión de linfocitos y una ausencia de folículos en bolsa de Fabricio y bazo de pollos de 1 día de edad, infectados con una cepa virulenta de *S. typhimurium* con una dosis 1×10^8 UFC. La depresión y la repoblación parcial de los linfocitos fue revelada por atrofia de los órganos linfoides 2 días posinfección, y un incremento en el peso de los órganos afectados 7 días después de la infección (Gast, 1994).

1.6. INMUNOLOGÍA.

La respuesta inmune humoral por infección experimental oral de pollos con *S. typhimurium* se ha estudiado mediante ELISA. Pollos infectados por esta vía muestran un considerable grado de protección contra reinfecciones (Brito *et al.*, 1993). Las salmonelas pueden ser divididas en tres categorías: Las primeras que comprenden adaptación y alta patogenicidad para el huésped son *S. gallinarum* y *S. pullorum*, el segundo corresponde a serotipos invasivos por ejemplo, *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, y el tercero formado por un gran grupo de serotipos que no son esencialmente invasivos y comúnmente no causan enfermedad en las aves (Padrón, 1991).

Estudios de la respuesta inmune en aves contra salmonelas, involucran ensayos en suero para determinar anticuerpos circulantes, contra serovariedades invasivas. La respuesta es comúnmente alta en aves mayores a una semana de edad, aunque las bacterias, pueden ser poco invasivas en aves mayores. Los anticuerpos pueden desarrollarse en aves que no excretan aparentemente salmonelas, y estos pueden ser detectados por varios meses después de que ha cesado la fase de excreción del microorganismo. Sin embargo, se sugiere que una respuesta inmune mediada por células es más importante que la respuesta humoral en protección, aunque altos niveles de anticuerpos circulantes pueden ser detectados antes de que disminuya el número de salmonelas excretadas (Barrow *et al.*, 1992).

En estudios de la respuesta humoral por anticuerpos circulantes (IgA, IgG, IgM) contra *S. typhimurium* y *S. kedougou* en pollos "SPF" infectados experimentalmente, se encontraron títulos altos de IgA en suero y bilis después de la tercera semana posinfección y en intestino a la cuarta semana (Brito *et al.*, 1993). La IgG fue detectada desde la primera semana en las tres muestras aunque, títulos altos en bilis fueron

detectados hasta la cuarta semana mientras que en intestino y suero hasta la quinta semana. La IgM fue detectada desde la primera semana a partir de intestino y suero, y en la segunda semana a partir de bilis. La respuesta blastogénica de los linfocitos de sangre periférica de pollo y cultivo de linfocitos de bazo en presencia de ConA fue medida, encontrando que la proporción de respuesta positiva se incrementa con la edad de los pollos, siendo dicha respuesta del 55%, 66%, 94%, 94% y 100% en aves de 1-5 semanas de edad, respectivamente (Brito *et al.*, 1993).

1.7. DIAGNÓSTICO

1.7.1. Bacteriológico.

El aislamiento del género *Salmonella* se puede realizar de sangre cuando se produce septicemia, y a partir de heces se puede recuperar, en la mayoría de los casos. También la bacteria puede ser recuperada de órganos (hígado, bazo, ciegos, ovarios y oviductos) de las aves enfermas (seropositivas) o muertas (Padrón, 1992; Gast, 1994). *Salmonella*, crece bien en caldos selectivos como tetracionato y selenito, así como en agar sangre, MacConkey y verde brillante con noboviocina, no es una bacteria hemolítica y es lactosa-negativa. Dentro de las principales características bioquímicas se observa que es oxidasa negativa. Producen ácido y gas durante la fermentación de los carbohidratos (Bailey y Scott's, 1990).

1.7.2. Serológico.

Las medidas más efectivas para el control de la pulorosis y la TA son una combinación estricta de medidas de manejo y eliminación. La erradicación se hace comúnmente mediante la identificación de parvadas infectadas, y la eliminación de aves rectoras se hace individualmente por medio de pruebas serológicas. Una de las razones, por las cuales se utiliza con mayor frecuencia la serología como método de diagnóstico para detectar la presencia de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, se debe a que dichas bacterias no son eliminadas abundantemente en heces.

Por muchos años, las pruebas de elección han sido las de aglutinación desarrolladas originalmente por Runnells para uso de suero, y adaptada por Schaffer *et al.*, (1957), y para sangre completa usando un antígeno teñido (Delamer, 1980). Esta prueba es de fácil uso y controla considerablemente estas infecciones cuando se usan en las parvadas. Sin embargo, estas pruebas reducen su efectividad en campañas de erradicación, sobre todo porque existen variaciones en la calidad de los antígenos. Estas pruebas pueden ser usadas como tamiz en progenitoras y reproductoras, sin embargo, los antígenos pueden dar reacción cruzada con infecciones causadas por otros serotipos invasivos del grupo D, tales como *S. enteritidis*, *S. berta*. y *S. typhimurium*.

Recientemente, el uso de inmunoensayos enzimáticos (ELISA) se ha incrementado para detectar serológicamente, otros serotipos invasivos asociados a intoxicación alimenticia en humanos causada por *S. typhimurium* y *S. enteritidis* (Barrow *et al.*, 1992). Verdugo-Rodríguez *et al.*, (1989, 1993a, 1993b, 1993c) desarrollaron un inmunoensayo enzimático basado en el uso de pPME de *S. typhi* para diagnosticar en forma temprana la fiebre tifoidea en zonas endémicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Utilización de proteínas de la membrana externa (PME) de *Salmonella gallinarum* para diagnosticar, mediante un inmunoensayo enzimático, la tifoidea aviar (TA-ELISA).

2.2. Objetivos específicos:

1. Comparación de los perfiles electroforéticos de diferentes cepas de *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis* con la finalidad de establecer tipos electroforéticos.
2. Estandarización de un inmunoensayo enzimático, utilizando como antígeno de captura PME de *S. gallinarum* para diagnosticar la tifoidea aviar, en suero de pollos "SPF" (*Specific-Pathogen-Free*) infectados experimentalmente con *S. gallinarum*.
3. Evaluar el inmunoensayo enzimático, en grupos de pollos "SPF" infectados experimentalmente con *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Cepas bacterianas. Se utilizaron distintas cepas de campo, así como cepas de colección de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Se usaron las siguientes cepas: *Salmonella gallinarum* (FVB-323, 9-R, ATCC-9184, FVB- 285, FVB-383, FVB-432 y FVB-591), *S. pullorum* (ATCC-10398, FVB- 47) y *S. enteritidis* (FM-36, FM-42), para obtener las μ PME y comparar la variabilidad electroforética de éstas. Posteriormente, se estandarizó el TA-ELISA, usando como antígeno las μ PME obtenidas a partir de la cepa FVB-323.

Las bacterias utilizadas para infectar grupos de pollos en la primera fase experimental fueron: *Salmonella gallinarum* FMV-323, *S. gallinarum* ATCC-9184, *S. gallinarum* 9-R (vacuna) y *S. pullorum* ATCC-10398. Las cepas utilizadas para infectar pollos en la segunda fase fueron tratadas previamente, con tres pases en embrión de pollo SPF. Dichas cepas fueron: *Salmonella gallinarum* FVB-323, *S. gallinarum* U-2 resistente a la novobiocina y al ácido nalidixico (NO-NA) y *S. enteritidis* fagotipo 13.

Las bacterias se cultivaron en un caldo nutritivo (medio "A") hasta alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento (Verdugo-Rodríguez, 1989), estableciendo un tiempo de incubación promedio de 7 h a 37 C en una incubadora (Environ-shaker, USA) con agitación a 200 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente, las bacterias se concentraron por centrifugación (Beckman J2-21, rotor Beckman JA-20) a 8,000 rpm durante 10 min a 4 C, y se suspendieron en solución salina fisiológica estéril, con un pH 7.2, determinando las dosis infectantes de las cepas de *S. gallinarum*, *S. pullorum*, y *S. enteritidis* fagotipo 13 (Tablas I y II).

3.2. Pollos: Embriones de pollo "SPF" de gallinas de raza ligera (*White Leghorn*). Fueron incubados a 37 C en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción animal: Aves. Después del nacimiento, los pollos se mantuvieron juntos hasta las cinco semanas, posteriormente fueron separados para ser infectados. Los pollos fueron alimentados durante todo el experimento con una ración no comercial de iniciación y crecimiento, libre de *Salmonella spp* y de antibióticos.

3.3. Preparación de sueros hiperinmunes: Se formaron 9 grupos de pollos "SPF" de cinco semanas de edad, y fueron infectados experimentalmente en dos fases con *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis*.

Primera fase. Se formaron cinco grupos de pollos, y fueron tratados de la siguiente manera: grupo I con *S. gallinarum* FVB-323, grupo II con *S. gallinarum* ATCC-9184, grupo III con *S. gallinarum* 9-R, grupo IV con *S. pullorum* ATCC-10398 y el grupo V se dejó como control. Se infectaron con una dosis única y por vía oral, como se muestra en la **Tabla I**, y el grupo control, se trató con 100 μ l de solución amortiguadora salina fosfatada (PBS, pH 7.4). Los pollos fueron sangrados, antes de ser infectados y a los 14, 21, 28 y 35 días posinfección.

Segunda fase. Se formaron cuatro grupos de pollos, y fueron infectados de la siguiente manera: grupo VI con *S. gallinarum* FVB-323, grupo VII con *S. gallinarum* U-2, grupo VIII con *S. enteritidis* fagotipo 13 y el último grupo se dejó como control negativo (**Tabla II**).

Los pollos se infectaron por vía oral, con 100 μ l de suspensiones frescas de bacterias cultivadas en "medio A" hasta alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento. El grupo testigo fue tratado con 100 μ l de PBS. Los grupos de pollos fueron sangrados, antes de ser infectados, y posteriormente a los 7, 14, 21, 28 y 35 días posinfección.

Se practicaron estudios bacteriológicos a partir de hisopos cloacales antes de ser infectados y a las 24, 48, y 72 h posinfección. También se realizaron hemocultivos, inoculando 1 ml de sangre en medio bifásico de Ruiz-Castañeda (1957). Al sacrificio se obtuvieron muestras de hígado, bazo, médula ósea y tonsilas cecales, se inocularon en caldo tetracionato y se incubaron 24 h. Posteriormente, los caldos fueron resembrados en agar verde brillante y MacConkey para recuperar las cepas de infección. Los aislamientos bacteriológicos fueron tipificados bioquímicamente con el sistema UNISCEPT-20E (Division of Sherwood Medical New York, USA), y serotipificados con antisuero somático "O" (DIFCO) que detecta a los factores 1, 9 y 12 del grupo D₁.

Tabla I.

DISEÑO EXPERIMENTAL (FASE UNO) EN GRUPOS DE POLLOS "SPF" DE CINCO SEMANAS DE EDAD, INFECTADOS CON DIFERENTES CEPAS DE *S. gallinarum* Y UNA CEPA DE *S. pullorum*.

GRUPO Y NUM.		TRATAMIENTO	VIA ORAL	DIAS DE MUESTREO
POLLOS		(Inoculación)	Y DOSIS	POSINFECCION.
			UFC/100 μ l	
I	46	<i>S. gallinarum</i> FVB-323	1×10^7 1×10^8	0, 14, 21, 28, 35
II	23	<i>S. gallinarum</i> ATCC-9184	1×10^7 1×10^8	0, 14, 21, 28, 35
III	19	<i>S. gallinarum</i> 9-R	1×10^8 1×10^9	0, 14, 21, 28, 35
IV	24	<i>S. pullorum</i> ATCC-10398	1×10^8 1×10^9	0, 14, 21, 28, 35
V	33	Control "PBS"		0, 14, 21, 28, 35

Tabla II.

DISEÑO EXPERIMENTAL (FASE DOS) EN GRUPOS DE POLLOS "SPF" DE CINCO SEMANAS DE EDAD, INFECTADOS CON *S. gallinarum* Y *S. enteritidis*.

GRUPO Y NÚM. POLLOS		TRATAMIENTO (Inoculación)	VÍA ORAL Y DOSIS (UFC/100 μ l)	DÍAS DE MUESTREO POSINFECCIÓN.
VI	49	<i>S. gallinarum</i> FVB-323	1X10 ⁸	0, 7, 14, 21, 28, 35
VII	55	<i>S. gallinarum</i> FVA-U2	1X10 ⁹	0, 7, 14, 21, 28, 35
VIII	20	<i>S. enteritidis</i> fago-13, FVA-1	1X10 ⁹	0, 7, 14, 21, 28, 35
IX	42	Control "PBS"		0, 7, 14, 21, 28, 35

3.4. Preparaciones de proteínas de la membrana externa (μ PME)

Las bacterias fueron cultivadas hasta alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento, en medio nutritivo ("A") con alta osmolaridad (20% de sacarosa) y baja osmolaridad (sin sacarosa), las PME fueron obtenidas de acuerdo al método descrito por Matsuyama *et al.*, (1984) y Verdugo-Rodríguez *et al.*, (1989). Los cultivos fueron centrifugados a 1,400 xg a 4 C por 10 min y las pastillas fueron suspendidas en PBS, en seguida se lisaron por sonicación con 7 pulsos de 60 seg cada uno a 20 kHz equivaliendo a 20,000 ciclos/segundo (Vibra cell sonicator, Sonic & Material Co., Danbury, Connecticut, USA). Las células lisadas fueron centrifugadas a 1,400 xg a 4 C por 10 min y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 100,000 xg a 4 C por 35 min en una centrifuga Beckman J2-21 (rotor SW50.1), la pastilla se suspendió en 20 ml de PBS, pH 7.4 conteniendo 2% de Triton X-100 e incubado a 37 C por 20 min. Se centrifugó nuevamente a 100,000 xg, se suspendió en fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 10mM, finalmente la pastilla fue resuspendida en 1 ml de de PBS, pH 7.4 y congelada a -20 C hasta su uso.

3.5. Cuantificación de las μ PME.

Las μ PME se descongelaron y se depositó una alícuota de 30 μ l en un tubo *ependorf* de 1.5 ml, en seguida se agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y se dejó precipitar en hielo 10 min. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 12,000 rpm en una microcentrifuga IEC (International Equipment Company, USA), el sobrenadante se desechó y la pastilla fue deshidratada al vacío en una centrifuga SC-100 Savant. La pastilla fue resuspendida en 1 ml de hidróxido de sodio al 0.4 N (solución fresca), y se mezcló durante 60 segundos aproximadamente para homogeneizar perfectamente la

proteína. Las mezclas se congelaron a -70 C durante 30 min y después se agitaron con vortex 60 seg tratando de no hacer espuma. Las muestras se depositaron en una microplaca *MaxiSorp F96* (NUNC, Danemark) de la siguiente manera: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μ l de proteína y 28, 26, 24, 22, 20 y 18 μ l de NaOH respectivamente, ajustando el volumen a 100 μ l. Finalmente a cada pozo se le agregaron 100 μ l de solución de *Bradford* preparada con 50 mg de azul de *Coomassie G-25*, 25 ml de etanol 95% y 50 ml de ácido fosfórico al 85%. La lectura se hizo, en un lector de ELISA (SIGMA, EIA-II. Florida, USA) a una longitud de onda de 590 nm (Bradford, 1976). La concentración de proteína se determinó usando como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

3.6. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida para análisis de proteínas (*SDS-PAGE*).

Las preparaciones de PME de *S. gallinarum* (cepas: 9-R, ATCC-9184, FVB-285, FVB-323, FVB-383, FVB-432, FVB-591), *S. pullorum* (cepas: ATCC-10398 y FVB-47) y *S. enteritidis* (cepas: FM-36 y FM-42), fueron separadas de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). La electroforesis se llevó a cabo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (PA-SDS) de 14X10 cm y 0.75 mm de grosor en una cámara *slab gel unit SE-400*. El gel concentrador se preparó al 4% y el gel separador al 14%, o en gradiente de 8-17% de poliacrilamida. Se depositaron 10 μ g de PME de cada una de las cepas por carril, usando una solución amortiguada de tris-glicina con 0.1% de SDS. Los geles de PA-SDS, se sometieron a 20 mA durante 1 h para el gel concentrador y 40 mA durante 4 h para el gel separador (Verdugo-Rodríguez, *et al.*, 1993abc). La tinción del gel se realizó con

azul de Coomassie al 0.01%, se calentó durante 60 segundos a ebullición en un horno de microondas y se dejó en agitación 15 min, posteriormente el gel se destiñó con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 7%, calentándolo a ebullición 60 segundos y posteriormente dejándolo en agitación durante 15 min. Este paso se repitió tres veces hasta visualizar claramente las proteínas.

3.7. Estandarización del TA- ELISA.

El TA-ELISA se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos previamente (Adrew y Harold 1979; Barrow *et al.*, 1992; Tijssen 1985; Verdugo-Rodríguez *et al.*, 1993a,b,c), el antígeno (PME) extraído de la cepa FVB-323 de *S. gallinarum* fue inmovilizado en microplacas *MaxiSorp F-96* (NUNC-inmunomodulo, Danemark) como se muestra en la Figura 1, usando 1, 3, 6, 9 y 12 $\mu\text{g/ml}$ de PME diluido en PBS (pH 7.4), hervido previamente durante 5 min en solución amortiguadora desnaturizante (PBS/B-1), de acuerdo al procedimiento descrito por Verdugo-Rodríguez, *et al.*, (1993c). El tiempo mínimo de inmovilización fue de 12 horas a 4 C. Al momento de usar las placas, los pozos fueron lavados 3 veces con PBS-tween-20 (pH 7.4) 0.05%. Las placas fueron bloqueadas con 150 $\mu\text{l/pozo}$ de BSA al 1% en PBS (pH 7.4) durante 60 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS-tween-20 y en seguida se agregaron 100 $\mu\text{l/pozo}$ de suero diluido (1:75, 1:375, 1:1,875, 1:9,375 y 1:46,875) en PBS, obtenidos de pollos infectados experimentalmente con *S. gallinarum* positivos en el hemocultivo, en la prueba de microaglutinación (título 1:512) y en aglutinación en placa con antígeno K-polivalente, así como, suero de pollos no infectados y suero de conejo. Las microplacas se incubaron 60 min a 37 C, se lavaron tres veces y después se agregaron 100 $\mu\text{l/pozo}$

de IgG de cabra anti-Ig de pollo acoplada con biotina (Vector Laboratories, Inc. USA) a diluciones 1:1,000, 1:2,000 y 1:3,000 incubándose 60 min a 37 C y lavándose tres veces. Posteriormente se agregaron 100 μ l/pozo de streptavidina acoplada con peroxidasa (Vector Laboratories, Inc. USA) diluido 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:3,000 y 1:4,000, y se incubó 60 min a 37 C. Por último, las microplacas se lavaron 5 veces con PBS-tween-20, dejando un intervalo de 5 min entre cada lavado, y en seguida se agregaron 100 μ l/pozo de sustrato ABTS (*3-ethyl-benzyl-thiazoline sulfonic acid*, SIGMA) a una concentración final de 87 μ g/ml. Se dejó reaccionar, realizando lecturas a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 min a una longitud de onda de 405 nm de luz ultravioleta para establecer el tiempo óptimo de lectura.

3.8. Análisis estadístico.

Los resultados de la estandarización y evaluación del TA-ELISA, están dados en porcentajes y fueron analizados por medio de ji-cuadrada y análisis de varianza en un sistema de análisis estadístico "SAS" versión 6.04 (1990). La sensibilidad y especificidad del TA-ELISA se determinó según la metodología establecida (Morton y Hebel, 1985).

ELISA

Detección de anticuerpos

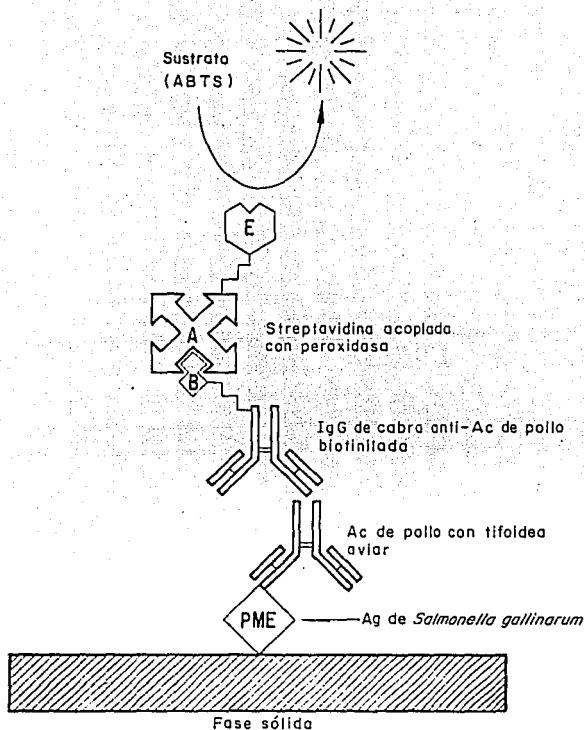


Figura 1.

Representación esquemática del TA-ELISA, con el sistema estreptavidina-biotina usando como antígeno de captura „PME de *S. gallinarum* FVB-323.

4. RESULTADOS

4.1. Cuantificación de las μ PME

Se cuantificaron aproximadamente 29 PME electroforéticamente diferentes obtenidas tanto en baja como en alta osmolaridad. Las cepas de *S. gallinarum* (FVB-323, ATCC-9184 y 9-R) cultivadas en baja osmolaridad, que presentaron un perfil de PME bien definidas (35, 36 y 37 kDa) en PAGE-SDS, fueron seleccionadas para diseñar, estandarizar y evaluar el TA-ELISA (Tabla-III).

4.2. Perfil electroforético de las PME.

Se observaron 4 bandas o proteínas principales, con un peso molecular de aproximadamente 45, 36, 34, y 18 kDa. La PME de 45 kDa se observó en tres cepas de *S. gallinarum*, en una de *S. pullorum* y *S. enteritidis*; las PME de 36 y 34 kDa, se detectaron en todas las cepas estudiadas, con excepción de la ATCC-9184 y la FVB-285 de *S. gallinarum*, respectivamente; mientras que la PME de 18 kDa no se observó en *S. gallinarum* ATCC-9184 y en *S. pullorum* FVB-47. Por otra parte, se observaron con menor frecuencia PME principales de 37, 32, y 24 kDa. Con respecto a la expresión en alta osmolaridad, con el sistema de geles utilizado; únicamente se detectó mayor expresión de una banda de aproximadamente 36 kDa en *S. pullorum* (Figuras 2 y 3).

Con excepción de *S. gallinarum* FVB-323 las demás cepas de *S. gallinarum* y *S. pullorum* mostraron una osmorregulación de dos PME principales; en alta osmolaridad se reprimió la expresión de la PME de 37.5 kDa, mientras que la PME de 36 kDa se expresó. En contraste, en baja osmolaridad la PME de 37.5 kDa se expresa a nivel de la de 37 kDa, mientras que se reprime la expresión de la PME de 36 kDa.

Tabla III.

CONCENTRACIÓN EN $\mu\text{g/ml}$ DE DIFERENTES PREPARACIONES DE PME, DE *Salmonella gallinarum*, *S. Pullorum* Y *S. Enteritidis* CULTIVADAS EN BAJA OSMOLARIDAD.

SEROTIPO	CEPA	PME DE 35, 36 Y 37 KDa EN PAGE-SDS.	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA $\mu\text{g/ml}$
<i>S. gallinarum</i>	ATCC-9184	(++)	2.5
	FVB-323	(++)	5.84
	Vacuna 9-R	(+++)	9.4
<i>S. pullorum</i>	ATCC-10398	(++)	5.7
<i>S. enteritidis</i>	FVB-36	(++++)	15.0

La (+) indica la intensidad de las bandas observadas en geles de poliacrilamida-SDS.

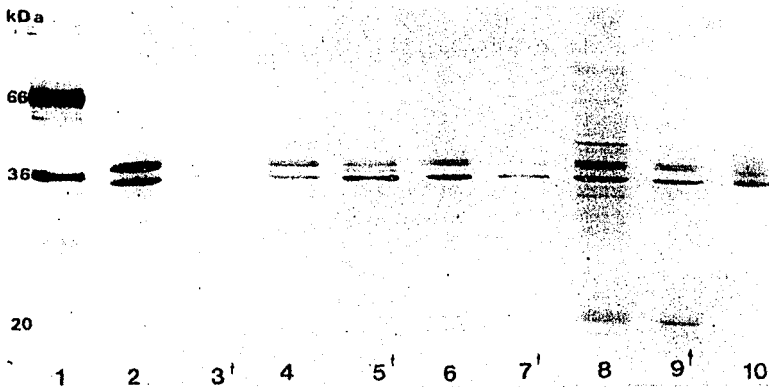


Figura 2.

Gel de poliacrilamida-SDS (14%), donde se muestran PME de *Salmonella gallinarum* cepas: 9-R (carriles 2 y 3), ATCC-9184 (carriles 4 y 5) y FVB-323 (carriles 8 y 9); de *S. pullorum* ATCC-10398 (carriles 6 y 7); y *S. typhi* IMSS-1 (carril 10). En los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 las PME se obtuvieron de bacterias cultivadas en baja osmolaridad y en los carriles 3, 5, 7 y 9 las PME se obtuvieron de bacterias cultivadas en alta osmolaridad. En el carril 1 se incluyeron marcadores de peso molecular.

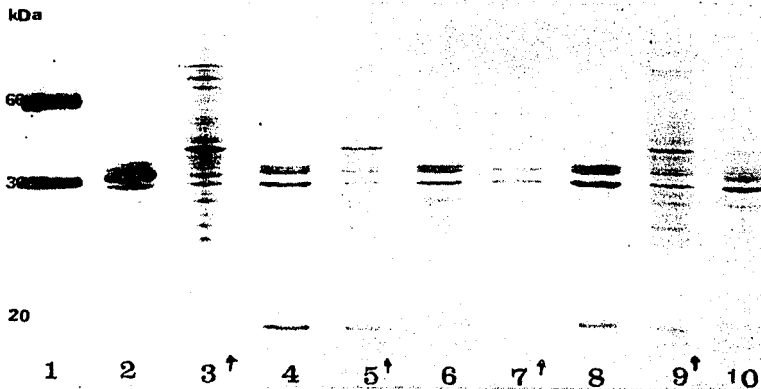


Figura 3.

Gel de poliacrilamida-SDS (14 %), donde se muestran PME de *Salmonella pullorum* cepas: 47 (carriles 2 y 3); *S. gallinarum* cepas: 591 (carriles 4 y 5), 285 (carriles 6 y 7), 383 (carriles 8 y 9); y *S. enteritidis* cepa 36 (carril 10). En los carriles 2, 4, 6, 8, y 10 las PME se obtuvieron de bacterias cultivadas en baja osmolaridad, mientras que en los carriles 3, 5, 7, y 9 las PME se obtuvieron de bacterias cultivadas en alta osmolaridad. En el carril 1 se incluyeron marcadores de peso molecular.

4.3. Estandarización del TA-ELISA.

Los resultados de la estandarización del TA-ELISA, graficados en la Figura 4, mostraron que con una concentración de 3 μg del antígeno (ρPME), una dilución de 1:3,000 del conjugado y una dilución de 1:9,375 del suero, fue posible diferenciar a los pollos infectados con *S. gallinarum* de los pollos no infectados, a los 35 min de la reacción enzima-sustrato ($p=0.0001$).

La figura 5 muestra la cinética de aparición de anticuerpos, determinados por el TA-ELISA, en un grupo de 25 pollos infectados experimentalmente, con *S. gallinarum* positivos al aislamiento bacteriológico y seropositivos a la prueba de aglutinación en placa, con el antígeno K-polivalente, contra un grupo de 25 pollos control (sin infectar); las medias de los títulos de anticuerpos en los pollos infectados y no infectados en el mismo día de muestreo (Figura 5), fueron diferentes ($p=0.0001$). También, se observó que el pico de los títulos de anticuerpos (0.617) en el grupo infectado, se alcanzó a los 14 días, manteniéndose estable a los 21, 28, y 35 días posinfección. Para determinar el punto de corte se compararon los resultados obtenidos en el TA-ELISA, con un grupo de 50 pollos infectados experimentalmente en las fases uno y dos con *S. gallinarum*, positivos al aislamiento bacteriológico y seropositivos a la prueba de aglutinación en placa con el antígeno K-polivalente y 50 pollos del grupo control no infectado (Figura 6). Los resultados se expresan como porcentajes de absorbancia obtenidos a partir de un suero control positivo, con altos títulos de anticuerpos contra *S. gallinarum* (obtenido en la fase 1). Con base en los valores obtenidos con los dos grupos de pollos en el TA-ELISA se determinó un punto de corte de 60% ($p=0.0001$). Usando 195 sueros de pollos infectados positivos al aislamiento bacteriológico y no infectados, se determinó una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98.5% para el TA-ELISA ($p<0.05$).

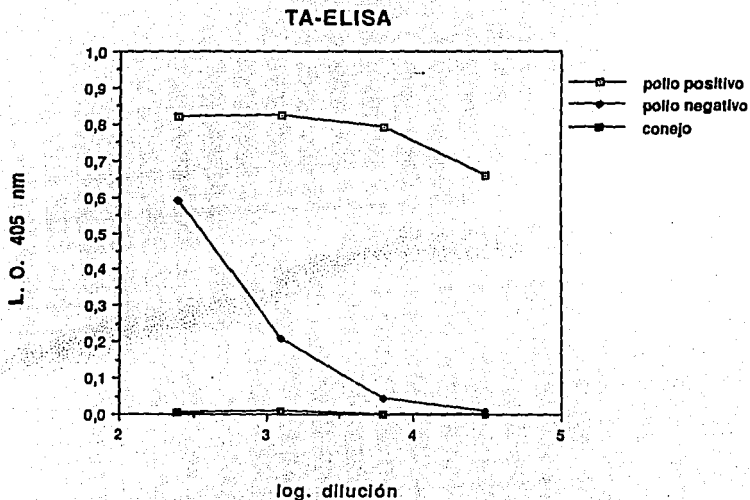


Figura 4.

Valores de absorbancia en el TA-ELISA graficados contra el logaritmo de la dilución de suero de pollo infectado con *S. gallinarum*, suero de pollo sin infectar y suero de conejo.

La lectura se realizó después de 35 min de la reacción enzima-sustrato a una longitud de onda de 405 nm.

TA-ELISA

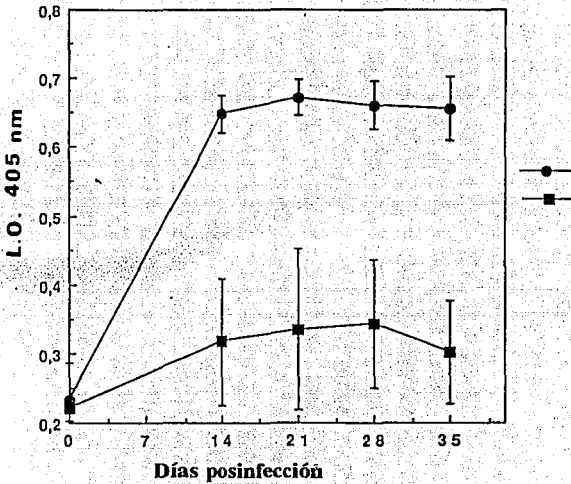


Figura 5.

Cinética de aparición de anticuerpos detectados por el TA-ELISA en pollos infectados experimentalmente con *S. gallinarum*, positivos al aislamiento bacteriológico (—●—) y grupo control negativo (—■—).

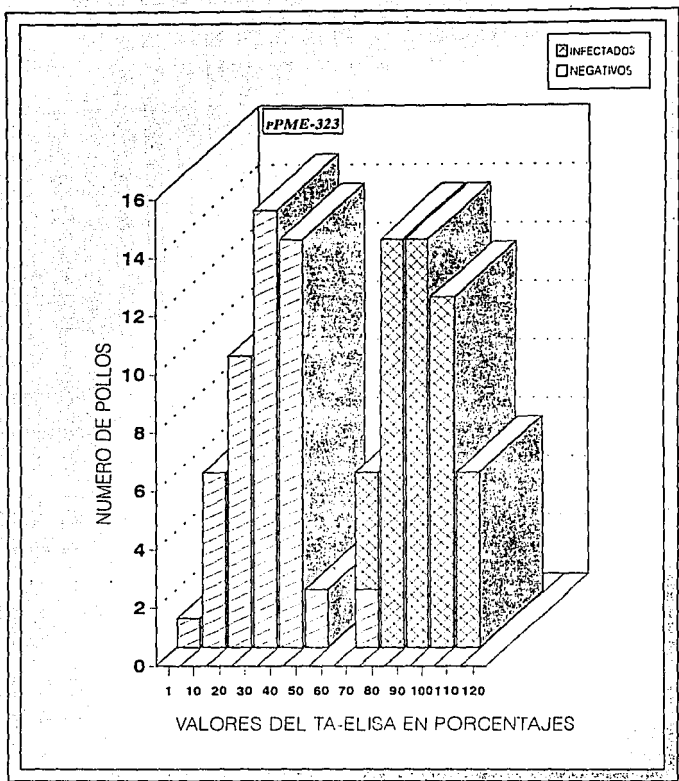


Figura 6.

Determinación del punto de corte en el TA-ELISA mediante el porcentaje de los valores de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. Se utilizaron sueros de pollos "SPF" a los 28 días posinfección, con aislamiento bacteriológico. Los pollos fueron infectados experimentalmente, vía oral, con *Salmonella gallinarum* (cepas: FVB-323 y U-2). Los valores del TA-ELISA se calcularon como el porcentaje de absorbancia obtenida con un suero control positivo.

4.4. Evaluación del TA-ELISA.

4.4.1. Primera fase experimental.

Se estudiaron 5 grupos de pollos SPF infectados experimentalmente (Tablas I y II), usando diferentes dosis de *S. gallinarum* (cepas: FVB-323, ATCC-9184 y 9R) y *S. pullorum* ATCC-10398, y los resultados se muestran en la Figura 7.

Grupo I. De los pollos infectados con *S. gallinarum* FVB-323, usando una dosis 1×10^7 UFC, el 86.96% fueron positivos mediante el TA-ELISA. Al corroborar estos resultados con aglutinación en placa usando antígeno K-polivalente, se encontró una positividad del 60.87%, y un 13.04% de aislamientos bacteriológicos a partir de órganos ($p=0.044$). En el segundo subgrupo de pollos infectados con la dosis 1×10^8 UFC, con el TA-ELISA se detectó el 91.3% de seropositividad, y con la prueba de aglutinación en placa se detectó al 78.26% ($p<0.05$), mientras que el aislamiento bacteriológico se logró únicamente en el 30.43% de los pollos (Tabla-IV).

Grupo II. Se infectó con *S. gallinarum* ATCC-9184. Utilizando la dosis 1×10^7 UFC, el 25% de los casos fue positivo mediante el TA-ELISA, mientras que en este subgrupo la prueba de aglutinación fue positiva en el 58.33% de los pollos ($p=0.098$). El subgrupo infectado con 1×10^8 UFC, fue positivo en el TA-ELISA en el 72.73% de los casos, mientras que la prueba de aglutinación detectó al 54.55% ($p<0.05$). El aislamiento bacteriológico no se logró en ninguno de los pollos de este grupo.

Grupo III. Pollos infectados con *S. gallinarum* 9-R (cepa vacunal). El primer subgrupo tratado con una dosis de 1×10^8 UFC fue positivo en un 77.78% al TA-ELISA y la prueba de aglutinación no detectó a ninguno de los pollos ($p=0.001$), el subgrupo tratado con 1×10^9 UFC fue positivo en el 60% de los casos, mientras que la prueba de aglutinación solo detectó al 10% de los pollos ($p=0.01$). En ninguno de los pollos de este grupo, se aisló la cepa vacunal.

Grupo IV. En estos pollos infectados con *S. pullorum* ATCC-10398 el subgrupo infectado con una dosis de 1×10^7 UFC, el TA-ELISA y la prueba de aglutinación detectaron el 100% de los animales. Al comparar el TA-ELISA y la prueba de aglutinación en el subgrupo infectado con 1×10^8 UFC, también el 100% de los pollos fueron positivos ($p<0.05$). El aislamiento bacteriológico fue negativo.

Grupo V. En el grupo control el TA-ELISA, no detectó anticuerpos contra Salmonelas en el 95.1% de los sueros, y la prueba de aglutinación también fue negativa en el 94.2% de los casos. Estos pollos antes y después del experimento fueron negativos al aislamiento bacteriológico ($p=0.04$).

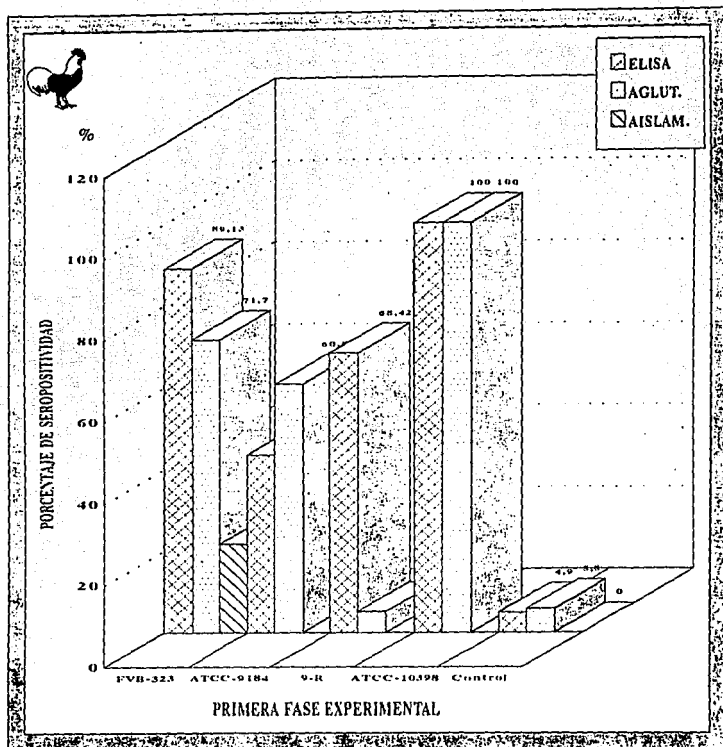


Figura. 7

Porcentaje de positividad en el TA-ELISA, de los sueros procedentes de pollos SPF infectados experimentalmente a las 5 semanas de edad, con *Salmonella gallinarum* (cepas: FVB-323, ATCC-9184 y 9-R) y *S. pullorum* (ATCC-10398). Los sueros se obtuvieron a los 28 días posinfección. También se muestra el porcentaje de positividad mediante aglutinación con antígeno K-polivalente, así como el aislamiento bacteriológico a partir de sangre y heces (cepa: FVB-323).

4.4.2. Segunda fase experimental.

En la **Tabla V** se muestra el análisis en forma individual de cuatro grupos de pollos infectados con *S. gallinarum* y *S. enteritidis*. Mientras que en la **Tabla VI** se muestran los resultados obtenidos por el TA-ELISA y la prueba de aglutinación en placa con antígeno K-polivalente, analizados por día de muestreo.

Grupo VI. Pollos infectados con *S. gallinarum* FVB-323 (1×10^8 UFC). El TA-ELISA detectó una seropositividad del 77.55%, la prueba de aglutinación en placa detectó el 71.42%, mientras que la cepa de infección fue recuperada en el 22.44% de los casos, siendo un 16% a partir de hemocultivos y un 4.08% de órganos ($p < 0.001$).

Grupo VII. Pollos infectados con *S. gallinarum* U-2 resistente al NO-NA, el TA-ELISA detectó el 100% de los pollos. También, la prueba de aglutinación fue positiva en el 100% de los casos. El hemocultivo fue positivo en el 81.8% de los pollos y los aislamientos se lograron a partir de muestras obtenidas durante las primeras 72 h (**Figura 8**). El aislamiento bacteriológico a partir de órganos se logró en el 5.95% de los pollos, mientras que, de heces no se aisló la bacteria ($p < 0.001$).

Grupo VIII. Pollos infectados con *S. enteritidis* fagotipo 13 (**Figura 8**). Los resultados fueron idénticos a los obtenidos en el grupo VII, ya que tanto el TA-ELISA como la prueba de aglutinación, detectaron al 100% de los sueros, siendo el aislamiento bacteriológico positivo a partir de heces en el 55% de los pollos ($p < 0.001$).

Grupo IX. Pollos utilizados como controles negativos, sin infectar. El 93.5% fueron negativos al TA-ELISA, mientras que el 91% fueron negativos a la prueba de aglutinación en placa durante todo el estudio ($p < 0.002$). El aislamiento bacteriológico fue negativo a partir de sangre, heces, así como de órganos al sacrificio.

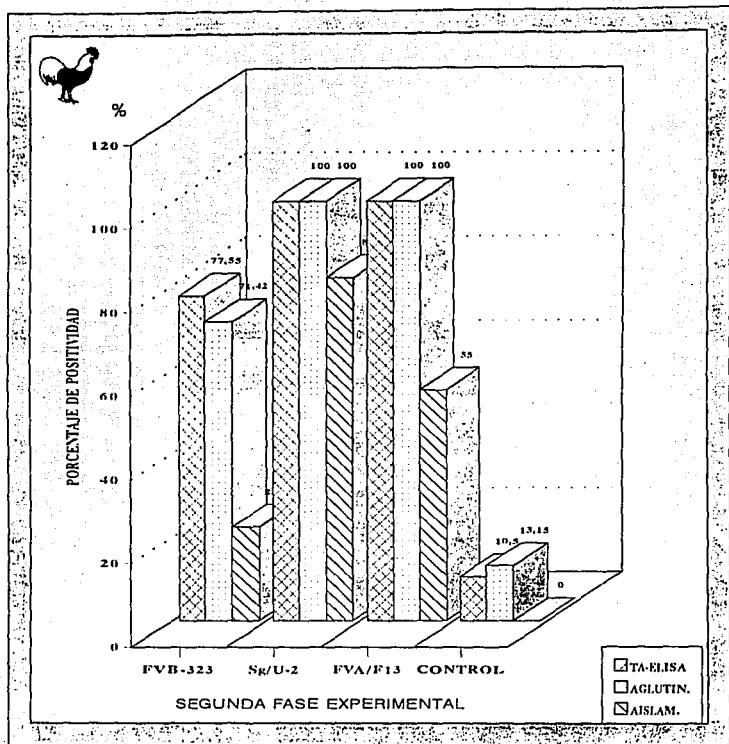


Figura 8.
 Porcentaje en el TA-ELISA, de sueros procedentes de pollos SPF infectados experimentalmente a las 5 semanas de edad, con *Salmonella gallinarum* (cepas: FVB-323 y U-2) y *S. enteritidis* fagotipo 13. Al grupo control se le administró PBS. Los sueros se obtuvieron a los 28 días posinfección. También se muestra el porcentaje de positividad mediante aglutinación con antígeno K-polivalente y el aislamiento bacteriológico a partir de sangre (cepa: FVB-323) y heces (cepa: FVA-F13).

Tabla IV

AISLAMIENTO DE *S. gallinarum* FVB-323 DE DIFERENTES ÓRGANOS, Y RESULTADOS DEL TA-ELISA COMPARADO CON DOS PRUEBAS CONVENCIONALES (FASE EXPERIMENTAL I).

POLLOS "SPF" INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON <i>Salmonella gallinarum</i> FVB-323						
NÚM. DE POLLO	HC.	HÍGADO	BAZO	AP.	MA.	TA-ELISA
17	-	+	+	+	*1:512	+
20	-	+	+	+	1:4	+
35	-	+	+	+	*1:64	+
37	-	-	+	+	1:4	+
39	+	-	-	+	*1:512	+
47	-	-	+	+	1:8	+
50	+	+	-	+	1:4	+
54	-	+	+	+	*1:64	+
55	-	-	+	+	1:4	+
58	-	+	+	+	1:4	+
Control 4	-	-	-	-	Negativo	-
Conejo	-	-	-	-	Negativo	-
12	2	6	8	10	* POSITIVO	10

Sueros '17 y 4 se usaron como controles positivo y negativo respectivamente, para desarrollar el TA-ELISA. Hemocultivo (HC), aglutinación en placa (AP), micro-aglutinación (MA).

Tabla V.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PORCENTAJES DE ANIMALES POSITIVOS DETECTADOS MEDIANTE EL TA-ELISA, EN GRUPOS DE POLLOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE (FASE 2) CON DIFERENTES CEPAS DE *Salmonella*.

GRUPOS DE POLLOS Y TRATAMIENTO		PRUEBAS		AISLAMIENTO		
		SEROLOGICAS.		BACTERIOLOGICO		
		TA-ELISA (%)	AGLUTINACIÓN (%)	HEMOCUL. (%)	HECES (%)	*ORGANOS (%)
VI (50)	<i>S. gallinarum</i> (1X10 ⁹)	77.55 (a)	71.43 (b)	22.45	0	0
VII (55)	<i>S. gallinarum</i> U-2 (1X10 ⁹)	100 (a)	100 (a)	81.82	0	5.45
VIII (20)	<i>S. enteritidis</i> Fago-13 (1X10 ⁹)	100 (a)	100 (a)	0	55	0
IX (42)	PBS (100 µl)	6.50 (a)	8.94 (b)	0	0	0

Órganos, de los cuales se logró el aislamiento bacteriológico: *hígado, *bazo y *tonsilas cecales.

Medias con diferente literal (ab) dentro del renglón son diferentes estadísticamente ($p < 0.001$)

Tabla VI.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PORCENTAJES DE ANIMALES POSITIVOS DETECTADOS MEDIANTE EL TA-ELISA Y AGLUTINACIÓN EN PLACA, POR DÍAS DE MUESTREO, EN POLLOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE (FASE 2) CON AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO.

GRUPO	PRUEBA	DIAS POSINFECCION				
		7 (%)	14 (%)	21 (%)	28 (%)	35 (%)
<i>S. gallinarum</i> FVB-323 (1X10 ⁸)	TA-ELISA	80 (a)	90 (ns)	100 (a)	S	S
	AGLUT.	50 (b)	90 (ns)	66.6 (b)	S	S
<i>S. gallinarum</i> -U2 (1X10 ⁸)	TA-ELISA	88.8 (a)	100 (a)	100 (ns)	100 (ns)	100 (ns)
	AGLUT.	62.2 (b)	97.8 (b)	100 (ns)	100 (ns)	100 (ns)
<i>S. enteritidis</i> FVA-1 Fago-13 (1X10 ⁸)	TA-ELISA	81.8 (a)	100 (ns)	90.9 (ns)	100 (ns)	100 (ns)
	AGLUT.	100 (b)	100 (ns)	90.9 (ns)	100 (ns)	100 (ns)

Medias con diferente literal (ab) dentro de columna, dentro del grupo por día de muestreo, son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$). No significancia (ns), sacrificados. (S).

Considerando los resultados serológicos obtenidos tanto en la fase I como 2; analizados por grupo, sin considerar la dosis (Figura 6 y 7) se encontró que el grupo I, infectado con *S. gallinarum* FVB-323 el TA-ELISA detectó el 89.13%, mientras que aglutinación en placa el 71.74%, siendo el aislamiento bacteriológico del 21.74% de los pollos ($p < 0.001$). El grupo II, infectado con *S. gallinarum* ATCC-9184 el TA-ELISA detectó el 39.13%, mientras que aglutinación detectó 60.87% de positividad y el hemocultivo fue negativo en todos los casos ($p < 0.001$). En el grupo III, tratado con la vacuna 9R, el TA-ELISA detectó una seropositividad del 75.2%, mientras que aglutinación solo detectó el 5.5% y el aislamiento bacteriológico fue negativo ($p < 0.001$). En el grupo IV, de pollos inoculados con *S. pullorum*, el TA-ELISA y la prueba de aglutinación detectaron al 100% de los pollos.

En los pollos del grupo VI, infectados con *S. gallinarum* FVB-323, el TA-ELISA (77.55%) fue ligeramente más sensible que aglutinación en placa (71.43%), los grupos infectados con *S. gallinarum* U-2 y *S. enteritidis* fagotipo 13 el TA-ELISA y aglutinación detectaron al 100% de los pollos. En los tres grupos infectados, el aislamiento bacteriológico fue inferior a los resultados obtenidos por las pruebas serológicas. Aunque, en el grupo VII se logró recuperar la bacteria en el 81.82% de los casos (Figura 7).

Al analizar la capacidad del TA-ELISA y la prueba de aglutinación en placa para detectar de manera temprana anticuerpos contra salmonela, se encontró que los grupos infectados con *S. gallinarum* cepas FVB-323 y U-2 el TA-ELISA detectó un mayor porcentaje de seropositividad que la prueba de aglutinación a partir del día 7 posinfección, incrementándose al 100% a los 14 días y manteniéndose constantes hasta el sacrificio. En el grupo infectado con *S. enteritidis* fagotipo 13, el TA-ELISA fue menos sensible que la prueba de aglutinación a los 7 días, sin embargo, el 100% se alcanzó a

los 14 días posinfección (Tabla VI).

4.4.3. Lesiones macroscópicas a la necropsia.

Todos los grupos de pollos que formaron parte de la segunda fase, fueron revisados minuciosamente al sacrificio encontrándose los siguientes resultados: el grupo VI infectado con *S. gallinarum* FVB-323 presentaron a la necropsia un 30% de abscesos en hígado con esplenomegalia y congestión severa difusa con fibrina en cápsula y sacos aéreos opacos. Al estudiar los órganos histopatológicamente, se encontró que en hígado, bazo y bolsa de Fabricio existieron lesiones clásicas provocadas por enterobacterias.

4.4.4. Aislamientos bacteriológicos.

En el 24.45% de los pollos del grupo VI se recuperó la cepa de infección a partir de hemocultivo, mientras que en los pollos infectados con *S. gallinarum* U-2, el aislamiento se logró desde las 24 h llegando a recuperar el 81.82% a las 72 h a partir de hemocultivos, y al sacrificio fue posible recuperar la cepa de hígado, bazo y tonsilas cecales en el 5.45% de los casos. En las aves del grupo VIII infectado con *S. enteritidis* la cepa se recuperó en el 55% de los pollos, durante las primeras 72 h a partir de hisopos cloacales, sin tener éxito en hemocultivo y órganos al sacrificio (Tabla V). Las cepas recuperadas fueron identificadas bioquímicamente (Tabla VII) y posteriormente serotipificadas con antisueros somáticos "O" para detectar los factores 1, 9 y 12 del grupo D, y además en el caso de *S. enteritidis* fagotipo 13, se realizó serotipificación con antisueros flagelares (factores: *m*, *s*, *t* y *q*) y el fagotipo fue corroborado, con un juego de fagos obtenido del Instituto de Salud Pública de Londres.

Tabla VII.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA (UNISCEPT-20E), DE 10 AISLAMIENTOS BACTERIOLÓGICOS DE *S. gallinarum* FVB-323, EN POLLOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE (FASE 2).

BIOQUÍMICAS UNISCEPT-20E	POLLOS CON AISLAMIENTO DE <i>S. gallinarum</i> FVB-323									
	Número de identificación.									
	6	7	10	17	21	23	37	38	39	40
ONPG.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
H ₂ S.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa/Nitrato.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), Dihidrolasa de la arginina (ADH), Descarboxilasa de la lisina (LDC), Descarboxilasa de la ornitina (ODC), Desaminasa del triptófano (TDA).

5. DISCUSIÓN.

Como se describió en **RESULTADOS**, se observó que las PME de 36 y 37,5 kDa se osmorregulan, las cuales podrían corresponder a OmpC y OmpF, respectivamente. Con respecto a las PME que no se osmorregulan, es probable que la PME de 37 kDa, pueda ser equivalente a la OmpC de *S. typhi* o a la OmpD de *S. typhimurium* (Nikaido y Vaara, 1985; Puente *et al.*, 1991). Al respecto, Puente *et al.*, (1995) reportaron recientemente que OmpC de *S. typhi* hibrida con el DNA de *S. gallinarum* FVA-1. Así mismo, por migración electroforética, la PME de 35 kDa podría corresponder a la OmpA (Puente *et al.*, 1991). No se observó un patrón electroforético intra-especie, ni tampoco se detectó una proteína especie-específica (Figura 2 y 3). Al respecto, se requiere de un estudio con un mayor número de cepas, así como el uso otras estrategias, como la utilización de un sistema de geles de doble dimensión, condiciones de cultivo, así como clonación y secuenciación para definir las similitudes de las PME observadas con las PME reportadas previamente.

En **MATERIALES Y METODOS**, se mencionó la preparación de μ PME de *S. gallinarum* FVB-323, para usarlas como antígeno en el desarrollo y estandarización del TA-ELISA. Para tal fin, se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno, encontrándose que con 3 μ g/ml, usando una dilución del suero de 1:9,375, y diluyendo el conjugado 1:3,000 se pueden diferenciar sueros de pollos infectados de no infectados (Figura 4). Sin embargo, el análisis estadístico indicó que una dilución del suero 1:1,875, también diferenció animales infectados de no infectados, cuando fueron leídos a los 35 min a una longitud de onda de 405 nm. Verdugo-Rodríguez *et al.*, estandarizó un ELISA indirecto, usando como antígeno μ PME de *S. typhi* para detectar anticuerpos contra fiebre tifoidea, encontrando que con una concentración de 5 μ g/ml, puede diferenciar pacientes

infectados de no infectados, aunque a una dilución 1:3,125 (Verdugo-Rodríguez *et al.*, 1989, 1993a, 1993b, 1993c). Por otro lado Kim *et al.*, (1991), estandarizó un ELISA para diferenciar gallinas infectadas de no infectadas, usando como antígeno PME de *S. enteritidis*. En dicho trabajo, la concentración óptima de antígeno fue de 60 ng/pozo (0.6 µg/ml), con una dilución del suero 1:200. También observó, que incrementando la concentración del antígeno (240 ng/pozo) los valores de absorbancia se incrementan. Ellos observaron que al evaluar diferentes diluciones de conjugado, la dilución 1:1,000 fue la óptima usando una dilución constante del suero. Por otro lado, Barrow *et al.*, (1992), usando 6 µg/ml de LPS y flagelina como antígeno de detección en un ELISA indirecto, diferenció la infección causada por *S. gallinarum* y *S. pullorum* de la infección causada por otros grupos de salmonelas en pollos de engorda. Usando flagelina de *S. montevideo* como antígeno, diferenció infecciones causadas por *S. pullorum* y *S. enteritidis*. Por otra parte, como se menciona en **RESULTADOS**, las medias de los títulos de anticuerpos obtenidas por el TA-ELISA (Figura 5), en un grupo de pollos infectados con aislamiento bacteriológico de *S. gallinarum*, y un grupo de pollos sin infectar, fueron diferentes a partir de los 7 días, alcanzando su valor máximo a partir del día 14 posinfección.

Como se describió en **MATERIALES y METODOS** en inmunoensayos previamente descritos, se han establecido diferentes porcentajes de puntos de corte, por ejemplo, cuando se uso como antígeno hapteno nativo o lipopolisacárido se usó 70% y cuando se usó citosol fue 60% (Díaz *et al.*, 1994). El punto de corte obtenido por el TA-ELISA fue también muy similar al obtenido en un estudio con 1,000 sueros de bovino, el cual fue del 62% para los sueros positivos (Nielsen *et al.*, 1993).

Al analizar la capacidad para detectar títulos de anticuerpos en los primeros días

posinfección, se encontró que el TA-ELISA fue más sensible, a partir del día 7, que la prueba de aglutinación en placa con antígeno k-polivalente, en los grupos de pollos infectados con *S. gallinarum* (cepas: FVB-323 y U-2). Sin embargo, en el grupo infectado con *S. enteritidis*, la prueba de aglutinación fue más sensible que el TA-ELISA a los 7 días. Esto se puede deber, a que *S. enteritidis* fagotipo 13, es altamente invasiva en pollos de un día de edad, infectados experimentalmente con 1×10^7 UFC/ml, donde se ha observado una mortalidad hasta del 90% (Gast, 1994). En infecciones experimentalmente realizadas en gallinas con *S. enteritidis* fagotipo 13, con 1×10^9 UFC/ml, se ha observado entre la primera y segunda semana posinfección, una alta producción de anticuerpos (IgM, IgG) que son detectados por aglutinación (Gast, 1992).

Como se muestra en la Figura 5, los títulos de anticuerpos totales se mantuvieron constantes después de haber alcanzado su valor máximo a los 14 días posinfección, en el suero de pollos infectados con aislamiento bacteriológico de la fase 1 y 2. Lo cual concuerda con trabajos realizados en aves adultas infectadas experimentalmente con *S. gallinarum*, donde se han encontrado títulos altos de IgG contra esta bacteria hasta por 30 semanas (Barrow *et al.*, 1992). Por lo que concierne, a la capacidad del TA-ELISA para detectar anticuerpos contra *S. gallinarum*, dentro de los mismos grupos de pollos infectados con diferentes dosis (fase 1), se encontró que en los grupos I y III el TA-ELISA fue más sensible que la prueba de aglutinación ($p < 0.05$). Sin embargo en el grupo tratado con una dosis 1×10^9 de *S. gallinarum* 9R (vacuna), el TA-ELISA detectó al 77.78%, mientras que en los pollos tratados con 1×10^9 detectó al 60%, y la prueba de aglutinación no detectó anticuerpos en el primer subgrupo, siendo sólo detectado el 10% del segundo subgrupo, y esto se puede explicar, debido a que el TA-ELISA detecta principalmente anticuerpos del tipo IgG, mientras que las pruebas de aglutinación

detectan principalmente IgM. Considerando el total de los **RESULTADOS** obtenidos en cada uno de los grupos en ambas fases, se encontró que el grupo tratado con *S. gallinarum* (Figura 7), el TA-ELISA detectó el 68.42%, mientras que la prueba de aglutinación solo detectó el 5.2%, esto es interesante debido a que la cepa vacunal 9R de *S. gallinarum* es una mutante rugosa no aglutinante, que posiblemente haya perdido algunos antígenos de superficie (LPS), lo cual provoca una escasa producción de anticuerpos aglutinantes. En este sentido las PME contienen aproximadamente 30% de LPS, con lo cual el TA-ELISA sí detecta la respuesta inmune humoral contra el LPS (Verdugo-Rodríguez *et al.*, 1993). Por otro lado, estos resultados concuerdan con un estudio de vacunación realizado en pollos de 1 a 7 días de edad con dicha cepa vacunal por vía oral, donde se encontró una aglutinación del 5% (Bojorques y Ponce, 1989). Los **RESULTADOS** obtenidos por el TA-ELISA, la prueba de aglutinación con antígeno K-polivalente, y el aislamiento bacteriológico (Figura 7 y 8), se comportaron de manera similar en los grupos I y 6 infectados con *S. gallinarum* FVB-323. En el grupo II, el subgrupo infectado con una dosis de 1×10^7 UFC *S. gallinarum* ATCC-9184, la prueba de aglutinación reaccionó positivamente con el 58.33% de los sueros, mientras que el TA-ELISA solo detectó al 25%. Sin embargo, el subgrupo tratado con una dosis de 1×10^8 UFC el TA-ELISA detectó el 72.73% y aglutinación el 54.55%.

En el grupo IV infectado con *S. pullorum* ATCC-10398 en ambas dosis, el TA-ELISA y la prueba de aglutinación detectaron al 100% de los pollos. Sin embargo, el aislamiento bacteriológico en este grupo no se logró (Figura 7). En este sentido, Barrow *et al.*, (1992) al infectar pollos de engorda con una dosis 1×10^8 UFC/ml, con *S. pullorum* cepa 573/87 altamente virulenta, encontró por medio de un ELISA usando LPS como antígeno, una producción de IgG significativamente más bajas; que cuando usó una cepa (16662/87)

menos virulenta de *S. pullorum* .

Los grupos VII y VIII (Figura 8) infectados con *S. gallinarum* U-2 y *S. enteritidis* fagotipo 13 con una dosis 1×10^9 , el TA-ELISA y la prueba de aglutinación detectaron al 100% de los pollos y los aislamientos bacteriológicos fueron del 81.8% y 55% respectivamente ($p < 0.001$). Se debe mencionar que *S. gallinarum* U-2 se recuperó principalmente de sangre durante las primeras 72 h, lo cual indica la alta capacidad invasiva de esta cepa. Al respecto, Godoy *et al.*, (1994) determinaron la patogenicidad de *S. gallinarum* U-2 en pollos de engorda (estirpe Arbor-Acres) de 4 días de edad, encontrando una mortalidad del 65%, cuando usaron una dosis 1×10^4 UFC/ml y una mortalidad del 100%, cuando usaron una dosis 1×10^8 UFC/ml. Por lo que toca, *S. enteritidis* fagotipo 13 la mayoría de los aislamientos se lograron de hisopos cloacales, lo cual es entendible, considerando que esta bacteria coloniza principalmente el tracto intestinal. Estas observaciones concuerdan con los trabajos de Gast *et al.*, (1994), donde encontró un 83% de aislamientos bacteriológicos a partir de heces durante la primera semana posinfección, en gallinas *Leghorn* "SPF" inoculadas oralmente con una dosis 1×10^9 de *S. enteritidis* fagotipo 13. Además, observó la invasividad provocada en órganos de gallinas infectadas por este serotipo durante las primeras 5 semanas posinfección, recuperando la bacteria en un 60% a partir de ciegos, 53% de hígados, 49% de bazo 19% de ovario y 17% de oviductos muestreados.

Por otro lado, al analizar la capacidad del TA-ELISA para detectar anticuerpos a los 7 días posinfección, se encontró que, en los grupos VI y VII que el TA-ELISA fue más sensible que la prueba de aglutinación (Tabla VI).

Como se describió en MATERIALES Y METODOS, el TA-ELISA, se estandarizó utilizando „PME de *S. gallinarum* como antígeno. En los grupos infectados con *S.*

pullorum y *S. enteritidis* (Figura 7 y 8), el TA-ELISA mostró una seropositividad del 100%. Resultados similares se han observado, cuando se ha usado LPS de *S. gallinarum* como antígeno, en Inmunoensayos enzimáticos para detectar anticuerpos contra *S. pullorum*, *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, en parvadas de gallinas infectadas (Zijderveld *et al.*, 19992). Desde ese punto de vista, el TA-ELISA puede tener un valor potencial como prueba de escrutinio para detectar y poder eliminar en granjas a las aves rectoras. Sobre todo, considerando que existe una Campaña Nacional para el Control y la Erradicación de esta enfermedad. Como se describe en **RESULTADOS**, el TA-ELISA presentó una mayor sensibilidad y especificidad, que la prueba convencional de aglutinación en placa. Por otro lado, dada la similitud antigénica entre los serotipos del grupo D, del género *Salmonella*, también puede ser útil para diagnosticar otros serotipos de importancia que afectan a las aves destinadas a la industria avícola. Sobre todo, si se consideran algunas desventajas que presentan las pruebas convencionales, que usan antígenos polivalentes para detectar anticuerpos circulantes, ya que se fundamentan principalmente en la detección de la IgM, lo que provoca que se presenten resultados falsos negativos, los cuales causan más problema que los falsos positivos, ya que evita la eliminación de aves portadoras, con colonización intestinal, que pueden mostrar títulos de anticuerpos fluctuantes.

El desarrollo del TA-ELISA, es importante, ya que existe la posibilidad de que en un futuro próximo, pueda ser utilizado como una prueba complementaria para el control y la erradicación de la tifoidea y pulorosis aviar en nuestro país. Sin embargo, se deben seguir realizando más investigaciones para esclarecer, cuales son las PME de *S. gallinarum* involucradas en la respuesta inmunológica, así como la respuesta cruzada con diferentes serotipos del género *Salmonella* que afectan a la industria avícola nacional.

6. CONCLUSIONES

1. El TA-ELISA mostró una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98.5 % en suero de pollos infectados y no infectados ($p < 0.05$).
2. Las medias de los títulos de anticuerpos detectados por el TA-ELISA, en cada muestreo, fueron diferentes en pollos infectados y no infectados ($p = 0.0001$).
3. El TA-ELISA se estandarizó usando $3 \mu\text{g/ml}$ de PME como antígeno, una dilución del suero problema de 1:9,375 y un tiempo de lectura de 35 min, diferenció pollos infectados experimentalmente con *S. gallinarum* de pollos no infectados ($p = 0.0001$).
- 4.- En los grupos de pollos infectados con *S. gallinarum* y *S. pullorum* en la fase experimental uno, donde se usaron dos dosis diferentes, el TA-ELISA fue más sensible y más específico que la prueba de aglutinación.
- 5.- De los grupos de pollos infectados en la fase dos; el TA-ELISA presentó mayor sensibilidad y especificidad con respecto a la prueba de aglutinación con antígeno K-polivalente en el grupo VI infectado con *S. gallinarum* FVB-323 y en el grupo VII y VIII el TA-ELISA se comportó igual que la prueba de aglutinación.
- 6.- El TA-ELISA fue más sensible y específico para detectar anticuerpos en la primera semana posinfección en los grupos VI y VII, y solo hasta los 14 días posinfección la prueba de aglutinación presentó porcentajes de seropositividad similares.
- 7.- La respuesta del TA-ELISA depende de la dosis infectante.
- 8.- La mayor parte de las cepas estudiadas mostraron un perfil electroforético común de PME principales (45, 37,5, 37, 36, 35 y 18 kDa) y solo mostraron variaciones menores dependiendo de la osmolaridad del medio de cultivo.

7. APENDICE

7.1. Trabajos derivados del proyecto de tesis.

1. Variabilidad electroforética de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum*. *Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Chihuahua 1992.*
2. Proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum*: Variabilidad electroforética y potencial en diagnóstico. *XVIII Convención Nacional de ANECA. México, 1993.*
3. Utilización de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* en ELISA para el diagnóstico de la tifoidea aviar. *IV Jornada Médico Avícola, México, 1993.*
4. 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, Jalisco, 1993.*
5. *Salmonella gallinarum*, outer membrane protein preparations in the diagnostic of fowl typhoid. *74th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago, Ill, USA, 1993.*
6. Desarrollo de un inmunoensayo enzimático para el diagnóstico de la tifoidea aviar, utilizando como antígeno proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum*. *XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Acapulco Gro. México, 1994.*

8. LITERATURA CITADA

- 1.- Acha, P. N., Boris, S. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª ed. *Organización Panamericana de la Salud*, Washington, USA. pp:158-166
- 2.- Adrew J. O'beirne and Harold R. C., 1979. Heterogeneous Enzyme Immunoassay. *J. Histochem. and Cytochem.* 27:1148-1162.
- 3.- Balley and Scott's., 1990. Methods for identification of etiologic agents of infectious disease: Diagnostic Microbiology, enterobacteriaceae 8th. *Mosby Company*. pp:363-385 USA.
- 4.- Barrow, P. A. and Lovell, A. M., 1989. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, and *S. pullorum* and *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* 57:3136-3141.
- 5.- Barrow, P. A., Berchieri A. and Al-Haddad O., 1992. Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum-S.pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 36:227-236.
- 6.- Bergey's manual of systematic bacteriology., 1990 vol. 1th, ed. Noel R. Krieg, John G. Holt. *Williams & Wilkin*, Baltimore. pp: 412-447.
- 7.- Bouzoubaa, K., Nagaraja K. V., Newman, J. A. and Pomeroy, B. S., 1987. Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.* 31:699-704.
- 8.- Bojorquez N. L., Ponce L. J., 1989., Aplicación de la vacuna *Salmonella gallinarum* cepa 9R por vía oral. *Reunión Nal. de Inv. Pecuaria*, México, D. F., p:56
- 9.- Bradford M. M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- 10.- Brito, F. J. R., Hinton, M., Stokes R. C. and Pearson, R. G., 1993. The humoral and cell mediated immune response of young chicks to *Salmonella typhimurium* and *S. kendougou*. *J. British Veterinary.* 149:225-234.

- 11.- Calderón, I., Lobos, S. R., Rojas, H. A., Palomino C., Rodríguez C. and Mora, G. C., 1986. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid fever in humans. *Infect Immun.* 52:209-212.
- 12.- Calva, E. and Puente, J. L., 1988. Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *Bio. Essays.* 9:173-177.
- 13.- Clarke, R. C. and Gyles C. L., 1993. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2nd ed. Edited by Carlton L. Gyles and Charles O. Thoen. Iowa/AMES, pp:133-153.
- 14.- Cowan, S. T., and Steel's, K. J., 1982. Manual for the identification of medical bacteria. 2th ed. Cambridge University Press. p:156-157.
- 15.- Diario Oficial., 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO 1993. Campaña nacional contra la salmonelosis aviar. 1º de Septiembre. SARH, México.
- 16.- Díaz A. E., Marin C., Alonso B., Aragon V., Pérez S., Pardo M. y Col., 1994. Evaluation of serological test for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J. of Clinical Microbiology.* 32:1159-1165.
- 17.- Delamer, H. M., 1980. Preparación de un antígeno pullorum de alta sensibilidad y especificidad. *V convención de ANECA.* p:230-232.
- 18.- Dunn, C. and Martin, W. J., 1971. Comparison of media for isolation of *Salmonellae* and *Shigellae* from fecal specimens. *Appl. Microbiol.* 22; 17-22.
- 19.- Edwards P R., Ewing W H., 1972. Identification of enterobacteriaceae, 3th ed. Burgess Publishing.
- 20.- Fraizer, N. M., 1980. Application of microtiter test on *Salmonella gallinarum* vaccinated flocks field report. *V convención ANECA.* pp:226-229.
- 21.- Freeman, B. A., 1990. Morfología y estructura de las bacterias. 22ª ed. Microbiología de Burrows. Interamericana McGraw-Hill, México. pp:17-56.

- 22.- Galdiero, F., Tufano, M. A., Sommese, L., Flore A. and Tedesco F., 1984. Activation of the complement system by porins extracted from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 46:559-563.
- 23.- Galdiero, F., Tufano, M. A., Rossi, F., Galdiero M., Masiello S. and Di Rosa M., 1990. Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 58:3283-3186.
- 24.- Gast, K. R., 1994. Aplicación de modelos experimentales para comprender y detectar las infecciones por *Salmonella enteritidis* en pollos. II Curso de *Salmonella enteritidis*. ANECA, México. pp:1-7.
- 25.- Guesdon, J. L., Ternynck T. and Avrameas S., 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Histochem Cytochem.* 27:1131-1139.
- 26.- Godoy, V. O., Tellez, I. G., Quintana, L. J. A., Urquiza, B. O., Salado, C. R., y Hargis, B. M., 1994. Patogenicidad de una cepa de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda de un día de edad, en una infección experimental. *Tesis de lic. FMVZ-UNAM*.
- 27.- Hassan, O. J., Barrow P. A., Mockett, P. A. and Mcleod, S., 1990. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. *Veterinary Record.* 126:519-522.
- 28.- Hassan O. J., and Curtiss R., 1994. Virulent *Salmonella typhimurium* induces lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. *Infect. Immun.* 62:2027-2036.
- 29.- Isibasi, A., V. Ortiz, M. Vargas, J. Paniagua, C. González, J. Moreno and J. Kumate., 1988. 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.
- 30.- Jacques Nicolet., 1985. Compendium der Veterinarmedizinischen Bakteriologie. *Paul Parey, Berlin und Hamburg*.
- 31.- Kim, C. J., Nagaraja K. V., Pomeroy B. S., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.* 52:1069-1074.

- 32.- Laemmli U K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- 33.- Macario A. J. L., 1986. Monoclonal antibodies against bacteria. *Academic Press, Inc. USA*, 3:29-42.
- 34.- Mancera, M. A., Vázquez, N. J., 1995. Fagotipificación de cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas de aves en México. *XXVI Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Ver. México*. p:W-89.
- 35.- Matsuyama, S. I., Inokuchi, K. and Mizushima S., 1984. Promoter exchange between *OmpF* and *OmpC*, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Echerichia coli* K/12. *J. Bacteriol* 158:1041-1047.
- 36.- Merchant, I. A., Packer, R. A. 1980. *Veterinary bacteriology and virology* 7th ed. *Iowa State University Press. Ames, Iowa*. p:299-332
- 37.- Miranda, R. A. L., 1989. Evaluación de los Métodos de Diagnóstico de Tifoidea Aviar en Aves Pesadas Semimaduras. *Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. Zoot. UNAM. México*.
- 38.- Morton, R. F., Hebel, J. R., 1985. Selección; Sensibilidad y Especificidad. Bioestadística y Epidemiología. 2ª ed. *Interamericana, México*. pp:59-67.
- 39.- Nielsen K. H., Kelly L., Gall D., Balservicius S., Bosse J., Nicoletti P. and Kelly W., 1993. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Agric. Canada, Animal Diseases Research Institute. Ontario, Canada*, pp:1-31.
- 40.- Nikaido, H., and M. Vaara., 1985 Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
- 41.- Nikaido H., Nakae T., 1979. The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Adv. Microbio.l Physiol.* 20:163-250.
- 42.- Nikaido H., 1994. Isolation of Outer Membrane. Methods in Enzimology. *Academic. Press, Inc.* 235:225-252.

- 43.- Padrón, M. N., 1991. Control y prevención de la tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. *II Jornada Médico Avícola. México.* pp:128-149.
- 44.- Padrón N. M., 1992. Diagnóstico de *Salmonella enteritidis*. Curso de actualización sobre criterio diagnóstico en la práctica avícola. *ANECA, México.* pp:37-39.
- 45.- Pang T, Calva E., Punjabi N. and Rowley D., 1992. Report from an international symposium on typhoid fever. *Asian Pacific Journal and Immunology* 10:73-77.
- 46.- Puente, J. L., Verdugo-Rodríguez, A. and Calva, E., 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbol.* 5:1205-1210.
- 47.- Puente, J. L., D. Juárez, M Bobadilla, C. F. Arias and E. Calva. 1995. "The *Salmonella typhi* ompC gene: Structure and use as a carrier for heterologous sequences". Gene (en prensa).
- 48.- Rizo, Q. N., 1987. Como está integrada la avicultura nacional. *VII Curso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar.* Monterrey, N. L. México, pp:2-12.
- 49.- Rowe, R. and Hall M. L. M., 1989. Kauffmann-White Scheme. *Central Public Health Laboratory, London.*
- 50.- Ruiz C. M., 1957. Equipo perfeccionado para el aislamiento de *Brucella*, *Salmonella*, etc. por hemocultivo. *Bol. Oficina Sanitaria Panamericana*, 42:564.
- 51.- Schnaitman, C. A., 1974. Outer membrane proteins of *Echerichia coli*. Differences in outer membrane proteins due to strain and culture differences. *J. Bacteriol.* 118:454-464.
- 52.- Shaffer, M. F., Miller, K. C., Clemmer, D. I. and Bridges, J. H., 1957. Bacteriologic studies of experimental *Salmonella* infections in chicks. *J. Inf. Dis.* 100: 17-31.
- 53.- SARH., 1990. Modernización del campo: Programa especial de fomento a la ganadería. pp:3-20.
- 54.- SAS., 1990. SAS/STAR[®] User's Guide. 4th ed. *SAS Inst. Inc.*, Cary, North Carolina.

- 55.- Taiji N., 1985. Outer-membrane permeability of bacteria. *CRC Critical Reviews in Microbiology*. 13:1-62.
- 56.- Tijssen P., 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Elsevier Science Publishers B.V.* 15:20-30
- 57.- Towbin H., Staechelin, T. and Gordon J., 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:4350-4354.
- 58.- Tufano, M. A., Ianniello, R., Galdiro M., De Martino L., and Galdiero F., 1989. Effect of *Salmonella typhimurium* porins on biological activities of human polymorphonuclear leukocytes. *Microb. Pathog.* 7:337-346.
- 59.- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan V. R., 1987. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhi* in mice. *Infect. Immun.* 55:816-821.
- 60.- Uemura J. and Mizushima S., 1975. Isolation of outer membrane proteins of *Escherichia coli* and their characterization on polyacrylamide gel. *Biochim. Biophys. Acta* 413:163-176.
- 61.- UNA., 1994. Compendio de indicadores económicos del sector avícola. *Unión Nacional de Avicultores*. México, D. F. pp:3-46.
- 62.- Verdugo-Rodríguez A., Sierra, J., Ruiz, P. G. M. and Calva, E., 1989. Early diagnosis of typhoid fever (TF) by detection of specific serum antibodies to *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Abstr. Annu. Meet. ASM*. C-139.
- 63.- Verdugo-Rodríguez A., López, V. Y., Puente, L. J., Ruiz-Palacios, G. M y Calva, E., 1993. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 12: 248-254.
- 64.- Verdugo-Rodríguez A., Gam, L. H., Devi, S., Koh, C. I., Puthucheary, S. D., Calva, E. and Pang, T., 1993. Detection of Antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparation in typhoid fever patients. *Asian Pac. J. of All. and Immun.* 11:45-52.

65.- Verdugo-Rodríguez A. and Calva E., 1993. Denaturing treatment of *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations for improved immunodiagnosis of typhoid fever. *Aspac. J. Mol. Biol. Biotechnol*, 1:113-116.

66.- Verdugo-Rodríguez, A., Puente, G. J. L., Suárez, G. F and Quintana, L. J. A., 1994., Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar. *Noticiario de desarrollo tecnológico en alimentos (NODETEC)*, U.N.A.M., No. 2, México.

67.- Voller A., Bidwell D. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Rose NR, Friedman H, Fahey J. L., 1986. Manual of clinical laboratory immunology. *American Society for Microbiology, Washington, D. C.*, pp:99-109.

68.- Van Zijderveld F. G., van Ziderveld A. M. Z. B. and Anakotta J., 1992. Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. *J. Clin. Microbiol.* 30:2560-2566.