

22,  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“DETERMINACION DE LA EXISTENCIA DE  
PLASMIDOS EN AISLAMIENTOS DE *Salmonella*  
*enteritidis* FAGOTIPOS 4 Y 8 A PARTIR DE AVES  
DOMESTICAS Y SU ANALISIS EN EL PATRON  
DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA”

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

CARLOS /GARCIA VARGAS

ASESORES: DR. VICTOR R. TENORIO GUTIERREZ.  
M.C. MA. DE LOURDES ONTIVEROS CORPUS.  
COASESOR: M.V.Z. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

271791



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL  
 AVANZA DE  
 MEXICO

S. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES  
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Determinación de la Existencia de Plásmidos en Aislamientos de Salmonella enteritidis Fagotipos 4 y 8 a Partir de Aves Domésticas y su Análisis en el Patrón de Resistencia Anti--microbiana"

que presenta el pasante: Carlos García Vargas  
 con número de cuenta: 8831998-0 para obtener el TITULO de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de Octubre de 199 98

PRESIDENTE MVZ. José Rojo López

VOCAL MVZ. Gilberto Ochoa Uribe

SECRETARIO MVZ. Jorge Alfredo Cuéllar Ordez

PRIMER SUPLENTE MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Silviano Trejo Nuñez

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE  
BACTERIOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
FORESTALES Y AGROPECUARIAS (INIFAP), DE LA SECRETARÍA DE  
AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL (SAGAR).

"MUY POCOS POSEEN VALOR PARA SER JUICIOSOS, PUES SERLO,  
IMPLICA OLVIDARSE DE LA SEGURIDAD PERSONAL Y ENTREGARSE  
AL RIESGO DE VIVIR; ACEPTAR EL DOLOR COMO CONDICIÓN  
DE LA EXISTENCIA, CORTEJAR LA DUDA Y LA OSCURIDAD,  
ARMARSE DE TENACIDAD EN EL CONFLICTO Y ACEPTAR  
SIEMPRE LAS CONSECUENCIAS DE VIVIR Y DE MORIR"

Morris West.

## **D E D I C A T O R I A S**

A Don Walther García y su esposa, la señora Rosa Vargas:

*Ustedes que juntos soñaron en labrar la tierra  
para en el mañana poder cosechar sus frutos,  
que me apoyaron moral, espiritual y económicamente,  
a ustedes que no tendré manera alguna para pagar  
la gran herencia que hoy me dan en la vida,  
una profesión, Gracias mamá y papá.*

A los integrantes de la familia García Vargas: Jorge, Martha, Ofelia, Edgar y Walther.

*Por su apoyo incondicional que cada uno me ha brindado a su manera, se los agradezco hermanos.*

A mi novia: Jasdy Melgarejo Carranza.

*Con mucho amor. Tu que has compartido momentos de gloria y de guerra a mi lado, sin dar paso atrás a nuestros anhelos.*

## A G R A D E C I M I E N T O S

A los asesores de tesis: El Dr. Victor R. Tenorio Gutiérrez y la M. en C. Ma. de Lourdes Ontiveros Corpus.

Por su apoyo y confianza encaminado a la elaboración de este trabajo.

Al coasesor de tesis: El M.V.Z. Jorge A. Cuéllar Ordaz.  
Por valiosa colaboración y orientación

A los sinodales de tesis: M.V.Z. José Rojo López, M.V.Z. Gilberto Ochoa Uribe, M.V.Z. Jorge A. Cuéllar Ordaz, M.V.Z. Marco A. Mendoza Saavedra y M.V.Z. Silviano Trejo Núñez.

Gracias por el tiempo que dedicaron para la realización de este trabajo.

A los investigadores: Laura Hernández, Laura Jaramillo, Francisco Aguilar, Francisco Morales, Francisco Velázquez, Efren Díaz, Jesús Vásquez y Arturo Mancera.

Gracias por la amistad que me brindaron durante todo ese largo tiempo de trabajo en el laboratorio.

Al grandioso grupo de amigos Veterinarios: David López, Mauricio Vega, Abner Ríos, Sandra Duran y Adriana Acevedo.

Por esos momentos inolvidables al ser universitarios, y que de alguna manera alentaron el deseo de superación personal.

# ÍNDICE

## PÁGINA

### RESUMEN

1

### 1. INTRODUCCIÓN

3

#### 1.1 HISTORIA

4

#### 1.2 TAXONOMÍA

5

#### 1.3 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

5

#### 1.4 EPIDEMIOLOGÍA

6

#### 1.5 SIGNOS CLÍNICOS

7

#### 1.6 DIAGNÓSTICO

7

#### 1.7 ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS

8

##### AUTOTRANSFERENCIA

9

##### CLASIFICACIÓN (TAMAÑO)

10

#### 1.8 AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS

11

##### ELECTROFORESIS

11

#### 1.9 RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS

12

#### 1.10 IMPORTANCIA CLÍNICA

13

#### 1.11 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

14

#### 1.12 LA AVICULTURA NACIONAL

16

#### 1.13 USO DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DEL

##### CRECIMIENTO EN ALIMENTOS DE AVES DE POSTURA

17

### 2. OBJETIVOS

20

#### 2.1 OBJETIVO PARTICULAR

20

#### 2.2 OBJETIVOS GENERALES

20

### 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA

21

#### 3.1 SIEMBRA DE CULTIVOS

21

#### 3.2 AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS

21

#### 3.3 LIMPIEZA DE PLÁSMIDOS

23

#### 3.4 ELECTROFORESIS

23

#### 3.5 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

24



4. RESULTADOS	26
4.1 OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS	26
4.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS PLÁSMIDOS	31
4.3 RESISTENCIA ANTIBACTERIANA	34
5. DISCUSIONES	38
6. CONCLUSIONES	40
7. ANEXOS	41
8. BIBLIOGRAFÍA	45

## RESUMEN

Actualmente la avicultura nacional es acreditada como una de las alternativas más adecuadas para obtener proteína de origen animal altamente digestible y por ostentar un precio más económico por kilogramo de carne en el mercado, comparado con otras especies de animales. Por lo tanto se debe tener más en cuenta la investigación para la prevención de enfermedades que acosan a la producción avícola, evitando de esta manera cuantiosas pérdidas económicas, que las enfermedades ocasionan a los avicultores nacionales. La *Salmonella* se ha convertido en un tema muy importante en la industria avícola en los últimos años. Un serotipo en particular *Salmonella enteritidis* ha sido identificado como la causa principal de infecciones alimenticias en humanos en varios países, inclinándose en aumento en Norte América, Sud América y Europa. Se han identificado más de 2000 serotipos de *Salmonella*, siendo *S. gallinarum* y *S. pullorum* los serotipos que originan enfermedades muy severas a las parvadas aviarias (3, 16).

El propósito del presente estudio fue definir la existencia de DNA extracromosómico en 50 cepas de *Salmonella enteritidis* de origen aviar y además examinar su patrón de resistencia antimicrobiana. Se utilizaron 18 cepas de *Salmonella enteritidis* del fagotipo 4 y 32 del fagotipo 8, las primeras fueron aisladas en los estados de: México, Querétaro, Morelos, Puebla y Jalisco, y las del fagotipo 8 fueron obtenidas en los estados de: México, Coahuila, Durango, Morelos, Querétaro, Puebla y Oaxaca (19).

Se utilizó el método de Birboin y Doly de lisis alcalina para efectuar la extracción de plásmidos en las cepas de *Salmonella enteritidis* y se posteriormente se realizó la limpieza de estos plásmidos para eliminar los restos de proteína o RNA para obtener una mayor visualización de los plásmidos. En seguida se procedió a realizar la electroforesis de los plásmidos para su observación utilizando minigeles de agarosa al 0.6%. Justificando la presencia de plásmidos en cinco cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipo 4, una presentó cuatro plásmidos y las cuatro restantes sólo un plásmido; siete cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipo 8 tuvieron plásmidos, cinco presentaron un plásmido y en dos de ellas se

observaron cinco plásmidos. Los plásmidos presentaron una apreciable diferencia en el tamaño, que oscila entre 3513 y 34517 pares de base (25, 26).

A su vez se procedió a efectuar las pruebas de resistencia antimicrobiana a las cepas de trabajo utilizando la técnica de Difusión en Placa con Discos Impregnados basándose en la técnica de Kirby-Bauer. De las 50 cepas bacterianas el 4% presentó resistencia a amikacina, 8% a netilmicina, 22% a gentamicina, 24% a carbenicilina y el 64% a nitrofurantoina (22).

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente los países en desarrollo se enfrentan a grandes problemas, como lo es el satisfacer las necesidades de proteínas de origen animal que necesitan sus poblaciones en constante crecimiento. Una de las alternativas más adecuadas, es la producción avícola, debido a la gran cantidad de kilogramos de carne producidos en poco tiempo y el poco espacio ocupado por las aves con respecto a otras especies de animales. Los productos de las aves son fuentes excelentes de proteína animal necesaria para balancear nuestras dietas y proporcionar crecimiento saludable y dinámico a la población. La avicultura mexicana ha sido una de las actividades del subsector pecuario que ha presentado un fuerte dinamismo. En el período 1972-1995, la tasa de crecimiento promedio anual para la producción de huevo fue de 5.75% y para la producción de carne de pollo fue de 8.59%, porcentajes por encima de la tasa de crecimiento de la población, la cual fue en ese período del 2.5%, lo que determinó una mayor disponibilidad de huevo y carne de ave, pasando en 1972 de 6.36 kg de huevo por habitante a 15.9 kg en 1995, con respecto a carne de pollo el consumo por habitante en 1972 fue de 3.9 kg, y en 1995 de 15.7 kg, por persona. Sin embargo, la avicultura nacional es afectada por diversos factores que impiden se logre la producción deseada. Entre ellos uno de los puntos más importantes, las enfermedades, a las que la industria avícola se encuentra constantemente expuesta (3, 13, 18).

La producción avícola constituye el reservorio más grande de microorganismos de *Salmonella* que prevalece en la madre naturaleza. Estas bacterias son más comúnmente mencionadas en aves y productos avícolas, en relación con las demás especies animales, esto se debe en parte a la gran población mantenida en riesgo y a los activos programas nacionales para su aislamiento e identificación (10, 16).

La salmonelosis aviar es un término que se emplea para designar un gran grupo de enfermedades agudas y crónicas en aves provocado por uno o más miembros del género bacteriano *Salmonella*, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (10).

En México, se encuentran principalmente problemas de tifoidea aviaria, la cual ha venido ocasionando cuantiosas pérdidas económicas a la avicultura a través de los años, el problema

lejos de solucionarse, ha venido empeorando cada vez más, ya que recientemente se puede localizar en la mayoría de los estados del país, tanto a nivel de reproductoras pesadas y semipesadas, como de ligeras. Algunos tipos de *Salmonella enteritidis* tienen portadores específicos y causan enfermedades muy severas en los pollos, tales como la pulorosis y la tifoidea. La mayoría pueden ocurrir en varias especies de animales y a menudo no causan ninguna enfermedad en particular. De tal manera que este es uno de los problemas con *Salmonella enteritidis*, ya que es difícil detectarla en los pollos porque normalmente la enfermedad no se puede notar, y ni siquiera el sistema inmune presenta una reacción fuerte. Resaltando el problema por el aspecto de salud pública (10, 16).

## 1.1 HISTORIA

En 1883, en la provincia de Frankehausen, Alemania, se realizó el aislamiento de *Salmonella enteritidis* durante una epidemia alimenticia (27).

En 1885, Smith y Salmon aislaron una bacteria del grupo *Salmonellae* a partir de cerdos muertos de peste. Creyendo que el germen era el causante de la muerte de los cerdos, por lo cual le dieron el nombre de *Bacillus cholerae suis*. Hasta 1904 se siguió creyendo que esta bacteria producía la peste porcina, pero en el mismo año, Schweinitz y Dorset descubrieron que la verdadera causa de la enfermedad era un virus filtrable. En 1899 el agente etiológico de la pulorosis fue descubierto por Rettger y lo descubre como una "septicemia mortal en pollitos". Posteriormente, lo designó como "diarrea blanca" y poco después se tomó el término de "diarrea blanca bacilar" (6, 10). Garther en 1888, a partir de un joven muerto de gastroenteritis por haber consumido carne cruda procedente de una vaca enferma aisló un germen al cual se le dio el nombre de *Bacillus enteritis*. En el año de 1935, se reporta el primer aislamiento de *Salmonella enteritidis* de aves de corral (8, 10).

El nombre genérico *Salmonella* fue propuesto por Lignieres, en 1900, en honor a D. E. Salmon, primer jefe del Bureau of Animal Industry de los Estados Unidos (2).

## 1.2 TAXONOMÍA

La taxonomía del género *Salmonella* es descrita por el Comité Internacional sobre Bacteriología Sistemática con los siguientes nombres de especies: *S. typhi*, *S. cholerae-suis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. arizonae*. Con excepción *S. typhi* y los serotipos paratíficos (en particular A y C), que son especie-específicos para el hombre, todas las demás infecciones por *Salmonella* se pueden considerar como zoonosis (2).

El género *Salmonella*, se compone por más de 2100 serotipos, incluyendo el grupo Arizona hinshawii. Antes de 1966 casi todas las salmonellas móviles se designaban con un nombre de serotipo (serovariedad) el cual correspondía al sitio geográfico del cual era aislada esta. Hasta ahora se han clasificado los serotipos basándose principalmente en las características de los antígenos somáticos "O" para la formación de grupos y en los antígenos "H" o flagelares para la identificación de la especie o serotipos. Las salmonelas son bacilos no esporulados, Gram-negativos, están estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los géneros de la familia Enterobacteriaceae. Por lo general la mayoría son móviles, las únicas especies excluidas son: *Salmonella pullorum* y *S. gallinarum* que son específicas del huésped (4, 10).

## 1.3 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Producen ácido y gas de la glucosa, maltosa, manitol, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, trehalosa, dextrina, glicerina, dulcitol y sorbitol. No fermentan la lactosa, sacarosa, inulina, rafinosa, adonitol, inositol y salicina. No forman indol, ni coagulan la leche, ni licúan la gelatina, producen hidrógeno sulfurado (4, 9, 10, 11). Sobreviven en forma libre en agua durante largos períodos, son resistentes a la congelación en agua y a ciertos agentes químicos, por ejemplo el verde brillante, el tetratiónato sódico y el deoxicolato sódico: tales compuestos inhiben a los bacilos coliformes y son, por lo tanto, útiles para el

aislamiento de salmonelas a partir de heces fecales (9, 10).

## 1.4 EPIDEMIOLOGÍA

El hábitat de las salmonelas normalmente se presenta en el aparato digestivo tanto del humano como de los animales. Estas bacterias mantienen una cadena de contagio directamente de un animal a otro o puede ser también indirectamente a través de un medio contaminado a consecuencia de la eliminación de los gérmenes (20, 28, 29).

No hay duda alguna sobre el hecho de que el hombre contrae la infección al momento de consumir productos pecuarios contaminados por salmonelas, pero también es posible la transmisión directa de hombre a hombre. Aunque algunas veces se denomina envenenamiento alimentario, es una enfermedad gastrointestinal debida a la diseminación alimentaria por *Salmonella* y es más adecuado llamarla infección por alimentos contaminados. A pesar de los grandes esfuerzos de investigadores y agencias de salud pública, la incidencia de salmonelosis ha aumentado continuamente durante los últimos, convirtiéndose en la causa más común de gastroenteritis bacteriana de origen alimenticio en el hombre, anualmente se reportan más de 40,000 casos de salmonelosis humana (8, 10, 15, 16).

El contagio directo de los animales al hombre (animales de compañía) es posible, pero no ocupa el primer plano. Los alimentos más importantes que funcionan como vehículo de transmisión de salmonelosis son: carne de aves, huevos y sus productos derivados (huevos en polvo, pastelería, helados, cremas, etc.), las carnes de vacuno y cerdo, la leche y lacticios (10, 13, 15).

Las vías de contagio en los animales son un tanto complejas. El ciclo principal está abarcado por los piensos contaminados por harinas (carne, huesos, sangre, pescado, en parte importadas) o por deyecciones, los pastizales igualmente contaminados. La resistencia de

las salmonelas varía según las circunstancias en las que se encuentren, por ejemplo, en el agua pueden permanecer vivas hasta por tres semanas y en las plantas durante meses o años, cuando están en materias protegidas por una costra (por ejemplo, heces fecales desecadas) pueden permanecer durante meses (10, 14, 15).

La leche y los huevos son productos alimenticios que fácilmente pueden contaminarse si no se tienen las medidas sanitarias correspondientes, por ejemplo, la leche puede contaminarse con heces fecales al momento del ordeño. Referente a los huevos, las salmonelas pueden permanecer en la cloaca de las aves y al momento de ovopositar contaminan la cáscara y penetran al interior a través de sus poros (10, 15).

## 1.5 SIGNOS CLÍNICOS

Los pollos que son infectados por *Salmonella enteritidis* no presentan signos clínicos específicos, pero los pollitos con 1 a 4 semanas de nacidos presentan mayor susceptibilidad pudiendo llegar su mortalidad hasta un 20%, y muy en especial cuando el fagotipo de *Salmonella enteritidis* es 4 (28). Se presenta retraso en el crecimiento, poca ganancia de peso, ojos cerrados, alas caídas, plumas erizadas, anorexia marcada, polidipsia, diarrea acuosa profusa de color amarillento, aspecto sucio en las plumas de la cloaca, decaimiento y muerte. En gallinas de postura no se observan signos clínicos, pero se puede presentar una reducción en la producción de huevo, afectando también la fertilidad, incubabilidad e índice de conversión alimenticia, la mortalidad puede estar relacionada con peritonitis y ooforitis (7, 10, 23, 29).

## 1.6 DIAGNÓSTICO

El aislamiento bacteriológico puede realizarse a partir de órganos internos como: hígado,



bazo, corazón , ovarios, sangre, buche, ciegos, oviducto, vesícula biliar, testículo; también de cama, polvo, plumas, nidos, equipo, huevos, fosas de estiércol, maquinaria, entre otras, en resumen de todo material que esté en contacto con las aves contaminadas (6, 10, 29).

Para realizar el aislamiento bacteriano se puede emplear caldo Selenito o caldo Tetracionato, estos caldos se incuban a 37° C durante un período de 18 a 24 horas. En caso de sospechar de colonias contaminantes se pueden incubar a 42° C (4, 5).

Los medios sólidos más comunes para el aislamiento de *Salmonella* son: Agar Verde Brillante, Agar Verde Brillante con Sulfa, Agar Mac Conkey. Los cultivos bacterianos se incuban a 37° C durante un período de 18 a 24 horas. Las principales pruebas bioquímicas que se utilizan para la identificación del género *Salmonella* son: Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), Urea y medio Movilidad Indol Ornitina (MIO) (4, 5, 29).

El diagnóstico también puede realizarse por métodos serológicos para la detección de anticuerpos, tales como aglutinación en placa y microaglutinación con el antígeno k-polivalente (4, 5, 6).

## 1.7 ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS

No todo el DNA de las bacterias está en la forma de un único cromosoma circular; hay una pequeña porción del DNA celular (que a veces representa sólo del 0.1 al 0.2 %) que está fuera del cromosoma, en forma de plásmidos o episomas. Estas estructuras de DNA subsidiarias se asemejan a los cromosomas en que son capaces de una autorreplicación autónoma dentro de la célula bacteriana, en otras palabras en que son replicones. Los plásmidos están también adheridos a la membrana plasmática bacteriana, e igual que los cromosomas bacterianos, son unas moléculas circulares cerradas dobles (1, 21) Sin embargo, los plásmidos se diferencian de los cromosomas en que no son indispensables para la existencia de la bacteria y en que se pueden eliminar de la célula bacteriana por un

proceso de curación, que consiste en el tratamiento de las células por unos reactivos entre los que están la acriflavina, y otras acridinas, la rifampicina, el bromuro de etidio (altamente carcinogénico) y los iones de cobalto (1, 21).

La ocurrencia de los plásmidos se hace presente cuando los genes que llevan le confieren nuevas propiedades al huésped, y es entonces cuando son asignados por estas propiedades (1, 21).

Los plásmidos más conocidos son:

1. Los factores sexuales (plásmidos F): Estos son los mediadores de la transferencia cromosómica.
2. Los factores Col: Estos transportan genes que provocan que sus huéspedes produzcan colicinas (bacteriocinas), proteínas que son toxinas letales para las bacterias coliformes.
3. Los factores de resistencia (R): Estos transportan genes que le confieren a la célula huésped resistencia a diferentes agentes antimicrobianos, como los antibióticos. Un sólo plásmido, por ejemplo, puede transportar genes separados para la resistencia a la estreptomicina, el cloramfenicol, las tetraciclinas y a las sulfonamidas (Los factores R, fueron descubiertos en 1959 en el Japón como la causa de la resistencia farmacológica en las bacterias entéricas).
4. Los plásmidos penicilinasas de los estafilococos: Estos plásmidos transportan un gen que origina que la célula bacteriana produzca una penicilinasas potente, haciéndola resistente, por lo tanto, a la penicilina. Difieren de los factores R en que no son capaces de transmitirse por conjugación. Sin embargo, pueden ser transportados de célula a célula por transducción mediada por fagos.
5. Los plásmidos degradantes de las *Pseudomonas*: Estos plásmidos transportan grupos de genes que determinan las enzimas de las rutas catabólicas, como las enzimas de la degradación del alcanfor, tolueno, octano y ácido salicílico, y
6. Los plásmidos Hyl, productores de alfa hemolisinas (1, 21).

## AUTOTRANSFERENCIA

Muchos de los plásmidos de las bacterias Gram-negativas se conjugan: ellos transportan

los genes (denominados genes *tra*) que median su propia transferencia por el proceso de conjugación celular (9, 21).

La transferencia de plásmidos en las bacterias Gram-negativas comienza con la expulsión del pilus (filamentos sexuales), que es una hebra de proteína, que tiene su longitud varias veces mayor que el de la célula. El pilus se adhiere a las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas, poco después, las dos células quedan unidas y en un punto hay contacto directo de pared a pared, posiblemente por retracción del pelo dentro de la célula donadora (9, 21).

Después de la formación de un par específico el plásmido sufre un tipo especial de replicación llamada "replicación por transferencia", pasando una cadena del donador al interior del receptor y la otra permaneciendo en la célula donadora. Las cadenas complementarias se sintetizan en el progenitor y en el receptor en forma simultánea con la transferencia. Las moléculas hijas son redondeadas por acción de una ligasa inmediatamente después de que la replicación por transferencia ha terminado (9, 21).

Ningún material que no sea DNA o citoplasma alguno pasa del donador al receptor. Las parejas copulantes se separan eventualmente, resultando dos células con plásmidos en donde antes sólo había una (9, 21).

## CLASIFICACIÓN (TAMAÑO)

Los plásmidos se dividen en dos clases principales, los grandes plásmidos, de 60 a 120 kilobases de longitud que son en su mayor parte conjugativos (llamados también autotransmisibles), es decir, codifican dentro de una célula para un aparato destinado a su propia transferencia, por contacto a otra célula. Los pequeños plásmidos, de 1.5 a 15 kilobases de longitud (kb), no son conjugativos, pero pueden ser a menudo movilizados para la transferencia por un plásmido conjugativo en la misma célula (21).

## 1.8 AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS

Para lograr conocer la presencia de plásmidos, es necesario separar el DNA de la bacteria con métodos especiales, utilizando enzimas que favorecen la liberación del material genético, también empleando detergentes o compuestos orgánicos que sean capaces de destruir la pared celular bacteriana. Para determinar el tamaño de los plásmidos se establece una relación entre el número de pares de base (pb) y la movilidad relativa de estos fragmentos en las placas de gel utilizadas en la electroforesis, empleando marcadores de referencia en las placas de gel (17, 21, 25)

## ELECTROFORESIS

La electroforesis, es un proceso en el que el gradiente de potencial produce el transporte de moléculas cargadas. Las moléculas de DNA, RNA y proteína pueden separarse de acuerdo a su tamaño. esta técnica se basa en la razón de que las moléculas en solución se mueven en un campo eléctrico con una velocidad determinada por la relación entre su carga y su masa (17, 21).

Generalmente, los ácidos nucleicos en solución tienen carga negativa debido a la ionización de sus grupos fosfato. Por lo tanto, al someter DNA en una placa de gel (material semisólido de agarosa) en campo eléctrico, las moléculas migrarán hacia el electrodo positivo (17, 21).

En estos geles de agarosa, el tamaño del poro es un factor limitante de la velocidad de migración de las moléculas a su través. Los ácidos nucleicos que mantengan idéntica relación carga-masa se separarán en base a su longitud, moviéndose los mayores más lentamente a través de los poros del gel. Los geles suprimen las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, favoreciendo una separación más efectiva (17, 21).

Para poder observar las bandas de DNA en los geles de agarosa, estos se deben sumergir, después de realizada la electroforesis, en el colorante bromuro de etidio el cual una vez unido al DNA, es fluorescente a la luz ultravioleta (17, 21).

## 1.9 RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS

La resistencia a los antibióticos es un problema serio, porque en las infecciones humanas se ha comprobado su aumento (especialmente la resistencia múltiple). Trátase de un fenómeno determinado por los plásmidos, que se transmite con facilidad a otras enterobacteriáceas (y particularmente a la inversa). Se sabe que los animales de engorde albergan muchos plásmidos determinantes de resistencia en su flora colibacilar. Por otro lado, en algunas epidemias humanas ha quedado demostrado también que las salmonelas habían adquirido su resistencia en los animales. Pero en muchos casos no hay relación entre estos plásmidos y los de los animales en las salmonelosis humanas. Aunque la distribución de la resistencia varía con la cepa y la región en las salmonelas aisladas del hombre, parece ser que *S. typhimurium* es la afectada con mayor frecuencia. La resistencia única es la regla (sulfamidas, tetraciclinas); la múltiple es más rara. Las cepas de salmonelas aisladas en todos los brotes epidémicos son multirresistentes, lo cual ha motivado las especulaciones acerca de si los plásmidos de resistencia son también portadores de informaciones para la virulencia (20, 31).

Los mecanismos genéticos mediante los cuales las bacterias pueden hacerse resistentes a los medicamentos son: 1. Mutación a la resistencia medicamentosa: Las mutaciones que se presentan en los genes del cromosoma bacteriano pueden conferir a la célula resistencia a los medicamentos. 2. Recombinación: Una vez que ha aparecido una mutante resistente a los medicamentos en una población de células bacterianas, aquella puede ser transferida a las otras células por cualquiera de los mecanismos siguientes: transformación, transducción

o conjugación y por alta frecuencia de recombinación (H.F.R.). La recombinación entre dos células, cada una resistente a diferente medicamento, puede producir una célula resistente a ambos. 3. Adquisición de plásmidos: Puesto que muchos de los plásmidos son autotransferibles y pueden movilizar otros que no lo son, la resistencia a los medicamentos puede diseminarse entre una población de bacterias sensibles en forma epidémica. Los factores R se recombinan uno con otro frecuentemente, produciendo combinaciones nuevas de determinantes de resistencia (9, 21).

La mayor parte de la resistencia gobernada por plásmidos está mediada por inactivación enzimática del medicamento (por ejemplo, por acetilación o fosforilación), mientras que la resistencia mediada por cromosomas refleja habitualmente una afinidad disminuida de su molécula blanco para el medicamento. Estos hallazgos son compatibles con el hecho de que los plásmidos no son (por definición) indispensables para la célula (9, 21).

## 1.10 IMPORTANCIA CLÍNICA

La facilidad con la cual los plásmidos pueden ser transferidos de célula a célula y la intensa selectividad que la quimioterapia ha ejercido en la resistencia medicamentosa, se han combinado para producir resultados impresionantes. En investigaciones recientes se han encontrado evidencias de similitud en las huellas digitales del DNA de plásmidos obtenidos de humanos y de animales en la región noreste de Estados Unidos (20, 31).

El uso de antibióticos como suplementos alimentarios para animales domésticos han conducido al aumento considerable (por selección) en los factores R entre la flora Gram-negativa normal de tales animales, y dichos factores R son transmitidos al humano. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo en Inglaterra mostró mayor frecuencia de bacterias que portaban factores R de resistencia múltiple en las heces de los granjeros que estaban en contacto con los cerdos alimentados con antibióticos, en relación con un grupo control que

estuvo en contacto con cerdos alimentados sin antibióticos (9, 31).

Es de importancia recordar que aunque los antibióticos como aditivos nutricionales ayudan a controlar ciertos factores que limitan el crecimiento y conversión alimenticia, no deben considerarse como sustitutos del buen manejo de la higiene y sanidad del medio ambiente (12, 18).

## 1.11 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La salmonelosis es una de las enfermedades que tiene ocurrencia universal en todas las especies, y durante los últimos años su frecuencia infecciosa ha aumentado notablemente (2, 8, 30).

Los serotipos de *Salmonella* que están adaptados a las aves domésticas son: *pullorum* y *gallinarum*, pero estos son poco patógenos para el hombre, sin embargo, hay información acerca de casos de salmonelosis en niños causadas por estos serotipos. A pesar de la implementación a nivel mundial de programas de erradicación, bioseguridad, vacunación, limpieza, desinfección y medicación, y de los esfuerzos en el ámbito de la educación pública para promover prácticas de seguridad en el manejo de los alimentos, la salmonelosis continúa afectando a la industria avícola (14, 24, 27, 30).

Se han rastreado cepas de *Salmonella* que ocasionan gastroenteritis transmitida por los alimentos en los productos hechos con huevos crudos como natillas, pasteles de crema, merengues, tarta y ponche de huevo (egg nog); también es elevado el número de infecciones por el consumo de carne de pollo y de cerdo contaminadas. Este tipo de epidemias son el origen de una morbilidad y mortalidad con una economía agobiante, siendo particularmente más severa la enfermedad cuando infecta a los infantes, personas de edad madura y los pacientes inmunodeprimidos (8, 13, 24, 27, 28).

Actualmente, *Salmonella enteritidis* ha reemplazado a *Salmonella typhimurium* como la

más prevaleciente serovariedad aislada de humanos en varios países europeos. Cabe mencionar que en estos países las infecciones por *Salmonella enteritidis* fagotipo 4 se han incrementado en aves de corral y humanos, mientras que la prevalencia de infecciones debido a otros fagotipos de *Salmonella enteritidis* y otras serovariedades de *Salmonella* han permanecido igual o han llegado a declinar. En los Estados Unidos en 1993, a *Salmonella enteritidis* se le atribuía el 21% de las infecciones por salmonelosis en humanos siendo el fagotipo 8 como predominante en dichas infecciones. Ya en 1996, se dio a conocer aislamientos predominantes del fagotipo 4 a partir de aves comerciales en la región Suroeste de los Estados Unidos (24). De acuerdo a un estudio realizado por El Centro de Enfermedades de Información Obligatoria, se calcula que la incidencia real de salmonelosis humana en Estados Unidos puede alcanzar de los 2 a 4 millones de casos al año (16). En Canadá, también predominan las infecciones por *Salmonella enteritidis* fagotipo 8; los aislamientos de *Salmonella enteritidis* en humanos variaban entre 4.2 y 9.2% del total de aislamientos de *Salmonella* entre 1976 y 1989, pero más recientemente los porcentajes han aumentado a un 12.5% en 1991, con lo cual *Salmonella enteritidis* ha permanecido como la segunda infección más común después de *Salmonella typhimurium*, la cual mantiene un 20.3% del total de aislamientos de *Salmonella* (24).

En México, los conocimientos acerca de la epidemiología por infecciones de *Salmonella enteritidis* en la avicultura comercial se empezaron a generar hacia finales de 1994, los fagotipos que fueron identificados son el 4 y el 8 en algunos estados de la república, principalmente los de la zona central. Ya en 1996, se dieron a conocer en base a una investigación, aislamientos de *Salmonella enteritidis* a partir de muestras de tejido de pollo de engorda, aves reproductoras, aves de postura y de embrión picado no nacido de pollo de engorda. Obteniéndose los fagotipos 4, 13a, 28; los fagotipos 4 y 13a fueron detectados tanto en pollo de engorda como en gallinas reproductoras; y en las gallinas de postura se aislaron los fagotipos 4 y 28 (30). En base a otra investigación se logró el aislamiento de 140 cepas obtenidas hasta finales de 1995, y se presentó este reporte en la XXI Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANEAA), los fagotipos que fueron identificados son el 2, 4, y 8. Los aislamientos de fagotipo 4 fueron capturados de



los estados de México, Querétaro, Morelos, Puebla y Jalisco. El fagotipo 8 del estado de México, Coahuila, Durango, Morelos, Querétaro, Puebla y Oaxaca; el fagotipo 2 únicamente del estado de Chiapas. Las cepas de los fagotipos 4 se obtuvieron de órganos de aves reproductoras y pollo de engorda, y los fagotipos 2 y 8 se recuperaron de aves progenitoras, reproductoras, postura comercial, pollo de engorda, plumón de nacedora y huevo (19).

## 1.12 LA AVICULTURA NACIONAL

La avicultura mexicana ha sido una de las actividades del subsector pecuario con mayor crecimiento. De 1972 a 1995 la producción de huevo creció a una tasa promedio anual del 5.75% y el crecimiento de carne de pollo fue de 8.59%, tasas que son superiores a la tasa de crecimiento promedio anual de la población, la cual fue en ese mismo período de 2.5%, lo que determinó, para el caso de huevo para plato, un aumento en el consumo por habitante que pasó en 1972 de 6.36 kg a 15.9 kg en 1995. Con referencia a pollo de engorda, el consumo por habitante en 3.975 kg en 1972 para pasar en 1995 a 15.7 kg. (3).

La proteína derivada de los productos avícolas al ser una de las más baratas en el mercado, ha determinado en el consumidor mexicano, hasta cierto punto, que su patrón de consumo cambie en favor de los productos avícolas, y poniendo en detrimento la demanda de carne de cerdo. En 1980, el consumo de este producto fue de 14 kg, por persona, en 1994, el consumo se contrajo hasta 9 kg, dándose un estancamiento en el consumo de carne de cerdo (3).

Por otro lado, es relevante destacar que la avicultura nacional viene presentando una mayor concentración de capitales, así por ejemplo, en 1995 cinco empresas productoras de pollo de engorda aportaron el 50% de la producción nacional y en huevo para plato solamente diez empresas aportaron el 40% de la producción nacional. Asimismo, y sobretodo en pollo de engorda, a partir de mediados de los 80 se vienen integrando asociaciones entre avicultores capitalistas integrados y granjas medianas, pero sobre todo con

las pequeñas, lo que les ha permitido a las primeras liberar recursos financieros en inversiones de activos fijos, y gastos de operación para "colocarlos" en las cadenas de comercialización del producto final o de adquisición de insumos, transformándose no solamente en productoras avipecuarias, sino también en comercializadoras de insumos y productos finales (3).

En la avicultura nacional hay una mayor participación del capital foráneo, transnacionalizando la actividad, llegando a niveles donde el 100% del capital de la empresa es extranjero, como en el caso de *Pilgrim's Pride*. El análisis histórico presenta la total dependencia de la avicultura nacional con el exterior, en lo referente al material genético ultraespecializado y al de las compras foráneas de sorgo y soya que en el período 1972-1994 crecieron a una tasa promedio anual del 12.78% y 28.12% respectivamente (3).

Aún con la devaluación de 1994, la avicultura mexicana se ha visto en la penosa necesidad de seguir importando material genético ultraespecializado, así como pastas de aves, ya que estas mercancías presentan una alta falta de elasticidad en las importaciones. El que se tenga que importar aún con devaluaciones, obedece a que el material genético no se produce en el país, y para las pastas la producción interna es sumamente marginal (3).

### **1.13 USO DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO EN ALIMENTOS DE AVES DE ENGORDA**

Los promotores del crecimiento son compuestos (antimicrobianos, agentes sintéticos o mezclas de éstos), que suministrados a los animales aumentan su crecimiento y eficiencia alimenticia, disminuyendo a la vez la morbilidad y mortalidad. Estos compuestos son agregados en pequeñas cantidades a la dieta (menos de 55 partes por millón) (12).

Desde los años 50's la capacidad de los antimicrobianos para aumentar el crecimiento, ha sido aprovechada en la producción pecuaria. Los antibióticos usados como aditivos nutricionales deben considerarse como medios para estabilizar y mejorar el comportamiento

productivo de los animales, resultando ser eficaces para reducir infecciones subclínicas promoviendo de esta manera un ambiente adecuado para el rápido crecimiento y desarrollo del animal (12).

Existen algunas evidencias de que el uso continuo del mismo antibiótico durante períodos prolongados puede traer como consecuencia la disminución en los efectos de eficiencia productiva esperados, por lo tanto, se recomienda usarlos en forma rotativa y en los diferentes tipos que se encuentran en el mercado. En general, los animales jóvenes son los que responden más eficientemente al suministro de antibióticos en la dieta que los adultos. Por lo tanto, se emplean más en las raciones alimenticias de iniciación y crecimiento que en las de mantenimiento (12).

En la producción avícola nacional, el uso de vacunación ofrece un método para prevenir que se establezcan muchas enfermedades avícolas, pero también el uso de antibióticos son abundantemente utilizados para ayudar a aliviar los síntomas de un vasto número de enfermedades que sufren las parvadas (12, 18, 31).

La mayoría de los antibióticos se suministran en la ración. A pesar de que en algunos casos se les agrega al agua de modo que alcancen el aparato digestivo y el torrente sanguíneo con mayor rapidez, ya que algunas aves no comen pero si beben durante el curso del brote de una enfermedad grave; en otros casos, ciertos antibióticos pueden ser inyectados (12, 18).

Los análisis calculados en dos alimentos para aves de engorda son (12):

Iniciador		Finalizador	
Proteína	22%	Proteína	18%
Grasa cruda	3.5%	Grasa cruda	5%
Fibra cruda	3.0%	Fibra cruda	3%
Energía	3 000 K/cal.	Energía	3 150 K/cal.

Ambos alimentos son a base de sorgo, soya, harina de pescado, aceite de soya ortofosfatos, vitaminas, premezclas; así como también se le adicionó L-lisina y metionina.

Ejemplo de las dosis recomendadas por los Laboratorios que producen los promotores del crecimiento, son (12):

a) Avoparcina (Avotan). Producido por Laboratorios Aditivos y Premezclas, a dosis de 10 ppm (partes por millón), tanto en el alimento iniciador como el alimento tipo finalizador.

b) Bacitracina (Bacitracina de Zinc). Se suministra tanto en el agua como en el alimento, usada principalmente durante períodos de tensión y para enterítis necrótica.

c) Clorotetraciclina (Aureomycin). Se emplea en el alimento y agua, de ligera acción coccidicida. No deben ser proporcionadas las concentraciones por arriba de 100 g. por tonelada para aves de postura. A concentraciones más altas no se debe alimentar continuamente por más de cinco días a pollitos jóvenes.

d) Eritromicina (Gallimycin 50). Suministro en el alimento, agua e inyectable.

e) Virginiamicina (Stafac). Producido por Laboratorios Proveedores Pecuarios, a dosis de 15 ppm en el alimento tipo iniciador y a dosis de 10 ppm en el alimento tipo finalizador.

f) Gentamicina. Se puede suministrar en el agua o inyectable.

g) Sulfato de Neomicina (Neomycin). Es utilizado en el alimento y en el agua. Por lo general no debe ser inyectado debido a que produce diarrea.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la existencia de material genético extracromosómico en cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipos 4 y 8.

### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Analizar los perfiles de tamaño de los plásmidos obtenidos.
- b) Determinar la ocurrencia de resistencia a diferentes antibióticos en las cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas de aves en producción.

### 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Se emplearon 50 cepas de *Salmonella enteritidis* para el aislamiento e identificación de los plásmidos (19).

Estas cepas bacterianas fueron aportadas por los investigadores MC Mancera M. A. y MC Vazquez J. del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (19).

Los nombres de las granjas de las cuales proceden las muestras, no pueden ser mencionadas, debido a que estas empresas pidieron mantener la información confidencialmente. Únicamente se informa que las 18 cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipo 4 provienen de los estados de: México, Querétaro, Morelos, Puebla y Jalisco; las 32 cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipo 8, fueron aisladas en los estados de: México, Coahuila, Durango, Morelos, Querétaro, Puebla y Oaxaca (19).

#### 3.1 SIEMBRA DE CULTIVOS

Cada una de las cepas bacterianas se sembró en forma individual en una caja de petri conteniendo Agar MacConkey. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en una estufa bacteriológica. Después, las cepas fueron cultivadas en matraces de Erlen-Meyer con Caldo de Luria-Bertani, estos caldos de cultivo fueron incubados a 37°C durante 48 horas en una incubadora con agitación (25, 26).

#### 3.2 AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS

Cada una de las cepas de investigación fueron sometidas al proceso de extracción de DNA

utilizando el método con lisis alcalina descrito por Birboin y Doly (25, 26).

La técnica de extracción es descrita a continuación :

Se tomaron 20 ml del cultivo bacteriano de cada una de las cepas bacterianas, y fueron suspendidos en tubos Falcon, dicho cultivo fue centrifugado a 10 000 rpm/ 10 min/ 4°C. Todo el sobrenadante fue extraído con mucho cuidado evitando sacar el precipitado, a este se le adicionaron 400  $\mu$ l de la solución I:

25 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

50 mM Glucosa

Al adicionar esta solución las células se fragmentan por hipotonicidad.

La solución resultante se depositó en dos tubos Eppendorf, a ambas muestras se les adicionó 300  $\mu$ l de la solución II:

0.2 N Na OH

1% SDS

Al adicionar la solución II se deja libre el DNA y con el SDS se le aportan cargas netas negativas en toda la molécula.

Se agitaron ambos tubos para clarificar la solución y posteriormente se dejaron reposar durante 5 minutos en hielo, para después adicionarle 300  $\mu$ l de  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (pH 5 / 3 M) a cada tubo, se movieron hasta que se formara un coágulo y fueron congelados en nitrógeno. Aquí se termina la lisis alcalina (base de la extracción de plásmidos). Después, los tubos Eppendorf fueron centrifugados a 10 000 rpm/ 15 min/ 0-5°C; el sobrenadante fue separado y agregado a otros tubos Eppendorf, por cada 400  $\mu$ l del sobrenadante se adicionó 800  $\mu$ l de etanol. El contenido de los tubos se emulsificó y se dejó reposar durante 10 min/ T° ambiente para después ser centrifugados a 10 000 rpm/ 10 min/ 0-5 °C, el sobrenadante fue extraído y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiental. Ya seco el sedimento,

se le adicionó 100  $\mu$ l de TE y los tubos se mantuvieron en refrigeración a 4°C (25, 26).

### 3.3 LIMPIEZA DE PLÁSMIDOS

Fue necesario realizar este procedimiento para eliminar restos de proteína o RNA que se encontrara en las muestras obtenidas para obtener una mejor visualización del DNA al realizar la electroforesis en los geles de agarosa (25).

#### **Desarrollo:**

Se hizo primeramente una dilución del plásmido 1: 10, y fue colocado en un tubo de ensaye, y le fue agregado un volumen igual de TE-Fenol, para después ser centrifugado a 3 500 rpm/ 10 min. La fase acuosa se separó, y se depositó en un tubo de ensaye (en la fase acuosa permanece el DNA plasmídico), a esta solución se le adicionó un volumen igual de *fenol-cloroformo- alcohol isoamílico* (25 : 24 : 1) y fue emulsificada. Posteriormente se centrifugó a 3 500 rpm/ 10 min. y se aisló la fase acuosa en un tubo de ensaye para adicionarle una décima de volumen de CH<sub>3</sub>COOK 3M. Al volumen resultante se le adicionó dos partes de etanol, y se suspendió en tubos eppendorf, estos fueron centrifugados a 7 000 rpm/ 10 min. El etanol y el acetato sirven para resuspender y purificar a los plásmidos presentes. Se les retiró el alcohol completamente y el sedimento obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE. El sedimento blanquecino contiene los plásmidos libres de proteínas y RNA. Los tubos con DNA fueron guardados en el refrigerador a 4°C (25).

### 3.4 ELECTROFORESIS

El proceso de electroforesis se debe realizar en gel submarino para poder observar los



plásmidos que tengan las bacterias, también nos servirá para realizar la medición de sus pares de bases (17, 25, 26).

#### **Desarrollo:**

Para poder observar por electroforesis el DNA obtenido de las cepas de *Salmonella* se utilizaron geles de agarosa al 0.6%. Los geles utilizados fueron preparados fundiendo 0.12 gramos de agarosa en 20 ml de solución TAE 1X (Tris base, ácido acético, EDTA). Esta solución fue puesta en una pequeña cámara hasta que se solidificara. De cada una de las muestras de DNA se tomaron 5  $\mu$ l mezclándolo con 2  $\mu$ l de colorante de corrida ( azul de bromofenol, xilencianol).

En el primer pozo del gel ya solidificado se colocaron 2  $\mu$ l de un marcador de tamaño el cual sirvió para realizar las comparaciones con las muestras, y en cada uno de los siguientes pozos fue puesto una muestra de DNA, posteriormente a la placa de gel se le aplicó un potencial de  $80 \pm 5$  Volts durante 90 minutos aproximadamente con el fin de permitir que se desplazara el DNA puesto en el gel. Una vez terminado el corrido del gel, este se tiñó con bromuro de etidio (5  $\mu$ g/ml) durante 5-10 min tomando las precauciones debidas ya que es un reactivo carcinogénico, inmediatamente se lavó el gel con agua corriente.

Para poder observar el DNA, se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y se tomaron las fotografías respectivas de los geles que presentaron DNA (17, 25, 26, 27).

### **3.5 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

Se considera que la guía más importante para seleccionar una terapia antimicrobiana, es el aislamiento e identificación del microorganismo, muchas bacterias son de susceptibilidad predecible a la respuesta de drogas antimicrobianas, también existen otros grupos de organismos no predecibles en su respuesta, por lo tanto en algunos casos es necesario

realizar pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos "in vitro", esto es un antibiograma (11, 20, 22).

Se utilizaron 50 cepas aisladas de *Salmonella enteritidis* de origen aviar de casos clínicos que fueron identificados utilizando pruebas bioquímicas (fagotipificación y serotipificación) y mantenidas en medios enriquecidos (19).

Para realizar la prueba de resistencia antimicrobiana se utilizó el método de Kirby-Bauer de susceptibilidad a quimioterapéuticos. Estas cepas fueron sometidas a pruebas de resistencia a antibióticos por el método de difusión de disco en placa con discos impregnados con diferentes antibióticos a concentraciones estandar (11, 16, 20, 22).

Los quimioterapéuticos empleados fueron seleccionados con base a la literatura, que los menciona como los de mayor eficacia y a su disponibilidad en el mercado, siendo estos los siguientes: amikacina (30 mcg), ampicilina (10 mcg), carbenicilina (100 mcg), cefalotina (30 mcg), cefotaxima (30 mcg), ceftriaxona (30 mcg), cloranfenicol (30 mcg), gentamicina (10 mcg), netilmicina (30 mcg), nitrofurantolna (300 mcg), pefloxacina (5mcg) y trimetoprim-sulfametoxazol (25 mcg) (16, 22).

La concentración de los cultivos de *Salmonella enteritidis* que se empleó en la investigación se basó en los datos aportados por otras investigaciones en donde también se trabajó con los fagotipos 4 y 8. La concentración se estandarizó por medio del nefelómetro de Mcfarland a  $150 \times 10^6$  UFC /ml (22).

Posteriormente se prepararon cajas con medios de agar Muller-Hinton las cuales fueron sembradas con los cultivos de *Salmonella enteritidis* por frote en tres planos con hisopos estériles dejando secar el líquido de la suspensión, los sensibilizadores fueron colocados en el agar asegurando su contacto. Estas cajas fueron incubadas durante 18 hrs. a 37°C, y posteriormente les fue medido el diámetro de las zonas de inhibición (22).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS

Los resultados fueron muy favorables al lograr el aislamiento de un 24% de cepas de *Salmonella enteritidis* con plásmidos (figura 1); de las 18 cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipo 4 que se trabajaron, cinco de ellas presentaron plásmidos, de las cuales dos contenían un plásmido, dos cepas más poseían dos plásmidos y la última contenía cuatro plásmidos. En las 32 cepas bacterianas de *Salmonella enteritidis* fagotipo 8 se obtuvieron siete cepas con plásmidos, cinco de estas disponían de un plásmido y las dos restantes presentaron cinco plásmidos (cuadro 1, figura 2).

CUADRO 1  
NÚMERO DE PLÁSMIDOS Y SU TAMAÑO EN 50 CEPAS  
DE *Salmonella enteritidis* FAGOTIPOS 4 Y 8

CEPAS BACTERIANAS*	No. PLÁSMIDOS	TAMAÑO (Pares de base)
1. A 3 F4	0	
2. A 7 F4	0	
3. A 8 F4	0	
4. A 9 F8	0	
5. A 10 F4	1	17200
6. A 11 F8	0	
7. A 12 F4	0	
8. A 13 F4	0	
9. A 14 F8	0	
10. A 15 F4	0	
11. A 16 F8	0	

12. SA 15 F4	0	
13. SA 16 F4	0	
14. SA--92-245-F4	0	
15. 96-895-F8	0	
16. 96-845- 1-4 Pan Sal F8	0	
17. 96-836 F8 8-15 Pan bit	1	24934
18. 95-3690 Salmo F8	0	
19. 96-845 14 B Dit F8	1	24934
20. 96-1008 Gpo B F8	1	24934
21. 95-3695 F4-5	0	
22. 94-513 F8	1	24934
23. SE 4931 F4	0	
24. 93-1447 F8	1	24934
25. T 4 F8	0	
26. T 6 F8	0	
27. T 9 F8	0	
28. T 11 F8	0	
29. T 12 F8	0	
30. T 15 F8	5	34517/ 24934/ 18565/ 6326 3513
31. T 18 F8	0	
32. T 19 F8	0	
33. T 22 F8	0	
34. T 23 F8	0	
35. T 25 F8	0	

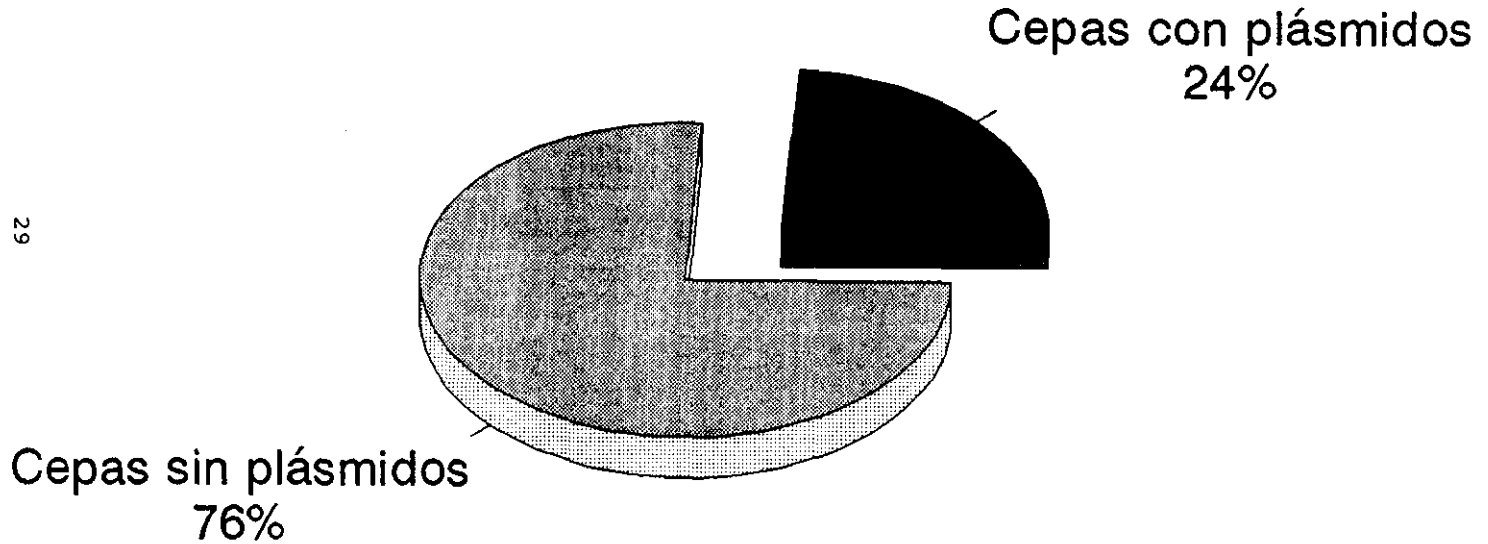
36. T 26 F4	4	34517/ 24934/ 18565/ 3513
37. T 27 F8	5	34517/ 24934/ 18565/ 6326 3513
38. T 29 F4	0	
39. T 30 F4	0	
40. T 31 F4	2	34517 / 18565
41. T 32 F8	0	
42. T 34 F8	0	
43. T 37 F8	0	
44. T 38 F8	0	
45. T 40 F8	0	
46. T 41 F8	0	
47. T 43 F8	0	
48. T 44 F8	0	
49. T 45 F4	1	24934
50. T 46 F4	2	6326/ 3513

\*Las cepas bacterianas se anotaron tal como fueron aportadas por los investigadores, en forma de claves de recepción al laboratorio.

En los resultados del cuadro No.1 es notoria la diversidad de plásmidos obtenidos, hay cepas que presentan desde uno hasta cinco plásmidos y su tamaño varía de los pequeños hasta los megaplásmidos. El 76% de las cepas de estudio careció del DNA extracromosómico, este porcentaje abarca a ambos fagotipos de *Salmonella enteritidis*.

# FIGURA 1

% de cepas con plásmidos aislados

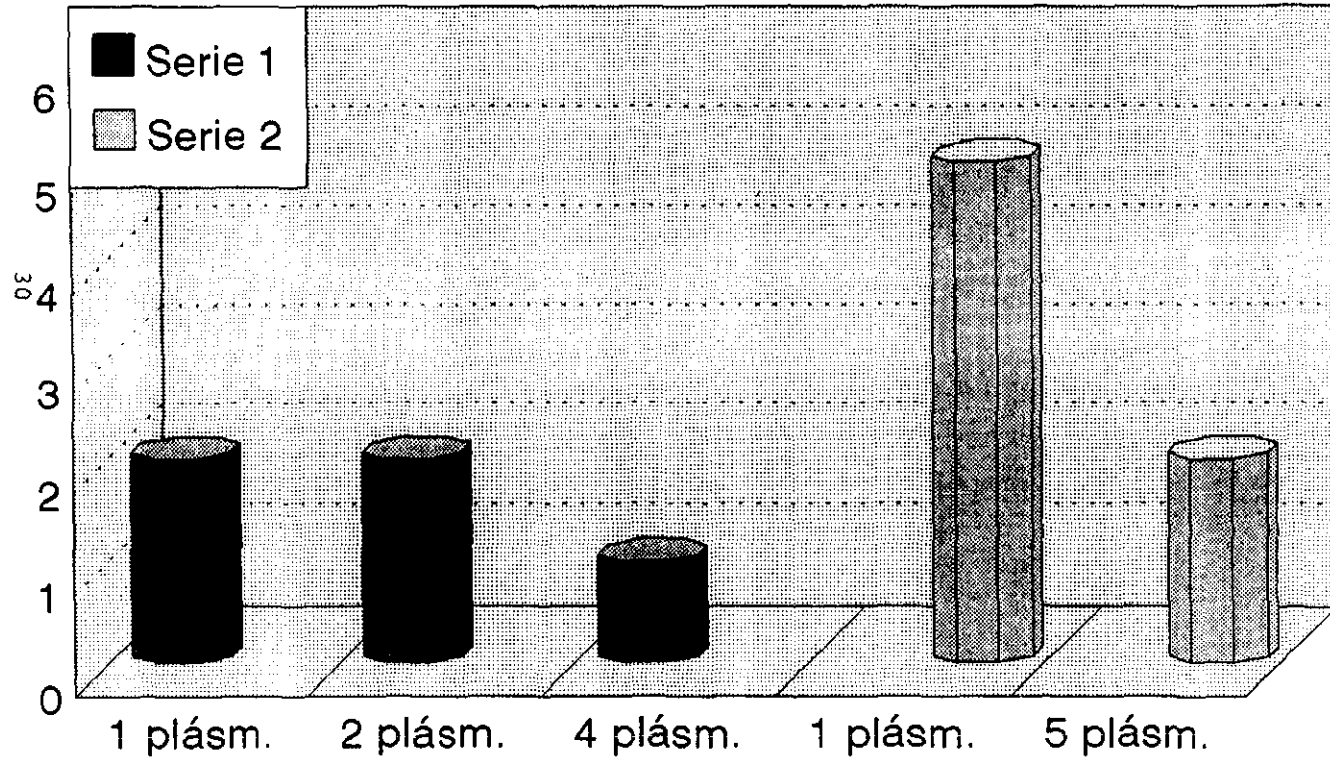


*Salmonella enteritidis* fagotipos 4 y 8

En base a 50 cepas

# FIGURA 2

## RELACIÓN DE CEPAS CON PLÁSMIDOS



Serie 1 (fago 4) Serie 2 (fago 8)

## 4.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS PLÁSMIDOS

A todos los geles que en sus carriles presentaron plásmidos se les tomaron fotografías para poder tomar los datos que servirían para conocer sus números de pares de base (pb). Primeramente se calculó el RF de cada banda incluyendo las del marcador de referencia (25).

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el frente del colorante}}$$

Y posteriormente para determinar el número de pares de base se obtiene el antilogaritmo marcando de esta manera el tamaño de los plásmidos:  $N_{pb} = e^x$  (cuadro 2, figuras 3 y 4) (25).

**CUADRO 2**  
**PERFIL DE PLÁSMIDOS EN 50 CEPAS**  
**DE *Salmonella enteritidis* FAGOTIPOS 4 Y 8**

<i>PERFIL DE PLÁSMIDOS</i>	<i>FAGO 4</i>		<i>FAGO 8</i>	
PARES DE BASE	TOTAL	%	TOTAL	%
34517/24934/18565/6326/3513	0	0	2	6.25
34517/24934/18565/3513	1	5.5	0	0
34517/18565	1	5.5	0	0
24934	1	5.5	5	15.625
17200	1	5.5	0	0
6326/3513	1	5.5	0	0
SIN PLÁSMIDOS	13	72.2	25	78.125
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>100</b>	<b>32</b>	<b>100</b>

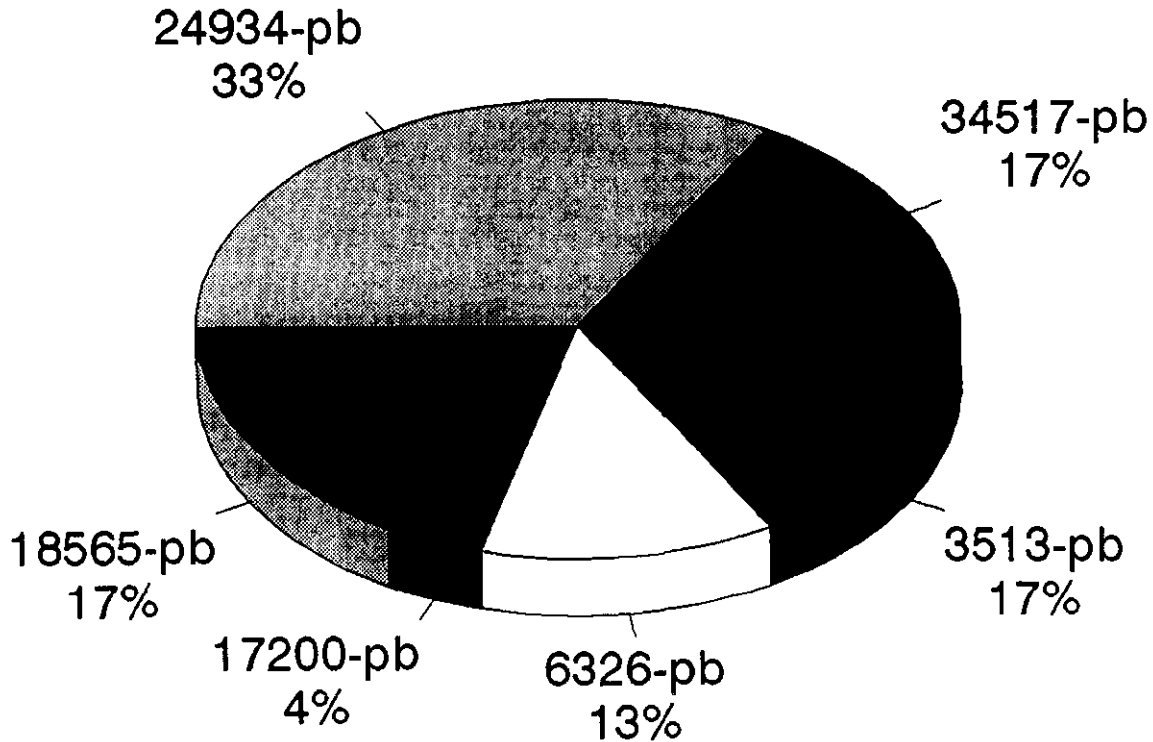


# GRÁFICA 3

## PORCENTAJE DE PLÁSMIDOS SEGÚN TAMAÑO

---

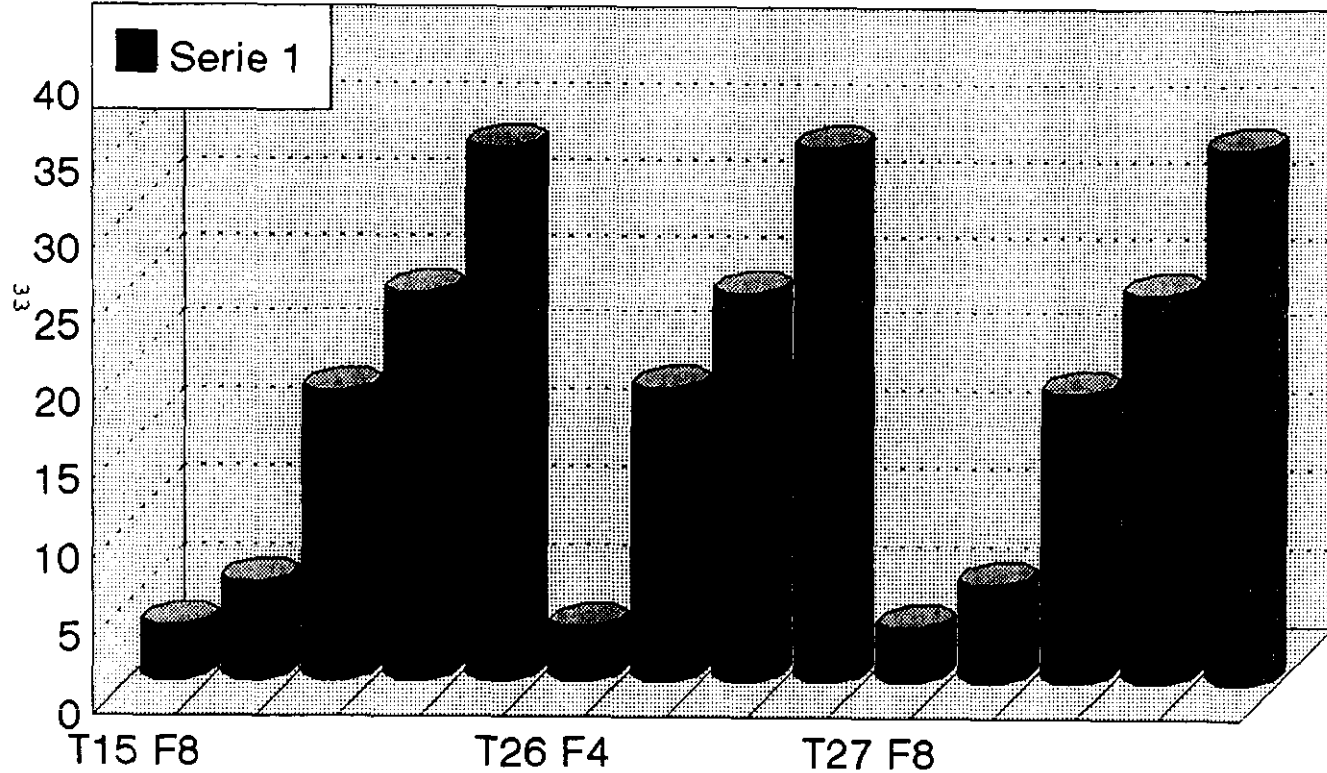
32



Total: 24 plásmidos

# FIGURA 4

TAMAÑO DE PLÁSMIDOS (cepas con plásmidos múltiples)



Medida: Kp de base

Los resultados en el cuadro No. 2 indican la presencia de seis diferentes perfiles y tamaños de plásmidos en cepas de *Salmonella enteritidis*. Ambos fagotipos contienen cepas con plásmidos pequeños y megaplásmidos (20).

En el cuadro No. 2 se puede observar a cuatro de estas cepas conteniendo un plásmido de 34517 -pb. Nueve cepas tuvieron un plásmido de 24934-pb. Cuatro aislamientos de cepas con un plásmido de 18565-pb fueron obtenidos. Una sola cepa tuvo presente un plásmido de 17200-pb. Tres cepas poseían un plásmido de 6326-pb y cuatro cepas contenían un plásmido de 3513-pb (figura No. 3). Restando treinta y ocho cepas sin contener algún plásmido.

Dos cepas del fagotipo 8 presentaron plásmidos múltiples (cinco plásmidos) y del fagotipo 4 sólo una tuvo cuatro plásmidos (figura 4).

### 4.3 RESISTENCIA ANTIBACTERIANA

El patrón de susceptibilidad antibacteriano de las cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipos 4 y 8 están representados en los cuadros No. 3 y 4..

Para realizar las pruebas de susceptibilidad se utilizaron 12 agentes antimicrobianos de uso común en el campo para tratamientos de bacterias gram-negativas (20, 22).

**CUADRO 3**  
**COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD**  
**DE *Salmonella enteritidis* CON DOCE ANTIBIÓTICOS**

No	CEPAS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	A 3 F4	18	16	15	18	20	22	20	20	22	14	18	20
2	A 7 F4	20	20	20	20	20	22	20	20	23	14	22	24
3	A 8 F4	20	20	22	20	25	24	20	20	20	15	22	25

4	A 9 F8	18	22	16	21	26	27	20	19	14	12	26	23
5	A 10 F4	19	20	24	21	20	25	20	20	24	15	24	20
6	A 11 F8	18	21	25	24	25	23	20	16	16	11	26	24
7	A 12 F4	18	20	24	22	20	25	20	20	24	15	29	20
8	A 13 F4	20	20	25	20	18	24	20	17	21	16	24	20
9	A 14 F8	24	24	15	23	27	26	24	15	15	11	25	24
10	A 15 F4	18	20	19	21	23	20	19	18	17	16	23	25
11	A 16 F8	16	22	26	24	25	28	20	16	15	11	20	23
12	SA 15 F4	18	24	20	25	29	28	26	13	15	13	28	25
13	SA 16 F4	19	20	18	22	21	23	21	15	13	16	25	25
14	SA-92-245-F4	18	21	23	25	30	26	22	13	15	13	21	24
15	96-895-F8	17	19	22	23	24	23	19	20	19	15	24	25
16	96-845-1-4 PAN SAL F8	18	22	25	20	26	24	20	14	12	12	25	23
17	96-836 F8 8-15 PAN BIT	21	23	16	23	28	25	22	14	15	11	18	24
18	95-3690 SALMO F8	14	23	24	22	24	26	21	13	14	17	25	23
19	96-845 14-B DIT F8	19	21	18	21	27	22	21	14	13	11	26	25
20	96-1008 GPO B F8	18	21	17	21	26	24	21	14	13	11	25	23
21	95-3695 F4-5	18	25	25	26	31	29	25	14	16	20	23	25
22	94-513 F8	20	18	24	20	25	25	20	22	22	15	12	25
23	SE 4931 F4	16	20	19	20	25	23	22	18	17	13	24	23
24	93-1447 F8	14	20	14	20	20	25	20	19	22	14	19	24
25	T 4 F8	18	19	22	18	24	21	19	12	14	11	24	24
26	T 6 F8	20	19	22	18	25	23	20	14	14	12	24	25
27	T 9 F8	18	20	23	20	21	22	19	10	13	14	20	22
28	T 11 F8	15	23	20	20	25	21	19	11	14	11	23	24
29	T 12 F8	21	20	16	19	23	21	22	15	17	10	25	22

30	T 15 F8	16	19	16	18	24	22	21	11	12	14	23	23
31	T 18 F8	18	19	17	22	22	24	20	13	19	16	24	23
32	T 19 F8	20	21	19	21	23	23	21	16	16	15	25	21
33	T 22 F8	20	22	18	20	25	22	20	17	14	14	24	25
34	T 23 F8	19	19	17	23	26	22	22	16	11	10	24	26
35	T 25 F8	19	22	24	19	24	23	20	18	14	15	23	25
36	T 26 F4	15	22	23	24	24	22	18	10	14	14	25	23
37	T 27 F8	17	18	17	22	23	21	18	12	10	11	24	24
38	T 29 F4	16	20	20	23	27	24	20	14	13	11	24	23
39	T 30 F4	16	19	22	24	23	22	19	12	15	13	23	25
40	T 31 F4	15	14	18	19	25	23	21	13	16	16	24	23
41	T 32 F8	20	16	18	21	24	24	21	10	14	12	24	22
42	T 34 F8	20	20	15	20	22	20	24	18	14	16	23	20
43	T 37 F8	16	22	20	20	24	21	23	12	13	15	25	20
44	T 38 F8	15	21	21	22	20	22	20	14	19	11	23	25
45	T 40 F8	18	19	20	21	23	19	19	13	13	15	26	25
46	T 41 F8	15	23	18	19	23	21	24	14	14	14	24	22
47	T 43 F8	20	20	20	21	20	25	25	10	14	10	21	23
48	T 44 F8	16	18	24	20	19	23	22	14	13	12	25	20
49	T 45 F4	20	24	23	23	28	26	23	18	14	14	21	26
50	T 46 F4	21	25	26	24	29	27	23	17	13	19	24	25

*A- AMIKACINA (AK)30 mcg*

*B- AMPICILINA (AM)10 mcg*

*C- CARBENICILINA (CB)100 mcg*

*D- CEFALOTINA (CF)30 mcg*

*E- CEFOTAXIMA (CTX)30 mcg*

*F- CEFTRIAXONA (CRO)30 mcg*

*G- CLORANFENICOL (CL)30 mcg*

*H- GENTAMICINA (GE)10 mcg*

*I- NETILMICINA (NET)30 mcg*

*J- NITROFURANTOINA (NF)300 mcg*

*K- PEFLOXACINA (PEF)5 mcg*

*L- TRIMETOPIN SULFAMETOXASOL (SXT)25 mcg*

\* Los números expresan en milímetros la zona de inhibición en los resultados del antibiograma.

La cepas de *Salmonella enteritidis* de origen aviar mostraron un carácter heterogéneo en la respuesta a los quimioterapéuticos que fueron probados en la investigación.

Todas las cepas bacterianas de ambos fagotipos resultaron ser resistentes a diversos antibióticos. Inclusive, a pesar de carecer de plásmidos algunas cepas de salmonelas resultaron tener resistencia a ciertos antibióticos. Las cepas T15 F8 y T27 F8 son las únicas que presentan resistencia a cuatro agentes antibacterianos (carbenicilina, gentamicina, netilmicina y nitrofurantoina), además de poseer cinco plásmidos cada una de ellas (cuadro 3 y 4) (16, 20, 22).

**CUADRO 4**  
**RELACIÓN DE LOS RESULTADOS**  
**DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA**  
**EN 50 CEPAS DE *Salmonella enteritidis* FAGOTIPOS 4 Y 8**

<b>AGENTE ANTIMICROBIANO</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>MS</b>	<b>S</b>
Amikacina	2	12	0	36
Ampicilina	0	0	0	50
Carbenicilina	12	22	0	16
Cefalotina	0	0	0	50
Cefotaxima	0	0	13	37
Ceftriaxona	0	0	3	47
Cloranfenicol	0	0	0	50
Gentamicina	11	15	0	24
Netilmicina	4	23	0	23
Nitrofurantoina	32	15	0	3

Pefloxacina	0	11	0	39
Trimetoprin-sulfamitoxazol	0	0	0	50

Diámetro del halo de inhibición en mm.

R=resistente    I=intermedio    MS=moderadamente sensible    S=susceptible

De las 50 cepas de estudio que se trabajaron, 2 (4%) de ellas fueron resistentes a Amikacina; 12 (24%) a Carbenicilina; 11 (22%) a Gentamicina; 4 (8%) a Netilmicina y 32 (64%) a Nitrofurantoina .

Los antibióticos que mostraron el mayor número de cepas susceptibles fueron: Ampicilina con 100%; Cefalotina con 100%; Cloranfenicol 100% y Trimetoprin-sulfametoxazol con 100% (Cuadro 4).

## 5. DISCUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se determina la presencia de pequeños plásmidos y megaplásmidos en cepas de *Salmonella enteritidis*, demostrándose la facultad que poseen los plásmidos para transferirse entre una infinidad de bacterias. Además, se aprecia que el tamaño de los plásmidos no se encuentra intimamente ligado al fagotipo de *Salmonella*, y que una misma cepa bacteriana puede presentar varios plásmidos de diversos tamaños (10, 16, 20, 21, 22). De tal manera, que la variedad que poseen las cepas de *Salmonella enteritidis* en cuanto a cantidad y tamaño de plásmidos en Estados Unidos, también existe en México (11, 16, 20).

Al realizar una revisión a los resultados obtenidos, se observó que el 76% de las cepas

carecen de plásmidos dando la posibilidad del planteamiento de la hipótesis de que algunos plásmidos fueron eliminados accidentalmente al realizar el preceso de limpieza de estos (25).

Estos resultados demuestran que el fagotipo 8 presentó un mayor porcentaje de cepas de *Salmonella enteritidis* con plásmidos (78.125%) a diferencia del fagotipo 4 (72.2%). Además dos cepas del fagotipo 8 tuvieron mayor cantidad de plásmidos en relación con las otras cepas y las del fagotipo 4, de tal manera que se puede sugestionar la probabilidad de mayor incidencia de resistencia antibacteriana, debido a que las cepas que contenían cinco plásmidos fueron las únicas que presentaron resistencia al mismo tiempo a cuatro agentes antibacterianos (carbenicilina, gentamicina, nitrofurantoina y netilmicina), de los doce utilizados. Esto puede estar relacionado como se mencionó anteriormente, con la presencia de los cinco plásmidos contenidos en las cepas T15 F8 y T27 F8, funcionando alguno de estos como transmisor de la resistencia antibacteriana, pero, para poder confirmar esta resistencia es necesario realizar otros estudios, como es la purificación de los plásmidos en estas cepas (20, 22) . Existen varias cepas bacterianas de ambos fagotipos, de las cuales no se logró el aislamiento de algún plásmido y éstas también presentaron resistencia a algunos antibacterianos, por lo tanto, no es posible establecer una correlación entre la presencia de plásmidos y su resistencia antibacteriana (22).

Los agentes antibacterianos que presentaron el 100% de eficacia fueron: Ampicilina, Cefalotina, Cloranfenicol y Trimetoprin-sulfametoxazol. Estos resultados mantienen similitud con los obtenidos por otros investigadores; en sus trabajos mencionan cepas de salmonelas resistentes a estos antibióticos y a otros más, pero ellos en su trabajo no lo relacionan con la presencia de plásmidos (22).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



## 6. CONCLUSIONES

- 1.- Se demostró la presencia de plásmidos en un 24% de las cepas de *Salmonella enteritidis* de origen aviar estudiadas.
- 2.- Durante la presente investigación se logró el aislamiento de seis perfiles de plásmidos, que fueron obtenidos en cepas de *Salmonella enteritidis* fagotipos 4 y 8.
- 3.- Cinco cepas del fagotipo 4 presentaron plásmidos, una tuvo cuatro plásmidos y las restantes sólo uno; siete cepas del fagotipo 8 tuvieron plásmidos, cinco con un plásmido y dos con cinco plásmidos.
- 4.- Los resultados del estudio indican los presentes porcentajes de respuesta antibacteriana: A) Resistencia: amikacina 4%, ampicilina 0%, carbenicilina 24%, cefalotina 0%, cefotaxima 0%, ceftriaxoma 0%, cloranfenicol 0%, gentamicina 22% netilmicina 8%, nitrofurantoina 64%, pefloxacina 0% y trimetopin-sulfammitoxazol 0%; B) Susceptibilidad: amikacina 72%, ampicilina 100%, carbenicilina 32%, cefalotina 100%, cefotaxima 74%, ceftriaxona 94%, cloranfenicol 100%, gentamicina 48%, netilmicina 46%, nitrofurantoina 6%, pefloxacina 78% y trimetoprin-sulfamitoxazol 100%.
- 5.- No se puede confirmar en esta investigación una correlación entre la presencia de plásmidos y la resistencia antibacteriana.
- 6.- Los avicultores mexicanos se ven en la penosa necesidad de seguir importando material genético ultraespecializado de los Estados Unidos de Norteamérica. Por lo tanto, es posible que además de importarse este material genético, también se introducen a México microorganismos originadores de fuertes infecciones, como es la salmonelosis (transmisión vertical) tanto en aves ponedoras como en pollo de engorda (3, 19).

## 7. ANEXOS (25, 26).

### A. MEDIOS DE CULTIVO

#### 1. CALDO LURIA

Cantidad:

Peptona de caseína	1.0 g
Estracto de levadura	0.5 g
Cloruro de sodio	0.5 g

Disolver en 100 ml de agua destilada y homogeneizar el medio; calentar hasta ebullición. Vaciar en tubos con tapón de rosca y esterilizar (15 lb. de presión/ 15 minutos/ 121°C.).

### B. SOLUCIONES

#### 1. TRIS-HCl 1 M

Cantidad:

Tris base	0.8255 mg
-----------	-----------

Mezclar en 100 ml de agua destilada. Ajustar a pH 8.0 con HCl concentrado. Esterilizar la solución y verificar el pH final, en caso de ser necesario reajustarlo a 8.0.

#### 2. TE (TRIS-EDTA)

Cantidad:

Tris base	0.8255 mg
EDTA	0.0268 mg

Disolver en 100 ml de agua destilada y esterilizar la solución. La solución preparada tiene una concentración 100 x; para utilizar esta solución se toma 1 ml y se lleva a 100 ml con agua destilada estéril. La solución final debe contener 10 mM de tris y mM de EDTA por ml.

### 3. TAE (TRIS-ÁCIDO ACÉTICO-EDTA)

Cantidad:

Tris base	3.3019 mg
EDTA	0.0268 mg
Ácido acético glacial	3.1 $\mu$ l

Adicionar todo en 100 ml de agua destilada y esterilizar. La solución preparada tiene una concentración 50 x, para utilizarla se toma 1 ml y se lleva a 50 ml con agua destilada estéril. La solución final tener las siguientes concentraciones: 40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA.

### 4. ACETATO DE SODIO

Cantidad:

Acetato de sodio trihidratado	2.2045
-------------------------------	--------

Agregar en 100 ml de agua destilada, ajustar el pH a 5.0 con HCl concentrado y esterilizar la solución. Verificar el pH final y de ser necesario reajustar a 5.0.

### 5. SDS 10% (DODECIL SULFATO DE SODIO)

Cantidad:

SDS	10 g
-----	------

Adicionar en 100 ml de agua destilada y esterilizar.

### 6. GLUCOSA 1 M

Cantidad:

Glucosa	0.5551 mg
---------	-----------

Anexar en 100 ml de agua destilada y esterilizar.

**7. NaOH 2 N (HIDRÓXIDO DE SODIO)**

Cantidad:

NaOH            8 g

Agregar en agua destilada y aforar a 100 ml la solución; esterilizar.

**8. EDTA 0.5 M**

Cantidad:

EDTA            0.1343 mg

Disolver en 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH. Esterilizar la solución y verificar el pH, de ser necesario reajustar el pH a 8.0.

**9. GEL DE AGAROSA 0.6 %**

Cantidad:

Agarosa            0.12 g

Adicionar en 20 ml de TAE; calentar a baño maría hasta formar una solución cristalina. Vaciar la solución en la base para el gel de electroforesis y dejar gelificar.

**10. BROMURO DE ETIDIO 5 %**

Cantidad:

Bromuro de etidio            2.5 mg

Disolver en 500 ml de agua destilada, la solución debe contener 5  $\mu$ g de bromuro de etidio por ml.

**11. SOLUCIÓN I DE LISIS**

Cantidad:

Tris-HCl 1 M                    25  $\mu$ l

EDTA 0.5 M	20 $\mu$ l
Glucosa 1 M	28 $\mu$ l
Agua destilada estéril	927 $\mu$ l

Mezclar las soluciones y agitar hasta homogeneizar completamente.

## 12. SOLUCIÓN II DE LISIS

Cantidad:

SDS 10 %	100 $\mu$ l
NaOH 2 N	100 $\mu$ l
Agua destilada estéril	800 $\mu$ l

Mezclar las soluciones y agitar hasta homogeneizar completamente.

## 8. B I B L I O G R A F Í A

1. Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K. and Watson J.: Biología Molecular de la Célula. Editorial Omega, Tercera Edición, España. 1996. pp. 293, 306-308.
2. Acha N.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington, Organización Panamericana de la Salud. Segunda Edición, 1989, pp. 158-165.
3. Alonso F.; Dominguez C., M. C.: "Estudio histórico de algunas variables productivas y económicas de la avicultura nacional hasta 1995", Correo Avícola, Año X, número 5, Junio de 1997.
4. Balows A. : Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition, Washigton, D.C., U.S.A., 1991. pp. 371-373.
5. Bioxón de México. Manual de Medios de Cultivo 1. México, D.F. (sin fecha).
6. Blood C.: Medicina Veterinaria. Volumen I, España, Interamericana Mc Graw-Hill., Séptima edición, 1992.
7. Bradshaw J. : Laboratory Mycrobiology. Fourt Edition, U.S.A., 1992. pp. 381-384.
8. Brock D.; Madigan M., T.: Microbiología. PHH S.A .Sexta edición, 1993. pp. 591-592.
9. Brooks : Microbiología Médica de Jawetz. México, D.F., El Manual Moderno. Décimo quinta edición, 1997, pp. 46-55, 113-116, 247.
10. Calnek W.: Enfermedades de las aves. El Manual Moderno. 1995. pp. 81-139.

11. Christensen P.; Olsen E.; Hansen C.; and Bisgaard M.: "Characterization of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* and *pullorum* by plasmid profiling and biochemical analysis". Avian Histology. p. 461-470. 1992.
12. Delgadillo Ma. de la L.: "El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en aves de engorda y su posible repercusión en la salud pública". Tesis de Licenciatura, UNAM, FES-C, México. 1991. pp 7-42.
13. Dorn R.; Silapanuntakul R.; Angrick E., J.; and Shipman L., D.: "Plasmid analysis and epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in tree commercial layer flocks". Avian Diseases. Vol. 36, 1992, pp. 844-851.
14. Ebel D.; David M., J.; and Mason J.: "Ocurrence of *Salmonella enteritidis* in the U.S. comercial egg industry: Depart on a National spent hen survey". Avian Diseases. Vol. 36, 1992, pp. 646-654.
15. Kenton K. : "*Salmonella enteritidis*". Correo Avícola. Año XI, Número 4, Abril de 1998. pp. 4-5.
16. Kogut H.; Tellez I.; Ziprin R.; Moyes B.; and Deloach J., R.: "Increased resistance against both paratyphoid and typhoid salmonellosis in young chickens conferred by administration of *Salmonella enteritidis* inmunecytokines". Memorias de la XXI Convención Anual, Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). Cancún, México. 1996, pp. 247-249.
17. Lodish H.; Darnell J.; Blatimore D. : Biología Celular y Molecular. Barcelona, España. 1988
18. López C. : " Panorama actual de las afecciones digestivas y metabólicas en la avicultura nacional". Noveno curso de actualización AVI-MEX, Patologías digestivas y metabólicas de

las aves. Ciudad de México, Julio 25 de 1997. pp. 7.

19. Mancera A.; Vazquez J.; and Henedi A. : "Situación actual de la *Salmonella enteritidis*, su distribución y posible origen". Memorias de la XXI Convención Anual, Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). Cancún, México. 1996, pp. 245-246.

20. Nagaraja K.; Kim C.; and Bichler L. : "Plasmid diversity and genetic fingerprinting of *Salmonella enteritidis* isolates from poultry an human origin". Memorias de la XXI Convención Anual, Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). Cancún. México. 1996, pp. 250-252.

21. Olivares T.: "Identificación de plásmidos por electroforesis en bacterias anaerobias estrictas". Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México. México. 1997. pp. 27-29.

22. Ontiveros C., M. de L. : "Presencia de plásmidos y resistencia a los antibióticos en cepas de *Salmonella enteritidis*". Reunión Anual de Investigación Pecuaria. Morelos, 1996. p. 22.

23. Padrón N. : "Diagnóstico de *Salmonella enteritidis*". Memorias del curso de actualización sobre criterio diagnóstico avícola. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). D.F. México, Octubre, 1992.

24. Poppe C.; Demezuk W.; Mc Faddien; and Jphnson R., P. : "Virulence of *Salmonella enteritidis* phagotypes 4, 8, and 13 and other *Salmonella spp.* for dag-old chicks, hens and mice. Canadian Journal of Veterinary Research. Vol. 57, No. 4. October, 1993, pp. 281-287.

25. Tenorio G. V. R. : "Construcción de un banco genómico de *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 1". Tesis de Maestría, UNAM, FES-C. México. 1990. pp. 32-44



26. Tenorio G. V. R. : "Expresión de antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1". Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, FES-C. México. 1997. p. 33.
27. Thong K.; Ngeow Y.; Altwegg M.; Navaratnam P.; and Pang T. : "Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping". Journal of Clinical Microbiology. Vol. 33, No. 5. May, 1995, pp. 1070-1074.
28. Tietjen M.; and Fung O., Y. : "*Salmonella* and food safety". Critical Reviews in Microbiology. 21 (1) : pp. 53-83, 1995.
29. Urquiza, B.O. : " Paratifoidea Aviar" . Memorias de la III Jornada Médico Avícola. UNAM. México, D.F. 1992.
30. Valladares J., C.; Barrientos B.; Angulo E.; Juárez D., y Lara A. : "Epidemiología de la infección por *Salmonella enteritidis* En el Noreste de México". Memorias de la XXI Convención Anual, Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Cancún, México. 1996. pp. 253-256.
31. Woolcock J. : Microbiology of animals and animal products. Edit. Elsevier, New York, U.S.A., 1991. pp. 181-193, 210-212.