



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INMUNIZACION DE POLLOS DE ENGORDA CONTRA
Salmonella enteritidis MEDIANTE EL EMPLEO DE
PROTEINAS DEL SOBRENADANTE DEL CULTIVO Y
DE PROTEINAS PERIPLASMATICAS DE *Salmonella*
enteritidis BIOVAR Issatschenko.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

VANIA URIBE TORRES



ASESORES: MVZ GABRIELA GOMEZ VERDUZCO
MVZ ODETTE URQUIZA BRAVO

MEXICO, D. F.

2004



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.

INMUNIZACIÓN DE POLLOS DE ENGORDA CONTRA *Salmonella enteritidis*
MEDIANTE EL EMPLEO DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE DEL
CULTIVO Y DE PROTEÍNAS PERIPLASMÁTICAS DE *Salmonella enteritidis*
BIOVAR Issatschenko.

DEDICATORIA

A mis padres, Bernarda y José, quienes siempre trabajaron y pusieron todo su esfuerzo, para que yo tuviera la oportunidad de estudiar y finalizar mis estudios de licenciatura. "Este logro también es suyo, los amo".

A mi hermano Fernando por todo tu apoyo, te quiero mucho.

A mis abuelitos Fernando, Vicky y Mela, porque son una parte importante de mi ser, y siempre me enseñaron a amar la vida en toda su expresión; pero en especial a mi abuelita Vicky, porque no alcanzó a estar conmigo para culminar mi sueño. Siempre los llevo en mi corazón.

A el amor de mi vida: Arturo, por creer en mí, por apoyarme e impulsarme a seguir adelante; y por darle un sentido especial a mi vida, te amo mucho.

A mis amigos que me apoyaron en el transcurso de esta etapa, en especial a Gaby porque creíste en mí y me brindaste tu amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A Diosito por permitirme llegar hasta este momento, "gracias por todo lo que me has brindado".

A mi familia por su amor, comprensión, consejos y apoyo. Los amo a todos.

A mis asesoras Gaby y Odette por su confianza, el apoyo que me brindaron y la paciencia que me tuvieron para realizar este trabajo.

A los miembros de mi jurado, por el tiempo que le dedicaron a la revisión de mi tesis.

A Gaby, Rodrigo, Asunción, Ulises, Hilda, Nidia, Carlos, Adriana y Rafa; por apoyarme en la fase experimental de este trabajo. "Muchas gracias por su ayuda".

Al DPA: Aves por permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones, y a todo el personal académico, técnico y administrativo, que de alguna manera contribuyeron en mi formación. "Gracias por su amistad".

A los miembros de mi facultad por darme todos los conocimientos necesarios para cumplir mi meta.

A todos ellos "Muchas Gracias".

CONTENIDO

	Página
TÍTULO.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CONTENIDO.....	IV
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Situación actual de la avicultura.....	2
Salmonelosis.....	2
Patogenia de la salmonelosis.....	4
La salmonelosis en la avicultura.....	6
Impacto de la <i>Salmonella enteritidis</i> en la salud pública.....	8
Métodos de control.....	9
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	20
LITERATURA CITADA.....	21
CUADROS Y FIGURAS.....	25
GLOSARIO.....	32

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Diseño experimental.

Cuadro 2. Muestras sospechosas para *Salmonella* spp.

Cuadro 3. Relación de los sueros positivos en la aglutinación en placa.

Cuadro 4. Prueba de microaglutinación.

Cuadro 5. Diferencias bioquímicas entre SE biovar Issatschenko y SE biovar Danysz.

Grafica 1. Crecimiento de bacterias lactosa negativa y positiva en agar MacConkey.

Grafica 2. Aglutinación en placa positiva para *Salmonella* spp.

ABREVIATURAS

CICC	-	Caldo infusión cerebro corazón
CHO	-	Células de hámster chino
GALT	-	Tejido linfoide asociado al intestino
LIA	-	Agar de hierro y lisina
OIE	-	Organización Internacional de Epizootias
PP	-	Proteínas periplasmáticas
PSNC	-	Proteínas del sobrenadante del cultivo
RPM	-	Revoluciones por minuto
SEI	-	<i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko
		Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad
SENASICA	-	Agroalimentaria
SEPT13A	-	<i>Salmonella enteritidis</i> fagotipo 13 A
SH2	-	Ácido sulfhídrico
SIM	-	Ácido sulfhídrico, Indol, Motilidad
SRE	-	Sistema retículo endotelial
TSI	-	Agar triple azúcar hierro
UFC	-	Unidad formadora de colonia

RESUMEN

URIBE TORRES VANIA. Inmunización de pollos de engorda contra *Salmonella enteritidis* mediante el empleo de proteínas del sobrenadante del cultivo y de proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko. (bajo la dirección de la MVZ Gabriela Gómez Verduzco y la MVZ Odette Urquiza Bravo).

Las medidas biológicas consideradas en los programas de control para *Salmonella* incluyen el uso de antibióticos, la exclusión competitiva, la inmunoprofilaxis y las vacunas. Algunas vacunas contra *Salmonella* en fase experimental, emplean ciertos componentes bacterianos como inmunógenos. Se han utilizado vacunas con base en subunidades, como las proteínas de membrana externa de *S. gallinarum* quienes han inducido protección. En el presente trabajo, se evaluaron las proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y las proteínas periplasmáticas (PP) de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SEI), como inmunógenos para el control de *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda. La prueba se realizó en 167 pollitos de engorda estirpe Ross x Ross clínicamente sanos y de sexo mixto. Al finalizar la prueba, a los 28 días de edad, los resultados coincidieron con los reportados por otros investigadores, al no haber obtenido el aislamiento de *Salmonella* en la mayoría de las muestras, aunque debe tomarse en cuenta que esta bacteria se elimina de forma intermitente. Con la administración de PSNC de SEI, se observó reducción de los aislamientos de SE, sugiriendo que estas proteínas pueden funcionar como inmunógenos. Con el empleo de PP de SEI y desafío con SE, se obtuvieron aislamientos negativos a *Salmonella* en la mayoría de las muestras.

INTRODUCCIÓN

Situación actual de la avicultura.

Dentro de las áreas de producción pecuaria, la avicultura es la más dinámica y tecnificada, es la principal industria transformadora de proteína animal de alto valor nutritivo^(1, 2, 3). La industria avícola produce más de 4 millones de toneladas de alimento al año, la producción mundial de carne de pollo y huevo, de 1994 a 2001, mostró un crecimiento promedio anual de 5.3% y 4.9% respectivamente⁽³⁾.

Estados Unidos es el principal productor y exportador mundial de pollo (pierna y muslo). Por su parte, México es el sexto país productor de huevo, el tercer consumidor mundial, y el cuarto productor de pollo a nivel mundial⁽³⁾.

Existen diversas causas que favorecen el consumo de carne de pollo en nuestro país; entre las principales están su frescura, su disponibilidad en diversos establecimientos como mercados públicos, restaurantes y tiendas de autoservicio, la tendencia de consumo hacia carnes con bajo contenido en grasa, y su bajo costo. México cuenta con una parvada de más de 115 millones de gallinas ponedoras, 208 millones de pollos por ciclo y 801 mil pavos por ciclo; siendo los principales estados y zonas productoras de carne de pollo: Querétaro, Jalisco, Veracruz, Puebla, la Comarca Lagunera, Nuevo León, Estado de México, Guanajuato, Yucatán, Aguascalientes y Sinaloa; y el 95% de la producción de huevo se lleva a cabo en: Jalisco, Puebla, Sonora, Nuevo León, la zona de la Comarca Lagunera, Yucatán y Guanajuato⁽³⁾.

Salmonelosis

La producción avícola es una de las áreas pecuarias más susceptibles a pérdidas económicas por problemas sanitarios; uno de éstos, lo representa la Salmonelosis debido a los sistemas intensivos que demandan trabajar con altas densidades de aves^(1, 2).

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las enterobacterias y se compone de 2463 serotipos⁽⁴⁾, basándose en su estructura antigénica, que

comprende los antígenos O (somáticos), que son polisacáridos de la membrana externa y los antígenos H (flagelares), que son proteínas que constituyen los flagelos peritricos de éstas bacterias. Ambos antígenos son fundamentales para la serotipificación de *Salmonella* por la gran diversidad en su estructura química y estabilidad antigénica^(5, 6). El género *Salmonella* consta de sólo dos especies *S. enterica* y *S. bongori*, éstas a su vez se conforman por seis subespecies la primera y una subespecie la segunda^(4, 7).

En las aves, las infecciones por *Salmonella* se agrupan en tres formas: la primera comprende a las únicas salmonelas no móviles que son *Salmonella pullorum*, quien produce la Pulorosis y *Salmonella gallinarum* causante de la Tifoidea aviar, ambas son específicas de aves. La segunda incluye a las enfermedades llamadas paratifoideas ocasionadas por *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, las cuales representan un severo problema para las aves, y tienen un gran impacto en términos de salud pública; además de afectar a otras especies animales. La tercera comprende a la *S. arizonae*, la cual es una salmonela móvil de importancia económica en pavos⁽⁸⁾.

Las salmonelas son bacterias gram negativas, anaerobias facultativas, que no esporulan y la mayoría no poseen cápsula^(7, 9). Son bacilos cortos de 2 a 4 micras de longitud por 0.5 micras de ancho⁽⁶⁾. Exceptuando a *S. pullorum* y *S. gallinarum*, el resto de las salmonelas son móviles y tienen largos flagelos, aunque pueden presentarse ocasionales variantes no móviles. Crecen con rapidez en medios de cultivo generales y en medios sólidos (agar), forman grandes colonias gruesas, de color gris-blancuzcas y en forma de domos⁽⁶⁾.

Entre las características bioquímicas que definen el grupo de *Salmonella* podrían mencionarse su capacidad para reducir los nitratos a nitritos, producen ácido sulfídrico (SH₂), fermentan la glucosa pero no fermentan a la lactosa; salvo excepciones, utilizan el citrato como fuente única de carbono y energía; además de su capacidad para sobrevivir por varios meses fuera del huésped⁽⁷⁾.

En comparación con otras bacterias gram negativas, las salmonelas son resistentes a varios factores ambientales. Crecen a temperaturas que oscilan

entre 8 y 45°C, con un pH de 4 a 8; pueden multiplicarse en un medio ambiente con poca concentración de oxígeno o totalmente carente de éste; presentan gran resistencia al secado, a la congelación y a la deshidratación aún por años, sobre todo en las heces, el polvo y los materiales secos como algunos alimentos para consumo humano y animal; ésto explica porque sobreviven en muchas clases de productos. Se ha observado que estas bacterias pueden sobrevivir en salmuera que contiene más del 20% de sal, sobre todo en productos con un alto contenido en proteína y grasa. En productos de carne seca ahumada puede sobrevivir fácilmente por varias semanas o aún meses⁽¹⁰⁾.

En la actualidad la salmonelosis constituye un problema potencial en todas las partes del mundo, por ser una de las zoonosis declarables de mayor prevalencia en los países en desarrollo. De todos los serotipos, solo unos pocos son específicos de hospedador (el hombre, el ganado bovino, equino, porcino y aves), mientras que la mayoría son microorganismos inespecíficos de especie; siendo en general potencialmente patógenos, situación que les confiere una extraordinaria importancia epidemiológica⁽⁶⁾.

Patogenia de la salmonelosis

En los mamíferos, casi todas las infecciones por estos microorganismos tienen lugar a partir de la infección oral de la bacteria. Se requiere una dosis mayor a 1×10^4 unidades formadoras de colonia (UFC) suficiente para superar defensas, (inmunidad específica o resistencia) tales como la acidez gástrica, la flora intestinal nativa y los movimientos peristálticos del intestino⁽⁶⁾.

Salmonella en mamíferos no parece que colonice el estómago, sino que se dirige rápidamente hacia el lumen del intestino delgado, donde se multiplica en competencia con la flora nativa; penetra en la mucosa del ileon distal del intestino delgado y la porción proximal del intestino grueso. Se cree que las bacterias penetran a través de células especializadas (células M), que se encuentran formando parte del epitelio de la mucosa intestinal e interactúan directamente con las placas de Peyer. Los microorganismos penetran

rápidamente en la mucosa intestinal y alcanzan los ganglios linfáticos mesentéricos en los mamíferos. En el caso de las aves, se diseminan e interactúan con los centros germinales de las placas de Peyer, de las tonsilas cecales, y con el tejido linfoide asociado al intestino (por sus siglas en inglés: GALT) donde continúan multiplicándose; posteriormente llegan a sistema circulatorio. Ésta fase bacterémica conduce a la infección del hígado, bazo, vesícula biliar y bilis. La bilis infectada puede ser causa de una infección intestinal secundaria en aproximadamente dos semanas después de la infección inicial⁽⁶⁾.

El GALT, hígado y bazo, se hipertrofian. Además se observa una marcada hiperplasia e hipertrofia del sistema retículo endotelial (SRE), lo que indica una batalla activa de las células fagocíticas del sistema inmune con la *Salmonella*. Las salmonelas son fagocitadas activamente por células que incluyen macrófagos y polimorfonucleares⁽⁶⁾.

Con carácter general, en mamíferos las salmonelas son causa de las siguientes manifestaciones clínicas:

1. Fiebres entéricas. Debidas a la invasión del epitelio intestinal, multiplicación en los ganglios (mamíferos) y diseminación por el sistema linfático, produciendo fiebre⁽⁶⁾.

2. Septicemia. Una vez que las salmonelas penetran en la barrera intestinal, pueden acceder al torrente sanguíneo lo que origina una bacteremia que permitirá la afección de muchos órganos. Se observa fiebre, escalofríos, anorexia, anemia y lesiones focales en vísceras⁽⁶⁾.

3. Gastroenteritis. A consecuencia de la invasión superficial del epitelio intestinal, se produce una destrucción de las células, acompañada de la producción de enterotoxinas. Ésto implica una rápida aparición de náuseas y vómitos después de un periodo de 8 a 48 horas desde la ingestión del microorganismo (que caracteriza a los denominados brotes de toxoinfección alimentaria). Más tarde aparecen diarrea, dolor abdominal y frecuentemente fiebre. Por lo general esta manifestación clínica es originada por *S. enteritidis* y

por la mayoría de las subespecies de *S. typhimurium*. En pacientes inmunodeprimidos, se observa con frecuencia un tipo de diarrea más grave y de mayor duración⁽⁶⁾.

4. Portadores crónicos. Se denomina así a los individuos infectados, sin signología aparente; los enfermos excretan de manera intermitente gran cantidad de bacterias por las heces, contaminando el ambiente y difundiendo la infección. En ésta condición pueden encontrarse tanto seres humanos como animales domésticos (incluyendo aves comerciales), y también los animales silvestres, lo que supone una gran trascendencia epidemiológica⁽⁶⁾.

La salmonelosis es la zoonosis más compleja tanto en su epidemiología como en su control. Los patrones de comportamiento de la enfermedad son diferentes según las regiones geográficas, el clima, la densidad de población, el uso de la tierra, las prácticas de cultivo, las técnicas de cosechado, la elaboración de alimentos, los hábitos de consumo y otras variables por el momento desconocidas⁽⁶⁾.

El diagnóstico requiere del aislamiento y la identificación del agente causal. Las salmonelas se aíslan de tejidos infectados mediante cultivos directos tales como agar MacConkey o agar verde brillante, medios para bioquímica, (TSI, LIA, SIM, Urea y Citrato de Simmons) y medios para bioquímica complementarios (caldo malonato, glucosa, sacarosa, lactosa, dulcitol y maltosa)^(7, 11).

La salmonelosis en la avicultura.

Tanto la pulorosis como la tifoidea aviar se consideran erradicadas en la mayor parte de Europa y Canadá, pero aún no han sido controladas en el centro y sur de América, África y Asia. En México no se han reportado casos *S. gallinarum* desde 1998 y en el año 2002 éste país fue declarado libre de *S. pullorum*, debido a que desde 1989 no se han reportado casos de pulorosis^{*, **}.

^{*}<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx> (22/08/03)
^{**}http://www.oie.int/hs2/help_esp (01/09/03)

Al respecto, la pulorosis es una enfermedad que afecta principalmente a pollos menores de tres semanas de edad y puede ocasionar hasta el 90% de mortalidad, los animales sobrevivientes usualmente son débiles, raquíticos y pierden por ello su valor comercial. Por otro lado, la tifoidea aviar se observa en aves adultas, usualmente mayores de 12 semanas de edad. En la fase aguda de la infección las aves pueden morir entre los 4 a 10 días de la enfermedad y la mortalidad varía entre el 1 y 40%; sin embargo aunque lo antes mencionado es lo que se presenta con más frecuencia, para éstas enfermedades no existe un patrón general de manifestaciones⁽¹²⁾. En el caso de las paratifoideas causadas por *S. enteritidis* o *S. typhimurium* afectan principalmente a pollos jóvenes y sometidos a situaciones de estrés⁽¹²⁾, pero también llegan a afectar a aves adultas⁽⁸⁾.

En los pollos se desarrolla una infección que invade la mucosa intestinal y los tejidos linfoides asociados a ella, ocasionando la eliminación de *Salmonella* en heces. A menudo invade los ovarios y el oviducto, pudiéndose presentar una futura infección *in ovo*⁽¹²⁾. Además, la superficie de los huevos puede ser contaminada al pasar por la cloaca o inmediatamente después de ser ovopositados⁽¹²⁾. En aves adultas los dos hallazgos observados con mayor frecuencia son la colonización intestinal y la diseminación sistémica hacia órganos internos, donde se han podido aislar salmonelas a partir de hígado, bazo, pulmones, ovarios, oviducto y peritoneo de aves infectadas natural o experimentalmente⁽¹³⁾. Las aves enfermas presentan signos como diarrea, debilidad, anorexia, plumas erizadas, amontonamiento y conjuntivitis⁽¹⁴⁾.

Las aves afectadas representan uno de los reservorios más importantes de salmonelas que pueden ser transmitidas hacia las demás especies de la cadena alimenticia. Con más frecuencia que en cualquier otra especie, se mencionan los aislamientos de *Salmonella* tanto de aves como de productos avícolas. Ésto tal vez refleja la gran prevalencia de las infecciones en las aves, aunado a los sistemas intensivos que demandan altas densidades de pollos y pavos criados

de manera comercial, con la necesidad de aplicar programas a nivel mundial para identificar las parvadas infectadas⁽¹³⁾.

La presencia de cualquiera de las entidades antes descritas en las granjas de producción avícola repercute de dos maneras: impacta directamente sobre la industria, ya que contribuye a diseminar la bacteria en los pollos recién nacidos, y afecta la salud pública, ocasionando diarreas asociadas al consumo de huevos o productos avícolas contaminados⁽¹²⁾.

Impacto de la *Salmonella enteritidis* en la salud pública.

En humanos, los problemas de salud pública asociados con infección por *Salmonella* han aumentado en los últimos veinte años, en particular los originados por la infección de aves comerciales con *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, generado serios brotes epidémicos en Europa y Estados Unidos⁽¹⁵⁾. Éste incremento, está relacionado con el consumo de alimentos contaminados, entre los cuales se encuentran principalmente la carne de pollo, la carne de cerdo y el huevo, además del agua y la leche sin pasteurizar, así como la presencia de mascotas que fungen como portadores⁽¹⁰⁾.

Otras formas de infección derivan de manos de trabajadores que manejan alimentos, equipo y utensilios contaminados. Los casos esporádicos ocurren por contacto directo con un animal o persona infectada⁽¹⁶⁾.

Actualmente en Gran Bretaña los serotipos más frecuentes son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*⁽⁷⁾. En México, las notificaciones por casos de salmonelosis humana registran un incremento, de 100,342 casos en 1994 a 215,155 en 1998. En el período de 1972 a 1999 se analizaron 24,394 cepas de *Salmonella*, de las cuales el 64.9% fueron de origen humano y el 35.1% de origen no humano; de éste último el 57.6% se aisló de alimentos, donde el 22% corresponde a carne (molida de pollo, pescado y res) y el 1% a huevo fresco y en polvo. Los resultados encontrados son similares a los que provienen de otras partes del

mundo, quienes coinciden al reportar a *S. enteritidis* y *S. typhimurium* como los serotipos aislados con mayor frecuencia⁽¹⁷⁾.

Métodos de control.

La frecuente asociación entre las infecciones por *Salmonella* y los huevos de consumo humano han tenido gran impacto y han causado profunda inquietud, dando lugar a diversas tentativas nacionales e internacionales de controlar el problema⁽¹⁸⁾, y aún cuando la prevención eficaz de estas infecciones sólo puede conseguirse implementando programas integrales de seguridad y control, tanto en la producción animal como en el sector alimenticio, al igual que en los consumidores; probablemente, lo más práctico para reducir la magnitud del problema sea el control de la infección en la granja, con el cual se evitarían pérdidas en la industria avícola, y la entrada de la bacteria a la cadena alimenticia⁽¹²⁾.

Entre los métodos preventivos cabe citar el sacrificio de los reproductores infectados, el tratamiento térmico de los alimentos y la aplicación de estrictas medidas de higiene, como el uso de barreras sanitarias a la entrada de la granja, aunque tales medidas no siempre resultan económicamente viables⁽¹⁸⁾.

Las medidas biológicas consideradas en los programas de control incluyen el uso de antibióticos, la exclusión competitiva, la inmunoprofilaxis y las vacunas. La terapia con antibióticos, o en combinación con exclusión competitiva, se aplica con muchas reservas en la producción de animales para consumo humano debido al incremento en la selección de cepas resistentes, patógenas para aves y/o humanos. En la exclusión competitiva se emplean cepas bacterianas no patógenas para colonizar el intestino de pollitos recién eclosionados y con ello impedir la multiplicación de bacterias patógenas como *Salmonella*^(12,18). Con respecto a la inmunoprofilaxis, se ha reportado el empleo de extractos crudos de citocinas producidas por linfocitos T provenientes de pollos inmunizados con *Salmonella enteritidis*⁽¹⁹⁾. Ambos procedimientos muestran resultados

alentadores cuando se administran en pollos jóvenes, sin embargo la duración de protección no es prolongada y no se genera memoria⁽²⁰⁾.

Con relación a las vacunas, está plenamente demostrado que son mejores reactivos biológicos que permiten prevenir infecciones, debido a que confieren una inmunidad más sólida o persistente. Para ello se encuentran disponibles dos tipos de vacunas: las elaboradas a partir de bacterias inactivadas y las elaboradas a partir de bacterias vivas atenuadas^(20, 21).

En 1950 se obtuvo la cepa atenuada *Salmonella gallinarum* 9R con la cual se elaboró una vacuna que es administrada por vía oral y confiere protección contra la infección sistémica en pollos adultos, aunque su gran inconveniente es retener cierto grado de virulencia, por lo tanto la bacteria persiste durante varios meses y puede ser transmitida verticalmente a los huevos⁽²⁰⁾.

Actualmente, en Europa se comercializan dos vacunas. La primera, está elaborada con *Salmonella enteritidis* fagotipo 4 inactivada y se recomienda para el control de infecciones producidas por dicha bacteria; y la segunda, es una vacuna con base en una cepa mutante de *Salmonella typhimurium*, y de acuerdo con las especificaciones protege contra *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella heidelberg*⁽²¹⁾.

En fase experimental, se encuentran un par de candidatos a vacunas elaboradas con cepas mutantes de *Salmonella gallinarum*: la mutante en el gen Aro A, cuya característica que le confiere deficiencias en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, siendo menos virulenta que la cepa original, ésta no induce mayor protección que la alcanzada con la vacuna 9R^(21, 22); la inmunización con la cepa mutante de *Salmonella enteritidis* EI/1/3, cuyos primeros resultados han mostrado que pollos desafiados con la cepa virulenta han presentado una disminución significativa en la cantidad de bacterias que colonizan bazo, así como también se ha observado disminución en la excreción de la bacteria en heces⁽²³⁾.

Otras vacunas en experimentación emplean algunos de los componentes bacterianos como inmunógenos. Se han utilizado vacunas contra *Salmonella* con base en subunidades, como las proteínas de membrana externa (PME) de *Salmonella gallinarum*, quienes han inducido protección⁽²⁴⁾.

Chopra en 1987⁽²⁵⁾ y Ruttler en 1988⁽²⁶⁾ realizaron trabajos sobre la patogenia de las infecciones intestinales causadas por *S. typhi* y *S. typhimurium*, encontraron que producen una enterotóxina que altera la secreción de líquidos y electrolitos en el intestino de conejo. Kunkel y Robertson en 1979⁽²⁷⁾, demostraron la existencia de una enterotóxina que estaba muy relacionada a la membrana externa en *S. enteritidis*. Al respecto, Meenakshi *et al.*, en 1999⁽²⁸⁾, comprobaron que dichas proteínas fueron capaces de generar protección contra un desafío de campo con *S. enteritidis*, al no reaislarla a partir de heces en las aves desafiadas. Fadl en el 2002⁽²⁹⁾, demostró que existen proteínas de membrana externa capaces de reducir la unión entre *S. enteritidis* y la mucosa intestinal, sugiriendo que es posible que éstas proteínas sean inmunógenos potenciales para reducir la colonización por *Salmonella* en aves y, por otra parte Urquiza y sus colaboradores en el 2002⁽³⁰⁾ demostraron que *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko produce proteínas que se liberan al medio (PSNC), además de contener, proteínas en el espacio periplasmático (PP), ambas, fueron capaces de producir efecto citotóxico y efecto de vacuolización temprana en células de hámster chino (CHO). Con éstos antecedentes, el presente trabajo tiene el objetivo de evaluar la capacidad inmunogénica de las PSNC y las PP.

HIPÓTESIS

Las proteínas del sobrenadante del cultivo y las proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko, protegerán a los pollos de engorda contra una infección experimental de *Salmonella enteritidis*.

OBJETIVO

Evaluar el uso de las proteínas del sobrenadante del cultivo y de proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko como inmunógenos para el control de *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa bacteriana. Se empleó una cepa de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SEI), y una cepa de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 A (SE PT13A), del Departamento de Producción Animal: Aves⁽³¹⁾.

Obtención de las proteínas. Las PSNC y las PP se aislaron a partir de un cultivo puro de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko.

Extracción de proteínas. Se realizó un cultivo primario con 80 colonias de la cepa de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko, en matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 200 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón^a (CICC)⁽³⁰⁾, incubándose en agitación a 200 RPM^b durante 24 hrs a 37°C.

De éste cultivo primario se tomaron diez ml y se sembraron en un matraz Erlen Meyer de 500 ml conteniendo 200 ml de CICC^a, y se incubaron en agitación a 200 RPM^b durante 24 hrs a 37°C. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 12,000 RPM durante 30 minutos a 4°C^c. El sobrenadante se mantuvo en refrigeración para seguidamente ser filtrado a través de membranas de 0.22µm^d. El medio de cultivo que se obtuvo después de la primera centrifugación contenía las PSNC. A continuación, el precipitado de células obtenido, fue lavado dos veces con una solución amortiguadora salina fosfatada (PBS) con pH 7.4 y centrifugado en cada ocasión a 12,000 RPM a 4°C. En el último lavado, la

^a Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, Maryland 21211

^b New Brunswick Scientific CO. Inc., USA., Modelo G-24

^c Sorvall, RC-5B, DuPont Company, Wilmington, DE., USA.

^d Millipore HVLPO2500

pastilla fue resuspendida con PBS y se trató con 0.001g/10 ml de sulfato de polimixina B^e, incubándose en agitación durante 30 minutos a 37°C. El sobrenadante obtenido fue filtrado y almacenado como se describió anteriormente.

Las PSNC y las PP obtenidas de las células tratadas con polimixina, fueron precipitadas con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)^e al 70%, para posteriormente ser dializadas contra una solución de trizma^f base al 0.05 M, NaCl^a 0.2 M, Na₂ EDTA^e 0.001 M, NaN₃ 0.003 M^e, pH 7.5⁽³²⁾.

Cuantificación de proteínas. La cuantificación de las PSNC y las PP obtenidas de ambas salmonelas se llevó a cabo mediante el micrométodo de Bradford⁽³³⁾. La lectura se realizó por espectrofotometría^g a 595 nm en absorbancia.

Preparación del inmunógeno. Las PSNC y las PP de SEI se prepararon con una concentración de 5µg /ml de PSNC y 5µg/ml de PP. Como vehículo de las proteínas se empleó agua destilada⁽³²⁾.

Diseño Experimental

Animales de experimentación. La prueba se realizó en 167 pollitos de engorda, de un día de edad estirpe Ross x Ross, clínicamente sanos, sexo mixto los cuales se alojaron en las Unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la FMVZ, UNAM, en una batería Petersime^h de 6 niveles con dos divisiones en cada nivel. Al arribo de los pollitos, 5 de ellos fueron sacrificados humanitariamente de acuerdo con la NOM-033-ZOO-1995, para realizar estudios bacteriológicos, a partir de muestras de hígado, bazo, vesícula biliar, duodeno, tonsilas cecales y conducto de Meckel con objeto de

^e Sigma Chemicals. St. Louis, MO. USA.

^f Difco Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

^g Beckman, USA., Mod. DU.

^h Petersime incubator, Gettysburg, Ohio 45328, USA. Mod. 2 SD 24

descartar la presencia de *Salmonella* spp, para ello se utilizaron métodos de cultivo estándar⁽¹¹⁾. Al resto de los pollitos se les proporcionó alimento comercial y agua *ad libitum* durante todo el tiempo de la prueba.

Los pollitos fueron distribuidos de la siguiente manera:

Se crearon 6 grupos, formados por 27 pollitos cada uno, con tres repeticiones de 9 pollitos cada uno (Cuadro 1).

Grupo 1. Grupo testigo positivo de SE PT13A. Cada pollo fue inoculado con 500µl de SE PT13A, con una concentración de 1×10^6 UFC/ml en una sola dosis por vía oral, al día uno de edad.

Grupo 2. Grupo testigo negativo a SE PT13A. Cada pollo fue inoculado con 500µl de PBS estéril, en una sola dosis por vía oral, al día uno de edad.

Grupo 3. Grupo testigo positivo de PSNC de SEI. Cada pollo fue inoculado con 500µl de PSNC de SEI, con una concentración de 5µg/ml en una sola aplicación por vía oral, al día uno de edad.

Grupo 4. Grupo testigo positivo de PP de SEI. Cada pollo fue inoculado con 500µl de PP de SEI, con una concentración de 5µg/ml en una sola aplicación por vía oral, al día uno de edad.

Grupo 5. Grupo experimental con PSNC de SEI y desafío con SE PT13A. Cada pollo fue inoculado con 500µl de PSNC de SEI, con una concentración de 5µg/ml en una sola aplicación por vía oral al día uno y, al día 15 de edad se desafiaron con una dosis de 500µl de SE PT13A, con una concentración de 1×10^6 UFC/ml por vía oral.

Grupo 6. Grupo experimental con PP de SEI y desafío con SE PT13A. Cada pollo fue inoculado con 500µl de PP de SEI, con una concentración de 5µg/ml en una sola aplicación por vía oral al día uno y, al día 15 de edad se desafiaron con una dosis de 500µl de SE PT13A, con una concentración de 1×10^6 UFC/ml por vía oral.

Durante el tiempo de la prueba a todos los pollitos se les proporcionó agua y alimento comercial a libre acceso.

Exámen bacteriológico. Las aves fueron sacrificadas humanitariamente⁽³⁴⁾ y se les realizó la necropsia, poniendo especial interés en buscar lesiones sugestivas a salmonelosis. Se tomaron muestras de corazón, pulmón, bazo, hígado, vesícula biliar, saco vitelino y conducto de Meckel, para realizar exámenes bacteriológicos⁽¹¹⁾. El corazón y el pulmón se trabajaron como una sola muestra combinada, al igual que el bazo y el hígado. Las muestras de vesícula biliar, saco vitelino y conducto de Meckel se trabajaron en forma separada. Los órganos fueron incubados por 24 horas a 37°C en Caldo Tetrionato (Ctet)^f. Después de la incubación, el caldo se homogenizó y se sembró en placas de agar Mc Conkeyⁱ, las cuales se incubaron 24 horas a 37°C. A las colonias sospechosas a *Salmonella* spp, se les realizaron pruebas bioquímicas⁽¹¹⁾ y bioquímicas complementarias, lisina descarboxilasa (LD)^f y ornitina descarboxilasa (OD)^f, para su identificación final^(35, 36).

Estudio serológico. Se tomaron muestras de todos los pollitos para estudios serológicos (Aglutinación en placa y microaglutinación), a los días 1, 7, 15 y 28 de edad, y se mantuvieron en refrigeración.

ⁱ Diagnostica Merck, Darmstadt, R.F. de Alemania.

RESULTADOS

Bacteriología.

Debido a las principales características bioquímicas de *S. enteritidis* se empleó como medio de cultivo caldo tetrionato; posteriormente, se sembraron en agar MacConkey, donde se apreció el crecimiento de bacterias lactosa negativa o positiva (Gráfica 1).

A las bacterias lactosa negativa se les realizaron resiembras hasta purificarlas, de tal modo que se observaran homogéneas en la caja de Petri. Por último, se les corrieron pruebas bioquímicas complementarias donde pudimos observar diversas reacciones, como la producción de ácido sulfídrico, producción de gas y motilidad, entre otras. Obteniendo los siguientes resultados:

En las muestras de las aves correspondientes al grupo 1, que se inocularon sólo con *S. enteritidis*, se aislaron 28.42% organismos lactosa negativo, de los cuales se aisló una muestra sospechosa a *Salmonella* spp.

En los grupos 2, 3, 4 y 5 se encontraron organismos lactosa negativos en un 34.25, 44.74, 43.42 y 32.95% respectivamente, sin embargo no hubo bacterias sospechosas a *Salmonella* spp.

El grupo 6, correspondiente a las aves inoculadas con PP y desafiadas con *S. enteritidis*, se obtuvo un 22.22% de bacterias no fermentadoras de lactosa, en éstas se encontró una muestra sospechosa de *Salmonella* spp (Cuadro 2).

Serología.

La aglutinación en placa realizada a las muestras, tomadas los días 1, 7 y 15, fue negativa. No obstante, se encontraron resultados positivos en los grupos 5 y 6 del día 28 (Gráfica 2, Cuadro 3).

La prueba de microaglutinación fue negativa en todas las muestras tomadas los días 1, 7, 15 y 28 (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial que tiene impacto económico en la avicultura además de afectar la salud pública y las paratifoideas representan un severo problema, ya que afectan a varias especies animales y también al hombre^(1, 2).

Las aves afectadas representan uno de los reservorios más importantes de salmonelas que pueden ser transmitidas hacia las demás especies de la cadena alimenticia; en las estadísticas realizadas en México se mencionan los aislamientos de *Salmonella* tanto de aves como de productos avícolas. En humanos, los problemas de salud pública asociados a infección por *Salmonella* se han incrementado en los últimos veinte años, en particular los originados por la infección de aves comerciales con *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, generando serios brotes epidémicos de paratifoideas en Europa y Estados Unidos, ocasionados por el consumo de huevos y/o carne de pollo contaminados con este género bacteriano⁽¹⁷⁾.

El desarrollo de las investigaciones sobre salmonelosis se puede observar desde tiempos remotos, cuando la enfermedad ocurría de forma natural en ratas y ratones de laboratorio, siendo Loeffler⁽³¹⁾ quien realizó el primer aislamiento de *S. typhimurium* a partir de éstos animales en la última década del siglo XIX. En 1893, Danysz⁽³¹⁾ aisló una cepa de *Salmonella* que causó mortalidad en ratones de laboratorio y, después la utilizó para controlar la enfermedad en ratones de campo y en roedores domésticos; dicha cepa se denominó como *S. enteritidis* var Danysz⁽³¹⁾. Posteriormente, V. L. Issatschenko en 1898^(37, 38) separó cultivos puros a partir de los órganos de ratas grises muertas en el transcurso de una epizootia que se desarrolló en San Petesburgo, ésta variedad de *Salmonella* después de varios años fué identificada como *S. enteritidis*, la cual afectó solamente a roedores y resultó inocua para humanos y animales domésticos⁽³⁸⁾.

A través de los años, se han utilizado diversos sinónimos de *S. enteritidis* variedad 17 F-4, subgrupo 1, grupo D que provoca mortalidad en roedores, tales como: *S. enteritidis* var. Issatschenko, Danysz, Gaetner, Liverpool, Ratin, Projorov y *Salmonella enteritidis*, subespecie entérica, bioserotipo *enteritidis*; ambas salmonelas poseen similar fórmula antigénica pero tienen diferencias en las reacciones bioquímicas, incluyendo a *S. Issatschenko*, quien además afecta solamente a roedores (Cuadro 5). Sin embargo, en estudios realizados con roedores en Cuba y experiencias de campo en laboratorios de algunos países asiáticos y centroamericanos, se ha observado que *S. enteritidis* variedad 17 F-4, subgrupo 1, grupo D (var. *Danysz*) solamente afecta a roedores de la familia Muridae y no a otras especies domésticas. Contrario a lo observado con *S. enteritidis* serotipo *enteritidis*, perteneciente al grupo D, subgrupo 1 con antígenos O: 1, 9, 12 y H: g, m según la clasificación de Kauffmann-White; pero ésta especie afecta a todas las especies animales incluyendo al hombre^(2,5,31,38). Cabe mencionar que dicha salmonella también contiene antígenos somáticos 1, 9, 12 y flagelares g, m; la descarboxilación a la lisina es negativa y la fermentación de rhamnosa es negativa también⁽³¹⁾.

Salyers y Whitt en 2002⁽³⁹⁾, mencionan que una vez que *Salmonella* spp se encuentra dentro del organismo, crece dentro de los macrófagos de hígado y bazo. En el caso de *Salmonella typhimurium*, vive principalmente dentro de las células del hospedero que fuera de ellas. Existen algunas evidencias de ensayos *in vitro*, donde se observa que, cuando *Salmonella typhimurium* es ingerida por fagocitos, muchas de éstas bacterias son destruidas, pero una subpoblación sobrevive. Hasta el momento, se desconocen las características de ésta subpoblación o si la bacteria que sobrevive puede crecer en los fagocitos. Chopra en 1987⁽²⁵⁾ y Ruttler en 1988⁽²⁶⁾, realizaron trabajos sobre la patogenia de las infecciones intestinales causadas por *S. typhi* y *S. typhimurium*, encontraron que producen una enterotóxina que altera la secreción de líquidos y electrolitos en el intestino de conejo. Kunkel y Robertson en 1979⁽²⁷⁾,

demonstraron la existencia de una enterotóxina que estaba muy relacionada a la membrana externa en *S. enteritidis*.

Urquiza en el 2001⁽³¹⁾, menciona que en el muestreo bacteriológico de las heces, se logró recuperar *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko en los 3 y 5 días postinoculación de dicha bacteria a partir de ratones; posteriormente, no hubo recuperación de la bacteria. En los grupos de ratones a los que se les administró la bacteria en suspensión por vía intra peritoneal y subcutánea, no se recuperó la bacteria en ningún momento de la prueba⁽³¹⁾. Los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por otros investigadores⁽³⁹⁾, al no obtenerse el aislamiento de *Salmonella* en la mayoría de las muestras. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que *Salmonella* no siempre se aísla de los tejidos y heces por ser eliminada intermitentemente⁽⁶⁾ y, por otra parte, el haber administrado PSNC y PP evitó que no se aislara la bacteria inoculada, como ocurrió con Meenakshi *et al.* en 1999⁽²⁸⁾, quienes comprobaron que las PME fueron capaces de generar protección contra un desafío de campo con *S. enteritidis*, al no reaislarla a partir de heces en las aves desafiadas. En el presente estudio, sólo se lograron aislar dos posibles salmonelas a partir de la combinación de órganos como bazo e hígado y pulmón con corazón de las aves que fueron sacrificadas (grupos 1 y 6), lo que indica una posible septicemia en esas aves por la invasión de *Salmonella* a órganos como parte de su patogenia.

Respecto a la producción de anticuerpos, no se detectaron anticuerpos contra salmonella en las pruebas realizadas, salvo en el día 28 posinoculación en 8/16 sueros a partir de los dos grupos experimentales (Grupos 5 y 6) habiéndose empleado un antígeno heterólogo^{***} con el que posiblemente no se pudieron detectar mayor número de muestras con anticuerpos⁽⁴⁰⁾.

*** Antígeno K polivalente de *S. pullorum*

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación sugieren lo siguiente:

- *Salmonella enteritidis*, produjo signología clínica de salmonelosis, al observarse una mortalidad mayor al 50% en pollitos de todos los grupos inoculados.
- Con la administración de PSNC de SEI se redujeron los aislamientos de SE, como lo observado en el grupo de PSNC + SE, donde no se obtuvo aislamiento positivo de SE, sugiriendo que éstas proteínas pueden funcionar como inmunógenos.
- En los muestreos aleatorios se encontraron anticuerpos contra *Salmonella* en el día 28 a partir de los grupos desafiados con *S. enteritidis* al día 15 de edad.
- Es necesario llevar a cabo estudios más prolongados y aumentar el número de muestras para conocer si existe eliminación de *S. enteritidis* en heces y en aves sacrificadas.
- Se necesitaría una mayor concentración de PP de SEI para producir el mismo efecto que se observó con las PSNC; debido a que en ésta investigación, con el empleo de PP de SEI y desafío con SE, aún cuando se obtuvieron aislamientos negativos a *Salmonella* en la mayoría de las muestras, sí se logró el aislamiento de la bacteria.

LITERATURA CITADA

1. Silva EN. The *Salmonella gallinarum* problem in America Central y South America. In G. H. Snoeyenos (de), Proc Int Symp *Salmonella*. Am. Assoc. Avian. pathol., Kennet Square, PA. 1984: 150-156.
2. Shivaprasad HL. Pullorum disease and fowl typhoid. In Diseases poultry. 11th. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, Mc Dougald LR, et al. Iowa State University press U. S. A. 2003: 567-568.
3. Unión Nacional de avicultores. Página electrónica www.una.com.mx 17/02/04.
4. Popoff MY, Bockemuhl J, and Brenner FW. Supplement 1998 (No. 42) to the Kauffmann-White Scheme. Res Microbiol, 2000; 151: 63-65.
5. Dorantes A, Reyes E, Téllez IG, Urquiza BO. Antisueros policlonales flagelares y diferenciación de *Salmonella enteritidis* en el diagnóstico de la salmonelosis aviar. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Dirección de Educación Continua, Departamento de Producción Animal: Aves. VI Jornada Médico Avícola del 12-14 de marzo 1997:299-310.
6. Álvarez MM, De la Puente RVA, Antelo NFR. Primer curso de zoonosis. Universidad de León, Facultad de Veterinaria. España 1997:333-358.
7. Wray C, Davies RH, Corkish JD. Enterobacterias. En Enfermedades de las aves, 3ª ed. Jordan FTW, Pattison M. El Manual Moderno. México 1998:9-22.
8. Gast RK. Paratyphoid infections. In Diseases poultry. 11th. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, Mc Dougald LR, et al. Iowa State University press U. S. A. 2003: 583-613.
9. Pomeroy BS, Nagaraja KV, Calnek BW. Fowl typhoid. In Diseases poultry. 9th. Iowa State University press U. S. A. 1991:87-99.
10. Gutiérrez CA del C, Calderón ANL, Paasch MLH, López FVY. Los alimentos de origen aviar como importante fuente de infección de *Campylobacter* y *Salmonella* en humanos. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. XXVIII Convención anual; Boca del Río, Veracruz. 20 de abril al 03 de mayo. 2003.

11. NOM-005-ZOO-1993. Norma Oficial Mexicana: Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Diario Oficial. México (DF): Septiembre, 1994.
12. Pascual M, Hugas M, Badiola JI, Monfort JM, Garriga M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. App. Env Microbiol. 1999; 65:4981-4986.
13. Gast RK. Paratyphoid infections. In Diseases of poultry. 10th. Calnek BW. Iowa State University Press Ames Iowa, USA 1997:97-112.
14. Buxadé CC. La gallina ponedora 2ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. España. 2000:572-575.
15. Baumler AJ, Hargis BM, Tsohis RM. Tracing de origins of *Salmonella* outbreaks. Science 2000; 287: 50-52.
16. Carter GR, Chengappa MM. Bacteriología y micología veterinarias: aspectos escenciales. 2ª ed. Edit. El Manual Moderno. México 1994.
17. Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera-Pérez P. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de México. Salud pública de México 2000; 42:490-495.
18. Barrow PA. The paratyphoid Salmonellae. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2000:351-375.
19. Kogut M, Tellez G, McGruder E, Hargis B, De Loach J. Immunoprophylaxis of *Salmonella gallinarum* infection by *Salmonella enteritidis* - immune lymphokines in broiler chicks. Adv. Exp. Med. Biol. 1997; 412:413-420.
20. Zhang-Barber L, Tuner AK, Barrow PA. Vaccination for control *Salmonella* in poultry. Vaccine 1999; 17:538-545.
21. Griffin HG, Barrow PA. Construction of an Aro A mutant of *Salmonella* serotype *gallinarum*: its effectiveness against experimental fowl typhoid. Vaccine 1993; 11:457-462.
22. Simon MS. Tendencias en el control de las enfermedades aviares. En Temas de actualidad para la industria avícola. Iván RB. Universidad Estatal de Louisiana. 1995:253-254.

23. Cerquetti MC, Gherardi MM. Vaccination of chicken with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis*. *Vaccine* 2000; 18:1140-1145.
24. Bouzoubaa K, Nagaraja VK, Newman JA, Pomeroy BS. Use of proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.* 1987; 31:699-704.
25. Chopra KA, Houston WC, Peterson WJ, Prasad R, Mekalanos JJ., Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *J. Bacteriol* 1987; 169:5095-5099.
26. Ruttler JM. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Roth, A. J. Editor. Bacterial toxin as a virulence determinants of veterinary pathogens: an overview. Library of congress Cataloging in Publication Data. American Society of Microbiology. Ames, Iowa State University USA 1988; 213-227.
27. Kunkel LS, Robertson CD. Purification and characterization of the Heat-Labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect and Immun* 1979; 25:586-596.
28. Meenakshi M, Bakshi CS, Butchaiah G, Bansal MP, Siddiqui MZ, Singh VP. Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella enteritidis*, *Vet. Res. Commun* 1999; 23:81-90.
29. Fadl AA, Venkitanarayanan KS, Khan MI. Identification of *Salmonella enteritidis* outer membrane proteins expressed during attachment to human intestinal epithelial cells. *J. Appl. Microbiol* 2002; 1:180-186.
30. Urquiza BO, Téllez IG, Paasch ML, Ruiz-Palacios G, Díaz BA, Determinación de la reacción cruzada de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de proteínas periplasmáticas (PP) de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko. *Memorias de la VIII Jornadas Medico Avícolas*; 2002 febrero 20-22; México, D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. DPA: Aves, UNAM, 2002: 283-295.
31. Urquiza BO. Patogenicidad e inocuidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 en animales de laboratorio y determinación de proteínas con actividad enterotóxica (tesis de doctorado). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.

32. Urquiza BO. Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum* (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantitative of proteins utilizing the principal of proteins dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
34. NOM-033-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana, sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Publicado en Diario Federal de la Nación 07/16/96.
35. Villegas P and Graham P. Titration of biological suspensions. Isolation and identification of avian pathogens. 2nd ed. New York: The American Association of Avian Pathologists 1980: 124-128.
36. Andrews WH, Poelma PL, Wilson CR and Romero A. Isolation and identification of Salmonella. In: Bacteriological Analytical and Manual, 5th de. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 1978: 1-29.
37. Página electrónica: <http://www.ocpi.cu/doc/2000/T6893.PDF> (01/06/04) Oficina Cubana de la Propiedad Industrial.
38. Mancera MA, Vázquez NJ, Heneidi ZA. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. Téc. Pecu. Méx. 2004; 42:287-294.
39. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis. A molecular Approach. Salmonella species. American Society for Mycrobiology Press. Washington, D.C. 2002: 381-392.
40. Tizard IR. Inmunología veterinaria 5ª ed. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México 1998: 19-21.

CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Diseño experimental.

Grupo	Experim/control	Espécimen	Dosis infectante	Día de inoculación	Vía de inoculación
1	Control (+)	<i>S. enteritidis</i>	500 μ l /10 ⁶	15	Oral
2	Control (-)	PBS	500 μ l	15	Oral
3	Control (+)	PSNC*	500 μ l	1	Oral
4	Control (+)	PP*	500 μ l	1	Oral
5	EXPERIMENTAL	PSNC* + S. <i>enteritidis</i>	500 μ l + 500 μ l/10 ⁶	1 desafío al día 15	Oral
6	EXPERIMENTAL	PP* + S. <i>enteritidis</i>	500 μ l + 500 μ l/10 ⁶	1 desafío al día 15	Oral

* de *S. enteritidis* biovar Issatschenko con una concentración de 5 μ g/ml de PSNC y 5 μ g/ml de PP.

Cuadro 2. Muestras sospechosas para *Salmonella* spp.

Grupo	Experim/Control	Espécimen	Muestras Lactosa (-) %	Resultados de las muestras sospechosas para <i>Salmonella</i> spp
1	Control (+)	<i>S. enteritidis</i>	28.42	1
2	Control (-)	PBS	34.25	0
3	Control (+)	PSNC*	44.74	0
4	Control (+)	PP*	43.42	0
5	EXPERIMENTAL	PSNC* + <i>S. enteritidis</i>	32.95	0
6	EXPERIMENTAL	PP* + <i>S. enteritidis</i>	22.22	1

* de *S. enteritidis* biovar Issatschenko con una concentración de 5µg /ml de PSNC y 5µg/ml de PP.

Cuadro 3. Relación de los sueros positivos en la aglutinación en placa.

Grupo	Experim/control	Espécimen	Ap Sp (+) día 1	Ap Sp (+) día 7	Ap Sp (+) día 15	Ap Sp (+) día 28
1	Control (+)	<i>S. enteritidis</i>	0/9	0/9	0/9	0/9
2	Control (-)	PBS	0/9	0/9	0/9	0/9
3	Control (+)	PSNC*	0/9	0/9	0/9	0/9
4	Control (+)	PP*	0/9	0/9	0/9	0/9
5	EXPERIMENTAL	PSNC* + <i>S. enteritidis</i>	0/9	0/9	0/9	3/9
6	EXPERIMENTAL	PP* + <i>S. enteritidis</i>	0/9	0/9	0/9	5/9

* de *S. enteritidis* biovar Issatschenko con una concentración de 5µg/ml de PSNC y 5µg/ml de PP.

Cuadro 4. Prueba de microaglutinación.

Grupo	Experim/control	Espécimen	día 1	día 7	día 15	día 28
1	Control (+)	<i>S. enteritidis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
2	Control (-)	PBS	(-)	(-)	(-)	(-)
3	Control (+)	PSNC*	(-)	(-)	(-)	(-)
4	Control (+)	PP*	(-)	(-)	(-)	(-)
5	EXPERIMENTAL	PSNC* + <i>S. enteritidis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
6	EXPERIMENTAL	PP* + <i>S. enteritidis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)

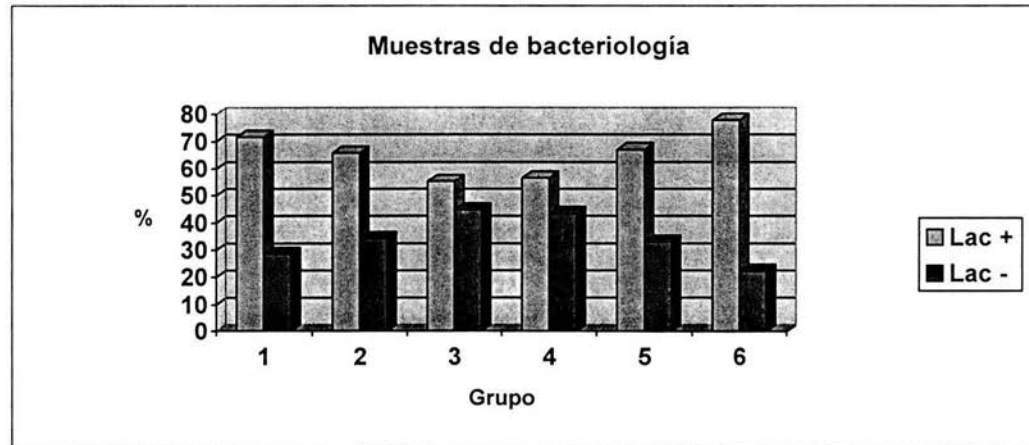
* de *S. enteritidis* biovar Issatschenko con una concentración de 5µg/ml de PSNC y 5µg/ml de PP.

Cuadro 5. Diferencias bioquímicas entre *SE* biovar Issatschenko y *SE* biovar Danysz.

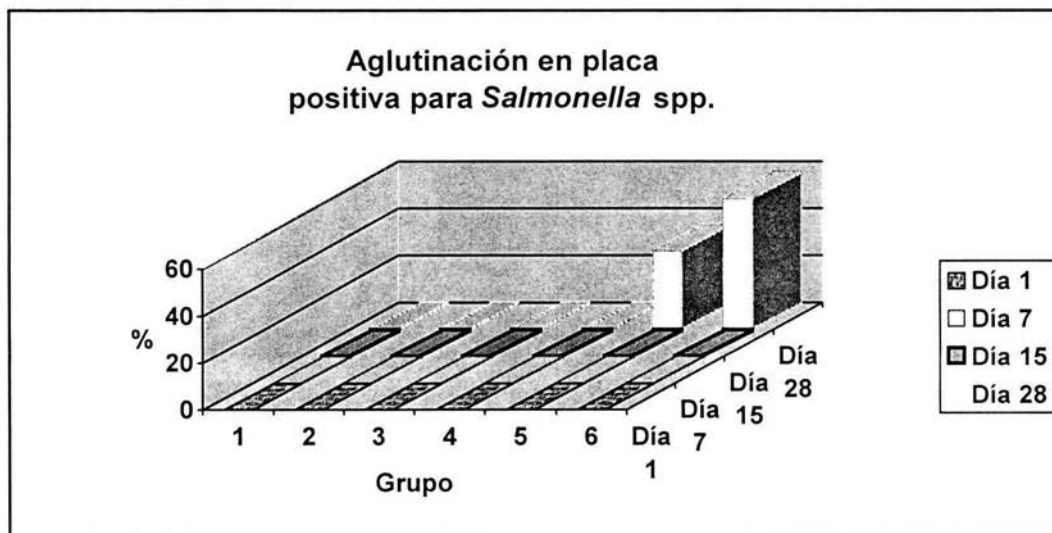
Biovar	Lisina descarboxilasa (LD)	Rhamnosa
Danysz	negativa	negativa
Issatschenko	negativa	positiva

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Gráfica 1. Crecimiento de bacterias lactosa negativa y positiva en agar MacConkey.



Gráfica 2. Aglutinación en placa positiva para *Salmonella* spp.



GLOSARIO

Antígeno: Molécula que induce una respuesta inmune.

Enterobacterias: Bacterias gram negativas aerobias o anaerobias facultativas, en forma de bastón, que pueden esporular y crecer bien en medios artificiales. Las especies móviles presentan flagelos peritricos y puede haber variantes sin movilidad. Algunas especies son inmóviles. Utilizan la glucosa para formar ácido o ácido y gas, mediante fermentación. Comprende a una gran cantidad de bacterias similares en su bioquímica, como son *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Proteus*.

Enterotoxina: Exotoxina producida por algunas enterobacterias, pueden ser producidas durante el crecimiento o ser liberadas durante la muerte bacteriana.

Exclusión competitiva: Actividad de la flora intestinal nativa para limitar la colonización intestinal por varios patógenos entéricos.

Inmunógeno: Sustancia capaz de producir respuesta inmune humoral y/o celular. Frecuentemente, éste término es usado como sinónimo de antígeno.

Inmunoprofilaxis: Prevención de enfermedades mediante el uso de vacunas, bacterinas, antisueros y toxoides.

Portador: Organismo vivo que no padece ningún cuadro clínico, pero elimina al agente patógeno diseminando la enfermedad.

Proteína: Compuestos orgánicos más comunes en todos los organismos, son responsables de las diferencias estructurales; están formadas por aminoácidos.

Unidad Formadora de Colonia: Término empleado para expresar el contenido de bacterias, asumiendo que cada bacteria da origen a una colonia.

Vacunas: Producto biológico elaborado con virus activos o inactivos o bacterias vivas atenuadas que, al ser inoculado a un individuo produce una inmunidad.

Vacuna atenuada: Producto biológico elaborado generalmente con virus vivo y bacterias de cepas, cuya virulencia se atenúa artificialmente; en el caso de las bacterias, haciendo pases por medio de cultivos celulares con temperaturas digenésicas, en el caso de los virus, por medio de pases de tejidos o en animales cuya susceptibilidad es muy baja. La capacidad de multiplicación por la atenuación no se ve afectada. Éstos productos biológicos confieren inmunidad.

Vacuna inactivada: Producto biológico elaborado con virus y bacterias que han perdido su capacidad de multiplicación por el tratamiento de sustancias químicas (formol, formaldehído, etc) o medios físicos (calor, rayos ultravioleta, etc). Producen inmunidad.

Zoonosis: Enfermedad infecciosa transmitida de los animales hacia el hombre.