



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“PATOGENIA DE *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar ISSATSCHENKO EN POLLOS DE ENGORDA”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**GRISELDA RUIZ FLORES**

**TUTOR: Dr. Fernando Constantino  
Casas**

**COMITÉ TUTORAL: Dr. José Antonio Quintana López  
Dr. Ariel Ortíz Muñíz**

**MÉXICO, DF**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIA**

**A Dios por estar siempre a mi lado**

**A tí que me diste tu vida, tu amor y respeto  
A tí que me llevaste en tu vientre con amor e ilusión  
A tí mi guerrero invencible, luchador incansable  
Valiente en tu casa y en cualquier lugar  
A tí mi amiga de toda la vida  
A tí que siempre crees en mí y confiaste en la distancia  
A tí que lloraste mi ausencia  
A tí que esperas con ansias mi regreso a casa  
A tí mi tesoro más valioso  
A tí te dedico quien soy, mis victorias  
A tí mis respetos, amor eterno  
Y para no hacer tanto alarde, esta mujer de quien hablo  
En mi vida es la más linda, mi amiga, mi tesoro  
Su nombre es Raymunda Flores de Ruiz  
es mi mamá.....**

**A mi padre y toda mi familia que en la distancia siempre me apoyaron con palabras de amor y aliento esperando mi regreso a casa...**

**A Santa Cruz de la Sierra, mi ciudad natal**

**A Bolivia mi hermoso país**

**por un futuro mejor...**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios padre, Jesús y a la Virgen María, guías de mi vida y destino, que me mostraron el camino y dieron fortaleza para obtener un logro más en mi vida**

**A mi madre, padre y toda mi familia por su apoyo moral y económico**

**A mis asesores de tesis:**

**La Dra. Odette Urquiza Bravo, por su colaboración a la realización del presente trabajo, por su tiempo, por sus sabios consejos, su confianza, su paciencia, por consentirme, defenderme y obsequiarme su amistad.**

**El Dr. Fernando Constantino Casas por responder a mí llamado en la distancia, por su tiempo dedicado a mi formación académica, la oportunidad y confianza durante la elaboración de esta tesis.**

**Al Comité tutorial: Dr. José Antonio Quintana López y Dr. Ariel Ortiz Muñiz, por sus acertados consejos durante la realización de la tesis.**

**A la Dra. Maria de la Luz Charles Noriega y Dr. Carlos López Coello por su amistad, cariño y por su colaboración en el análisis de hematología aviar.**

**A la Dra. Maritza Tamayo por su amistad, cariño y confianza.**

**Al Lic. Ramón Pacheco Ladrón de Guevara, un gran amigo, por sus sabios consejos, por su tiempo, cariño, amor, comprensión, confianza y apoyo incondicional durante mi estancia en México.**

**A México un bonito país a donde siempre volveré...**

**Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico con el Proyecto de Investigación para la investigación e innovación Tecnológica (PAPIT) con el No de Proyecto IN 219803.**

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Producción Animal Aves y en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Este trabajo fue presentado en el International Poultry Scientific Forum celebrado del 23-24 de Enero (2006) en Atlanta, Georgia.**

***No importa tanto si es poco o mucho lo que uno sea,  
pero lo que cuenta es serlo de verdad,  
cada día con mayor exigencia y rigor profesional  
Es preferible  
tener solo una habilidad bien desarrollada  
que varias con menor resultado***

***O. Capobianco***

***Cuando alguien logra en su corazón saber quien es,  
no hay nada que lo detenga para hacer de aquello  
el propósito de expresión de su vida***

***C. Walter***

CONTENIDO	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMARY</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. Epidemiología	4
1.2. Etiología	8
1.3. Transmisión	9
1.4. Patogenia de <i>Salmonella</i> spp.	9
1.4.1. Componentes de superficie de <i>Salmonella</i> spp.	10
1.4.2. Adhesión e Invasión	11
1.4.3. Invasión de la mucosa	12
1.4.4. Sistemas de secreción	13
1.4.5. Islas de patogenicidad	17
1.4.6. Aparatos de genes y proteínas secretadas	17
1.4.7. Vías de señalización celular inducidas por <i>Salmonella</i>	20
1.5. Patogenicidad de <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko	22
1.6. Signos clínicos	22
1.7. Lesiones macroscópicas por salmonelosis	23
1.8. Lesiones microscópicas por salmonelosis	24
1.9. Estudio ultraestructural de salmonelosis	24
1.10. Cambios leucocitarios por la infección por <i>Salmonella</i> spp.	25
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1. Objetivos general	27
3.2. Objetivos particulares	27
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
4.1. Animales de experimentación	28
4.2. Cepa bacteriana	28
4.3. Diseño experimental	29
4.4. Toma de muestras	30
4.5. Análisis bacteriológico	30
4.6. Conteo diferencial de leucocitos	31
4.7. Revisión de lesiones microscópicas	31
4.8. Revisión ultraestructural	32
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
5.1. Patogenia de <i>Salmonella enteritidis</i> fagotipo 13a	34
5.2. <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko	40
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>68</b>
<b>9. FLUJOGRAMA</b>	<b>83</b>
<b>10. CUADROS</b>	<b>84</b>
<b>11. FIGURAS</b>	<b>98</b>

## CUADROS

<b>Cuadro 1. Aislamiento bacteriológico de <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a y <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko en pollos de engorda inoculados experimentalmente</b>	<b>84</b>
<b>Cuadro 2. Frecuencia de aislamientos de SE FT 13a a partir de los órganos muestreados</b>	<b>85</b>
<b>Cuadro 3. Porcentaje de aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a por órganos muestreados</b>	<b>86</b>
<b>Cuadro 4. Estudio bacteriológico cuantitativo de <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a</b>	<b>87</b>
<b>Cuadro 5. Análisis bacteriológico para aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de heces tomadas cada 24 horas en pollos de engorda</b>	<b>88</b>
<b>Cuadro 6. Estudio bacteriológico cuantitativo de muestras de heces por tratamiento</b>	<b>89</b>
<b>Cuadro 7. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos después de la infección con <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a</b>	<b>90</b>
<b>Cuadro 8. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos después de la infección con <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a</b>	<b>91</b>
<b>Cuadro 9. Conteo diferencial de leucocitos en pollitos infectados por <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a y <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko</b>	<b>92</b>
<b>Cuadro 10. Frecuencia de aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko a partir de los órganos muestreados</b>	<b>93</b>
<b>Cuadro 11. Porcentaje del aislamiento <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko por órganos</b>	<b>94</b>
<b>Cuadro 12. Análisis bacteriológico cuantitativo de <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko</b>	<b>95</b>
<b>Cuadro 13. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos después de la infección con <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko</b>	<b>96</b>
<b>Cuadro 14. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos después de la infección con <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko</b>	<b>97</b>

## FIGURAS

Figura 1. Mapeo General de la patogenia <i>Salmonella</i> spp. por tratamientos a diferentes tiempos post-infección	98
Figura 2: Número y frecuencia de aislamiento de <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a en órganos	99
Figura 3: Porcentaje de aislamiento de <i>Salmonella enteritidis</i> FT13a por órganos	100
Figura 4a. Corazón: 126 hpi. SE FT13a. En endocardio, infiltración de heterófilos y macrófagos (paréntesis) H & E. 50x	101
Figura 4b. Corazón: 222 hpi. SE FT13a. Detalle de la infiltración de heterófilos y macrófagos (flecha). H & E. 400x.	101
Figura 5a. Hígado: 222 hpi. SE FT 13a. Área de necrosis coagulativa (Paréntesis) H & E 200x. 5b). Detalle del area de necrosis. H & E. 400X	102
Figura 5c. Hígado: 174 hpi. SE FT 13a. Áreas de infiltración de heterófilos y macrófagos. (Paréntesis y flecha) H & E. 50x. 5d) Detalle del área de infiltración. H & E. 200X.	102
Figura 6a. Íleon: 198 hpi. SE FT 13a. Áreas de infiltración de heterófilos, macrófagos. (Paréntesis y fecha). H & E. 50x. b) Detalle del área de infiltración. H & E. 200X.	103
Figura 6 c) Detalle del área de necrosis coagulativa del borde apical del epitelio intestinal (flecha) H & E 400x.	103
Figura 7. Íleon y ciego de pollitos infectados SE FT13a. Cambios ultraestructurales en enterocitos a) Ciego. 6 hpi. Bacterias en el lumen intestinal.	104
Figura 8. Íleon y ciego de pollitos infectados SE FT13a, 6 a 30 hpi. Cambios ultraestructurales, penetración e invasión de la bacteria a enterocitos	105
Figura 9. Número y frecuencia de aislamiento de <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko en órganos internos	106
Figura 10. Porcentaje de aislamiento de <i>Salmonella enteritidis</i> biovar Issatschenko por órganos	107

<b>Figura 11 a) Buche. 198 hpi. SI. Necrosis superficial del epitelio y áreas de infiltración de heterófilos y macrófagos (Círculo). H &amp; E. 100x. b) Detalle del área de infiltración. H &amp; E. 200X.</b>	<b>108</b>
<b>Figura 12. Ciego, 222 hpi. Áreas focales de infiltración de heterófilos y macrófagos. H &amp; E 100x. b) Detalle del área de infiltración. H &amp; E. 200X</b>	<b>108</b>
<b>Figura 13: Ciego de pollitos infectados con SI. Morfología general de microvellosidades intactas después de las 6 hpi. Diferentes estados de penetración de la bacteria a través de los microvellosidades</b>	<b>109</b>

**RUIZ FLORES GRISELDA. Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT13A y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda (Dr. FERNANDO CONSTANTINO CASAS, JOSE ANTONIO QUINTANA, ARIEL ORTIZ MUÑIZ y Dra. ODETTE URQUIZA BRAVO colaboradora invitada)**

El Objetivo del presente estudio fue determinar la patogenia de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a (SE FT13a) y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko fagotipo 6a (SI) en pollitos de engorda de 4 días edad. Veintiocho aves por tratamiento fueron inoculadas con dosis de  $1 \times 10^8$  (SE FT13a) y  $1 \times 10^9$  (SI) respectivamente. Se tomaron muestras de hígado, bazo, corazón, pulmón, buche, duodeno, yeyuno, íleon y ciego durante 14 tiempos post infección (6, 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 222, 246 y 270 horas post infección (hpi), para realizar el aislamiento bacteriológico de *Salmonella* spp., exámenes histopatológico y ultraestructural. Durante la primera semana algunas aves se observaron deprimidas y en la segunda semana se encontraron aves con retención de saco vitelino en ambos tratamientos. SE FT13a se aisló a partir de las 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 246 y 270 hpi, en todos los órganos previamente descritos. SI se aisló a las 42, 150, 174 y 222 hpi de muestras de buche, yeyuno, íleon y ciegos. El íleon fue el órgano de donde se aisló SE FT 13a y SI con mayor frecuencia. No se registró mortalidad en ambos tratamientos. El examen histopatológico reveló inflamación, necrosis coagulativa, congestión y hemorragia en tracto gastrointestinal (TGI) y órganos viscerales a partir de las 6 hpi. en ambos tratamientos, con grados de lesión de leve a severo. Ultraestructuralmente se observaron cambios en el citoplasma celular de enterocitos: degeneración, necrosis, invasión y penetración de SE FT13a y SI. Los resultados de la presente investigación evidenciaron la capacidad de SE FT13a y SI para penetrar e invadir enterocitos de los pollitos infectados experimentalmente, demostrando que SI es capaz de infectar pollos de engorda y no solo a la familia Muridae.

**Palabras claves:** *Salmonella*, Patogenia de *Salmonella*, Aislamiento de *Salmonella*, *Salmonella* en pollos de engorda.

**RUIZ FLORES GRISELDA. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* FT13a and *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko in broiler chickens (Dr. FERNANDO CONSTANTINO CASAS, JOSE ANTONIO QUINTANA, ARIEL ORTIZ MUÑIZ and ODETTE URQUIZA BRAVO)**

The objective of this study was to determine *Salmonella enteritidis* phage type 13a (SE PT 13a) and *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko phage type 6a (SI) pathogenesis in 4 days old broiler chickens. Twenty-eight birds per treatment were inoculated with a dose of  $1 \times 10^8$  (SE) and  $1 \times 10^9$  (SI) respectively. Samples from liver, spleen, heart, lung, crop, duodenum, jejunum, ileum and caecum were taken during fourteen different times post infection (6, 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 222, 246 and 270 hours post infection (hpi), in order to obtain *Salmonella* spp. isolation for bacteriology, histopathological and ultrastructural examination. During the first week some depressed birds were observed and the second week were found birds with indurated yolk sac in both treatments. SE PT13a was isolated at 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 246 and 270 hpi from all organs previously described. SI was isolated at 42, 150, 174 and 222 hpi, from crop, jejunum, ileum and caecum samples. Ileum was the main organ which more frequently were SE FT31a and SI isolated. There was no mortality in either treatments. Histopathology revealed inflammation, coagulative necrosis, congestion and hemorrhages in gastrointestinal tract (TGI) and visceral organs since 6 hpi in both treatments with lesions from mild to severe. Ultrastructurally changes in enterocytes cytoplasm: degeneration, necrosis, invasion and penetration of SE PT 13a and SI were observed. Results of this research showed the ability of SE PT 13a as well as SI to penetrate and invade enterocyte in experimental infected broiler chicken demonstrating that SI is able to infect broiler chickens and not only Muridae family.

**Keywords:** *Salmonella*, pathogenesis of *Salmonella*, isolation of *Salmonella*, *Salmonella* in broiler chickens.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La producción avícola es una de las áreas de producción pecuaria más importantes y susceptibles a pérdidas económicas por factores del mercado y problemas sanitarios (Gordon, 1980). De los agentes bacterianos que ocasionan pérdidas a la avicultura y que a la vez pueden causar graves problemas a la salud pública, está el género *Salmonella* (Dorn, 1989; Gast y Benson, 1995).

De acuerdo con la nomenclatura de Kauffmann-White, el género *Salmonella* consta de dos especies: *Salmonella enterica* (*S. enterica*) y *Salmonella bongori* (*S. bongori*) (Jordan y Pattison; Ezaki *et al.*, 2000) Dentro de *Salmonella enterica* están incluidos aproximadamente 2463 serotipos y se encuentra subdividida en seis subespecies: I *enterica*, II *salamae*, IIIa *arizonae*, IIIb *diarizonae*, IV *houtenae* y VI *indica*; de las cuales solamente una (*S. enterica* subespecie *enterica* (I) está asociada con infecciones en el humano y los animales (Brenner, *et al.*, 2000; Sánchez y Cardona, 2003, Santos *et al.*, 2003). Sin embargo, para su mejor comprensión existen dos grupos principales de salmonelas: las inmóviles, representando a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *gallinarum* y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *pullorum*, y las salmonelas móviles que incluyen a los demás serotipos del género, al respecto *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *enteritidis* y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *typhimurium* han sido las más estudiadas (Ezaki *et al.*, 2000; Sánchez y Cardona, 2003; Uribe, 2004). Por conveniencia y para evitar confusiones se las nombra directamente por el serotipo, por ejemplo *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, etc. (Jordan y Pattison, 1998).

La salmonelosis producida por *Salmonella enteritidis* (SE), es una enfermedad que afecta a las aves y a los mamíferos incluyendo al humano, provocando en algunos casos mortalidad, sobre todo en niños, ancianos e individuos inmunodeprimidos quienes son los más susceptibles (Jawetz, 1992; Ontiveros *et al.*, 2004). En aves, su curso es de forma septicémica provocando elevada mortalidad en pollos, pavipollos menores de 3 semanas de edad. En aves adultas se presentan en forma crónica y sin signos aparentes (Urquiza, 1998;

Jordan y Pattison, 1998). La capacidad de SE para producir infección, depende de su capacidad de ataque, colonización e invasión a las células del epitelio intestinal del hospedero (Fadl *et al.*, 2002).

SE, es una bacteria que ha adquirido importancia en los últimos veinte años debido al incremento de infecciones en el humano y en las aves comerciales. En el primero, causando brotes de infecciones entéricas, su importancia se incrementa por provocar grandes pérdidas económicas en la industria avícola, equivalentes aproximadamente de 64 a 114 millones de dólares (US\$) anualmente en Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) y también debido a que los animales que enferman quedan como portadores asintomáticos de la enfermedad, contribuyendo de esta manera a una mayor contaminación de los alimentos para los humanos y explotaciones pecuarias, lo que ha provocado que se considere un problema zoonótico de serias proporciones en todo el mundo (Clarke, 1986; Fadl *et al.*, 2002; Nagaraja, 1995; Gast y Benson, 1995; Mancera *et al.*, 2004). Entre los años de 1980 y 1989, los aislamientos de SE, aumentaron 13 veces en el Reino Unido. En Escocia se estableció que casi el 84% de las enfermedades por alimentos contaminados en humanos entre 1980 y 1989 se debieron a salmonelas, también entre 1976 y 1994 los EEUU experimentaron un aumento de 8 veces. En Canadá, el número de infecciones por SE, se elevó de 307 en 1983 a 1255 en 1994. La proporción de SE (número de casos de SE, número total de serotipos de *Salmonella*) se ha elevado de 4% en 1983 a 17% en 1994. Esto indica que SE ha desplazado de la 5ª posición en 1983 a 1º ó 2º lugar desde 1990 y en México según el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) en el año 1994 el incremento fue de 100,342 a 215,155 en 1998 (García *et al.*, 1996; Poppe *et al.*, 1993; Gast y Benson, 1995).

### **1.1. Epidemiología**

*Salmonella enteritidis*, es la bacteria de la cual mucho se ha especulado, pero poco se conoce (Borie y Sánchez, 1998). El origen de la infección con SE en las aves se remonta a la erradicación de las especies *gallinarum* y *pullorum* de la

avicultura en países desarrollados, esto produjo un nicho de infección vacío que fue ocupado por SE (Gast, 2003; Aviña, 2001).

Estudios epidemiológicos de esta infección en todo el mundo han determinado la clasificación de los diferentes aislamientos de SE en fagotipos tomando en consideración ciertas características como el hospedero, su virulencia y patogenicidad de la bacteria. Internacionalmente, se han aislado con mayor frecuencia de SE los fagotipos 2, 4, 6, 6a, 8, 12, 13, 13a, 18 y 28 (Borie y Sánchez, 1998). Los fagotipos (FT) comúnmente encontrados en aves hasta 1994 fueron 8, 13 y 13a, sin embargo, un examen a nivel nacional realizado en 1996 por el departamento de agricultura de Canadá, concluyó que SE fagotipo 4 (FT4) estuvo presente en huevos comerciales y por lo tanto, los reportes en humanos aumentaron (Poppe *et al.*, 1993; Gast y Benson, 1995; Borie y Sánchez, 1998). En el Occidente de Europa predomina el FT4 y en el Reino Unido los fagotipos más frecuentemente aislados de animales y el hombre fueron el 4, 6, 6a y 7 (Sánchez, 1998; Ontiveros *et al.*, 2004; Liebana, 2002; Mancera *et al.*, 2004; Sobel *et al.*, 2000). En EEUU predominaban los FT 8, 1 y 13a, pero a partir de 1995, en los EEUU y todo el mundo los fagotipos 4 y 8, han sido aislados con mayor frecuencia de casos de humanos y animales. En el año 2004 en México se realizaron 73 aislamientos de SE, los cuales fueron provenientes de la avicultura nacional. Estos fueron identificados por pruebas bioquímicas convencionales y serotipificados, siendo identificados los fagotipos 4 y 8 con mayor prevalencia (Mancera *et al.*, 2004)

Existen numerosas fuentes de infección de *Salmonella* spp. en las operaciones integradas de pollo comercial cuando no se procede a un control adecuado de plagas como ácaros, aves silvestres, artrópodos, insectos y roedores, quienes a través de sus heces contaminan el agua, alimento, material de cama y equipo, favoreciendo la permanencia de *Salmonella* en la naturaleza (Cox *et al.*, 1991 y Aviña, 2001). Los roedores infectados juegan un papel importante en la prevalencia de la infección sobre las granjas productoras de

huevo o pollo de engorda, contribuyendo a la diseminación de enfermedades como salmonelosis hacia otras especies animales y al humano a través de la contaminación de los alimentos, entre los que se encuentran la carne de pollo y los huevos de gallina, etc. (Blackwell, 1997, Aviña, 2001).

Al respecto, los roedores de la familia Muridae, representan el mayor riesgo para la diseminación de la enfermedad en granja y el medio urbano, en donde son una plaga en la que se ha confirmado la transmisión de *Salmonella* por vía horizontal. Debido a la falta de interés en almacenar alimentos en forma adecuada, estos han seguido propagando la enfermedad con ayuda del humano a muchas áreas provocando grandes pérdidas económicas. El ratón infectado permanece como portador latente que puede después excretar *Salmonella* spp. intermitentemente (Davies y Wray, 1995; Gast *et al.* 2002 Urquiza, 2001).

Los peligros sanitarios que involucra la convivencia con roedores tienen una estrecha relación con el incorrecto almacenamiento de los alimentos y bajos niveles higiénicos de la población. Por ello, es de vital importancia realizar una adecuada prevención y control de los roedores considerados plagas. Entre los métodos de control contra roedores, están los métodos de control mecánicos, físicos, químicos y el control biológico (Padrón, 1991; Davies y Wray, 1995).

Con relación a los métodos de control biológico, estos se basan en producir fenómenos de supresión de la reproducción o bien la utilización de un organismo que los destruya directamente. El control mediante la utilización de microorganismos patógenos para los roedores plaga comenzó en 1870 gracias a Yevyeni Mechnikov. En la primera mitad del siglo XX, se introdujeron rodenticidas biológicos a base de una cepa viva de *Salmonella*; entre ellos, los productos llamados Liverpool virus, Instituto Pasteur virus, *Ready rat relief* virus, *danzysz* virus, London virus y Ratín (en ese entonces mal llamados virus). Su permanencia en el tiempo fue limitada por su asociación con brotes de salmonelosis en el humano, lo que derivó en su prohibición en EEUU a partir de 1920 y en Inglaterra

en el año 1960. Hasta la fecha, esta situación no ha cambiado (EPA, 1998; HSE, 1986 y Threlfall *et al.*, 1996).

Actualmente en algunos países de Centro América, Sur América y Asia, existe en el mercado un “Rodenticida Biológico Comercial” (RBC)<sup>1</sup> el cual es elaborado con una cepa de *Salmonella* entérica serotipo enteritidis (fagotipo 6a). combinado con una porción de arroz e hidroxycumarina a razón de 0,02 ppm (Labiofam, 2002, Borie y Gonzáles, 2000). Por otro lado Urquiza (2001), demostró que la *Salmonella* mencionada, se trataba de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko. Según el laboratorio productor del RBC la bacteria involucrada es monopatógena para la familia Muridae, sin afectar al humano ni a otros animales. Dentro del género *Salmonella* existen sólo algunos serotipos específicos para ciertos hospederos, como es el caso de *Salmonella typhi* para el humano, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* para las aves, *Salmonella choleraesuis* para los cerdos, *Salmonella dublin* para el bovino y *Salmonella abortusovis* para los ovinos y caprinos (Paulin, *et al.*, 2002). La especificidad de hospedero está siendo estudiada y aún no se han logrado aclarar las bases genético-moleculares que dan origen a esta situación tan particular. Uzzau *et al.*,(2001), describen que se trataría de una compleja interacción entre genes, plásmido de virulencia (*spv*) y genes cromosomales ubicados en islas de patogenicidad que en su conjunto, derivan en el reconocimiento de una única especie en particular. El reciente hallazgo de infección, lograda con una cepa de *Salmonella gallinarum* en ovejas abre un nuevo escenario en la epidemiología de la salmonelosis (Uzzau, *et al.*, 2001). Este estudio reveló que la especificidad de un serotipo para un huésped particular, no sólo estaría dada por factores de virulencia propios de la bacteria, sino también por la capacidad del serotipo de circular dentro de una población de hospederos, es decir, el ambiente donde habitan los ovinos no permitiría que *Salmonella gallinarum* exprese sus factores de

---

<sup>1</sup> Biofam, 1996. Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba.

virulencia. Es en este contexto, cuando se producen las primeras interrogantes sobre la mono-especificidad de la cepa de SE presente en el RBC.

## **1.2. Etiología**

Las salmonelas son bacterias intracelulares, pertenecen a la Familia: Enterobacteriaceae. Son bacilos gram negativo, en forma de bastón recto, que miden desde 0.5 a 1.5 x 2.0 a 5.0  $\mu\text{m}$ . Las salmonelas móviles son bacilos peritricos flagelados y móviles aunque en ocasiones se presentan de manera natural como mutantes no móviles, no poseen cápsula, no esporulan y producen toxinas. Las colonias típicas de *Salmonella* en medio de agar son de 2 a 4 mm de diámetro, de borde redondeadas y lisas, ligeramente levantadas y brillosas (Gast, 2003, Urquiza, 1998). Son anaerobios facultativos y pueden crecer bien en condiciones aerobias como anaerobias. La temperatura óptima para apoyar su crecimiento es de 37C, pero pueden crecer desde los 5 a 42C. El pH óptimo para el crecimiento es de 7.0 (Gast, 2003; Nagaraja, 1995).

Según la clasificación de Kauffmann-White, SE pertenece al grupo D, subgrupo 1 con antígenos O: 1, 9, 12 y H: g, m; este serotipo afecta a todas las especies animales incluyendo el humano. Con respecto a SI contiene antígenos somáticos 1, 9,12 y flagelares g,m; con la diferencia de contener antígenos flagelares en fase 2; 1,7, la descarboxilación a la lisina es negativa y la fermentación de rhamnosa es positiva (Urquiza, 2001).

### **1.2.1. Características bioquímicas**

El género *Salmonella*, fermenta la glucosa, el dulcitol, el manitol, la maltosa y el mucato pero no fermenta la lactosa, la sacarosa, el malonato o la salicina. En muchos tipos de medios producen sulfito de hidrogeno, descarboxilan la ornitina y lisina, y utiliza el citrato como única fuente carbono, no hidroliza la urea, gelatina y no produce indol (Gast, 2003).

Las salmonelas por lo general son muy susceptibles al calor, la desecación, la ebullición durante 5 minutos y a los desinfectantes comunes como el fenol al 0.1 % y el formol al 2%. Pueden sobrevivir 9 meses en ropa guardada en oscuridad, tres meses en médula ósea de aves muertas, una semana en heces a partir de aves infectadas vivas, 11 semanas en cama nueva, 3 semanas en cama usada, 30 semanas en cama de casetas desocupadas, 43 veces seguidas en congelación y descongelación, uno o dos años en detritos de incubadora y en el ambiente (Gast, 2003; Nagaraja, 1995).

### **1.3. Transmisión**

Esta puede ser vertical o transovárica, horizontal directa por el contacto de aves sanas con aves enfermas y horizontal indirecta a través del material y equipo contaminado (sexado, despicado, inyecciones, cajas de transporte, alimento, agua, "huevos bomba", vectores mecánicos como gatos, perros, pájaros, ratas, etc.). El estado portador es de forma intermitente por toda la vida del hospedero (Gast, 2003; Nagaraja, 1995; Urquiza, 1998; Cason *et al.*, 1994; Berchieri *et al.*, 2001).

### **1.4. Patogenia de *Salmonella***

La estrategia básica de virulencia común de las especies de *Salmonella* es invadir la mucosa intestinal y multiplicarse en el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI). Para esto la bacteria consta con una serie de componentes y mecanismos de patogenicidad que colaboran con su ataque al hospedero (Rycroft, 2000, Baumler *et al.*, 2000; Wilson, 2002).

La capacidad de *Salmonella* para colonizar los tejidos de un animal, depende de algunas propiedades interrelacionadas:

- a) Adherencia y penetración (invasión) a los tejidos: si las bacterias no tienen la capacidad de adherirse a los tejidos, difícilmente podrán colonizar e infectar.
- b) Evasión de los mecanismos de defensa inespecíficos.

- c) Obtención de sus nutrimentos para su multiplicación y desarrollo.
- d) Capacidad de causar daño en el hospedador, es decir capacidad para producir toxinas (Urquiza, 1995; Rycroft, 2000, Baumler, *et al.* 2000).

La dosis mínima media para producir infección subclínica en animales y humano puede ser de tan solo  $10^3$  UFC, mientras que para la forma clínica es de  $10^5$  a  $10^8$  UFC, dependiendo de la resistencia del hospedero, pudiendo ser genética, resistencia por la edad, acides y motilidad del contenido intestinal, por la flora intestinal nativa, la inmunidad intestinal local, la inmunidad humoral que también favorecen o no el desarrollo de la enfermedad (Skov *et al.*, 2002; Sánchez y Cardona, 2003; De Buck *et al.*, 2004; Santos, *et al.*, 2001).

*Salmonella* debe pasar barreras y manipular las células del hospedero en sitios específicos a lo largo del curso de la infección. Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y seguidamente coloniza el intestino delgado, penetra las células epiteliales y migra a la lámina propia de la región ileocecal, se multiplica en los folículos de la región linfoide presentándose hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial (Santos *et al.*, 2003; Sánchez y Cardona, 2003). Los polimorfonucleares neutrófilos son estimulados y la infección se limita en el caso de enteritis en tracto gastrointestinal (Cox, 1996; Clarke, 1986; Santos *et al.*, 2003). Si son serotipos productores de fiebre entérica no son retenidas a este nivel sino que migran a hígado y bazo por circulación hemática. La respuesta inflamatoria regula también la liberación de prostaglandina, estimula la producción de AMP (Adenosin monofosfato) cíclico y la secreción activa de líquidos, produciendo diarrea en el caso específico de la enteritis (Sánchez *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2001, Galan, 2001).

#### **1.4.1. Componentes de superficie de *Salmonella* spp.**

La estructura de superficie de *Salmonella*, está formada por tres capas:

1. Membrana citoplasmática o interna.- Está compuesta por una capa de fosfolípidos y proteínas, entre sus funciones esta el transporte de nutrientes (Rycroft, 2000).
2. El peptidoglicano.- Es una capa relativamente delgada en bacterias gram negativas, confiere rigidez y forma a la célula bacteriana (Rycroft, 2000).
3. La membrana exterior.- Es una membrana compleja formada por una capa doble lípidos, que rodea la capa de peptidoglicano y protege el periplasma del exterior, por ello la membrana exterior de *Salmonella* puede ser considerada como un cernidor molecular, cuyo propósito es permitir el acceso de nutrientes requeridos mientras resiste la penetración de sustancias dañinas del medio ambiente externo (Rycroft, 2000; Mc Cormick, 2004).

#### **1.4.2. Adhesión e invasión**

Antes de invadir cualquier tipo de célula, *Salmonella* debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o pili, cuatro de los cuales están definidos genéticamente: fimbria tipo 1 (fim), fimbria codificada por plásmidos (pef), fimbria polar larga (lpf) y fimbria agregativa delgada (agf/csg) Es posible que las fimbrias ayuden a la bacteria a conseguir un estrecho contacto con las células hospederas y además a permitir la interacción de factores que estimulan la migración transepitelial de neutrófilos. La presencia de por lo menos estos cuatro sistemas fimbriales, sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares puede ser un paso crítico en la supervivencia de *Salmonella* en el ambiente, ya que ésta responde a factores del medio como pH y osmolaridad (Gast, 2003; Thorns y Woodward, 2000; Sánchez *et al.*, 2003). La adherencia e invasividad de las salmonelas pueden estar influenciadas por las condiciones de crecimiento, ya que las salmonelas en crecimiento logarítmico, resultan más invasivas en el tejido de cultivo que las bacterias en cualquier otra fase de crecimiento. Las salmonelas que crecen en medios anaerobios han demostrado

que son mas adherentes e invasivas que aquellas que se desarrollaron en aerobiosis (Gast, 2003; Thorns y Woodward, 2000).

### **1.4.3. Invasión de la mucosa**

Varios estudios han mostrado que *Salmonella* preferentemente se une e invade las células en la placa de peyer del intestino delgado (tejido linfoide intestinal asociado) en ratones infectados oralmente, sin embargo, las bacterias pueden también ser encontradas en enterocitos no fagocíticos. Las interacciones entre especies de *Salmonella* y células hospederas son íntimas y complejas. Esta bacteria es hábil en explotar las funciones celulares pre existentes del hospedero y usar estas funciones para su propio beneficio (Donnenberg, 2000; La Regione *et al.*, 2003)

Cuando las salmonelas se unen a cultivos celulares, producen cambios en la apariencia de la superficie de la célula del hospedero, semejante a un líquido que salpica “efecto splash”, haciendo contacto con la superficie de la célula, se parece a la salpicadura de una gota de líquido que pega en una superficie sólida. Este efecto “splash” provoca que la membrana celular se deforme y adquiera un aspecto rugoso (membrana rugosa), que finalmente, tiene como resultado la penetración de la bacteria dentro de una vesícula endocítica. Una vez que la bacteria es fagocitada, la célula recupera su forma normal y dentro de la vesícula endocítica las bacterias se dividen y diferentes vesículas crecen juntas, formando grandes vesículas llevando en su interior muchas bacterias (Gast, 2003; Salyers y Whitt, 2000; Urquiza, 2001; Sánchez *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003).

Después de que la bacteria pasa a través de las células epiteliales por procesos de endocitosis, se localiza dentro de los macrófagos, colonizando de esta manera el intestino. El periodo de incubación puede variar de 8 horas hasta 15 días. La bacteria pasa hacia el torrente sanguíneo, infecta otros órganos internos como hígado, bazo, duodeno, ciegos y gónadas, desarrollando signología como: fiebre intermitente, malestar general, nausea vómito y diarrea profusa,

además de ser excretada por vías urinarias y heces (Salyers y Whitt, 2000; Jordan y Pattison, 1998).

Debido a que *Salmonella* tiene tropismo por vías biliares, en vesícula biliar se multiplica de forma abundante y en ocasiones la bacteria se mueve de hígado a vías biliares, originándose un flujo continuo de microorganismos hacia el intestino delgado por segunda vez, donde tienden a localizarse a nivel de placas de Peyer, de aquí puede determinarse el estado de portador, eliminando en forma intermitente *Salmonella* por heces (Salyers y Whitt, 2000; Poppe *et al.*, 1993).

#### **1.4.4. Sistemas de secreción**

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia (González y Dreyfus, 2003, Hueck , 1998).

Las vías o sistemas de secreción en las bacterias gram-negativas han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan. Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases, dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (González y Dreyfus, 2003; Koster *et al.*, 2000 y Thanassi y Hultgren, 2000).

##### **1.4.4.1. Sistema de secreción tipo I (SSTI)**

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas. Es una vía Sec-independiente, por lo

que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplásmica; la secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular (Koster *et al.*, 2000). Los sustratos a exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, que sin embargo, no es procesada. Esta señal es específica para ciertas subfamilias de sustratos como por ejemplo, las proteasas; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza de dicha señal y el mecanismo mediante el que es reconocida (González y Dreyfus, 2003; Koster, 2000).

#### **1.4.4.2. Sistema de secreción tipo II (SSTII)**

El SSTII es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, como la toxina del cólera. Esta vía también se conoce como sistema general de secreción y ocurre en dos etapas. Primero, la maquinaria Sec transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática, por lo que el SSTII es una vía Sec-dependiente. Dicho péptido es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos (Lee y Schneewind, 2001). En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la membrana externa por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II o secretón (Lee y Schneewind 2001; González y Dreyfus, 2003).

#### **1.4.4.3. Sistema de secreción tipo IV (SSTIV)**

El SSTIV es una vía recientemente identificada, homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema Virulencia B de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitan la translocación de DNA (ácido deoxiribonucleico). Este sistema es un transportador versátil que secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas. La exportación de la toxina pertussis (agente causante de la tos ferina) por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos como *Legionella pneumophila*, *Helicobacter*

*pylori* y *Brucella suis*, entre otros (Christie y Vogel, 2000; González y Dreyfus, 2003, Baron *et al.*, 2002).

#### **1.4.4.4. Autotransportadores**

A través de este sistema se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Los autotransportadores representan una vía Sec-dependiente ya que utilizan la maquinaria Sec para atravesar la membrana interna, sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa. El prototipo de esta familia de transportadores es la secreción de la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoeae* (González y Dreyfus, 2003; Koster, 2000; Lee, y Schneewind, 2001)

#### **1.4.4.5. Sistema de secreción tipo III (SSTIII)**

El SSTIII constituye un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en los últimos años. Es una vía Sec-independiente en la que la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular, que desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias gram-negativas (Hueck, 1998). El SSTIII ha sido identificado en una gran variedad de patógenos de humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chamydophila*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. Mediante este sistema los factores de virulencia se pueden translocar hasta el citosol de la célula eucarionte. La maquinaria está conservada entre los diferentes patógenos, sin embargo, las proteínas secretadas difieren completamente, por lo que el mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades (Hueck, 1998; Yahr *et al.*, 1996; González y Dreyfus, 2003). Además de su papel en la patogénesis, el SSTIII se requiere para la biogénesis flagelar, y es también esencial para el establecimiento

de la relación simbiótica entre *Rhizobium* y plantas leguminosas (Kubori *et al.*, 1998; Hueck, 1998; González y Dreyfus, 2003).

Respecto a los sistemas de secreción mencionados, *Salmonella* es la única bacteria descrita que contiene dos sistemas de secreción tipo III; estas son estructuras dedicadas a la translocación de proteínas, que permiten a las proteínas bacterianas de patogenicidad ser liberadas directamente en el citosol de células hospederas eucarióticas (Galan y Collmer, 1999; Galan, 2001; Sánchez, *et al.*, 2003; González y Dreyfus, 2003).

Hueck *et al.*, 1998, describieron una característica esencial de la patogenicidad de *Salmonella* la cual es la de “engañar” a la célula hospedera en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversión cruzada, lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera. *Salmonella* responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado Tipo III o dependiente de contacto (Needle complex). Este sistema permite a ciertos bacilos gram negativos secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica y se ha encontrado en *Yersinia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia* y en patógenos de plantas como *Pseudomonas syringae* (Galan y Colmer, 1999; Cheng y Schneewind, 2000). Las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan factores eucarióticos con funcionamiento de señales de transducción y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera y dan lugar al denominado “efecto splash” (Galán, 2001; Sánchez *et al.*, 2003; Steele-Mortimer *et al.*, 2002).

En el caso de *Salmonella*, la redirección de señales celulares de transducción resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera, estableciendo nichos subcelulares para colonización bacteriana y facilitando una estrategia patogénica altamente adaptada de líneas de comunicación con la defensa del hospedero. La interacción de patógenos bacterianos dentro de las células hospederas, está particularmente caracterizada por factores que están

localizados en la superficie bacteriana o son secretados en el espacio extracelular (Bliska, 1993; Sánchez *et al.*, 2003; Collazo y Galán, 1997)

#### **1.4.5. Islas de patogenicidad**

*Salmonella* spp. requiere de múltiples genes de virulencia, muchos de esos genes se encuentran en las denominadas islas de patogenicidad que confieren los rasgos de virulencia específicos a la bacteria (Marcus, 2000). Los dos sistemas de secreción tipo III de *Salmonella* son codificados en dos distintos grupos de genes llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (ISP1 y ISP2), los cuales parecen jugar dos papeles diferentes durante la patogénesis de *Salmonella* spp. ISP1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal e ISP2, es necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica como la multiplicación y sobrevivencia dentro de las células del huésped (Sánchez *et al.*, 2003; Salyers y Whitt, 2000; Baumler *et al.*, 2000; Suárez y Russmann, 1998)

#### **1.4.6. Aparatos de genes y proteínas secretadas**

La ISP1 es requerida para el ingreso de *Salmonella* a la célula hospedera, está localizada en su centísoma 63 y en ella se encuentran genes implicados en su patogenicidad. Está dividida en dos grupos de genes que codifican la maquinaria de secreción para invadir la mucosa: *inv-spa* y *prg-org*. (Murray, 1998). Estos genes se encargan de codificar proteínas que cumplen con diversas funciones en el proceso de invasión (Darwin, 1999; Sánchez, 2003). Los genes *inv* se han extendido a *invJ, invI, invC, invB, invA, invE, invG, invF, invH*, en donde la mayoría forman parte del SSTIII, el cual forma un puente de proteínas a través del cual atraviesan moléculas que ejercen un efecto sobre la célula hospedera. Los genes *spaS, spaR, spaQ, spaP, spaO* (denominados así por su similitud con los genes de otra bacteria invasiva, *Shigella*) y los genes *sipA, sipD, sipC, sipB* (*Salmonella* invasion proteins). Por otro lado el gen *sptP*, codifica para una fosfatasa que actúa sobre las tirosinas de proteínas de la célula hospedera, alterando la transducción de señales. Curiosamente el gen regulador *hilA* fue descubierto independientemente, porque su sobre expresión confería capacidad de hiperinvasiva a *Salmonella* (“hyper invasive locus”). Los genes *prgK, prgJ, prgI*

y *prgH* (“PhoP repressed genes”) son prendidos por la proteína HilA y apagados por la proteína reguladora PhoP, la cual también tiene un efecto regulador negativo sobre la expresión de *hilA* (Baumler, *et al.*, 1997; Mahan, *et al.*, 1993; Sánchez y Cardona, 2003) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.- Genes de *Salmonella* spp.**

Genes	Función
<i>Inc.</i>	Codifica proteína que actúa como factor de adhesión y componente estructural del complejo aguja del aparato de secreción tipo III.
<i>invG</i>	Codifica proteína estructural del complejo aguja del aparato de secreción tipo III.
<i>invE</i>	Codifica proteína requerida para la invasión <i>in vitro</i> .
<i>invA</i>	Codifica proteína necesaria para la invasión.
<i>Inc.</i>	Desconocida.
<i>Inc.</i>	Codifica proteína que interactúa con otros componentes del aparato de secreción tipo III para facilitar la translocación de proteínas fuera de la célula.
<i>invI (spaM)</i>	Codifica proteína necesaria para la invasión <i>in vitro</i> .
<i>spaP, Q, R</i>	Requeridos para invasión y para la secreción de SipB, SipC e InvJ.
<i>spaS</i>	Requerido para la secreción de proteínas.
<i>sptP</i>	Codifica para una fosfatasa que actúa sobre las tirosinas de proteínas de la célula hospedera, alterando la transducción de señales.
<i>prgH</i> (gen reprimido por phoP)	Codifica la proteína PGR, componente estructural del complejo aguja.
<i>prgI</i> y <i>prgJ</i>	Desconocida.
<i>prgK</i>	Codifica proteína componente estructural del complejo aguja.
<i>orgA</i> (gen regulado por oxígeno)	Codifica proteína requerida para la invasión de células epiteliales en cultivo y para citotoxicidad en macrófagos.
<i>hilA</i>	Confiere la capacidad hiperinvasiva a <i>Salmonella</i>

#### 1.4.6.1. Proteínas secretadas

Otros genes codifican proteínas involucradas en el proceso de invasión, que son secretadas al interior de la célula hospedera, translocando las señales celulares del hospedero, induciendo la activación de efectores que producen desorganización del citoesqueleto de la célula hospedera y la penetración de la

bacteria y en los macrófagos, induciendo apoptosis (Darwin, 1999; Sánchez y Cardona, 2003) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.- Proteínas secretadas por el Sistema de Secreción Tipo III (SSIII) de la isla de patogenicidad 1(ISP1) de *Salmonella* spp.**

Proteína	Función
SipA	Invasión.
SipB	Translocación apoptosis.
SipC	Translocación.
SipD	Translocación.
InvJ/SpaN	Secreción
SpaO	Secreción.
SptP	Desorganización del citoesqueleto, colonización esplénica.
SopE	Reorganización del citoesqueleto, Invasión.
SigD/SopB	Invasión, señalización transepitelial de polimorfonucleares
AvrA	No determinada.
HilA	Requerida para la expresión del sistema de secreción tipo III

#### 1.4.6.2. Proteínas reguladoras

Con relación en los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* se ha descrito que los genes de la ISP1 son expresados en forma máxima a 37C y bajo condiciones de oxígeno limitado, además la expresión es óptima con pH neutro, con alta osmolaridad durante la última fase de crecimiento logarítmico. La expresión de los genes de invasión también requiere la proteína reguladora central HilA, la cual es codificada por el gen *hilA* en ISP 1, la proteína HilA es requerida para la expresión del sistema de secreción tipo III (Bajaj *et al.*, 1996). El gen *hilA* es un regulador transcripcional de genes de invasión, su expresión es activada por la proteína SirA que es codificado por el gen *sirA*; la proteína se cree que es estimulada por dos vías mutuamente independientes: la activación por la proteína Bar A que es una sensor kinasa que tiene como blanco a SirA o la fosforilación de SirA dada por la intervención del intermediario metabólico, acetil fosfato (Ahmer *et*

*al.*, 1999). Actualmente se conoce que el gen *hilD* también reprime la expresión de *hilA* cuando las condiciones ambientales no son favorables para la invasión (Schechter y Lee, 2001). La expresión de *hilA* también es regulada por PhoP (Miller *et al.*, 1989; Darwin y Miller, 1999; Sánchez y Cardona, 2003).

#### **1.4.6.3. Sistema PhoP/PhoQ**

Este es un sistema que se encuentra en operones formados por dos componentes, en donde PhoP regula la expresión de varios genes en el citoplasma, es decir, tiene un efecto pleiotrópico. PhoP a su vez es activada por la fosforilación proveniente de PhoQ, una proteína de membrana interna que percibe señales del exterior. Una de las señales es la baja concentración del ión magnesio, la cual causa un cambio conformacional en PhoQ con la consecuente fosforilación de una histidina de PhoP a partir del ATP (Miller *et al.*, 1989; Darwin y Miller, 1999). También, se ha observado que este sistema se activa dentro de las vacuolas del macrófago, en donde residen las salmonelas. Es así que se postula que la bacteria mantiene activados los genes *prg* (PhoP repressed genes) antes de invadir los macrófagos, y por ello tienen un papel en este estadio; para después desactivarlos en cuanto se activa el sistema y por consecuencia activar los genes *pag* (PhoP activated genes) que tendrían un papel en los estadios tardíos de la invasión (Miller *et al.*, 1989; Darwin y Miller, 1999; Hooper *et al.*, 2002)

#### **1.4.7. Vías de señalización celular inducidas por *Salmonella***

Existen diferentes propuestas sobre las vías de señalización inducidas por proteínas inyectadas por *Salmonella*, que provocan rearrreglo del citoesqueleto de la célula eucariótica y penetración de la bacteria. Una vía es la propuesta por Goosney *et al.*, (1999), quienes refieren que *Salmonella* inyecta en la célula eucariótica las proteínas SopE y SptP transportadas por el sistema de secreción tipo III e inyectadas por el complejo en aguja en la célula eucariótica, donde SopE activa las proteínas CDC42, que están en forma inactiva en el citoplasma de la célula eucariótica ligando GDP (Guanosin Difosfato). Al activarse esta proteína CDC42 liga GTP (Guanosin Trifosfato), aumentando la fosfolipasa G y por medio

de los segundos intermediarios inositol trifosfato y diacil glicerol aumenta la concentración de calcio permitiendo el re arreglo del citoesqueleto. La proteína SptP estaría implicada en la fosforilación de los residuos de tirosina de receptores ubicados al nivel de la membrana de la célula eucariótica, produciéndose así también la desorganización del citoesqueleto y el rizado (*ruffling*) de membrana (Marilda, 1990; Darwin y Miller, 1999; Sánchez y Cardona, 2003).

Galán *et al.*, (2001), propusieron otra vía de señalización en la cual *Salmonella* inyecta por medio del complejo en aguja (Needle complex) proteínas transportadoras (SopE, SopB, SptP) por medio del sistema de secreción tipo III que al ingresar en la célula eucariótica activan las proteínas de señalización celular (Cdc42 y Rac1) que ligan GDP que se encontraban inactivas pasando el GDP a GTP (Sánchez y Cardona, 2003).

Estas dos vías presentan elementos en común y son muy aceptadas para explicar cómo sucede la entrada de *Salmonella* a las células epiteliales del intestino delgado. Estas señales inducidas por *Salmonella* son de vida corta. Después de la infección bacteriana las células hospederas retoman su morfología normal (Sánchez y Cardona, 2003).

La comprensión de las vías de transducción de señales de la célula hospedera que son activadas por *Salmonella*, los determinantes bacterianos responsables de activar estas vías de señalización y los mecanismos por los cuales la bacteria estimula la respuesta celular por el contacto cercano con las células hospederas, son el punto de partida para desarrollar estrategias a mediano y largo plazo de prevención de las infecciones producidas por *Salmonella*, como por ejemplo vacunas, mediante el bloqueo de genes como los descritos anteriormente que están involucrados en el proceso de invasión (Sánchez *et al.*, 2003; Sevcikova, 2003; Dhillon *et al.*, 1999)

### **1.5. Patogenicidad de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko**

Estudios realizados por algunos investigadores <sup>2,3,4</sup> principalmente en ratones (*Mus musculus*), ratas (*Rattus rattus*) conejos (*Oryctolagus cuniculus*),

cobayos (*Cavia purcellus*), cerdos (*Sus scroffa scroffa*) y aves (*Gallus gallus*), observaron que SI produce mortalidad en la familia Muridae y no en otras especies animales (Biofam, 1996; Espino, *et al.*, 1989). La mayoría de dichos estudios han inducido como modelo biológico al humano y algunas especies animales de los archipiélagos cubanos, así como regiones específicas de donde se han realizados dichos ensayos. Los desafíos han sido por medio de inoculación por vía oral y parenteral y los resultados obtenidos han mostrado que dicha cepa no produjo mortalidad ni sinología clínica de salmonelosis en animales que no son de la familia Muridae, sin embargo, estos hallazgos no permiten hacer una generalización de la virulencia específica de SI hacia la familia Muridae (Urquiza, 2001; Urquiza *et al.*, 1997).

#### **1.6. Signos clínicos producidos por *Salmonella* spp.**

Los signos clínicos que se registran frecuentemente en la infección por *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* en aves jóvenes son: apatía, somnolencia, deshidratación, empastamiento cloacal, depresión, ceguera, diarrea y alta mortalidad, las aves que sobreviven pueden presentar aumento de leucocitos y pobre crecimiento. En aves adultas, la producción se reduce hasta un 30% existiendo deshidratación, anorexia y cianosis de cresta y barbillas (Ashton, 1990; Arnold y Holt, 1995). Los signos clínicos por infecciones con SE, no son específicos, sin embargo, en los pollitos de 1 a 4 semanas de edad hay mayor

---

<sup>2</sup> Del Aguila B C.: Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Zona 12, Guatemala, Centroamérica, Ref. DM590695, Jun, 1995. Datos no publicados.

<sup>3</sup> Hernández Carlos Miguel, Microbiólogo. Centro de Investigaciones Veterinarias, Universidad Centroamericana, Apartado 69, Managua, Nicaragua, Tel. 746559, Julio, 1995. Datos no publicados.

<sup>4</sup> Ayala, R.: Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Octubre, 1995, El Salvador, Datos no publicados.

susceptibilidad y mortalidad que puede llegar al 20%, especialmente cuando se trata del fagotito 4. Se ha descrito también retraso del crecimiento, poca ganancia de peso, decaimiento, retención de saco vitelino y muerte. En las gallinas no se observan signos pero puede haber una reducción en la producción de huevo. La

mortalidad puede estar asociada con peritonitis y ooforitis. En humanos existen síntomas de dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, escalofrío y fiebre en las 6 a 96 horas post infección y en algunos casos muerte, sobretodo en pacientes muy susceptibles y pacientes inmunodeprimidos aunque esto depende del fagotipo involucrado (Urquiza *et al.*, 1994; Gast, 2003; Jordan, 2002).

### **1.7. Lesiones macroscópicas por salmonelosis**

Las lesiones macroscópicas que se han observado como consecuencia de infección por *Salmonella pullorum*, son: inflamación crónica degenerativa en ovario, salpingitis, pericarditis, enteritis catarral, orquitis y neumonía supurativa focal (Nagaraja *et al.*, 1995; Gast, 2003).

*Salmonella gallinarum* puede producir hepatomegalia, esplenomegalia y necrosis multifocal en hígado, riñón y bazo así como focos de necrosis en miocardio y coloración bronceada de hígado, bazo, pulmón y corazón. *S. typhimurium* produce lesiones inflamatorias en intestinos delgado y grueso en diferentes animales y en muridos congestión del hígado y bazo; en mesenterio congestión y edema, adelgazamiento de las paredes del ileon y ciego con acumulación de líquidos, gas y petequias que pueden extenderse hasta el yeyuno cuando existe diarrea, pudiéndose encontrar pequeñas úlceras en el epitelio cecal con exudado fibrinoso. Las lesiones producidas por SE son muy similares a las descritas, dependiendo el fagotipo involucrado, en el proceso pueden observarse esplenomegalia, hepatomegalia, enteritis, onfalitis, peritonitis y ooforitis. En pollos de 2 a 3 semanas se observa típicamente pericarditis panoftalmítis y a veces tiflitis (Goodwin, 1996; Nagaraja *et al.*, 1995; Salyers y Whitt, 2000).

### **1.8. Lesiones microscópicas por salmonelosis**

Las lesiones microscópicas observadas producidas por bacterias del género *Salmonella* son: hepatitis parenquimatosa necrosante, infartos con necrosis

fibrinoide y esclerosis del miocardio, enteritis, focos múltiples de inflamación y necrosis en otros órganos (Riddell, 1996; Gast, 2003)

En humanos, las lesiones microscópicas observadas en la infección por *Salmonella typhi* causan: hiperplasia en el Tejido Linfoide Asociado al Intestino (TLAI), linfonodos y bazo, necrosis focal de hígado, inflamación de la vesícula biliar e inflamación focal en pulmón, medula ósea y periostio. Las hemorragias intestinales o perforaciones del intestino son generalmente consecuencia de úlceras necróticas en el TLAI. En las lesiones activas pueden observarse a los bacilos intracelularmente en los fagocitos mononucleares. En las aves con *S. pullorum*, se observa en hígado, hiperemia, hemorragias, degeneración focal, necrosis y focos proliferativos de células endoteliales. También se observa necrosis focal del miocardio, bronquitis catarral, enteritis catarral e inflamación en hígado, pulmón, riñones y pericardio. (Hoer, 1996, Gast, 2003). Los hallazgos por *S. gallinarum* en aves son hepatitis difusa y focos de necrosis en el parénquima hepático con infiltrado leucocitario. El miocardio presenta infartos y áreas de necrosis fibrinoide y esclerosis. *S. typhimurim* y SE ocasiona lesiones similares a *S. gallinarum*, *S. pullorum*, durante su infección. Al respecto, el hígado puede observarse congestionado o pálido, la necrosis focal debajo de la capsula es de tipo coagulativa (Goodwin, 1996; Barnes; 1996; Davies y Wray, 1995; Salyers y Whitt, 2000; Runnels *et al.*, 1970; Gast, 2003).

### **1.9. Estudio ultraestructural de salmonelosis**

En detalle se describe cuando *Salmonella typhimurium* logra establecer un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal, antes del contacto inicial, el borde permanece intacto. Sin embargo, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades sufren elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado rizado o arrugamiento de la membrana celular. Otros cambios que se han observado por el estudio ultraestructural son presencia y migración de heterófilos y macrófagos en el intestino delgado y cambios patológicos en los organelos del citoplasma de enterocitos en los cuales

*Salmonella* logró su penetración (Sánchez y Cardona, 2003, Salyers y Whitt, 2000).

#### **1.10. Cambios leucocitarios por la infección por *Salmonella* spp.**

Los leucocitos polimorfonucleares son células fagocíticas involucradas en la primera línea de defensa contra la invasión de organismos patógenos. En las aves predominan los heterófilos que son la contraparte de los neutrófilos en los mamíferos, de los cuales su principal función es la destrucción y fagocitosis de sustancias extrañas (Kogut *et al.*, 1994; Wells, *et al.*, 1998). Los pollitos recién nacidos expuestos a patógenos como *Salmonella* durante la primera semana de vida son altamente susceptibles a las infecciones comparadas con aves más adultas. Esto puede ser en parte debido a las defensas inmunes insuficientes (Kogut, 1994; Wells, *et al.*, 1998; Kramer, 2003).

En las aves, las células primarias en la respuesta inmune por la invasión bacteriana temprana por *Salmonella*, son los heterófilos. Estudios anteriores donde usaron un modelo de pollo granulocitopénico, en aves adultas demostraron que los heterófilos tienen el mecanismo más eficiente para la defensa contra *Salmonella* (Ziprin *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000). Wells *et al.*, (1998), realizaron un estudio la actividad bactericida y fagocítica de los heterófilos en pollos durante los primeros 7 días de vida para evaluar si la disminución de la función de los heterófilos juega un rol en la susceptibilidad de pollitos infectados con *Salmonella*. El conteo de leucocitos en sangre periférica no demostró ninguna diferencia significativa en los porcentajes de heterófilos durante la primera semana post infección. La actividad fagocítica de los heterófilos no cambió desde el primer hasta el cuarto día de edad, sin embargo, aumentó el doble de su eficiencia al séptimo día de edad de los pollitos (día 1, 30.69; día 4, 33.99; día 7, 60.46). La actividad bactericida de los heterófilos de todos los grupos infectados eliminaron SE eficazmente (Wells *et al.*, 1998; Andreasen, *et al.*, 1991).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Con base en lo descrito, las infecciones por Salmonelas en granjas avícolas pueden causar efectos económicos negativos como: alta mortalidad, pobre conversión alimenticia y retraso del crecimiento, con aumentos en los decomisos de canal debido a lesiones por septicemia, además de ciclar la bacteria por la presencia de portadores asintomáticos (Shivaprasad, 1990).

Existen muchas bacterias patógenas ampliamente estudiadas en cuanto a su fisiología, genética, estructura celular y patogenicidad, al respecto, *Salmonella typhimurium* debido a su fácil manejo en el laboratorio ha tenido mayor posibilidad de manipulación con técnicas moleculares y por tener un modelo animal como es el ratón, permite realizar experimentos *in vivo* en comparación de otros serotipos de *Salmonella* en otras especies animales (Sánchez y Cardona, 2003; Sangwei *et al.*, 1999).

La patogenicidad de SE en aves es poco entendida y muy pocos informes han descrito experimentalmente la patogenicidad de la bacteria en la infección de aves jóvenes y adultas. Por otro lado, tampoco existe información de la patogenicidad y virulencia que *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko que puede provocar en pollos de engorda.

Los antecedentes mencionados, muestran la necesidad de generar información sobre la patogenicidad de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda, debido a la posibilidad de poner en riesgo la sanidad aviar y la salud pública.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

Describir la patogenia de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda.

### **3.2. Objetivos particulares:**

- 1.- Realizar análisis bacteriológicos de órganos y heces de pollos desafiados con *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko para su aislamiento a diferentes horas post infección.
- 2.- Describir lesiones microscópicas en los órganos muestreados a diferentes horas post infección, clasificándolas en leves, moderadas y severas.
- 3.- Describir la penetración de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko mediante microscopía electrónica de transmisión y su efecto en enterocitos de aves infectadas.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Animales de experimentación.

La prueba se realizó en pollos de engorda clínicamente sanos, género indistinto, los cuales fueron observados durante 4 días antes de la realización del experimento.

A todos los pollitos se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* alojándolos por separado en baterías de crianza de las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal Aves: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (DPAA: FMVZ – UNAM). Al arribo de los pollitos, se tomaron muestras para análisis bacteriológico del alimento y 5 pollitos fueron sacrificados para descartar la presencia de *Salmonella* spp., utilizando métodos de cultivo estándar (Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO, 1993). Las muestras para estudio de lesiones microscópicas y de ultraestructura se realizaron en el Departamento de Patología, F.M.V.Z. –U.N.A.M.

### 4.2. Cepa bacteriana

Se empleó una cepa de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a (SE FT13a) para el tratamiento I y otra cepa de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SI) para el tratamiento II, las cuales fueron obtenidas del laboratorio de bacteriología del DPPA: FMVZ –UNAM.

Las cepas de SE FT13a y SI se sembraron por separado en CICC<sup>5</sup> (Caldo Infusión Cerebro Corazón) y se incubaron 24 horas a 37C. Las cepas se centrifugaron a 2500 RPM (Revoluciones por minuto) durante 60 minutos a 4C. El sobrenadante de cada cepa fue desechado y se depositó en su lugar solución de PBS (Solución amortiguadora de fosfatos, por sus siglas en inglés) para resuspender las pastillas de bacterias y nuevamente se centrifugó durante 60 minutos a 4C. El mismo procedimiento fue repetido una vez más.

---

<sup>5</sup> Acumedia, Baltimore Maryland 21211.USA.

Después del último lavado, la cepa de SI se ajustó con PBS a una concentración final de  $1 \times 10^9$  UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mililitro) y SE PT13a se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL para su posterior inoculación por vía oral a los pollitos.

#### **4.3. Diseño experimental para la determinación de la patogenicidad de *Salmonella enteritidis* FT13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda**

En el presente estudio se utilizaron 75 pollitos de engorda estirpe Ross de 1 día de edad, de género indistinto. Se dividieron en grupos de tratamientos de la siguiente manera:

**1. Tratamiento I: (Grupos 1 y 2)** Cada grupo constó de 14 pollitos. A cada pollito se le administró una suspensión de 250  $\mu$ L por vía oral con una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a como dosis única. Posteriormente se les proporcionó alimento comercial y agua *ad libitum* durante todo el tiempo de la prueba.

**Tratamiento II: (Grupos 3 y 4)** Cada uno de los dos grupos estuvieron formados por 14 pollitos. A cada pollito se le administró una suspensión de 250  $\mu$ L por vía oral con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko como dosis única. Posteriormente se les proporcionó alimento comercial y agua *ad libitum* y durante todo el tiempo de la prueba.

**Tratamiento III: (Grupo 5)** Este grupo también constaba de 14 pollitos. A cada pollito se le administró 250  $\mu$ L por la vía oral de solución salina fisiológica como dosis única, fungiendo como grupo testigo negativo. Posteriormente se les proporcionó alimento comercial y agua a libre acceso durante todo el tiempo de la prueba.

Los pollos fueron observados diariamente durante 12 días que duró la prueba, registrándose diariamente su estado clínico y mortalidad en las hojas de registro correspondiente.

#### 4.4. Toma de muestras

Un pollo de cada grupo por tratamiento a las 6, 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 222, 246 y 270 horas post inoculación fue sacrificado humanitariamente (NOM 033 ZOO 1995). Antes del sacrificio de cada uno de los pollitos se tomó aproximadamente 1mL de sangre con anticoagulante EDTA<sup>6</sup> (Ácido Etilen Diamino Tetraacético) para el análisis leucocitario. También cada 24 horas post inoculación experimental se obtuvieron muestras de heces (1g aproximadamente) para realizar análisis bacteriológicos.

Para los análisis bacteriológico, histológico y ultraestructural se tomaron asépticamente muestras de buche, corazón, pulmón, hígado, vesícula biliar, bazo, duodeno, yeyuno, íleon y ciegos. Cada muestra se dividió en tres porciones para llevar a cabo los respectivos estudios. Durante la necropsia, se realizó un registro de lesiones macroscópicas de los pollos de todos los tratamientos (Flujograma 1).

#### 4.5. Análisis bacteriológico

##### 4.5.1. Análisis bacteriológico cualitativo

Las muestras de órganos y heces obtenidas para el aislamiento de SE FT13a y SI, fueron tomadas en pequeñas bolsas de plástico asépticas e individuales para cada muestra. Todas las muestras fueron maceradas en un mortero. El análisis bacteriológico cualitativo (Siembra directa) consistió en la siembra de cada una de las muestras en TSA<sup>7</sup> (Agar Soya Trypticosa), por sus siglas en ingles), AVB<sup>8</sup> (Agar Verde Brillante) y por otro lado también se sembró en el medio CHR<sup>9</sup> (Chromagar *Salmonella*, por sus siglas en ingles) y fueron incubados a 37C durante 18 horas para permitir el desarrollo bacteriano (Pérez *et al.*, 1987 Urquiza, 1995). Se realizaron pruebas bioquímicas convencionales, incluyendo LD<sup>10</sup> (lisina descarboxilasa) y OD<sup>11</sup> (Ornitina descarboxilasa) a todas las colonias sospechosas aisladas.

<sup>6</sup>: SIGMA de México, SA. De C.V. Durango 104, Col Roma. México, DF.

<sup>7</sup>: BIOXON, Paseo de la constitución s/n, México,DF.

<sup>8</sup>: Acumedia. Baltimore Maryland 21211. USA.

<sup>9</sup>: CHROMagar Microbiology. Fax (33-1)45480600. Paris, France.

<sup>10</sup>: BIOXON de México, SA. Oaxaca. México.

<sup>11</sup>: MERCK. E. MERCK, Darmstad. Germany.

#### **4.5.2. Análisis bacteriológico cuantitativo**

El análisis cuantitativo consistió en depositar las muestras mencionadas en CT<sup>12</sup> (Caldo tetrionato) realizar diluciones decuples (1:10) en PBS, se sembrándose 3 gotas de 20µL en TSA<sup>7</sup>, AVB<sup>8</sup> y CHR<sup>9</sup> por separado desde la dilución 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> en cada cuadrante posteriormente las cajas fueron incubadas durante 18 horas a 37C para su lectura. Posteriormente se contaron las colonias lactosa negativa del AVB<sup>8</sup> y colonias de color blanco mate de CHR<sup>9</sup>, para determinar la concentración de bacterias sospechosas a *Salmonella*. Se realizaron pruebas bioquímicas convencionales, incluyendo LD<sup>10</sup> (lisina descarboxilasa) y OD<sup>11</sup> (Ornitina descarboxilasa) a todas las colonias sospechosas aisladas (NOM-005-ZOO, 1993; Pérez *et al.*, 1987).

#### **4.6. Cuento diferencial de leucocitos**

Una vez obtenida la muestra se realizó el extendido de sangre sobre un portaobjetos de vidrio, el cual fue teñido con el colorante de Wright<sup>12</sup> por 3 minutos. Después se aplicó el amortiguador de fosfatos por 10 minutos para luego enjuagar la preparación con agua corriente, se deja secar al aire. El conteo diferencial se obtuvo utilizando el contador manual para leucocitos<sup>13</sup> y la observación del extendido sanguíneo con el objetivo 100x (Charles, 2000).

#### **4.7. Revisión de lesiones microscópicas**

Simultáneamente a la toma de muestras de órganos para aislamiento bacteriológico se tomaron muestras de órganos para el examen histopatológico de cada uno de los tratamientos, las muestras fueron fijadas en formalina al 10% amortiguada a pH de 7.2 para su posterior procesamiento según las técnicas convencionales (Prophet, 1995). Una vez fijadas las muestras, se cortaron con un espesor de 2 a 5mm y fueron depositadas en capsulas de plástico e introducidas

---

<sup>12</sup>: HYCEL de Mexico, SA. Col. Chapultepec 11850. México, DF.

<sup>13</sup>: COUNTING DEVICE INC. North Bradford, ct06471. USA.

en el histoquinete (Zakura Mod RH12EP) para su deshidratación (etanol de 80, 95, y 100 %) aclaración (xilol) e infiltración en parafina, luego del tiempo transcurrido, cada muestras fue incluida en bloques de parafina y finalmente cortadas en el micrótopo (Leica Mod 820) con un espesor de 2 a 4  $\mu\text{m}$  para su posterior tinción en portaobjetos de vidrio por la técnica de hematoxilina – eosina y finalmente ser observadas en el microscopio óptico (Prophet *et al.*, 1995).

#### **4.8. Revisión ultraestructural (microscopia electrónica de transmisión)**

Se tomaron secciones de íleon y ciego, las cuales midieron de 1 a 2  $\text{mm}^2$ , procediéndose a su fijación por inmersión en glutaraldehído<sup>14</sup> 2.5% amortiguado en cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.2, por una hora a 4C.

Una vez fijadas las muestras, se lavaron con la misma solución amortiguadora de cacodilatos<sup>15</sup>, posfijándose con  $\text{OsO}_4$ <sup>16</sup> al 1% por una hora y deshidratándose con serie ascendente de acetonas<sup>17</sup> (50, 70, 80, 96, 100, 100 y 100%), 10 minutos en cada solución. Posterior a la deshidratación, se preincluyeron con mezcla de resina-acetona 2:1 (una hora) y mezcla de resina-acetona 1:1 (24 horas). Transcurrido el tiempo, se hicieron dos cambios de resina, de 1 hora a 60C cada uno, para finalmente incluirse en cápsulas de agar embebidas con resina por 24 horas a 60C. Para las etapas de preinclusión e inclusión se emplearon resinas epóxicas<sup>18</sup> (Epon 812) (Vásquez y Echeverría, 2000). Una vez procesadas las muestras, para el corte de las mismas, se utilizó el ultramicrotomo (Reichert- Jung MOD 570 0.7 TO 4,2x), se realizaron cortes semifinos de 180 y 200 nm de grosor los cuales se tiñeron con azul de toluidina mediante la metodología de rutina. Los cortes finos fueron de 70 a 80 nm de grosor, se montaron en rejillas de cobre<sup>19</sup> de 200 mesh y contrastaron con acetato

---

<sup>14</sup> Electron Microscopy Sciences, Whashintong, PO Box 251 Morris Road, USA.

<sup>15</sup> SIGMA Laboratorios, ST Lous, PO Box 14508, USA.

<sup>16</sup> Dpto Cell Biology and Science, PO Box 2003, USA.

<sup>17</sup> MERCK, Demcart Rd, Gibbstown NJ 08027, Germany.

<sup>18</sup> Electron Microscopy Sciences, PO Box 550 1560 Indsty Road , USA.

<sup>19</sup> Electron Microscopy Sciences, Whashintong, PO Box 251 , Fort Wast , USA.

de uranilo<sup>20</sup> (20 minutos) y citrato de plomo<sup>21</sup> (10 minutos). Las muestras se revisaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 (50 kv) (Vásquez y Echeverría, 2000).

---

<sup>20</sup>: Electron Microscopy Sciences, Whashintong, PO Box 251, Fort Wast, USA.

<sup>21</sup>: Electron Microscopy Sciences, Whashintong, PO Box 251, Fort Wast, USA.

## **5. RESULTADOS**

En el presente estudio se analizaron los resultados de tres tratamientos: Tratamiento 1 (*Salmonella enteritidis* FT13a), tratamiento 2 (*Salmonella enteritidis* biovar Issastschenko) y Tratamiento 3 (Testigo)

### **5.1. Patogenia de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a (Tratamiento I)**

#### **5.1.1. Signos clínicos:**

Durante la primera semana post infección se observaron dos pollitos con depresión. No hubo mortalidad de pollitos durante todo el experimento.

#### **5.1.2. Hallazgos a la necropsia:**

En los pollitos inoculados con SE FT13a entre las 6 a 126 hpi (horas post infección), no se observaron cambios macroscópicos aparentes a la necropsia. A partir de las 150 hpi (7 días) en hígado y bazo se observó congestión leve. En íleon se observó congestión, hemorragias equimóticas y gas en ciegos. A los 8 días post infección (174 hpi) se observaron 2/2 pollitos con retención de saco vitelino. En pulmón y corazón no se observaron cambios patológicos aparentes durante todo el experimento.

#### **5.1.3. Análisis bacteriológico y aislamiento de SE FT13a en órganos internos:**

En el cuadro 1, se presentan los resultados de forma general del análisis bacteriológico y del aislamiento de SE FT13a. A las 6 hpi no se obtuvo aislamiento de SE FT13a en muestras de ningún órgano, sin embargo, a las 18 hpi se obtuvo aislamiento a partir de las muestras de buche, yeyuno e íleon; a las 30 hpi nuevamente solo en las muestras de buche e íleon, la bacteria fue aislada. En ciegos se aisló SE FT13a a partir de las 42 hpi; a las 54 hpi la bacteria en estudio fue aislada a partir de muestras de duodeno, hígado – bazo y de la vesícula biliar y a las 78 hpi se aisló sólo de muestras de íleon y de ciegos. A partir de las 102 hpi se aisló nuevamente SE FT13a de hígado-bazo, vesícula biliar, duodeno, yeyuno, íleon y ciegos y a las 126 hpi nuevamente se aisló la bacteria a partir de muestras vesícula biliar, íleon y ciegos. El mayor número de aislamientos positivos a SE

FT13a fue a las 150 hpi a partir de muestras obtenidas de la combinación hígado - bazo, vesícula biliar, duodeno, corazón-pulmón, yeyuno, íleon y ciego. Durante las 174 y 198 hpi se aisló sólo de muestras obtenidas de hígado-bazo, vesícula biliar, duodeno, yeyuno, íleon y ciego. A las 222 hpi no se logró aislar SE FT13a de ningún órgano. Finalmente a las 246 y 270 hpi sólo hubo aislamiento positivo de la bacteria en estudio a partir de yeyuno, íleon y ciego. En la figura 1 se presenta el registro de aislamiento de SE FT13a a partir de órganos muestreados en las diferentes hpi.

En el cuadro 2 y la figura 2, se observa la frecuencia y el número de aislamientos positivos de SE FT13a en los órganos muestreados. El buche fue el primer órgano de donde se aisló SE FT13a de las 18 a las 30 hpi. En las muestras obtenidas de yeyuno e íleon, la bacteria también se aisló primero a partir de las 18 hpi y se continuó aislando en estos órganos hasta las 246 hpi. En ciego la bacteria se aisló por vez primera a las 42 hpi y continuó aislándose hasta las 270 hpi. Por otro lado, en las muestras obtenidas del duodeno, vesícula biliar y de hígado-bazo se aisló SE FT13a a partir de las 54 hpi hasta las 198 hpi. Por último, a partir de las muestras obtenidas de corazón y pulmón, la bacteria en estudio sólo se aisló a las 150 hpi.

En el cuadro 3 y la figura 3, se observa el porcentaje de aislamiento de SE FT13a en los órganos muestreados. El íleon presentó el 27.78% de aislamiento; el ciego, 18.06%; el yeyuno, 13.89% y el duodeno, 11.11%, registrándose en el tracto gastrointestinal el porcentaje de mayor frecuencia de aislamiento de SE FT13a. En contraste, el buche presentó sólo 4.16%, de las muestras de hígado-bazo y de vesícula biliar, se obtuvo el mismo porcentaje de aislamiento, 11.11% y por último de las muestras obtenidas de corazón-pulmón sólo se obtuvo el 2.78% de aislamiento positivo a SE FT13a.

En el cuadro 4 se presentan los resultados del análisis bacteriológico cuantitativo de SE FT13a por órganos positivos al aislamiento. El rango mínimo de

recuperación expresado en UFC en las muestras positivas al aislamiento de SE FT13a se obtuvo en hígado ( $5.6 \times 10^3$ ) y el máximo en ciego ( $9 \times 10^9$ ).

#### **5.1.4. Análisis bacteriológico y aislamiento de SE FT13a en heces:**

En los cuadros 5 y 6 se observan los resultados obtenidos del análisis bacteriológico de las heces de pollitos infectados con SE FT13a para el aislamiento de la bacteria y el análisis cuantitativo. En los días 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 y 12 se logró aislar SE FT13a a partir de las heces, obteniéndose un rango de recuperación de  $5 \times 10^5$  -  $9 \times 10^9$  UFC/g. Las heces obtenidas de pollitos infectados con SE FT13a de los demás días fueron negativas al aislamiento de *Salmonella* spp. identificándose otras bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Citrobacter freundii*, *Proteus* spp. y un hongo, *Mucor* spp.

#### **5.1.5. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos infectados con SE FT13a.**

Las lesiones microscópicas con mayor relevancia sugestivas a salmonelosis durante la revisión de lesiones microscópicas fueron observadas en íleon, ciego, yeyuno y duodeno con un grado de lesión de leve a severo y también se observaron lesiones similares en órganos viscerales.

##### **5.1.5.1. Buche**

En secciones de la mucosa de buche desde las 6 hpi, se observó descamación de las células epiteliales acompañada de congestión y hemorragia leves en submucosa; a las 42 hpi, además se observó un grado leve de necrosis coagulativa del epitelio en la mucosa. Por último a las 78 hpi en submucosa también se logró observar infiltración de leucocitos (heterófilos y macrófagos) e hiperplasia del tejido linfoide (Cuadros 7 y 8).

##### **5.1.5.2. Corazón**

Durante las primeras 6 hpi en diferentes secciones observadas en miocardio y epicardio se observó congestión y hemorragias en grado de lesión leve a moderado hasta las 42 hpi. A partir de las 54 hpi, se observaron focos de

infiltración difusa y/o focal de leucocitos en grado leve a moderado hasta el final del experimento (Cuadros 7, 8 y Figura 4).

#### **5.1.5.3. Pulmón**

En las secciones de pulmón a las 6 hpi se observó: congestión y hemorragias que variaron de grado leve a severo hasta el final del experimento (270 hpi). A las 198 y 222 hpi se observaron focos de infiltración de leucocitos (Cuadros 7 y 8).

#### **5.1.5.4. Hígado**

En secciones de hígado, a las 6 hpi sólo se observó congestión y hemorragias, y a partir de las 18 hpi áreas focales de infiltración de leucocitos de grado de lesión leve en un principio a moderado y severo en las horas subsiguientes. Por último a las 150 hpi se observaron áreas focales de necrosis coagulativa (Cuadros 7, 8 y Figura. 5).

#### **5.1.5.5. Bazo**

Desde las 6 hpi se observaron hemorragias y congestión persistente en grado de lesión leve a severo a nivel de parénquima de bazo, a las 174 hpi a nivel de pulpa blanca se observó hiperplasia del tejido linfoide e infiltración leve de leucocitos. (Cuadros 7 y 8).

#### **5.1.5.6. Duodeno**

A nivel de mucosa de duodeno a las 6 hpi se observó descamación epitelial y a las 30 hpi infiltración leve de leucocitos respectivamente y a partir de las 54 hpi se observaron áreas focales de necrosis coagulativa a nivel de mucosa intestinal (Cuadros 7 y 8).

#### **5.1.5.7. Yeyuno**

A partir de las 6 hpi se observó en mucosa, descamación epitelial, infiltración de leucocitos a partir de las 18 hpi y también se observó necrosis tipo coagulativa de los enterocitos a partir de las 30 hpi acompañados de congestión y hemorragias en grados de lesión de leve a severo (Cuadros 7 y 8).

#### **5.1.5.8. Íleon**

En los pollitos infectados con SE FT13a a las 6 hpi se observó descamación epitelial a nivel de mucosa e infiltración de leucocitos (heterófilos y macrófagos). A partir de las 30 hpi fueron observadas áreas focales de necrosis coagulativa en el epitelio intestinal y a las 126 hpi en la submucosa se observó hiperplasia del tejido linfoide. (Cuadros 7, 8 y Figura 6).

#### **5.1.5.9. Ciegos**

En los cuadros 7 y 8, se presentan cambios histológicos observados en muestras de ciego de pollitos infectados con SE FT13a, donde se observó infiltración de leucocitos y descamación epitelial (30 hpi) así como necrosis coagulativa en mucosa epitelial a partir de las 102 hpi respectivamente.

#### **5.1.6. Cambios leucocitarios observados durante la infección de SE FT13a**

En el cuadro 9, se presentan resultados del conteo diferencial de leucocitos en los pollitos infectados con SE FT13a a los 4 días de edad, donde se observa disminución de linfocitos de 41.25% durante la primera semana y de 41.56% en la segunda semana. Aumento en el porcentaje de heterófilos en la primera semana, 25% y en la segunda semana, 28.33 %. Eosinofilos la primera semana, 0% y la segunda semana, 3.17%; basófilos la primera semana, 10% y la segunda semana, 6.1% y monocitos la primera semana, 15% y la segunda semana, 19.89%.

#### **5.1.7. Revisión ultraestructural de SE FT13a en muestras de íleon y ciego mediante microscopia electrónica de transmisión en pollitos infectados experimentalmente.**

##### **5.1.7.1. 6 Hpi**

En secciones de ciego e íleon a partir de las 6 hpi en lumen intestinal se observaron estructuras de forma redondeada y oval de diferentes tamaños (0.49 - 1.2  $\mu\text{m}$ ), con pared celular y contenido central de aspecto granular de moderada electrodensidad, con base a las características morfológicas y de ubicación dichas estructuras fueron compatibles con enterobacterias (Figura. 7a). En otra sección

del ciego se observaron algunas de las estructuras mencionadas, en contacto con las microvellosidades del borde apical de un enterocito, (Fig. 7b). Por otro lado, en otras secciones de íleon se observaron en varios enterocitos pérdida de microvellosidades en el borde apical (Fig.7c). y en uno de ellos en su borde apical, presentaba proyección leve del citoplasma hacia el lumen (Fig.7d).

Así mismo en secciones de íleon se observó dentro de un enterocito estructuras de forma ligeramente redonda (bacteria) con pared celular delgada con un contenido granular de moderada electrodensidad y por las características morfológicas, dimensión e ubicación es sugerente a SE FT13a. (Fig. 8a). Así también dentro de enterocitos se observó células de núcleo oval irregular con gránulos electrodensos de diferentes tamaños (heterófilo mielocito) (Fig 8b).

#### **5.1.7. 2. 30 hpi:**

En secciones de ciego e íleon se observaron cambios similares a las 6 hpi, pero además en otra sección de la mucosa intestinal, se observó enterocito con invaginación y proyección de su citoplasma hacia el lumen por cada lado (forma de copa) y en medio de esta proyección se observaron estructuras de forma ligeramente oval (0.9  $\mu\text{m}$ ), con pared celular delgada y con contenido granular de moderada electrodensidad, sugerente a SE FT13a. (Fig. 8c). Dentro del citoplasma celular de enterocitos en otra secciones se observaron estructuras de forma ligeramente oval sugerentes a *Salmonella* spp., además se observaron cambios en el citoplasma celular del enterocito, degeneración (mitocondrias ligeramente aumentadas de tamaño y crestas hinchadas), (Fig. 8d). En íleon se observaron cambios similares a ciego y también mayor número de enterocitos con cambios degenerativos y necrosis (dilatación intensa de mitocondrias, formación de vacuolas, daño de la membrana celular y organelos, cariorexis, cariólisis y pignosis).

### **5.1.7.3. 54,102, 150, 198 y 246 hpi.**

En secciones de íleon y ciego se observaron cambios similares a las horas mencionadas. Sin embargo, a medida que las hpi pasaban se observó enterocitos con mayor pérdida de integridad del contenido celular (degeneración y necrosis), pequeñas vacuolas que contenían estructuras redondeadas y oval (0.46 a 1.2 µm), pared celular delgada y contenido granular electrodensó y ligeramente electrolúcido, sugerente a bacteria en estudio, heterófilos y detritos celulares en lumen.

## **5.2. *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (Tratamiento II)**

### **5.2.1. Signos clínicos:**

Los pollitos infectados en este tratamiento no presentaron ningún signo clínico ni mortalidad de durante todo el experimento.

### **5.2.2. Hallazgos a la necropsia:**

Los órganos muestreados de pollitos inoculados con SI desde las 6 a las 150 hpi no presentaron cambios macroscópicos a la necropsia. A las 174 hpi se observó gas en ciegos; a las 198 hpi se observó un pollito con retención de saco vitelino y en el íleon congestión y además áreas de hemorragias equimóticas. En los órganos viscerales a partir de las 174 hpi se observó congestión en hígado y bazo, en los demás órganos viscerales no se observaron cambios patológicos aparentes en la necropsia durante todo el experimento.

### **5.2.3. Análisis bacteriológico y aislamiento de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SI) en órganos internos:**

En el cuadro 1 se observan los resultados de forma general del análisis bacteriológico y el aislamiento de SI. Desde las 6 hpi hasta las 30 hpi no se registró aislamiento de SI en ningún órgano, sin embargo, a partir de las 42 hpi la bacteria en estudio fue aislada sólo de las muestras de buche. Posteriormente a las 54, 78, 102 y 126 hpi no se logró aislar SI de ningún órgano. A las 150 hpi se obtuvo aislamiento de SI en las muestras obtenidas del íleon y el yeyuno; y a las

174 y 222 hpi la bacteria fue aislada en muestras del íleon y ciego. Durante las horas restantes 246 y 270 hpi no se registró aislamiento de SI en ningún órgano muestreado. En la figura 1 se presenta el registro de aislamiento de SI a partir de órganos muestreados en las diferentes hpi.

En el cuadro 10 y la figura 9, se presenta la frecuencia y el número de aislamiento de SI en los órganos muestreados. De las muestras de obtenidas de la combinación de hígado-bazo, corazón-pulmón, de la vesícula biliar y el duodeno no se obtuvo aislamiento de SI durante el tiempo que duro el experimento. Sin embargo, en las muestras obtenidas del buche la bacteria fue aislada las 42 hpi. En el íleon y el yeyuno SI fue aislada a las 150 hpi. Finalmente a las 174 y 222 hpi se obtuvo aislamiento de la bacteria en estudio de muestras obtenidas del ileon y el ciego.

En el cuadro 11 y la figura 10 se observan los resultados en porcentajes de aislamiento de SI en los órganos muestreados. De un total de 12 aislamientos positivos a SI, el buche obtuvo 8.22%; el yeyuno representó el 16.67%; el ciego 25% y el íleon 50%. En las muestras obtenidas de la combinación corazón-pulmón, hígado-bazo y vesícula biliar no se obtuvo aislamiento positivo de SI durante todo el experimento.

Los datos del análisis bacteriológico cuantitativo en AVB<sup>8</sup> de SI en órganos positivos al aislamiento, se presentan en el cuadro 12. El rango mínimo de recuperación expresado en UFC/g de la bacteria fue en muestras obtenidas del buche ( $4 \times 10^5$ ) y el rango máximo lo obtuvo el ciego ( $7 \times 10^9$ ).

#### **5.2.4. Análisis bacteriológico y aislamiento de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SI) en heces:**

En los cuadros 5 y 6 se observan los resultados del análisis bacteriológico cuantitativo y cualitativo en AVB<sup>8</sup> para el aislamiento de SI a partir de heces tomadas cada 24 horas de pollitos infectados con la bacteria en estudio. Sólo en

las muestras de heces obtenidas a las 120, 168 y 240 hpi se logró aislar SI, con un rango de recuperación de  $7.8 \times 10^8$ - $6 \times 10^9$ .

## **5.2.5. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos infectados con SI**

### **5.2.4.1. Buche**

En la mucosa de buche se observó descamación epitelial a partir de las 18 hpi, necrosis epitelial tipo coagulativa, congestión y hemorragias a las 54 hpi de grado leve a moderado que varió durante todo el experimento. A las 126 hpi se observaron áreas focales de infiltración de leucocitos e hiperplasia del tejido linfoide (Cuadros 13, 14 y Figura 11).

### **5.2.4.2. Corazón**

En miocardio y epicardio a las 6 hpi se observó congestión y hemorragias. Además se observaron áreas de infiltración difusa y/o focal de leucocitos a partir de las 102 hpi en grado leve a moderado hasta el final de experimento (Cuadros 13 y 14).

### **5.2.4.3. Pulmón**

En las muestras obtenidas del parénquima pulmonar de los pollitos inoculados con SI, sólo se observó congestión y hemorragias en grado leve a severo durante todo el experimento (Cuadros 13 y 14).

### **5.2.4.4. Hígado**

La congestión y hemorragias fueron evidentes durante las primeras 6 hpi en el parénquima hepático. A partir de las 42 hpi se apreciaron áreas de infiltración de leucocitos con un grado de lesión leve a moderado; por último a las 222 y 246 hpi se observaron áreas de necrosis coagulativa (Cuadros 13 y 14).

### **5.2.4.5. Bazo**

Las lesiones constantes que fueron encontradas durante el experimento, son congestión y hemorragias y a partir de las 198 hpi hiperplasia de tejido linfoide en pulpa blanca (Cuadros 13 y 14).

#### **5.2.4.6. Duodeno**

En mucosa a las 6 hpi no fue observado ningún tipo de alteraciones patológicas. A partir de las 18 hpi se observó descamación epitelial, a partir de las 54 hpi infiltración de leucocitos de grado leve a moderado durante todo el experimento (Cuadros 13 y 14).

#### **5.2.4.7. Yeyuno**

Al igual que en el duodeno, en la mucosa a partir de las 6 hpi, se observó descamación epitelial, infiltración de leucocitos a partir de las 18 hpi y áreas de necrosis epitelial de tipo coagulativa a partir de las 42 hpi de grado leve a moderado durante todo el experimento (Cuadros 13 y 14).

#### **5.2.4.8. Íleon**

Las lesiones encontradas fueron constantes durante todo el experimento. En la mucosa de íleon a las 6 hpi en secciones observadas se encontró descamación epitelial e infiltración de leucocitos con un grado de lesión que varió de leve a severo hasta el final del experimento. A partir de las 42 hpi se observó necrosis epitelial tipo coagulativa con grado de lesión de leve a moderado durante todo el experimento. Finalmente a las 174 y 222 hpi se observó hiperplasia de tejido linfoide y apoptosis (Cuadros 13 y 14).

#### **5.2.4.9. Ciego**

En la mucosa de ciego a partir de las 30 hpi se observó infiltración de leucocitos acompañadas de congestión y hemorragias, además descamación epitelial a partir de las 54 hpi A las 102 hpi necrosis tipo coagulativa del epitelio (Cuadros 13, 14 y Figura 12).

#### **5.2.5. Cambios leucocitarios observados durante la infección de SI en pollitos infectados experimentalmente.**

En el cuadro 9, se encuentran los resultados de los valores de leucocitos en pollitos infectados con SI a los 4 días de edad, donde se observa disminución de

linfocitos y aumento en el porcentaje de heterófilos (Primera semana: 49% y segunda semana: 30.8%); eosinófilos (Primera semana: 0% y segunda semana: 3.42%), basófilos (Primera semana: 20 % y segunda semana: 7.36%) y monocitos (Primera semana: 18.75 % y segunda semana: 21.57%).

### **5.2.5. Revisión ultraestructural de SI muestras de íleon y ciego mediante microscopia electrónica de transmisión.**

#### **5.2.5.1. 6 hpi:**

En secciones de íleon de los pollitos infectados con SI a partir de las 6 hpi se observó la secuencia de penetración e invasión por una estructura de forma ligeramente oval, sugerente a SI. En sección de íleon, se observó en la mucosa intestinal, la siguiente secuencia, se apreció estructura de forma ligeramente redondeada, con pared celular delgada y contenido granular electrodensos, posteriormente una estructura similar, se observó en contacto con las microvellosidades de un enterocito, en otra célula se apreció la proyección del citoplasma hacia la luz formando una pseudocopa sobre la cual se encontraba estructura con las mismas características que las descritas. En otros enterocitos a nivel de citoplasma, de una a varias vacuolas las cuales contenían estructuras de forma ligeramente redonda, pared celular delgada y ligeramente electrodensas, sugerente a SI (Figura 13).

Por otro lado se observó degeneración en algunos enterocitos (mitocondrias ligeramente aumentadas de tamaño e hinchadas) y detritos celulares en lumen intestinal. En ciego se observaron cambios similares.

#### **5.2.5. 2. 30, 54, 102, 174 y 222 hpi**

En secciones de íleon y ciego se observaron cambios similares a las horas mencionadas y a los producidos por SE FT13a. Por otro lado también se observó enterocitos con degeneración y necrosis pero además apoptosis (constricción celular, condensación y fragmentación de cromatina nuclear y formación de vesículas citoplásmicas y cuerpos apoptóticos) a medida que las hpi transcurrieron

se observó que la pérdida de integridad de enterocitos fue mas evidente, mayor numero de pequeñas vacuolas que contenían bacterias (0.46-1.2  $\mu\text{m}$ ), de características similares a las mencionadas, sugerente a SI, presencia de heterófilos y macrófagos con núcleos de forma irregular, citoplasma granular, y detritos celulares en el lumen intestinal.

### **5.3. Testigo (Tratamiento III)**

En los pollitos del grupo testigo no se aisló *Salmonella* spp. de ningún órgano durante todo el experimento. Durante el examen histológico y ultraestructural no se observaron lesiones sugerentes a la infección por *Salmonella* spp. Durante la identificación de las bacterias negativas al aislamiento de *Salmonella* spp en corazón, pulmón, hígado y bazo se aisló: *E. coli*; en buche, duodeno, yeyuno, íleon y ciego se logro aislar *E coli*, *Citrobacter freundii* y *Proteus* spp. Por último, en muestras de heces se obtuvo aislamiento de *E coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus* spp. y el hongo *Mucor* spp.

## 6. DISCUSIÓN

*Salmonella*, tiene una variedad de fagotipos, incluyendo el fagotipo 6a, que es reconocido mundialmente como patógeno para el humano, este fagotipo es de origen alimenticio y es transmitido a través de huevos de aves infectadas. Este fagotipo se ha aislado con mayor frecuencia en Inglaterra y en algunos casos en los EEUU a partir de heces de humanos (Coyle *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1996; Dодhia *et al.*, 1998). Durante las dos décadas pasadas se observó el predominio en aumento de SE en muchos países. En los EEUU, los fagotipos con mayor reporte como fuentes de infección para el humano y la industria avícola fueron los FT8 y 13a, sin embargo, a partir de 1995, en EEUU y todo el mundo los fagotipos 4 y 8 también han sido aislados con mayor frecuencia de casos de humanos y animales (Dодhia *et al.*, 1998; Mancera *et al.*, 2004).

### 6.1. Análisis bacteriológico y aislamiento de SE FT13a y SI en órganos internos.

Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente, se requiere de un inóculo de aproximadamente  $10^6$  a  $10^8$  UFC para el desarrollo de la enfermedad sintomática en el humano y animales; otros factores como el tipo de cepa, alimento contaminado con la bacteria y el estado fisiológico del hospedero, también favorecen o no el desarrollo de la enfermedad (Desmidt, 1997). En el presente estudio, pollos de engorda a los cuatro días edad fueron inoculados con  $1 \times 10^8$  UFC de SE FT13a y  $1 \times 10^9$  UFC de SI fagotipo 6a respectivamente.

Después de la ingestión de *Salmonella*, ésta resiste el ambiente ácido del estómago y seguidamente coloniza el intestino delgado, penetra a las células epiteliales y migra hacia la lámina propia de la región ileocecal y ahí se multiplica en los folículos de la región linfóide. Los polimorfonucleares (heterófilos) son estimulados y la infección se limita a nivel del tracto gastrointestinal (Cox, 1996). Si son serotipos productores de fiebre entérica no son retenidas a este nivel, sino que migran a hígado y bazo por circulación hemática (Sánchez, 2003).

En el presente estudio, a partir de las 18 horas post inoculación (hpi) se inició el aislamiento de SE FT13a en buche, yeyuno e íleon. En muestras de hígado, bazo y vesícula biliar se obtuvo aislamiento a partir de las 54 hpi y a las 150 hpi (7 días) se aisló en todos los órganos muestreados al mismo tiempo (buche, hígado -bazo, vesícula biliar, duodeno, yeyuno, íleon y ciego) (Cuadro 1). Los órganos con mayor frecuencia de aislamiento durante el tiempo que duró el experimento fueron íleon y ciego. Los resultados anteriores sugieren que la infección causada por SE FT13a fue sistémica porque la bacteria invadió y colonizó el tracto gastrointestinal y hubo migración además a otros órganos viscerales (hígado -bazo) por circulación hemática, por otro lado el aislamiento negativo de salmonela en otros órganos y hpi pudo ser debido a que la concentración de SE disminuyó conforme se recuperaba el ave (Gast y Holt, 1998; Shivaprasad *et al.*, 1990), debido a que la infección en los pollitos no se elimina por completo y que por tanto SE permanece latente.

El buche es el primer sitio del huésped de donde es aislada frecuentemente SE en las primeras horas de la infección, pudiendo influenciar en la sobrevivencia y virulencia de *Salmonella* spp. Se ha descrito que el pH óptimo para el crecimiento de *Salmonella* esta generalmente entre 6.5 y 7.5, aunque también se ha descrito que SE puede crecer desde pH desde 4. El pH informado del buche de gallinas es de 4.57 y depende de factores de alimentación, población microbiana, si se encuentra vacío o lleno, así como también por el estado fisiológico del ave, sugiriendo que el pH del buche y del tracto gastrointestinal puede influir en la sobrevivencia de SE (Qin *et al.*, 1995; Sturkie, 1986; Durant *et al.*, 1999)

La población microbiana del buche esta conformada por lactobacilos, los cuales son de importancia para mantener bajo el pH y prevenir el establecimiento de bacterias patógenas, en condiciones de estrés o restricción alimenticia la población microbiana de lactobacilos del buche suele disminuir (Durant *et al.*, 1999; van der Wielen *et al.*, 2002). Al respecto Carrier *et al.*, (1999), realizaron un estudio sobre la supervivencia de *Salmonella* en el contenido del buche de pollos

a la edad de sacrificio durante el retiro del alimento, en el cual se indica que la contaminación del buche se eleva durante el periodo de retiro de alimento que antecede al sacrificio y que el contenido contaminado del buche puede servir como un punto importante de entrada de *Salmonella* a la planta de procesamiento. Por otro lado Seo *et al.* (2003), en un estudio sobre la detección de *Salmonella enteritidis* con inmunoglobulina A (IgA) en muestras de buche de aves infectadas con SE, observaron niveles elevados de IgA en este órgano después de la infección oral de SE en las aves. Seo *et al.*, (2002), realizaron un estudio sobre la inmunidad humoral de la mucosa frente a la infección experimental con SE FT 13a en el buche de pollos, donde los pollos infectados mostraron una fuerte respuesta IgA contra los flagelos de *Salmonella* en bilis y buche. En el presente estudio el buche fue el órgano donde se aisló SE FT13a por primera vez (Cuadro 1) desde las 18 a las 30 hpi y a partir de las 42 hpi fue aislada SI respectivamente. Posteriormente no se obtuvo su aislamiento. Estos resultados sugieren que el porcentaje de aislamiento obtenido de SE FT13a y de SI en el buche pudo deberse a la presencia de IgA, además de que la concentración de SE en los órganos afectados puede disminuir conforme el ave se recupera (Shivaprasad *et al.*, 1990).

En relación al hígado y al bazo, se ha descrito que en estos órganos, *Salmonella* puede permanecer “oculta” de la respuesta inmune, debido a la invasión intracelular por *Salmonella* spp. y así también el proceso inmunológico en el bazo puede controlar la infección al disminuir la multiplicación de *Salmonella* spp. Salyers y Whitt, (2001), mencionan que una vez que *Salmonella* spp. se encuentra dentro del organismo crece dentro de los macrófagos de hígado y bazo. Cuando *Salmonella* ha logrado colonizar y atravesar las barreras del intestino, pasa hacia el torrente sanguíneo por un lado y por el otro es excretada por las vías urinarias y heces. Las bacterias que están en sangre, infectan órganos internos como hígado y bazo (Salyers y Whitt, 2001; Poppe *et al.*, 1993). Debido a que *Salmonella* tiene tropismo por las vías biliares, en vesícula biliar se multiplica de forma abundante y en ocasiones la bacteria se mueve de hígado a vías biliares

originándose un flujo continuo de microorganismos hacia el intestino delgado por segunda vez, donde tiende a localizarse en las placas de Peyer, de aquí puede determinarse el estado de portador, eliminando en forma intermitente la bacteria por heces (Salyers y Whitt, 2001; Mdegela *et al.*, 2002). Las muestras de órganos excepto aquellos con contenido intestinal de aves infectadas con SE, por lo general contienen muy pocos microorganismos competitivos con *Salmonella* (Gast, 2001). Al respecto en hígado, bazo y vesícula biliar, durante el presente estudio, SE FT13a fue aislada de estos órganos desde las 54 hpi hasta las 198 hpi; en el caso de SI no se obtuvo aislamiento positivo durante todo el experimento, posiblemente debido a que la bacteria si bien colonizó estos órganos, una parte fue eliminada a través de las heces y la otra parte se encontraba dentro de los macrófagos, provocando el estado de portador asintomático de forma intermitente (Salyers y Whitt, 2001).

Con relación al aislamiento intermitente de *Salmonella*, Alva, (2005), logró aislar SE FT13a de muestras de hígado y bazo a la primera semana en (3/10) pollos y (1/10) pollos en la tercera semana post infección, durante la segunda, cuarta y quinta semana post infección, su aislamiento fue negativo en estos órganos.

Por otro lado debe tomarse en cuenta que las aves recién eclosionadas que carecen de microflora intestinal protectora son muy susceptibles a la colonización intestinal por *Salmonella* spp. u otras bacterias patógenas. Las células blanco (células M, enterocitos y células caliciformes) revisten el último tramo del intestino delgado y el primer tramo del intestino grueso (íleon-ciego) para la invasión por bacterias patógenas. Si la célula blanco esta “desocupada” con respecto al número de salmonelas, es posible que se produzca la infección. Después de adherirse a la célula blanco, las bacterias se multiplican, segregan proteínas SipA, SopB, SopE, etc., que ayudan a la bacteria en el proceso de invasión. En el interior de la célula, las salmonelas segregan una proteína con actividad citotóxica que provoca la muerte de la célula y su desprendimiento de la mucosa intestinal.

La gravedad de la enfermedad dependerá del número de células blanco afectadas (Salyers y Whitt, 2001; Sánchez, *et al.*, 2003 y Hirsh, 1990).

Los resultados bacteriológicos del aislamiento de SE FT13a y SI del presente estudio, muestran que íleon y ciego fueron los órganos con mayor frecuencia de aislamiento durante todo el experimento, por lo cual se les puede considerar como órganos de importancia en el aislamiento de *Salmonella* spp, coincidiendo con Alva, 2005; Sánchez *et al.*, 2003 y Hirsh, 1990.

En un estudio realizado por Gorham *et al.*, (1991), sobre persistencia de SE FT13a en pollitos infectados al primer día y siete días de edad, de los pollitos infectados al día edad SE FT13a fue aislada de la mayoría de los órganos (saco vitelino, hígado, bazo, íleon y ciego) después de la primera semana post infección. En los pollitos de 7 días de edad al cuarto día post infección se aisló SE FT13a de pulmón (2/4) pollitos, hígado (1/4), bazo(2/4), gónadas (0/4), del yeyuno (0/4), cerebro (0/4), duodeno (3/4), yeyuno (3/4), íleon (4/4) y ciego (4/4), a los 7 días post infección en los órganos de donde se obtuvieron aislamientos fueron bazo (2/4), yeyuno (1/4), íleon (2/4) y ciego (2/4), por último a los 21 días post infección sólo se aisló SE FT13a de íleon (1/4) pollitos y ciego (1/4) pollitos habiendo sido los órganos de preferencia para el aislamiento de la bacteria. Por otro lado Desmidt, *et al.*, (1997), realizaron un estudio de la patogenia de SE FT 4 en pollitos de un día de edad, donde se aisló a partir de las 3 hpi en tracto gastrointestinal y a partir de las 12 hpi en órganos viscerales. Recientemente estudios realizados por Alva (2005), encontró que pollitos inoculados con SE FT13a de dos días de edad, después de una semana post infección logró aislar la bacteria de saco vitelino, hígado, bazo y tonsilas cecales. Al respecto, se observa que la mayoría de los estudios realizados con SE en pollitos de 1 a 7 días, presentaron resultados muy similares a los obtenidos en el presente estudio sobre la patogenia de SE FT13a. Sin embargo, con SI, no se logró aislar en los pollitos infectados con la misma frecuencia que SE FT13a, posiblemente por las diferencias de patogenicidad entre los distintos fagotipos de SE, por ejemplo el

FT4 frecuentemente se relaciona con cierto grado de elevada invasividad y letalidad para pollos recién eclosionados, además otros estudios también revelan que la especificidad de un serotipo para un huésped particular no sólo estaría dada por factores de virulencia propios de la bacteria, sino también por la capacidad del serotipo de circular dentro de una población de hospederos, es decir, el ambiente donde habitan los aves no permitiría que SI exprese sus factores de virulencia (Borie y Gonzáles, 2000; Uzzau, *et al.*, 2001).

Urquiza (2001), realizó estudios sobre la patogenicidad e inocuidad de SI en animales de laboratorio y determinación de proteínas con actividad enterotóxica, en los cuales encontró que dicha bacteria al ser inoculada en ratones (*Mus musculus*) y ratas (*Rattus rattus*), produjo signos de salmonelosis y mortalidad, reaislándose la bacteria aun de los animales sobrevivientes, hasta los 20 días de edad, y de heces, en los primeros días post inoculación. En conejos, no produjo signos de enfermedad, ni mortalidad, ni reaislamiento de la bacteria en heces, ni de órganos de los animales sacrificados a los 30 días post inoculación. En cobayos, aunque hubo mortalidad, no hubo recuperación de la bacteria a partir de los órganos internos de los animales muertos, ni de los sobrevivientes y tampoco de las heces. En pollos de engorda de 1 y 8 días de edad, produjo una mortalidad del 3.1% (1/32) recuperándose la bacteria en estudio, del pollito muerto. Mientras que en otros grupos no hubo mortalidad en los 16 días que duro la prueba, sin embargo, en uno de los grupos se logró recuperar la bacteria a partir de órganos internos en solo de una de las aves que sobrevivió (3.1%). Por otro lado, en pollitos Leghorn de un día edad infectados con SI con una dosis de  $(1 \times 10^9)$  produjo mortalidad desde el 9.3 al 28.1 %, logrando aislarse en SI en 5/12 aves muertas, no habiéndose registrado el aislamiento de ninguna de las aves que sobrevivieron de ningún órgano interno durante todo el experimento.

Aviña *et al.*, (2001) y Barranco *et al.*, (2000), con gallinas SPF en postura y gallinas ponedoras comercial es de 25 semanas de edad respectivamente, mostraron que con la inoculación por vía oral de SI no se registro mortalidad

alguna durante 30 días que duro la prueba, tampoco se redujo la postura y no fue posible la recuperación de *Salmonella* spp. en huevo, ni heces en ningún momento de dichos ensayos.

Por otro lado, según estudios realizados por Espino *et al.*, (1989), de un rodenticida biológico comercial (RBC) administrado en aves ligeras mayores de 3 semanas de edad, no se registró mortalidad ni aislamiento. Cabe mencionar que las aves mayores de 3 semanas de edad, ya comienzan a tener un sistema inmune maduro y que probablemente debido a esto, las aves reaccionaron en contra del antígeno administrado en la forma esperada habiendo eliminado el antígeno a SI por completo (Sharma, 1997). Las aves adultas infectadas con salmonelas por lo general, no muestran signos externos; sin embargo, pueden servir como portadores de la infección por largos períodos de tiempo, por otro lado las aves ligeras son mas resistentes que las aves pesadas a cualquier tipo de infección (Gast, 2003).

Los estudios realizados por Espino *et al.*, (1989), indican que SI es patógena solamente para roedores de la familia Muridae (especificidad de especie) sin embargo, Urquiza (2001), logró aislar SI a partir de órganos internos y heces de pollitos. González, 2004 y Rejo, *et al.*, (1997), también demostraron en un modelo aviar, la inoculación de la cepa viva en dosis aproximadas de  $10^8$ - $10^9$  UFC/mL, han logrado inducir respuesta inmune mediada por anticuerpos aglutinantes, en porcentajes que van desde un 13% hasta un 94% con la cepa del rodenticida. De la misma forma, Chils (1997), realizó estudios donde se logró reaislar la cepa en deposiciones de perros, ovejas y cerdos inoculados experimentalmente por lo que todos estos resultados no coinciden con los descritos por Espino *et al.*, (1989).

Con base en lo anterior, las infecciones por SE con frecuencia, tienen diferentes consecuencias para las aves recién eclosionadas, que para las aves adultas. En pollitos y pavipollos jóvenes muy susceptibles, la infección por SE puede provocar enfermedad y muerte con mayor frecuencia. Los efectos usuales

de las infecciones por *Salmonella* en pollos y pavipollos corresponden a: 1) La colonización intestinal que es el primer paso en el proceso de la infección para salmonelas que producen paratifoideas introducidas por vía oral, en el cual, con frecuencia se observa la eliminación de la bacteria a través de las heces; 2) En muchas de las aves infectadas, la invasión del tracto gastrointestinal resulta en la multiplicación de *Salmonella* en el tejido reticuloendotelial del hígado y bazo y la diseminación final para colonizar diferentes órganos internos; 3) Por último, se puede presentar bacteremia, que en ocasiones genera una alta incidencia de mortalidad (Gast, 2003).

Por otro lado Wray (2000), realizó estudios sobre la patogenia de otras salmonelas como: *Salmonella typhimurium* mediante infección experimental en pollos en la primera semana de edad, demostraron que después de la invasión de la bacteria en tracto gastrointestinal, esta se multiplicó en hígado y bazo y se diseminaron a otros órganos, produciendo infección sistémica. Shivaprasad *et al.*, (1990), realizaron estudios sobre la patogenia de la infección por SE FT8 en gallinas ponedoras que fueron inoculadas vía oral, la cual resultó en una infección bacterémica con diseminación al hígado, bazo, óvulos y oviducto. Sin embargo, las aves permanecieron clínicamente sanas con una producción de huevo normal.

Con lo expuesto, los resultados en el presente estudio, sugieren que cualquiera sea la edad de infección en las aves, SE juega un importante papel en su persistencia en el ambiente y las aves y que tanto SE FT13a y SI pueden provocar infecciones paratifoideas en pollos y fungiendo como una fuente de infección para otras especies animales y además, para el humano.

#### **6.1.1. Análisis bacteriológico y aislamiento de SE FT13a y SI en heces**

La infección oral con SE en aves produce de manera primaria una infección gastrointestinal y a su vez, una eliminación constante de SE por las heces (Gast, 2000). Shivaprasad *et al.*, (1990), informaron que la persistencia en la infección se debe principalmente a que la infección queda latente en el tracto gastrointestinal (TGI) y en tonsilas cecales con la eliminación de SE en heces de forma

intermitente, aunque en los demás tejidos la concertación recuperada de SE en estos pueda disminuir conforme se recupera el ave. Alva, (2005), realizó estudios en heces de pollitos inoculados experimentalmente con SE FT13a, en los cuales se pudo recuperar la bacteria desde la primera hasta la quinta semana post inoculación. En el presente estudio SE FT13a fue aislada a partir de las heces desde las 24 hpi en el 75% de muestras analizadas (3/4), siendo persistente la eliminación de bacteria hasta el final del experimento (48, 96, 120, 120, 144, 216, 240, 288 hpi).

Con relación a SI, ésta fue aislada a partir de heces, pero no con la misma frecuencia que SE FT13a. La bacteria sólo se logró recuperar a partir de las 120, 168 y 240 hpi, mostrando una menor frecuencia de su aislamiento en comparación con SE FT13a. Estudios realizados por Urquiza (2001), en pollitos Leghorn, inoculados con SI y muestreados diariamente durante 27 días, se logró recuperar la bacteria a partir de las heces sólo al segundo día post inoculación, el resto fue negativo al aislamiento de SI.

Durante el análisis bacteriológico y aislamiento de SE FT13a y de órganos internos y heces, también se lograron identificar otros microorganismos como *E. coli*, *Proteus* spp., *Citrobacter freundii* y el hongo *Mucor* spp. Con relación a *E. coli*, ésta forma parte de la flora nativa bacteriana en última porción del intestino delgado y además puede ser un patógeno oportunista (Barnes *et al.*, 2003), lo cual sugiere que debido al daño causado por SE en los pollitos en estudio, *E. coli* pudo haber dañado más el tracto gastrointestinal, ya que también se ha descrito que *E. coli* produce enteritis, tiflitis y diarrea. Por otro lado tanto *Proteus* spp. como *Citrobacter* spp., se pueden encontrar como agentes contaminantes en el ambiente, también se ha informado que estas forman parte de la flora nativa bacteriana en íleon y ciego (Barnes, 2003). Por último, con referencia al aislamiento del hongo *Mucor* spp., se informa que generalmente las infecciones con este tipo de hongos en aves, no es común, pero denotan un estado de inmunopresión cuando están presentes. (Kunkle, 2003).

En cuanto al análisis bacteriológico cuantitativo, se observó que la mayor concentración de SE y SI se encontró en íleon, ciego y heces (Cuadros 6, 10 y 12) Aunque proporcionalmente existió una mayor cantidad de muestras positivas de íleon en general, fue en las muestras de ciego y heces donde hubo la mayor recuperación de SE y SI en todo el experimento. Esto sugiere entonces, una infección predominante tanto de SE y SI en el tracto gastrointestinal y que las heces son un buen monitor de la infección como se ha mencionado (Gast, 2003).

## **6.2. Hallazgos microscópicos en órganos de pollitos infectados con SE FT13a y SI.**

La relación del hallazgo de lesiones en diversos segmentos del tracto digestivo así como el aislamiento del agente, sugiere la importancia del tracto gastrointestinal de las aves, como un sitio importante para la replicación y diseminación de estos microorganismos. Asimismo, si los mecanismos de defensa del sistema inmune de las aves se encuentran debilitados, es posible que otros agentes patógenos encuentren un portal de entrada para su diseminación (Gast, 2003).

En aquellos brotes graves de infección por SE (paratifoideas) en aves recién nacidas, suele desarrollarse con rapidez una septicemia y esta puede causar elevada mortalidad con pocas o ninguna lesión aparente. Cuando el curso de la enfermedad es más crónico, es frecuente la enteritis grave acompañada de lesiones necróticas focales en la mucosa del intestino delgado. El bazo y el hígado aumentan de tamaño y se congestionan con evidentes franjas hemorrágicas o focos necróticos. Algunas veces los riñones aumentan de tamaño y se congestionan, en muchas ocasiones se ha informado de perihepatitis y pericarditis fibrinopurulentas (Gast, 2003). En saco vitelino se puede encontrar material de la yema sin absorberse. A veces se observan otras lesiones que incluyen hipopión, panoftalmítis, artritis purulenta, aerosaculítis y onfalítis (Gast, 2003).

En este trabajo se observó que en el parénquima hepático de pollitos infectados experimentalmente con SE FT13a y SI existieron áreas focales de

necrosis coagulativa, acompañadas de infiltración de heterófilos y macrófagos, congestión y hemorragias, en lo que se refiere a corazón, también se observaron leucocitos diseminados de forma focal y difusa, sugiriendo lesiones similares a *Salmonella*.

Por otro lado, la invasión de células epiteliales intestinales por salmonelas origina una serie de cambios patológicos que afectan al líquido intestinal y a la regulación de electrolitos; este proceso puede originar finalmente muerte celular y por tanto producir y exacerbar la diarrea. La inoculación oral de gallinas de postura con SE ocasiona inflamación del epitelio y de la lamina propia del colon y los ciegos relacionados con la infiltración heterofílica, aunque a menudo los ciegos y la unión ileocecal son los sitios de afinidad particular por las salmonelas para invadir las células epiteliales de todo el intestino. Además de la invasión epitelial se pueden diseminar las salmonelas a través de los macrófagos. En pollos Leghorn de 4 semanas de edad infectados con SE FT13a, en mucosa y submucosa de ciego se observó mayor infiltración de basófilos al primer día postinfección, heterófilos al quinto día y la infiltración de eosinofilos fue escasa (Petrone, 1998). Se han observado ligeros procesos inflamatorios con infiltración de heterófilos que varían de focales a difusos en los ovarios y los oviductos de parvadas infectadas de manera natural con SE (Gast, 2003; Hirsh, 1999). Con referencia a estas lesiones, coinciden con lo observado en íleon y ciego en el presente trabajo, con descamación epitelial, infiltración de leucocitos y áreas focales de necrosis coagulativa a nivel de vellosidades.

Con relación a las lesiones microscópicas que producen pullorosis y tifoidea aviar, existe una cantidad muy limitada de información acerca de las lesiones microscópicas. Casi todas las infecciones descritas para la pullorosis provienen de casos de campo, las que podrían complicarse con otros agentes bacterianos y virales; sin embargo, las lesiones se pueden resumir como sigue: en los casos agudos sólo se puede distinguir congestión vascular grave en varios órganos, en especial hígado, bazo y riñones; en casos agudos a subagudos hay necrosis

multifocal de los hepatocitos con acumulación de fibrina e infiltración de heterófilos en hígado, también es posible observar infiltración portal de heterófilos mezclados con pocos linfocitos y células plasmáticas. En los casos crónicos, en especial en donde hay grandes nódulos en el corazón, el hígado desarrolla congestión pasiva con fibrosis intersticial, el bazo puede tener congestión notable o exudado en senos vasculares en etapas agudas y grave hiperplasia del sistema de células fagocíticas mononucleares en las etapas terminales. En pollitos, los ciegos pueden presentar necrosis extensa de la mucosa y submucosa, con acumulación de restos necróticos mezclados con fibrina y heterófilos en la luz. Las lesiones en corazón consisten en necrosis de las miofibras con infiltración de heterófilos, linfocitos y células plasmáticas, en las etapas finales; estas células son reemplazadas por numerosas células de apariencia uniforme de tipo histiocítico. Otros cambios aunque menos frecuentes, consisten en bronquitis catarral, enteritis catarral e inflamación intersticial de los pulmones y riñones (Gast, 2003).

En la revisión histopatológica del presente estudio, se encontró que ambos serotipos de *Salmonella* (SE FT13a y SI) provocaron daño en grado de lesión desde leve a severo en órganos internos de los pollitos inoculados experimentalmente. En ambos tratamientos a partir de las 6 hpi en el de tracto gastrointestinal (TGI) se observó con frecuencia descamación epitelial, enteritis severa con infiltración de leucocitos (heterofilos y macrófagos) focos de necrosis coagulativa, hiperplasia de folículo linfoide y acompañados de hemorragias y congestión. En hígado durante las primeras horas post inoculación se observó congestión y hemorragias y posteriormente también se observaron áreas de infiltración de leucocitos y a partir de las 198 hpi con SE FT13a y 222 hpi con SI áreas de necrosis coagulativa. En corazón, las lesiones más evidentes fueron: hemorragias, congestión y áreas de infiltración de leucocitos en ambos tratamientos. En bazo también fue muy evidente la congestión y hemorragias y a partir de las 172 hpi con SE FT13a se observó hiperplasia de los folículos linfoides en pulpa blanca, al respecto en SI se evidenció congestión y hemorragias. En

pulmón durante el examen histológico se observó con frecuencia hemorragias y congestión en ambos tratamientos.

En estudios realizados por Dhillon *et al.*, (2001), se observaron resultados histopatológicos de aves de 7 y 14 días post infección que confirmaron que SE FT 4 podía causar peritonitis, peri hepatitis y enteritis.

Gorham *et al.* (1994), realizaron un estudio sobre lesiones macroscópicas y microscópicas en pollos jóvenes experimentalmente infectados con SE FT13a, en el cual, se observó que en el examen histológico se presentaron severas lesiones microscópicas como inflamación por leucocitos en pericardio y miocardio, hígado e intestino delgado con presencia de detritos celulares y colonias de bacterias en el lumen.

Desmidt *et al.* (1997), en el estudio de patogénesis de SE FT 4 después de la infección experimental en pollos jóvenes, durante la revisión histológica a partir de las 24 horas post infección observaron: inflamación en intestino y órganos viscerales y en algunas aves la formación de granulomas en ciego.

Lo descrito, sugiere que cuando *Salmonella* spp. evade las defensas corporales del huésped, invaden la mucosa intestinal y la lamina propia, se multiplican y cuando pasan al torrente sanguíneo logran también invadir otros órganos y con mayor facilidad lesionan los tejidos, provocando cambios celulares y vasculares asociados con la inflamación. La invasión de las células epiteliales intestinales está controlada por diferentes genes de invasión estimulados por la baja tensión de oxígeno del intestino. Estos genes corresponden a proteínas que participan en la adhesión y en el reclutamiento de las proteínas citoesqueléticas del huésped que ayudan a penetrar bacteria para colonizar y multiplicarse (Samuelson, 2003).

En contraste con la gran diversidad molecular de microorganismos, los patrones de respuestas titulares a estos agentes son ilimitados. Por tanto, a nivel microscópico muchos patógenos desencadenan patrones de reacción idénticos y

son escasos los datos exclusivos o patonogmónicos de cada agente. Además, lo que determina las características histológicas de la respuesta inflamatoria es la interacción entre el microorganismo y el huésped. Por lo tanto, en un huésped neutropénico, una bacteria piógena que normalmente desencadena una respuesta leucocitaria enérgica, puede dar lugar a una necrosis tisular rápida con escaso exudado leucocitario (Samuelson, 2003).

### **6.3. Cambios leucocitarios observados durante la infección experimental de SE FT13a y SI en pollos de engorda**

El proceso inflamatorio en las aves es similar al de mamíferos, sin embargo, se pueden encontrar algunas diferencias. La inflamación aguda en las aves transcurre en horas o días, mientras que en los mamíferos requiere de horas hasta semanas. En este periodo de la inflamación, las aves presentan mayor cantidad de basófilos que en los mamíferos. En la inflamación subaguda y crónica de las aves, la acumulación de exudado heterofílico se transforma invariablemente en caseoso, en contraste con los mamíferos, donde los neutrófilos promueven licuefacción produciendo exudado purulento. Al respecto Carlson y Allen (1969), demostraron que los polimorfonucleares están presentes en el proceso inflamatorio agudo en aves inoculadas en el pliegue del ala con *Staphylococcus aureus*. Los polimorfonucleares se observaron a los primeros 30 minutos después de la inoculación, alcanzando su mayor número a las 12 horas; mientras que los linfocitos eran las células predominantes a las 36 horas. En un estudio posterior Carlson (1972), observó en el músculo pectoral de aves inoculadas con *Staphylococcus aureus* que las células inflamatorias predominantes, en las primeras 12 horas; eran los polimorfonucleares. A las 24 horas post inoculación, la mayor cantidad de leucocitos eran los linfocitos. En ambos trabajos se encontraron gran cantidad de basófilos durante las primeras 4 horas.

Porter y Holt (1993), describieron que en una infección digestiva por SE la respuesta inflamatoria inicial se caracteriza por la llegada de gran número de polimorfonucleares y leucocitos mononucleares. En las aves, el origen de estas

células inflamatorias es la medula ósea, de donde migran a la sangre y después a los tejidos que presentan factores quimiotácticos, puesto que son muy pocos o no hay fagocitos residentes en los tejidos. Lo anterior fue comprobado por Kogut *et al.*, (1994), al utilizar el 5- fluorouracilo (droga mielosupresora, con acción citolítica) contra las células multipotenciales de la serie de los polimorfonucleares. Estas aves sufrieron mayor invasión de SE y lesiones con apariencia macroscópica de inflamación y hemorragias en intestino y ciego en comparación con las aves testigos. Las lesiones fueron más severas aun cuando se les inocularon por vía oral menor cantidad de unidades formadoras de colonias ( $1 \times 10^3$ ) de SE (Glick y Rose, 1976).

Swaggerty *et al.* (2005), evaluaron la susceptibilidad de estirpes de pollos genéticamente distintas a infecciones sistémicas por SE inoculada por vía intrabdominal. Los resultados indicaron que si bien hubo diferencia entre estirpes genéticas de resistencia a la infección por SE, lo más resaltante fue que en el periodo post infección emigraron más heterófilos a la cavidad abdominal en las estirpes resistentes, indicando que el incremento de heterófilos influye en el sitio de la infección, aumentando la resistencia sistémica contra la infección por SE en pollitos.

Anderson y Stephens, (1970), descubrieron que la infección en pollitos con *Salmonella anatum* y *Salmonella heidelberg* provocaron que se desarrollara leucopenia heterofílica severa y un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos juveniles a las 48 horas después de la inoculación.

En otro estudio sobre los cambios hematológicos después de una infección experimental por *Salmonella gallinarum* en pollos, realizadas por Assoku *et al.*, (1970), mostraron un gran aumento del número de heterófilos, sin embargo, el número de linfocitos y trombocitos se encontraban por debajo de los valores normales. Al respecto los resultados la mayoría de estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio (Cuadro 9), sugiriendo al igual que la infección por SE FT13a provoca estrés e inflamación crónica en el recuento de

leucocitos de los pollitos por la elevación del porcentaje de monocitos y heterófilos (Campbell, 1992).

#### **6.4. Revisión ultraestructural de SE FT 13a y SI en muestras de íleon y ciego mediante microscopia electrónica de transmisión.**

En 1967 Takeuchi y Sprinz, realizaron el primer y mas detallado estudio ultraestructural de una infección por *Salmonella typhimurium*, usando el íleon de cobayo, como modelo animal. *Salmonella* establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal, antes del contacto inicial, el borde permanece intacto. Sin embargo, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado *ruffling* (rizado). Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para reorganizar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que estas células normalmente no fagocíticas, son penetradas por la bacteria en un proceso llamado invasión (Sánchez, 2003).

Popiell y Turnbull (1985), realizaron un estudio sobre el paso de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella thompson* a través de la mucosa ileocecal de pollos y observaron la bacteria dentro de enterocitos, formación de vacuolas y macrófagos.

Amin *et al.*, (1994), realizaron un estudio *in vitro* en íleon de conejos y la invasión de *Salmonella typhimurium* logrando observar a las 2 horas post infección diferentes estados de penetración de la bacteria (0.63-0.86  $\mu\text{m}$ ) a través del borde de cepillo y su presencia dentro de los enterocitos, formación de vacuolas y ligeros cambios en el tamaño de las mitocondrias dentro de los enterocitos.

Bradley *et al.*, (1994), realizaron un estudio *in vitro*, en el cual infectaron experimentalmente roedores con *Salmonella typhimurium* y mediante microscopía electrónica de transmisión observaron la invasión de la bacteria a células M y enterocitos desde los 30 minutos hasta 180 minutos por los enterocitos. Por otro

lado Sánchez, (2003), realizó estudios en ratones para observar la invasión de *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*, demostrando que solo invadían células M en forma casi exclusiva, asociado con numerosas bacterias y destrucción.

Santos *et al.*, (2001), realizaron un estudio *in vitro* en íleon de terneros y observaron que los animales infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurium* a los 20 minutos post infección, la bacteria (0.77 $\mu$ m) ya se encontraba en contacto con células epiteliales M e induciendo el arrugamiento o rizado de la membrana para ingresar dentro de la célula y posteriormente a los 60 minutos post infección observaron a la bacteria (0.61 $\mu$ m) dentro de citoplasma celular de los enterocitos. Por otro lado, Santos, *et al.*, (2002), realizaron un nuevo estudio sobre la caracterización morfológica y molecular de *Salmonella typhimurium* en íleon de terneros, mediante el estudio de microscopía electrónica de transmisión lograron observar que la bacteria a los 15 minutos post infección se encontraba en contacto con el borde de cepillo de un enterocito y una célula M con la formación de la membrana rizada o arrugada (*ruffling*) y otro grupo de bacterias se encontraba dentro del enterocito en vacuolas. Posteriormente revisaron las muestras del íleon a las 1, 4, 12 hpi donde también observaron la presencia de la bacteria (0.44-0.66 $\mu$ m) dentro de los enterocitos, células M y/o células caliciformes, también se observó algunos neutrófilos alrededor.

Meyerholz y Stabel (2003), realizaron un estudio para comparar la invasión temprana de *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium* en íleon de cerdos y demostraron que ambos tipos de salmonelas pudieron invadir a nivel de enterocitos, células M y células caliciformes a partir de los 10 a 60 minutos post infección, las dimensiones de las bacterias observadas eran desde 0.90 a 1.09 $\mu$ m. Por otro lado, otros investigadores realizaron un estudio experimental sobre la invasión temprana con *Salmonella typhimurium* en íleon de cerdos y demostraron que la bacteria logra invadir células epiteliales, caliciformes y células M, desde los 10 a 25 minutos post infección. Las bacterias se observaron como estructuras de

forma oval y redonda con contenido granular de moderada electrodensidad y su tamaños variaron desde 0.36 a 1.09  $\mu\text{m}$  (Meyerholz, *et al.*, 2002).

Bayer *et al.*, (1990), infectaron pollitos de un día de edad con *Salmonella typhimurium* y observaron áreas de la mucosa intestinal sin microvellosidades, sugiriendo que esto también influye en la invasión por *Salmonella* y la absorción de nutrientes. Por otro lado Sevcikova *et al.*, (2003), realizaron un estudio en pollitos de un día infectados por *Salmonella enteritidis* FT4 y mediante microscopía electrónica observaron en la mucosa de los ciegos la presencia de la bacteria a las 6 horas post infección dentro de los enterocitos, cambios patológicos en el citoplasma de los enterocitos con formación de vesículas y pérdida de microvellosidades. A los 3 días post infección observaron heterófilos en la lámina propia. A los 10 días post infección se siguieron observando células inflamatorias, así como también el citoplasma granular de los enterocitos del ciego y algunos núcleos fragmentados y algunas mitocondrias aumentadas de tamaño y aun persistía la presencia de la bacteria dentro de los enterocitos del ciego de los pollitos infectados.

En el presente estudio, se observó que a partir de las 6 hpi tanto SE FT13a como SI se encontraban en contacto con las microvellosidades de los enterocitos, existiendo rizado o arrugamiento de la membrana celular y estructuras sugerentes a *Salmonella* spp. dentro de los enterocitos y en las subsiguientes hpi se observaron cambios patológicos en el citoplasma celular, coincidiendo con los estudios realizados por otros investigadores en aves y en otros modelos animales como, terneros, conejos, ratones, cerdos para estudiar los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* spp. El hecho de que interacciones similares entre *Salmonella* y la mucosa intestinal ocurran en por lo menos cinco diferentes modelos animales, sugiere que la misma forma puede suceder durante las infecciones humanas. Es importante recordar que muchos de los estudios mencionados se realizaron *in vitro* sin embargo, el presente estudio fue realizado *in vivo* mediante la infección de SE FT13a y SI en pollitos de engorda de cuatro días de edad.

*Salmonella* es hábil en explotar las funciones celulares pre existente del hospedero y usar estas funciones para su propio beneficio. Esto se ha visto durante la invasión, cuando la bacteria utiliza las señales de transducción del hospedero, lo cual afecta el rearrreglo del citoesqueleto y proteínas superiores de membrana produciendo el rizado (*ruffling*) de la membrana y la invasión bacteriana. También ocurre cuando *Salmonella* esta dentro de una vacuola ligada a la membrana tanto en células epiteliales como macrófagos (Santos *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que el examen bacteriológico a las 6 horas post inoculación no se aisló la bacteria en estudio de ninguno de los dos tratamientos, sin embargo, en el estudio ultraestructural de las muestras mediante microscopia electrónica de transmisión se logró observar SE FT13a y SI en íleon y ciego de pollitos infectados experimentalmente dentro de los enterocitos y además la secuencia de la penetración de SE FT13a y SI dentro de los enterocitos de pollitos infectados experimentalmente. El aislamiento negativo de SE FT13a y SI a las 6 hrs pi., sugiere una baja colonización y multiplicación en los tejidos de *Salmonella* spp., además que al inicio de la infección la bacteria experimenta severos cambios ambientales cuando ingresa al huésped por vía oral y tiene que enfrentarse con los mecanismos inespecíficos del huésped como el pH ácido del estómago, bajas tensiones de oxígeno, motilidad intestinal, flora microbiana y también con los mecanismos específicos del huésped regulada por la presencia de leucocitos. La bacteria responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes, para poder penetrar e invadir tejidos (Figueroa, 2003; Pérez, 1989).

Lo mencionado, sugiere que *Salmonella* después de combatir contra los mecanismos específicos e inespecíficos del huésped, disminuye su concentración de los tejidos, lo cual influye en su aislamiento en medios cultivos en los cuales la bacteria, deberá también enfrentar cambios de ambiente por la concentración de oxígeno del cultivo, la temperatura, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes del medio de cultivo, etc. pueden lograr influir en su aislamiento.

Se debe tomar en cuenta que en este estudio se evidenció que pollitos de engorda durante la primeras semanas de vida son susceptibles a la infección por *Salmonella enteritidis* FT13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko y que SI no es monopatógena que sólo produce enfermedad en roedores de la familia Muridae. Este es el primer trabajo de investigación que describe la patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda.

Actualmente la especificidad del hospedero está siendo estudiada a nivel nacional e internacional, y aún no se han logrado aclarar las bases genético-moleculares que dan origen a esta situación tan particular. Lo cierto es que se trataría de una compleja interacción entre genes plasmidiales de virulencia (spv) y genes cromosomales ubicados en islas de patogenicidad que en su conjunto, derivan en el reconocimiento de una única especie en particular. El reciente hallazgo de infección, lograda con una cepa de *Salmonella gallinarum* en ovejas (Uzzau *et al.*, 2001), abre un nuevo escenario en la epidemiología de la salmonelosis. Este estudio reveló que la especificidad de un serotipo para un huésped particular, no sólo estaría dada por factores de virulencia propios de la bacteria, sino también, por la capacidad del serotipo de circular dentro de una población de hospederos, es decir, el ambiente donde habitan los ovinos no permitiría que *S. gallinarum* expresara sus factores de virulencia. Es en este contexto donde se producen las primeras interrogantes sobre la mono especificidad de SI (Borie, *et al.*, 2004).

Por otro lado recordar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 1954 recomendó y prohibió el expendio de rodenticidas elaborados con *Salmonella enterica* serotipo *enteritidis* (fagotipo 6a), por causar riesgos de enfermedad en la salud del humano y muerte. En estudios realizados por Painter *et al.*, (2004), en el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CCPE) de Atlanta, Georgia (EEUU) evaluaron el riesgo en la salud del humano asociado al uso de un RBC que se usa actualmente y otro RBC que se usó en Europa a inicios

de 1960 y encontraron que ambos rodenticidas contenían cepas de *Salmonella*, las cuales presentaban características similares y pertenecen al fagotipo 6a. Basados en la similitud de las cepas, los rodenticidas biológicos elaborados con cepas de *Salmonella* que aún se encuentran disponibles en el mercado pueden provocar daños en la salud pública.

Parece entonces de innegable interés, considerar cuales serían las consecuencias en explotaciones pecuarias, toda vez que se utilice un producto biológico prohibido en los grandes mercados del mundo (EEUU y Reino Unido) y a la vez, cuales son los posibles impactos en salud pública y en la epidemiología de la salmonelosis que podría conllevar del uso del producto en México o en cualquier país del mundo (Borie *et al.*, 2005). En el caso de México, actualmente se cuenta con la campaña NOM- 005- ZOO, 1993, donde se solicita que las aves en control deben emplear la vacuna R-9 en gallinas comerciales. La vacuna R-9 contiene *Salmonella gallinarum* y antígenos O: 1, 9, 1, 3, mismos que SE FT13a y SI también contienen, por lo que al permitir el uso de un RBC conteniendo SI, las aves podrían infectarse con la bacteria y ser portadoras asintomáticas y en el monitoreo al realizar las pruebas de aglutinación en placa, no podrían diferenciarse los anticuerpos correspondientes a *Salmonella gallinarum* o SI, y por ende no se podría identificar si existiera infección por SI.

## 7. CONCLUSIONES

La patogenia de *Salmonella enteritidis* FT13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda, tiene similitud a la patogenia descritas de otros serotipos de *Salmonella* spp.

*Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko puede ser aislada mediante bacteriología y produce lesiones en diferentes órganos de pollos de engorda infectados experimentalmente desde las 6 hpi.

*Salmonella enteritidis* FT13a y de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko, penetra en enterocitos de íleon y ciego de pollos de engorda infectados experimentalmente, observados mediante microscopía electrónica de transmisión.

Este trabajo describe la patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda.

## REFERENCIAS

1. **Gordón R.** Enfermedades de las Aves. 2da ed. México: El Manual Moderno, 1980.
2. **Dorn P.** Manual de Patología Aviar. 2da ed. España. Acribia, 1989.
3. **Gast RK, Benson ST.** The comparative virulence for chicks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found and in poultry in the United States. Avian Dis 1995; 39: 567-574.
4. **Jordán FT, Pattison M.** Enfermedades de las aves. 3er ed. México: El Manual Moderno, 1998.
5. **Ezaki T, Kawamura Y, Yabuuchi E.** Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi* (Approved Lists 1980), *Salmonella enteritidis* (Approved Lists 1980) and *Salmonella typhimurium* (Approved Lists 1980), and conservation of the specific epithets *enteritidis* and *typhimurium*. Request for an opinion. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50 (Pt 2):945-7.
6. **Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B.** *Salmonella* Nomenclature. J Clin Microbiol 2000; 38 (7): 2465-2467.
7. **Sánchez JM, Cardona CN.** Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asociación Colombiana de infectología 2003; 7(1): 22-29.
8. **Santos RL, Tsolis RM, Bäumlér AJ, Adams LG.** Pathogenesis of *Salmonella* induced enteritis. Braz J Med Biol Res. 2003; 36(1):3-12.
9. **Uribe VT.** Inmunización de pollos de engorda contra *salmonella enteritidis* mediante el empleo de proteína del sobrenadante del cultivo de proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko México (DF). F.M.V.Z - UNAM, 2004 (tesis de licenciatura). México (DF) México: UNAM, 1995.
10. **Jawetz E.** Microbiología Médica. 2da ed. México: Manual Moderno 1992.
12. **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; 92(1):180-6.
13. **Clarke RC and Gyles CL.** *Salmonella*. In: Gyles CL, Thoen CO. Pathogenesis of Bacterial Infection in Animal, USA: University Press. 1986.
14. **Nagaraja K.V., Pomeroy, B.S, Williams, J.E:** Infecciones Paratifoideas. In: Calnek. B.W. Enfermedades de las aves. México: Manual Moderno 1995: 94

- 111.
15. **Mancera** MA, Vázquez NJ, Heneidi Z A. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. Tec pecu Mex 2004; 42(2): 287-294.
  16. **Poope** C, McFadden KA, Brouwer AM, Demezuk W. Characterization of *Salmonella enteritidis* Strain. Can J Vet Res 1993; 57: 176-184.
  17. **García** MA, Téllez IG, García EG, Valladares de la Cruz JC, Urquiza BO. Determinación de la existencia de *S. enteritidis* serotipo *enteritidis* a partir de 95 aislamientos de *Salmonella* spp. provenientes de brotes de campo de aves domésticas. Vet Méx 1996 27 (4): 343-345.
  18. **Borie** PC; Sánchez ML. *Salmonella enteritidis*: Un nuevo desafío. Tecno Vet: 1998; 4(2):1-3.
  19. **Gast** RK. Paratyphoid infections. In: Saif ym. Diseases of poultry. 11 ed. Iowa State: Press Ames Iowa 2003: 583-613.
  20. **Aviña** GL. Evaluación de la inocuidad, posible respuesta antigénica y transmisión ovárica de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 en gallinas de postura libres de patógenos específicos (tesis de licenciatura). México (DF) México: UNAM. 2001.
  21. **Liebana** E, Garcia L, Guard J, S.W.J. McDowell<sup>3</sup>, Rankin S. *Salmonella* enterica serotype *enteritidis* phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29 and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. J Appl Microb 2002; 92:196–209.
  22. **Bryan** FL, Doyle MP. Health risk and consequences of *Salmonella* and *Campilobacter jejuni* in raw. J. Food Prot 1995; 58: 326-344.
  23. **Sobel** J, Hirshfeld AB, McTigue K, Burnett CL, Altekruise S, Brenner F, Malcolm G, Mottice SL, Nichols CR, Swerdlow DL. The pandemic of *Salmonella enteritidis* phage type 4 reaches Utah: a complex investigation confirms the need for continuing rigorous control measures. Epidemiol Infect 2000; 125(1):1-8.
  24. **Cox** NA, Brailey JS, Heneidi A, Humphrey TJ, Shane S, Opitz HM et al. Curso de Actualización sobre *Salmonella enteritidis* y *Campilobacter* en las aves domésticas; 1991 Octubre 10-11; México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C., 1991: 1-96
  25. **Blackwell** M. The role of rodenticides in biosecurity and *Salmonella* control

- in broilers. Bulletin Antec International Ltd. February, 1997. Available from:  
URL: <http://www.antecint.co.uk/main/poultrat.htm>.
26. **Davies** BD, Wray C. Mice as carries of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units. *Vet Rec* 1995; 137: 337-341.
  27. **Gast** RK, Nasir MS, Jolley ME, Holt PS, Stone HD. Detection of experimental *S. enteritidis* and *S. typhimurium* infections in laying hens by Fluorence polarization assay for egg yolk antibodies. *Poult Sci* 2002; 81: 1128-1131.
  28. **Padrón** NM. Generalidades sobre pullorosis y tifoidea aviar. Memorias del VII Curso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea aviar. Monterrey, NL., México, 1987. Comisión permanente para el control y erradicación de la Pullorosis y Tifoidea aviar. México, DF. 1987:13-20.
  29. **Urquiza** BO. Patogenicidad e Inocuidad de *Salmonella enteritidis* var. 17F-4 en animales de laboratorio y determinación de proteínas con enterotóxica (tesis de doctorado). México (DF) México: UNAM, 2001.
  30. **E.P.A.** United State Environmental Protection Agency. 1998. Registration Eligibility decisión (RED). <<http://www.epa.gov/REDs/2100red.pdf>>.
  31. **H.S.E.** Health and safety executive. 1986. Non- Agricultural Pesticides approved under: The control of pesticides regulation, part B, section 8. <<http://www.hse.gov.uk/hthdir/noframes/bluebook/section8.pdf>>.
  32. **Threlfall** EJ, Ridley AM, Ward LR, Rowe B. Assement of health risk from *Salmonella* based rodenticides. *The Lancet* 1996; 348:616-617.
  33. **Labiofam**. 2002. Labiofam, grupo empresarial. Informativo "Biorat". La Habana, Cuba. Pp. 200.
  34. **Borie** PC, Gonzáles UR. Antecedentes Microbiológicos de un rodenticida biológico presente en Chile. Posible impacto en la epidemiología de la Salmonelosis. Laboratorio de Microbiología. Dpto de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. *Tecno Vet* 2000; 3: 95-102.  
<http://www.patologiaveterinaria.cl/Sochivet/Antecedentes%20de%20un%20rodenticida%20biol%F3gico.doc>.
  35. **Paulin**, SM, Watson PR, Benmore AR, Stevens MP, Jones, Pw., Villarreal-Ramos B, Wallis TS. Analysis of *Salmonella* enteric serotype-host specificity in calves: Avirulence of *S. enterica* Serotype *Gallinarum* correlates with

- bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence *in vivo*. Infect Immun 2002; 70: 6788-97.
36. **Uzzau** S, Leori GS, Petruzzi V, Watson PR, Schianchi G, Bacciu D, Mazzarello V, Wallis TS, Rubino S. *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. Infect Immun 2001; 69: 3092-99.
  37. **Urquiza** BO. Salmonelosis aviar in Enfermedades de las aves de importancia sanitaria nacional que se encuentran bajo proceso de control y erradicación. Sistema de Producción Animal 1. Aves: Vol II. FMVZ – UNAM. 1998: 137 – 144.
  38. **Berchieri** AJ, Wigley P, Page K, Murphy CK and Barrow PA. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage type 4 in chickens. Avian Pathol 2001; 30:297-310.
  39. **Cason** JA, Cox NA and Bailey JS. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. Avian Dis 1994; 38:583-588.
  41. **Baumler** AJ. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. in In: Wray C, Wray A. *Salmonella* in domestic animals. 2da ed. USA. CABI Publishing, 2000: 57-72.
  42. **Wilson** JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA *et al*. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgrad Med J 2002; 78(918):216-24.
  43. **Urquiza** BO. Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum*. (Tesis de maestría). México (DF). F.M.V.Z - UNAM, 1995.
  44. **Skov** MN, Feld NC, Cartensen B, Madsen M. The serologic response to *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in experimentally infected chickens, followed by an indirect lipopolysaccharide enzyme linked immunosorbent assay and bacteriologic examinations through a one year period. Avian Dis 2002; 46: 265-273.
  45. **De Buck** J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. A Review: Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. J Appl Microb 2004; 97: 233–245.
  46. **Santos** R L., Zhang S, Tsolis R M., Robert A. Adams K, Bäumler. A J.

- Animal models of *Salmonella* enteritis versus typhoid fever. *Microb. infect* 2001; 3:1335–1344.
47. **Cox** J, Berrang M. Alternative routes for *Salmonella* intestinal tract colonization of chicks. *Appl Poult sci* 1996:282-288.
  48. **Galan** JE. *Salmonella* interactions with host cells: Type III secretion at Work. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 53-86.
  49. **Mc Cormick** B A. Invasion mechanisms of *Salmonella*. In: Lamont R. Bacterial invasion of host cell. Cambridge University Press. Florida, USA, 2004.
  50. Thorns CJ, Woodward MJ. Fimbriae of *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. *Salmonella* in domestic animals. 2da ed. USA. CABI Publishing, 2000: 35-56.
  51. **Donnenberg** M. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 2000; 406: 768-774.
  52. **La Regione** RM, Cooley WA, Velge P, Jepson MA, Woodward MJ. Membrana ruffling and invasion of human and avian cell lines is reduced for aflagellated mutants of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis*. *Int J Med Microbiol* 2003; 293(4):261-272.
  53. **Salyers** A A, Whitt DP. Bacterial Pathogenesis. A molecular approach *Salmonella* infections American Society for Microbiology Press. Washington (DC). 2000.
  54. **Zhang** S, Kingsley RA, Santos RL, Raffatellu M, Figueiredo J, *et al.* Molecular Patogénesis of *Salmonella enterica* serotipo *typhimurium*-induced diarrhea. *Infect Immun* 2003: 1-12.
  55. **Poppe** C, Mc Fadden KA, Brouwer AM and Demczuk W. Characterization of *Salmonella enteritidis* strain. *Can J Vet Res* 1993; 57: 176-183
  56. **González** PB, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico* 2003; 27: 45-63.
  57. **Hueck** C J. Type III Protein Secretion Systems In: Bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; (7): 379–433.
  58. **Koster** M, Bitter W, y Tommassen J. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 2000; 290:325-331.
  59. **Thanassi** DG, y Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol* 2000; 12:420-430.
  60. **Lee** VT, y Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial

- infections. *Genes Dev* 2001; 15:1725-1752.
61. **Christie** PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 2000; 8:354-360.
  62. **Baron** C, O'Callaghan D, Lanka E Bacterial secrets of secretion: euroconference on the biology of type IV secretion processes. *Mol Microbiol* 2002; 43:1359-1365.
  63. **Yahr** TL, Goranson J, Frank D. W. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* 1996; 22: 991-103.
  
  64. **Kubori** T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, Aizawa SI. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 1998; 280: 602-605.
  65. **Galán** JE, y Collmer A Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999; 284: 1322-1328.
  66. **Galán** JE, Zhou D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 97: 8754-761.
  67. **Cheng** LW, y Schneewind O Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* 2000; 8:214-220.
  68. **Steele-Mortimer**, Brumell J, Knoder L, Meresse S, Lopez A, Finlay B. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella* enteric serovar *typhimurium* is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; 4(1): 43-54.
  69. **Bliska** JB, Galán JE, Falkow S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 1993;73: 903-20.
  71. **Marcus** SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb infect* 2000;2: 145-156.
  72. **Suárez** M, Russmann H. Molecular mechanisms of *Salmonella* invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island 1. *Internatl Microbiol* 1998;1:197-204.
  73. **Darwin** HK, Miller VL. Inv F is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1999;181:4949-954.
  74. **Murray** PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Salmonella*. In:

- Michael Braun Ed. Medical Microbiology. 3a ed. St Louis: Mosby Inc; 1998. p. 237-39.
75. **Baumler** AJ, Gilde AJ, Tsolis RM, van der Velden AW, Ahmer BM, Heffron F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. J Bacteriol 1997; 179(2):317-22.
  76. **Darwin** KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Mol Microbiol Rev 1999;12: 405-28.
  77. **Mahan** MJ, Slauch JM, Mckalanos JJ. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. Science 1993; 259: 686-688.
  78. **Bajaj** VR, Lucas L, Hwang C, Lee CA. Coordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hil A* expression. Mol Microbiol 1996;22: 703-14.
  79. **Schechter LM, Lee CA.** Arac/Xyls family members, Hil C and Hil D, directly bind and depress the *Salmonella typhimurium hil a* promoter. Mol Microbiol 2001; 40: 1289-1299.
  80. **Ahmer** BM, Van Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Heffron F. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. Mol Microbiol 1999;31:971-82.
  81. **Miller** SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. A two component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 5054-5058.
  82. **Hooper** LV, Midtvedt T and Gordon JI. How host –microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annu Rev Nutr 2002; 22:283-307.
  83. **Goosney** DL, Knoechel DG, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: masters of host cell cytoskeletal exploitation. Emerg Infect Dis 1999; 5: 216-20.
  84. **Marilda** C, et al. Virulence Factor of Avian Escherichia coli. Avian Dis 1990; 34: 531-538.
  85. **Darwin** HK, Miller VL. Inv F is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 1999; 181: 4949-4954.
  86. **Sevcikova** Z, Asheg AA, Kolodzieyski L, Cigankova V, Komorova T and Lev-

- kut M. Heterophils and macrophage – like cells in the caecum of chicks after experimental infection with *Salmonella enteritidis* PT4. Acta Vet Brno 2003, 72:565-570.
87. **Dhillon** AS, Alsantosa B, Shivaprasad HL, Jack O, Schaberg D, Bandli D. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* phage type 4, 8 and 23 in broiler chicks. Avian Dis 1999;43:506-515.
  88. **Espino** LL R, Montero G, Bornete J, Diaz M, Influenza de kis faactires ambientales sobre un biopreparado microbiológico contra roedores dañinos. Rev Cub Cienc Vet 1989;20:267-278.
  89. **Ashton** WLG. Poultry diseases. In: Jordan FTW. Fowl typhoid. 3rd Ed. Bailliere Thindall, London, England, 1990:11-31.
  90. **Arnold** JW, Holt PS. Response to *Salmonella enteritidis* infection by the immunocompromised avian host. Poultry Sci 1995; 74:656-665.
  91. **Padrón** NM. Control y prevención de la tifoidea aviar en las aves reproductoras pesadas. II Jornada Médico Avícola. DPA: Aves Fac. Med. y Zoot.. Universidad Nacional Autónoma de México. José Antonio Quintana López y Carlos López Coello editores. México, D.F, 1991:128-135.
  92. **Urquiza** B.O, Nava GM, Paasch ML, Jandet H, Feherbari T, Espino R, Fustes E, Fraga A., Téllez. IG. 1997. Determinación de la inocuidad de *Salmonella enteritidis* var 17F-4 en un roenticida biológico comercial en pollitos Leghorn de un día de edad. I<sup>er</sup> Simposio Internacional de Control Biológico de Ratas y Ratones, la Habana, Cuba, 1997.
  93. **Goodwin** MA. Alimentary System in Riddell C. Avian Histopathology. 2da ed. Canada. The American association of avian pathologist. University of Saskatchewan, 1996.
  94. **Riddell** C. in Avian Histopathology. Riddell C. 2da ed. Canada. The american associtation of avian pathologist. University of Saskatchewan, 1996.
  96. **Barnes** HJ. Hemic System. In: Riddell C. Avian Histopathology. 2da ed. Canadá. The American association of avian pathologist. University of Saskatchewan, 1996.
  97. Runnells, Principios de Patología Veterinaria. Patología Digestiva. The Iowa State University Press. 1970
  98. **Kogut** MH, Tellez GI, McGruder ED, Hargis BM, Williams JD, Corrier DE,

- DeLoach JR. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. *Microbial Pathogenesis* 1994; 16; 141-151.
99. **Wells** LL, Lowry VK, DeLoach JR, Kogutt MH. Age dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil. *Dev Comp Immunol* 1998; 22: 103-109.
  100. **Kramer** J. Immunological and genetic aspect of resistance to *Salmonella* in broiler. Erasmus Universities Róterdam. 2003: 1-162
  101. **Ziprin** RL, Corrier DE, Elissalde MH. Maturation of resistance to salmonellosis in newly hatched chicks: inhibition by cyclosporine. *Poult Sci* 1989; 68(12):1637-1642.
  102. **Lee** CA, Silva M, Siber AM, Kelly AJ, Galyov E, McCormick J., A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:83-88
  103. **Galán** JE, **Zhou** D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;97: 8754-761.
  104. **Andreasen** CB, Latimer KS, Harmon BG, Glisson JR, Golden JM, Brown J. Heterophil function in healthy chickens with experimentally induced staphylococcal tenosynovitis. *Vet Pathol* 1991; 28; 419-427.
  105. **Shivasprasad** HL, Timoney JF, Morales S, Lucio B, Baker RC. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. Studies on egg transmission clinical signs fecal shedding and serologic responses. *Avian Dis* 1990; 34; 548-557.
  106. **Sangwei** Lu, Manges AR, Yisheng Xu, Fang FC, Riley LW. Analysis of virulence of clinical isolates of *salmonella enteritidis* in vivo and in vitro. *Infect Immun* 1999; 11: 5651–5657
  107. **Norma** Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993: Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Diario Oficial. México (DF): Septiembre, 1994.
  108. **Norma** Oficial Mexicana NOM 033 ZOO 1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres diario oficial de la federación. México (DF): Julio, 1996.
  109. **Pérez** JM, Vázquez MJR, Rodríguez SMC, Miranda MRE, Romo GAL, Nader GE. Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología. México,

- UNAM, 1987.
110. **Charles** NML. Manual de hematología aviar. México (DF): FMVZ, UNAM, 2000.
  111. **Prophet** E, Mills B, Arrington J, Sobón L. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, Washington, DC. 1995.
  112. **Vásquez** NG, Echeverría O. Introducción a la microscopia electrónica aplicada. 2da ed. México: Fondo de cultura de economía, 2000.
  113. **Coyle** EF, Palmer SR, Ribeiro CD, Jones HI, Howard AJ, Ward L et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection: association with hen's eggs. *Lancet* 1988; 2; 1295-1297.
  114. **Evans** M, Lane W, Ribeiro CD. *Salmonella enteritidis* PT6: another egg-associated salmonellosis? *Emerg Infect Dis* 1998; 4:4.
  115. **Dodhia** H, Kearney J, Warburton F, A birthday party, home made ice cream and outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 6 infections. *Communicable Dis Public Health* 1998; 1; 31-34.
  116. **Desmidt** M, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. *Vet Microbiol* 1997; 56: 99-109.
  117. Gast RK, Holt PS. Persistence of *Salmonella enteritidis* from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. *Poult Sci* 1998; 77(12):1759-62.
  118. **Qin** ZR, Fukata T, Baba E and Arakawa A. Effect of lactose and lactobacillus acidophilus on the colonization of *Salmonella enteritidis* in chicks concurrently infected with eimeria tenella. *Avian Dis* 1995; 39:548-553.
  119. **Sturkie** PD. Avian Physiology. Fourth ed. New York, USA. Springer – Verlag, 1986).
  120. **Durant** JA, Corrier DE, Byrd JA, Stanker LH and Ricke SC. Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella enteritidis* colonization and invasion of leghorn hens. *Appl and environment Microbiol* 1999; 65(5): 1919-1923.
  121. **Van der Wielen** PW, Lipman LJ, Van Knapen F, Biesterveld S. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* by lactobacillus crispatus and clostridium lactatifermentans in a sequencing fed batch culture. *Appl En-*

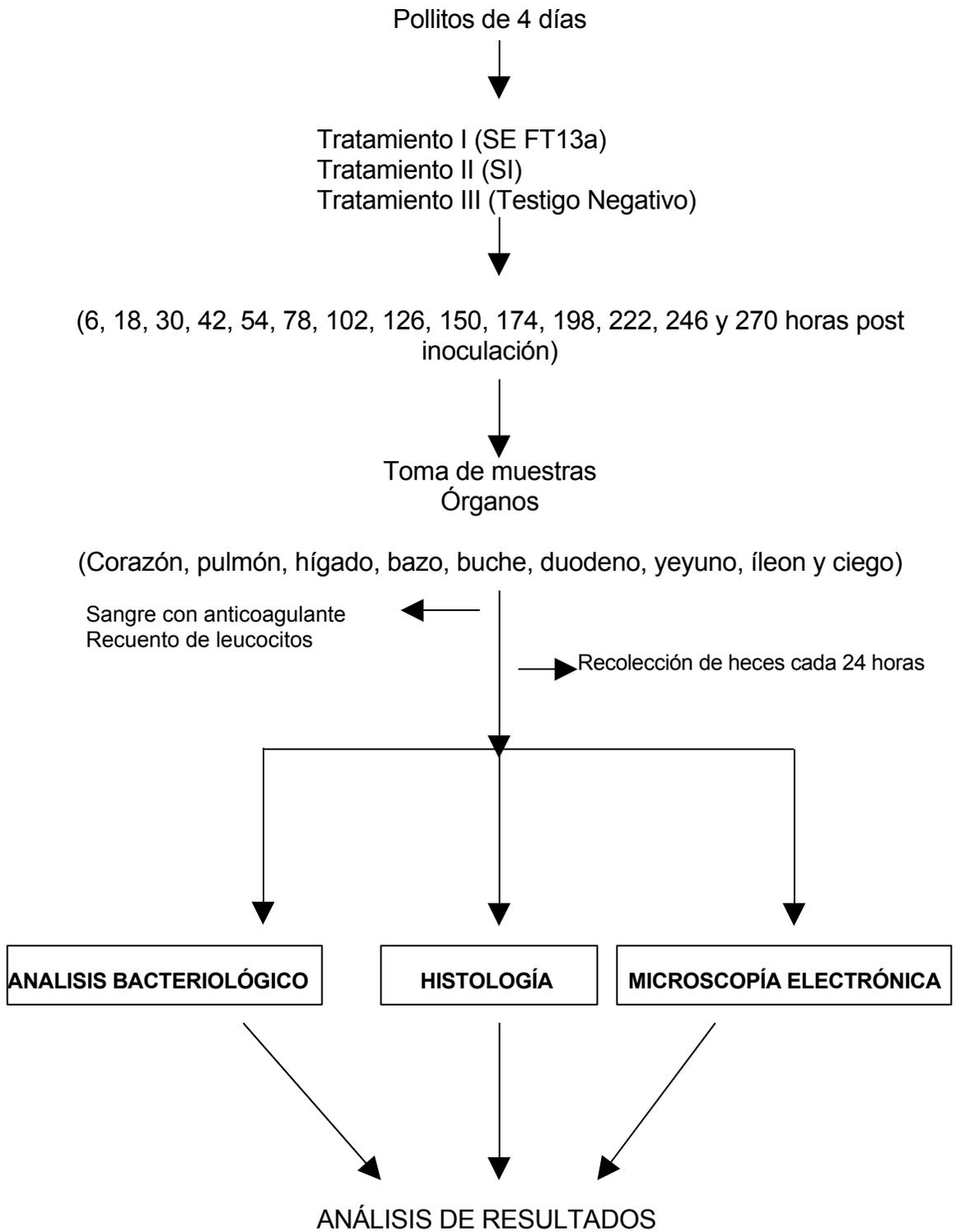
- viron Microbiol 2002; 68(2):555-559.
122. **Corrier** DE, Byrd JA, Hargis BM, Hume ME, Bailey RH, Stanker IH. Survival of *Salmonella* in the crop contents of market age broiler during withdrawal. Avian Dis 1999; 43; 453-460.
  123. **Seo** KH, Holt PS, Vaughn LE, Gast RK, Stone HD. Detection of *Salmonella enteritidis*-specific immunoglobulin A antibodies in crop samples from chickens infected with *Salmonella enteritidis*. Poult Sci. 2003; 82(1):67-70.
  124. **Seo** KH, Holt PS, Brackett RE, Gast RK and Stone HD. Mucosal humoral immunity to experimental *Salmonella enteritidis* Infection in the chicken crop. Avian Dis 2002; 46; 1015-1020.
  125. **Mdegela** RH, Msoffe PLM, Kananga JC, Mtambo MMA, Minga UM, Olsen JE. Comparative pathogenesis of experimental infections with *Salmonella gallinarum* in local and commercial chickens. Trop Anim Health Prod 2002; 34: 195-204
  126. **Alva** PJ. Determinación de la concentración mínima detectable por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR de *Salmonella enteritidis* en órganos y heces de aves infectadas experimentalmente (tesis licenciatura) DF México: UNAM, 2005.
  127. **Hirsh** DC. *Salmonella*. In Tratado de microbiología veterinaria. Biberstein EL, Zee YC. 1ra ed. Acribia, Zaragoza, España, 1994.
  128. **Gorham** SL, Kadavil K, Lambert H, Vaughan E, Pert B, Abel J. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. Avian pathol 1991; 20:433-437
  129. **Barranco** GR, Tellez IG, Paasch ML, Urquiza BO. Evaluación de la inocuidad de *Salmonella enteritidis* variedad 17F-4 en gallinas de postura libres de patógenos específicos (SPF). Memorias de la XXV Convención Anual ANECA; 2000 Mayo 3-6; Cancún, (Q. Roo), México, México (DF): Asociación Nacional de especialistas en ciencias avícolas AC, 2000: 37-40.
  130. **Sharma** JM. The structure and function of the avian immune system. Acta vet hung 1997; 45:229-238.
  131. **Rejo** T., Mosdeu V, Henreat R. Evaluación experimental de la inocuidad del producto "Biorat" en aves. I<sup>er</sup> Simposio Internacional de Control Biológico de Ratas y Ratones, la Habana, Cuba, 1997.
  132. **Rejo** T., Mosdeu V, Henreat R. Evaluación experimental de la inocuidad del producto "Biorat" en aves. I<sup>er</sup> Simposio Internacional de Control Biológico de

- Ratas y Ratones, la Habana, Cuba, 1997.
133. **Chils** A. 1997. Inocuidad de *Salmonella enteritidis* var danysz, fagotipo 6a (lisina negativa) para animales domésticos (perros, ovejas, cerdos). I<sup>er</sup> Simposio Internacional de Control Biológico de Ratas y Ratones, la Habana, Cuba, 1997.
  134. **Barnes** JH. Miscellaneous and sporadic bacterial infection. In Saif YM. Diseases of poultry 11<sup>th</sup> ed. Iowa State Press. Ames Iowa 2003:845-856.
  135. **Kunkle** AR. Zygomycosis (phycomycosis). In Saif YM. Diseases of poultry 11<sup>th</sup> ed. Iowa State Press. Ames Iowa 2003: 902.
  136. **Hirsh** D. *Salmonella*. In Hirsh D, Chun ZY, Veterinary Microbiology. 1ra ed. Blackwell science inc, USA 1999: 75-80.
  137. **Dhillon** AS, Shivaprasad HL, Roy P, Santos B, Schaberg D, Bandli D. Pathogenicity of environmental origin *Salmonellas* in specific pathogen free chicks. Poult sci 2001;80:1323-1328.
  138. **Gorham** SL, Kadavil K, Vaughan E, Lambert H, Abel J, Pert B. Gross and Microscopic lesions in young chickens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*. Avian Dis 1994: 38; 816-821.
  139. Samuelson J. Enfermedades infecciosas. In: Cotran R, Kuman V, Collins T. Patología estructural y funcional. España; Mc Grall Hill, 2003:349-370.
  140. **Carlson** HC y Allen JR. The acute inflammatory reaction in chicken skin: Blood cellular response. Avian Dis 1969;13:817-833.
  141. **Porter** y Holt (1993), Holt PS, Porter RE. Effect of induced molting on the recurrence of a previous *Salmonella enteritidis* infection. Poult Sci 1993 72(11):2069-78.
  142. **Glick** B y Rose C. Cellular composition of the bone marrow in the chicken. I. Identification of the cells. Anat Rec 1976: 185; 235-245.
  143. **Swaggerty** CL, Ferro PJ, Pevzner IY, Kogut MH.. Heterophils are associated with resistance to systemic *Salmonella enteritidis* infections in genetically distinct chicken lines. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 43(2):149-54.
  144. **Anderson** EL, Stephens JF. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *salmonella*. Appl Microbiol 1970;19; 726-730.
  145. **Assoku** RKG, Penhale WJ, Buxton A. Haematological changes in acute experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens. J Comp Path 1970;80: 473-482.
  146. **Campbell** TW. Avian hematology and cytology. 2da ed. Iowa, USA.

- Press/Ames, 1992.
147. **Takeuchi** A, Sprinz H. Electron-microscope studies of experimental *Salmonella* infection. II. Response of the intestinal mucosa to the invasion by *Salmonella typhimurium*. Am J Pathol 1967; 50: 137-61
  148. **Popiel** I, Turnbull PC. Passage of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella thompson* through chick ileocecal mucosa. Infect Immun. 1985 Mar; 47(3):786-92.
  149. **Figueroa** OIM. Caracterización de la capacidad de invasión celular y citotoxicidad en macrófagos de *Salmonella gallinarum* cepa FVA1. (tesis de maestría), México, DF. UNAM, 2003
  150. **Amin** I, Douce T, Osborne T and Stephen J. Quantitative studies of invasion of rabbit ileal mucosa by *salmonella typhimurium* strains which differ in virulence in a model of gastroenteritis. Infect immun 1994: Vol. 62, No. 2; 569-578.
  151. **Bradley** DJ, Ghori N and Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. J. exp. med.. Vol 180, July 1994: 15-23. Downloaded from [www.jem.org](http://www.jem.org) on May 6, 2005.
  152. **Santos** R L, S Zhanga, R M. Tsolisa, Robert A. Kingsleyb, L. Garry Adamsa, Andreas J. Bäumlerb\* Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. Microb. infect., 3, 2001, 1335-1344.
  153. **Santos** RL, Zhang S, Tsolis RM, Baumler AJ and Adams G. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. Vet Pathol 2002; 39: 200-215.
  154. **Meyerholz** DK, Stabel T. J. Comparison of early ileal invasion by *Salmonella enterica* serovars *choleraesuis* and *typhimurium*. Vet Pathol 2003; 40; 371-375.
  155. **Meyerholz** D, Stabel T, Ackermann M, Carlson S, Jones B and Pohlenz J. Early Epithelial Invasion by *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT104 in the Swine Ileum. Vet Pathol 2002; 39:712-720 ().
  156. **Sevcikova** A, et al. Heterophils and Macrophage-Like Cells in the Caeca of Chicks after experimental infection with *Salmonella enteritidis* PT4. Acta Vet. 2003; 72: 565-570.
  157. **Painter** JA, Melbak K, Sonne-Hansen J, Barrett Tim, Wells JG and

Tauxe RV. *Salmonella* – based Rodenticides and public health. Emerging Infectious Diseases 2004Vol 10, No. 6, June, 985-987. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid).

### Flujograma 1: Toma de muestras y pruebas realizadas



**Cuadro 1. Aislamiento bacteriológico de SE FT13a y SI en pollos de engorda inoculados experimentalmente**

		TRATAMIENTOS		
DIAS PI	HRS. PI	T1 SE FT13a	T2 SI	T3 TEST
1	6	-	-	-
2	18	Bu / Y/I	-	-
2	30	Bu/ I		
3	42	Y//C	Bu	-
3	54	D/HB/VB	-	-
4	78	I/C	-	-
5	102	HB/VB/D/Y//C	-	-
6	126	VB//C	-	-
7	150	HB/VB/D/CP/Y//C	Y/ I	-
8	174	HB/D/Y/I	I/C	-
9	198	VB/D//C	-	-
10	222	-	I/C	-
11	246	Y//C	-	-
12	270	C	-	-

HRS. = Horas.

PI = Post infección.

Bu = buche, CP = corazón y pulmón, HB = hígado y bazo, VB = vesícula biliar, D = duodeno, Y= yeyuno, I = íleon, C = Ciego.

T1: SE FT13a = Tratamiento1: *Salmonella enteritidis* fagotipo13a.

T2: SI = Tratamiento2 *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko.

T3: TEST = Tratamiento3: Testigo.

**Cuadro 2. Frecuencia de aislamientos de SE FT 13a a partir de los órganos muestreados.**

<b>ORGANO</b>	<b>GRUPO 1 Hpi</b>	<b>GRUPO 2 Hpi</b>
<b>Buche</b>	<b>18</b>	<b>18, 30</b>
<b>Íleon</b>	<b>18, 30, 42, 78, 102, 126 150,174, 198, 246</b>	<b>18, 30, 42, 78, 102, 126 150, 174, 198, 246</b>
<b>Yeyuno</b>	<b>42, 102, 150,174,</b>	<b>18, 42, 102, 150, 174, 246</b>
<b>Ciego</b>	<b>42, 78, 102, 126, 150 198, 246, 270</b>	<b>42, 126, 150, 246, 270</b>
<b>Hígado/Bazo</b>	<b>54, 102, 150,174</b>	<b>54, 102, 150,174</b>
<b>Vesícula biliar</b>	<b>54, 102, 126, 150, 198</b>	<b>102, 150, 198</b>
<b>Duodeno</b>	<b>54, 102, 150, 198.</b>	<b>54, 102, 174, 198</b>
<b>Corazón/Pulmón</b>	<b>150</b>	<b>150</b>

**Cuadro 3. Porcentaje de aislamientos de *Salmonella enteritidis* FT13a por órganos**

Hpi.	Bu	CP	HB	VB	D	Y	I	C	TOTAL AISLAMIENTO POSITIVOS
6	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
18	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	0/2	5/16
30	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	3/16
42	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	6/16
54	0/2	0/2	2/2	1/2	2/2	0/2	0/2	0/2	5/16
78	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	1/2	3/16
102	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	11/16
126	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	2/2	2/2	5/16
150	0/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	13/16
174	0/2	0/2	2/2	0/2	1/2	2/2	2/2	0/2	7/16
198	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	2/2	1/2	7/16
222	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
246	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2	5/16
270	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/16
<b>Total de aislamientos</b>	<b>3/28</b>	<b>2/28</b>	<b>8/28</b>	<b>8/28</b>	<b>8/28</b>	<b>10/28</b>	<b>20/28</b>	<b>13/28</b>	<b>72/224</b>
<b>% positivo</b>	<b>4.16%</b>	<b>2.78%</b>	<b>11.11%</b>	<b>11.11%</b>	<b>11.11%</b>	<b>13.89%</b>	<b>27.78%</b>	<b>18.06%</b>	<b>100%</b>

Hpi = Horas post infección

Bu = buche, CP = corazón y pulmón, HB = hígado y bazo, VB = vesícula biliar, D = duodeno, Y = yeyuno, I = Íleon,

C = ciego.

n= 28

**Cuadro 4. Estudio bacteriológico cuantitativo de *Salmonella enteritidis* FT13a**

Rango de recuperación expresado en UFC en las muestras positivas al aislamiento								
Hrs pi.	Buche	Corazón /pulmón	Hígado/ bazo	Vesícula biliar	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego
18	1.38x10 <sup>6</sup> – 5x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	8.1x10 <sup>6</sup>	6.3x10 <sup>6</sup> – 9.1x10 <sup>6</sup>	-
30	5x10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	5x10 <sup>6</sup> – 7x10 <sup>6</sup>	-
42	-	-	-	-	-	1.3x10 <sup>6</sup> – 5.3x10 <sup>6</sup>	6.3x10 <sup>6</sup> – 7x10 <sup>7</sup>	5.1x10 <sup>8</sup> – 4x10 <sup>9</sup>
54	-	-	5.6x10 <sup>3</sup> – 7.8x10 <sup>3</sup>	8.x10 <sup>3</sup>	8.3x10 <sup>6</sup> – 1.15x10 <sup>6</sup>	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	8.5x10 <sup>6</sup> – 8.1x10 <sup>7</sup>	8.x10 <sup>9</sup>
102	-	-	4.5x10 <sup>5</sup> – 6.1x10 <sup>5</sup>	7.1x10 <sup>4</sup> – 3.3x10 <sup>5</sup>	6.6x10 <sup>6</sup> – 6.8x10 <sup>6</sup>	5.5x10 <sup>6</sup> – 8x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>7</sup> – 6x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>9</sup>
126	-	-	-	8x10 <sup>6</sup>	-	-	1x10 <sup>7</sup> – 6.6x10 <sup>8</sup>	7x10 <sup>9</sup>
150	-	4.1x10 <sup>4</sup> – 5.6x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>6</sup> – 7x10 <sup>6</sup>	6 x10 <sup>6</sup> – 8x10 <sup>6</sup>	5.5x10 <sup>6</sup> – 6x10 <sup>7</sup>	7.5x10 <sup>6</sup> - 8x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>8</sup> – 1x10 <sup>9</sup>	9x10 <sup>8</sup> – 7x10 <sup>9</sup>
174	-	-	7 x10 <sup>6</sup>	-	9x10 <sup>7</sup>	6.8x10 <sup>6</sup> - 7.6x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>8</sup> - 7x10 <sup>9</sup>	-
198	-	-	-	4x10 <sup>10</sup> - 8 x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>6</sup> – 7x10 <sup>7</sup>	-	9x10 <sup>7</sup> - 7x10 <sup>8</sup>	8.x10 <sup>8</sup>
246	-	-	-	-	-	6x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>7</sup> – 8x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>9</sup> – 9x10 <sup>9</sup>
270	-	-	-	-	-	-	-	4x10 <sup>8</sup> – 7x10 <sup>8</sup>

UFC = Unidades formadoras de colonia

**Cuadro 5. Análisis bacteriológico para aislamiento de *Salmonella* spp. En muestras de heces tomadas cada 24 horas en pollos de engorda.**

Días Post inoculación	Hrs. pi	T1 SE PT13a	T2 SI	T3 TEST
1	24	3/4	0/4	0/4
2	48	2/4	0/4	0/4
3	72	0/4	0/4	0/4
4	96	1/4	0/4	0/4
5	120	1/4	1/4	0/4
6	144	1/4	0/4	0/4
7	168	0/4	1/4	0/4
8	192	0/4	0/4	0/4
9	216	1/4	0/4	0/4
10	240	4/4	1/4	0/4
11	264	0/4	0/4	0/4
12	288	1/4	0/4	0/4
<b>TOTAL % positivos</b>		<b>14/48 29.17</b>	<b>3/48 6.25</b>	<b>0/48 0</b>

T1: SE FT13a = Tratamiento1: *Salmonella enteritidis* fagotipo13a  
T2: SI = Tratamiento2 *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko  
T3: TEST = Tratamiento3: Testigo

**Cuadro 6. Estudio bacteriológico cuantitativo de muestras de heces por tratamiento.**

<b>Rango de recuperación expresado en UFC en las muestras positivas al aislamiento</b>		
<b>Días Post Infección</b>	<b>T1 SE FT13a</b>	<b>T2 SI</b>
<b>1</b>	<b>5X10<sup>5</sup>– 1.5X10<sup>9</sup></b>	
<b>2</b>	<b>4.5X10<sup>6</sup> – 3.16X10<sup>8</sup></b>	
<b>3</b>	<b>-</b>	
<b>4</b>	<b>1X10<sup>7</sup></b>	
<b>5</b>	<b>7X10<sup>9</sup></b>	<b>7.8x10<sup>8</sup></b>
<b>6</b>	<b>7X10<sup>9</sup></b>	
<b>7</b>	<b>-</b>	<b>1X10<sup>9</sup></b>
<b>8</b>	<b>-</b>	
<b>9</b>	<b>9.6X10<sup>8</sup></b>	
<b>10</b>	<b>1 X10<sup>8</sup> – 9 X10<sup>9</sup></b>	<b>6 X10<sup>9</sup></b>
<b>12</b>	<b>4.6 X10<sup>9</sup></b>	

T1: SE FT13a = Tratamiento1: *Salmonella enteritidis* fagotipo13a  
T2: SI = Tratamiento2 *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko  
UFC = Unidades formadoras de colonia

**Cuadro 7. Lesiones microscópicas en órganos internos de pollitos después de la infección con *Salmonella enteritidis* FT13a**

ORGANOS	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
	6 hpi	18 hpi	30 hpi	42 hpi	54 hpi	78 hpi	102 hpi
<b>Buche</b>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>ab</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>ab</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>ab</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Corazón</b>	1 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>
<b>Pulmón</b>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>
<b>Hígado</b>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup> , 3 <sup>a</sup>
<b>Bazo</b>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
<b>Duodeno</b>	0	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Yeyuno</b>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Ileón</b>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Ciego</b>	0	0	3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>

0 =Sin cambios aparentes; 1=Congestión y Hemorragia; 2=Descamación epitelial; 3=Infiltración focal Leucocitos (Heterófilos y Macrófagos); 4= Infiltración difusa de leucocitos (Heterófilos/macrófagos); 5=Necrosis epitelial coagulativa;6=Necrosis focal coagulativa;7= Hiperplasia de tejido linfoide.  
a =Leve; b= Moderado; c= Severo.

**CUADRO 8. Lesiones microscópicas en órganos internos de pollitos después de la infección con *Salmonella enteritidis* FT13a**

Órganos	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
	126 hpi	150 hpi	174 hpi	198 hpi	222 hpi	246 hpi	270 hpi
Buche	2 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>ab</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>ab</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>
Corazón	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>ab</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>ab</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>
Pulmón	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>
Hígado	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup>	1 <sup>ab</sup> , 3 <sup>ab</sup> , 6 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>c</sup> , 6 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 6 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 6 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup>
Bazo	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup>
Duodeno	1 <sup>b</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>c</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>
Yeyuno	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>c</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>c</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>
Íleon	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup> , 2 <sup>c</sup> , 3 <sup>c</sup> , 5 <sup>c</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>c</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>c</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>
Ciego	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>

0 = Sin cambios aparentes; 1= Congestión y Hemorragia; 2=Descamación epitelial; 3=Infiltración focal Leucocitos (Heterófilos y macrófagos); 4=Infiltración difusa Leucocitos (Heterófilos y macrófagos); 5=Necrosis epitelial coagulativa; 6=Necrosis focal coagulativa;  
7=Hiperplasia e hipertrofia de tejido linfoide.  
a =Leve; b= Moderado; c= Severo.

**Cuadro 9. Conteo diferencial de leucocitos en pollitos infectados con SE FT13a y SI**

	Linfocitos %	Heterófilos %	Eosinofilos %	Basofilos %	Monocitos %
<b>Valores Normales 2-21 Sem</b>	<b>66</b>	<b>20.9</b>	<b>1.9</b>	<b>3.1</b>	<b>8.1</b>
<b>Primera Sem. SE FT13a</b>	41.25	25	0	10	15
<b>Primera Sem. SI</b>	45	49	0	20	18.75
<b>Segunda Sem. SE FT13a</b>	41.56	28.33	3.17	6.1	19.89
<b>Segunda Sem. SI</b>	36	30.8	3.42	7.36	21.57

**SE FT13a = *Salmonella enteritidis* fagotipo13a**

**SI = *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko**

**Cuadro 10. Frecuencia de aislamientos de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko a partir de los órganos muestreados.**

<b>ORGANO</b>	<b>GRUPO 1 Hpi</b>	<b>GRUPO 2 Hpi</b>
<b>Buche</b>	<b>42</b>	
<b>Yeyuno</b>	<b>150</b>	<b>150</b>
<b>Íleon</b>	<b>150, 174, 222</b>	<b>150, 174, 222</b>
<b>Ciego</b>	<b>174, 222</b>	<b>222</b>
<b>Duodeno</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Hígado/Bazo</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Vesícula biliar</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Corazón/Pulmón</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**Cuadro 11. Porcentaje del aislamiento *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko por órganos**

Hpi	Bu	CP	HB	VB	D	Y	I	C	TOTAL AISLAMIENTO POSITIVOS
6	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
18	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
30	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
42	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/16
54	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
78	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
102	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
126	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
150	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	4/16
174	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	1/2	3/16
198	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
222	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	4/16
246	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
270	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/16
<b>Total de aislamiento</b>	<b>1/28</b>	<b>0/28</b>	<b>0/28</b>	<b>0/28</b>	<b>0/28</b>	<b>2/28</b>	<b>6/28</b>	<b>3/28</b>	<b>12/224</b>
<b>% positivo</b>	<b>8.33%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>16.67%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>	<b>100%</b>

Hpi= Horas post infección. Bu = buche, CP =corazón y pulmón, HB = hígado y bazo, VB = vesícula biliar, D = duodeno, Y = yeyuno, I = Ileon, C = Ciego.  
n = 28

**Cuadro 12. Análisis bacteriológico cuantitativo de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko**

Rango de recuperación expresado en UFC en las muestras positivas al aislamiento				
Hpi	Buche	Yeyuno	Ileon	Ciego
42	4X10 <sup>5</sup>	-	-	-
150	-	6X10 <sup>6</sup> - 6.8X10 <sup>6</sup>	9X10 <sup>6</sup> -8X10 <sup>7</sup>	-
174	-	-	6x10 <sup>7</sup> -7x10 <sup>7</sup>	7x10 <sup>8</sup>
222	-		8x10 <sup>7</sup> - 1x10 <sup>8</sup>	6x10 <sup>9</sup> - 7x10 <sup>9</sup>

**UFC =**  
Unidades formadoras  
de colonia

**CUADRO 13. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos después de la infección con *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko**

ORGANOS	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
	6 hpi	18 hpi	30 hpi	42 hpi	54 hpi	78 hpi	102 hpi
<b>Buche</b>	0	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>ab</sup>	2 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Corazón</b>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>
<b>Pulmón</b>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
<b>Hígado</b>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup>
<b>Bazo</b>	0	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>Duodeno</b>	0	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Yeyuno</b>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Íleon</b>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>
<b>Ciego</b>	0	0	3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>

0 =Sin cambios aparentes; 1=Congestión y Hemorragia; 2=Descamación epitelial; 3=Infiltración focal Leucocitos (Heterófilos y Macrófagos); 4= Infiltración difusa de leucocitos (Heterófilos/macrófagos); 5=Necrosis epitelial coagulativa; 6=Necrosis focal coagulativa; 7= Hiperplasia del tejido linfoide.

a =Leve; b= Moderado; c= Severo

**CUADRO 14. Lesiones microscópicas en órganos de pollitos después de la infección con *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko**

Órganos	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
	126 hpi	150 hpi	174 hpi	198 hpi	222 hpi	246 hpi	270 hpi
Buche	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>
Corazón	1 <sup>ab</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup>
Pulmón	1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>
Hígado	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup>	1 <sup>ab</sup> , 3 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>ab</sup> , 6 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 6 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup>
Bazo	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>
Duodeno	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>ab</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>
Yeyuno	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>
Íleon	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup> , 7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>
Ciego	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>b</sup> , 5 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup>

0 = Sin cambios aparentes; 1= Congestión y Hemorragia; 2=Descamación epitelial; 3=Infiltración focal Leucocitos (Heterófilos y macrófagos); 4=Infiltración difusa Leucocitos (Heterófilos y macrófagos); 5=Necrosis epitelial coagulativa; 6=Necrosis focal coagulativa; 7=Hiperplasia del tejido linfoide.  
a =Leve; b= Moderado; c= Severo

Figura 1.- Mapeo general de la patogenia *Salmonella spp.* por tratamientos a diferentes tiempos post-infección

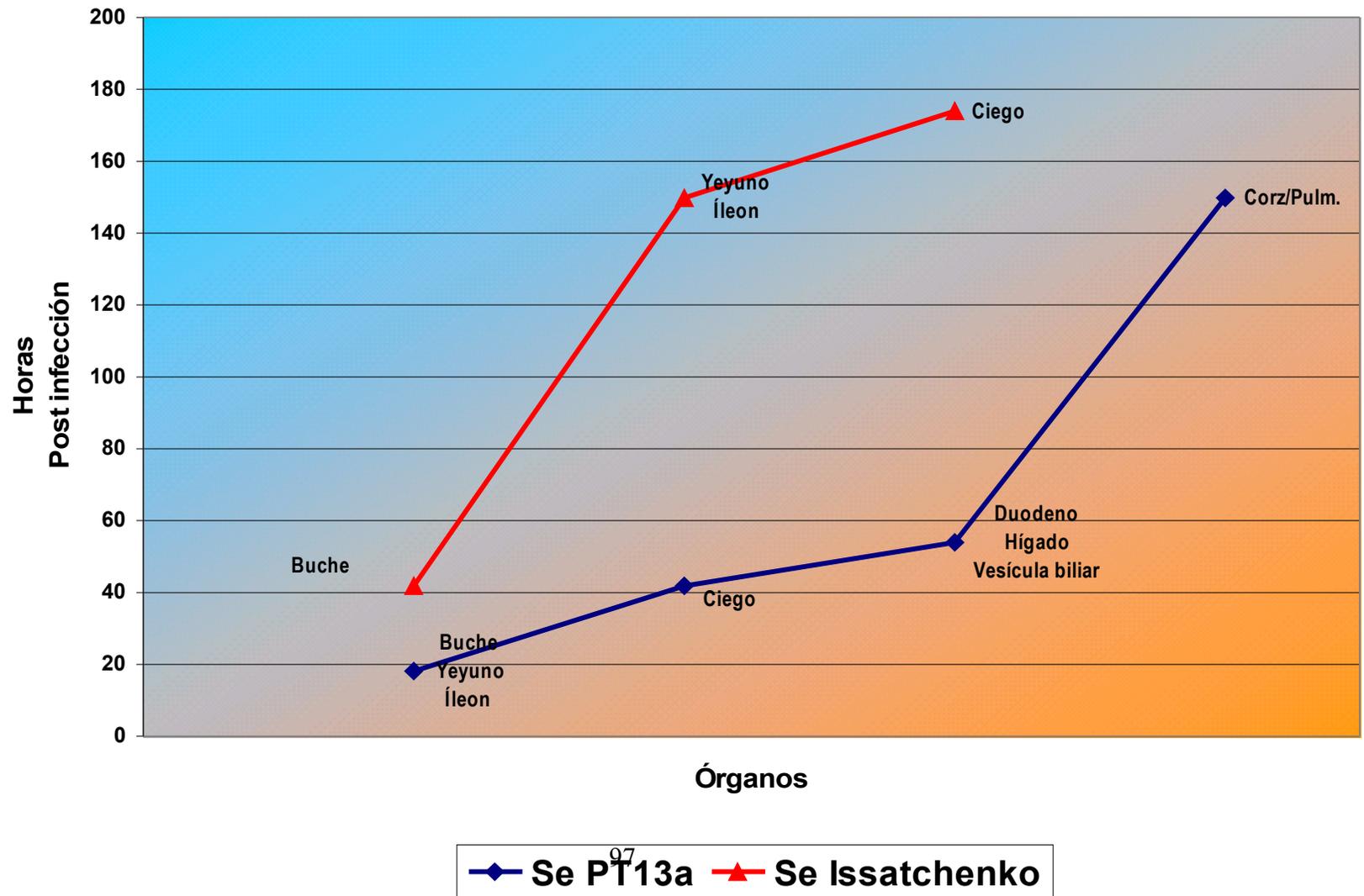


Figura 2 : Número y frecuencia de aislamiento de *Salmonella enteritidis* FT13a en órganos

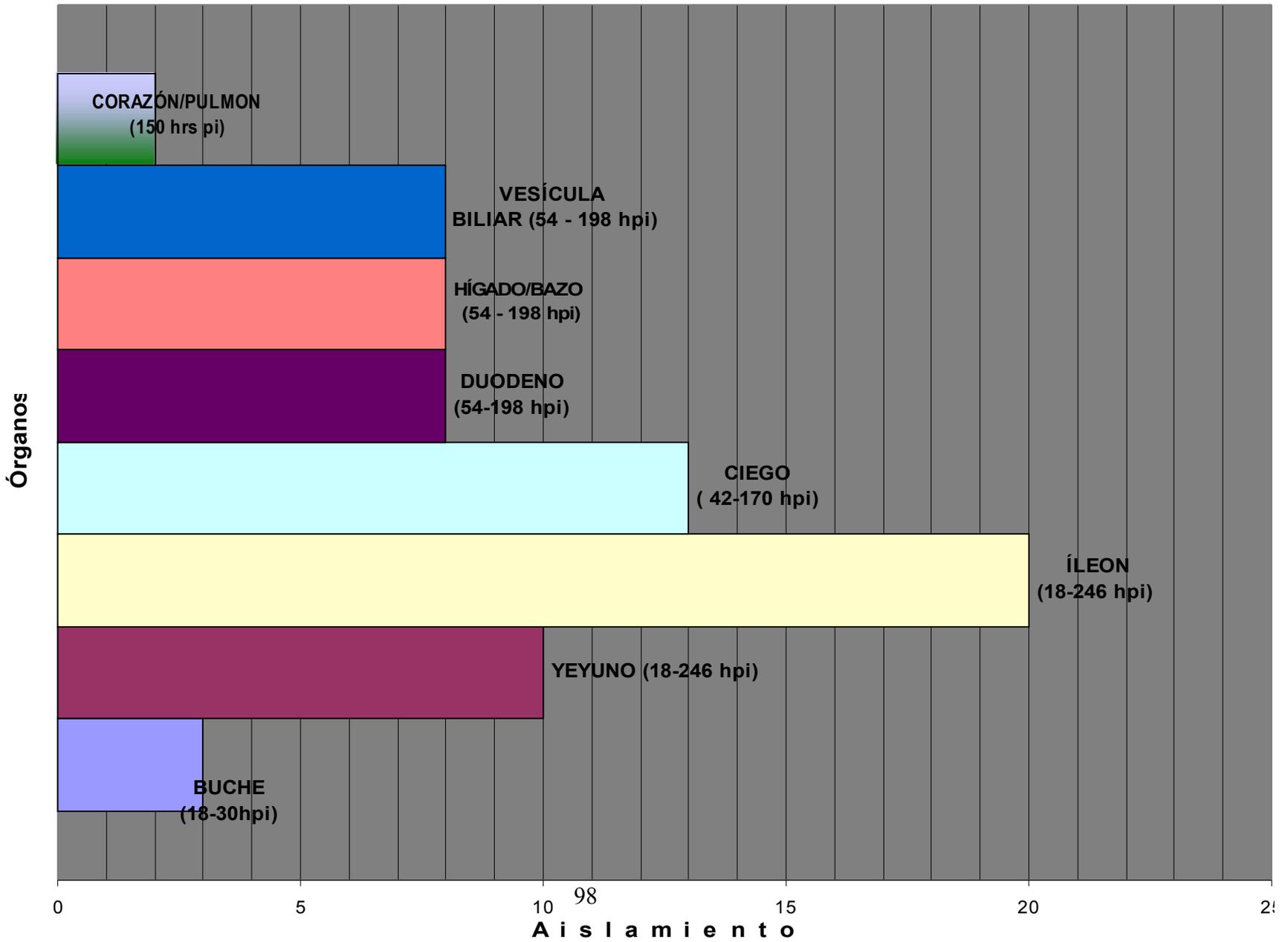
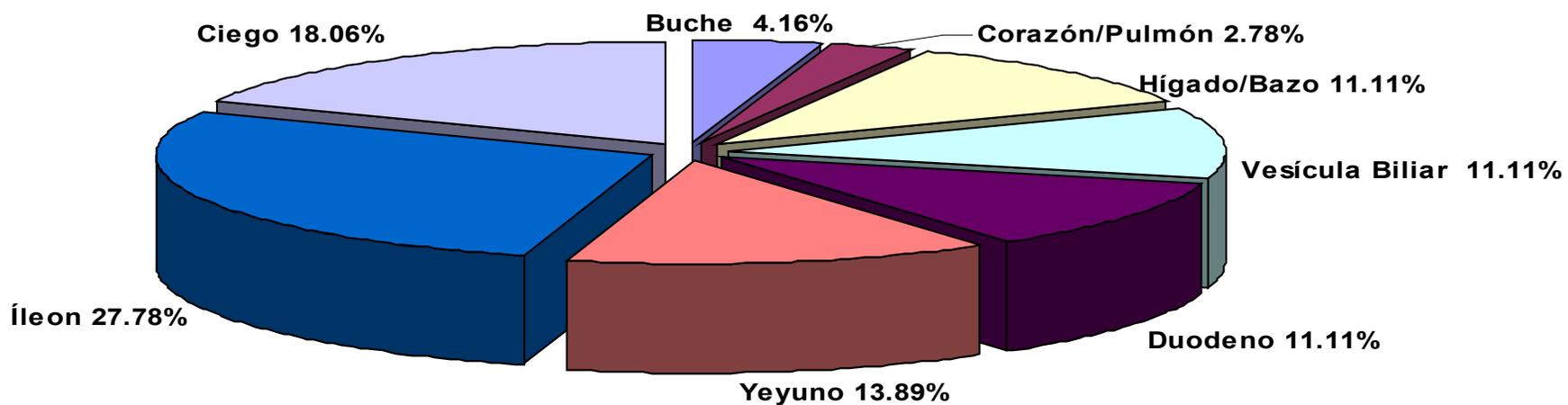


Figura 3: Porcentaje de aislamiento de *Salmonella enteritidis* FT13a por órganos



■ Buche   ■ Corazon/Pulmón   ■ Hígado/Bazo   ■ Vesicula Biliar   ■ Duodeno   ■ Yeyuno   ■ Ileon   ■ Ciego

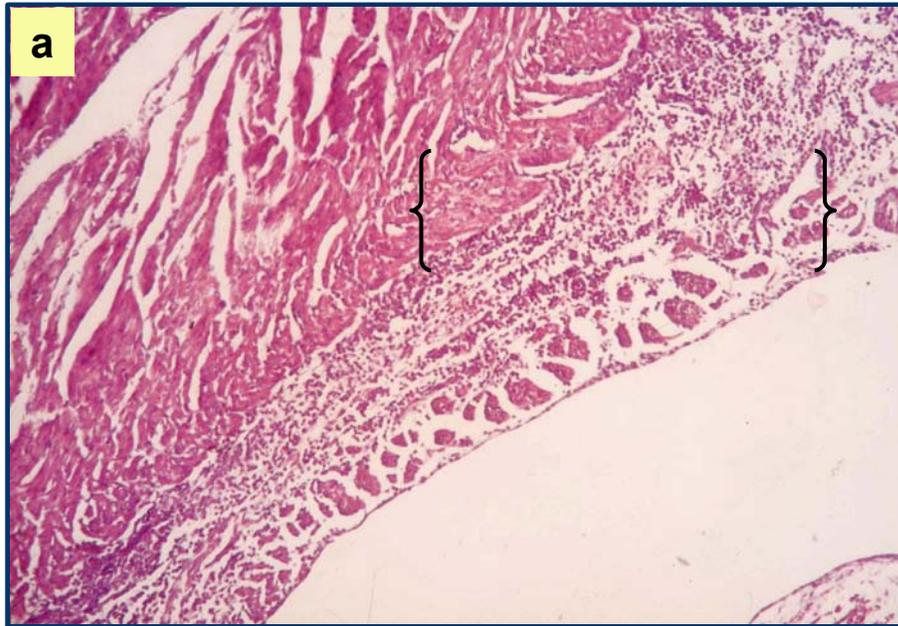


Fig. 4.a) Corazón: 126 hpi. SE FT13a. En endocardio, infiltración de heterófilos y macrófagos (paréntesis) H & E. 50x.

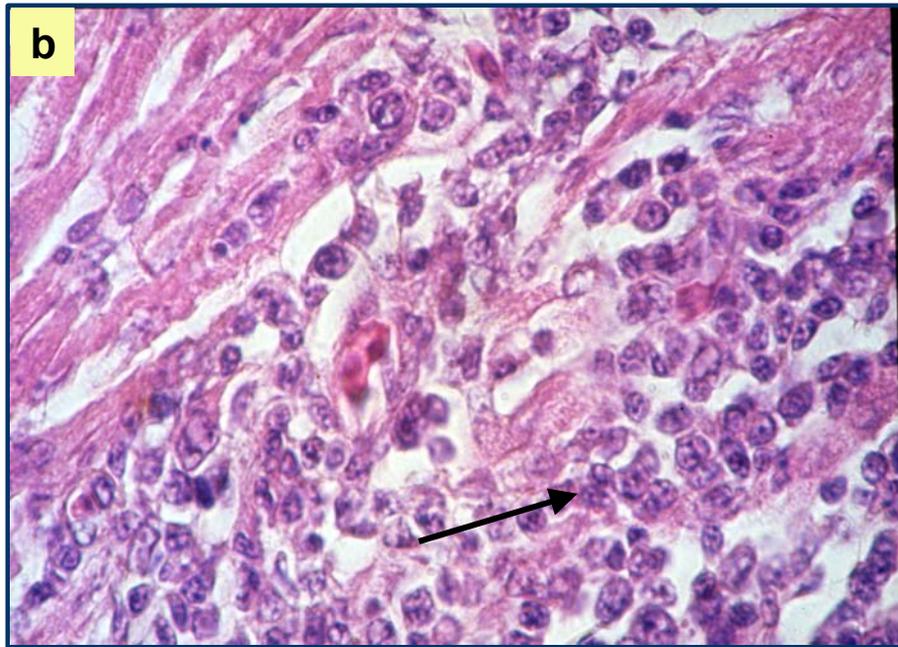


Fig. 4.b) Corazón: 222 hpi. SE FT13a. Detalle de la infiltración de heterófilos y macrófagos (flecha). H & E. 400x.

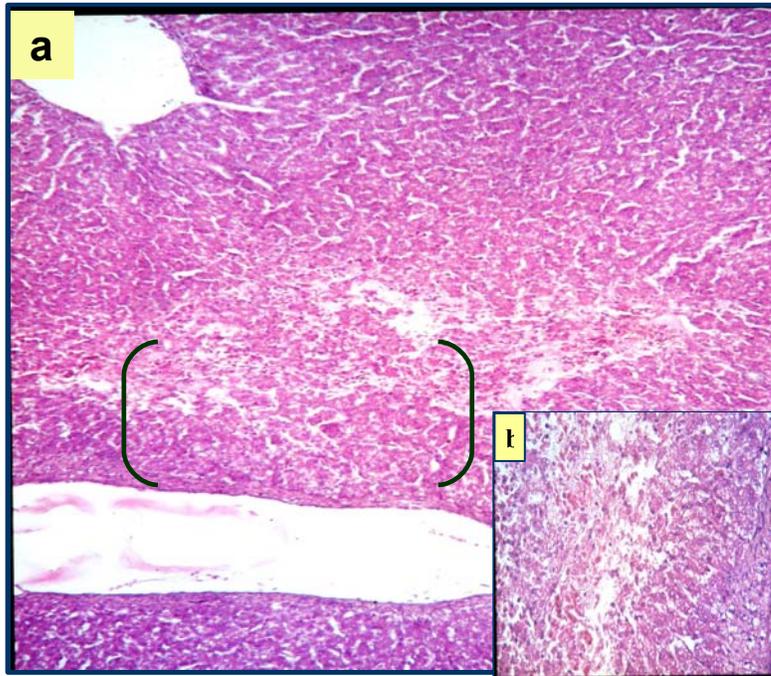


Fig. 5 a).Hígado: 222 hpi. SE FT 13a. Área de necrosis coagulativa. (Paréntesis) H & E 200x. b). Detalle del area de necrosis. H & E. 400X.

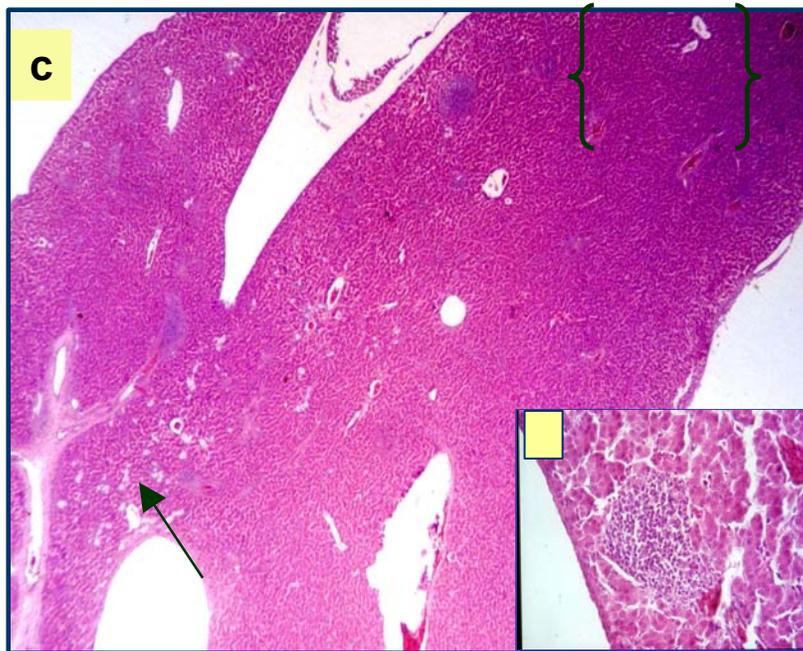


Fig. 5 c).Hígado: 174 hpi. SE FT 13a. Áreas de infiltración de heterófilos y macrófagos. (Paréntesis y flecha) H & E. 50x. 5 d) Detalle del área de infiltración. H & E. 200X.



Fig. 6 a). Íleon: 198 hpi. SE FT 13a. Áreas de infiltración de heterófilos, macrófagos. (Paréntesis y flecha). H & E. 50x. b) Detalle del área de infiltración. H & E. 200X.

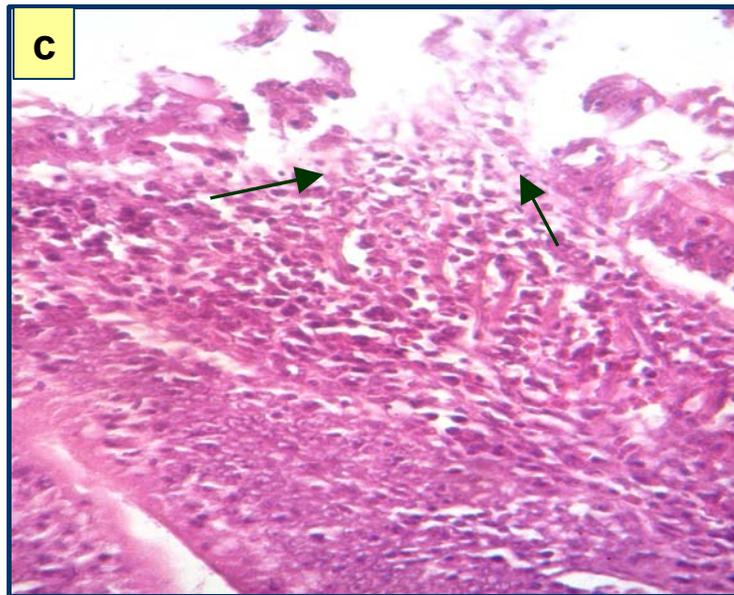


Fig. 6c) Detalle del área de necrosis coagulativa del borde apical del epitelio intestinal (flecha) H & E 400x.

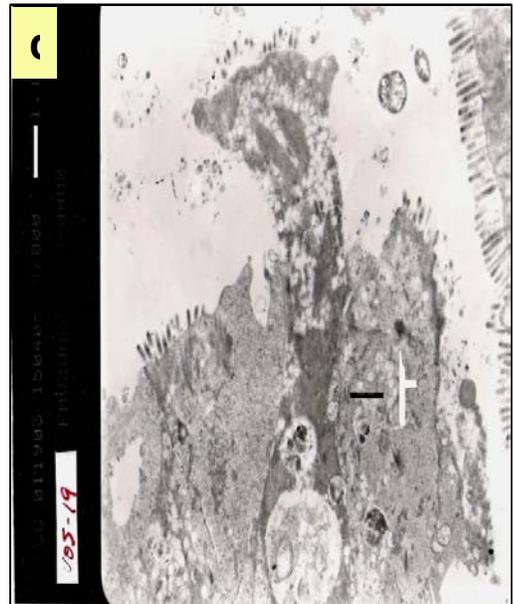
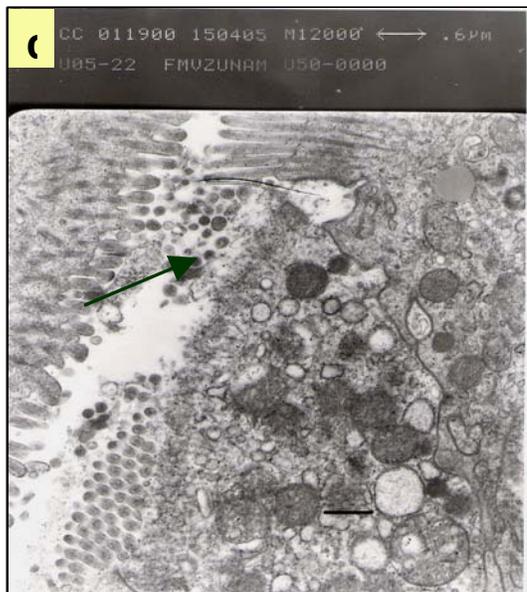
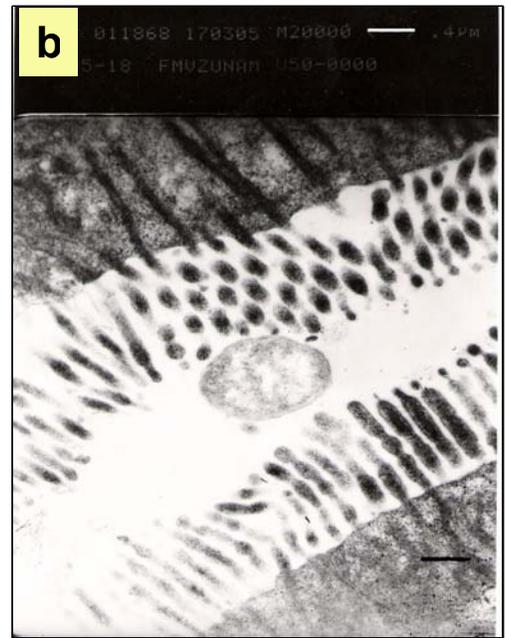
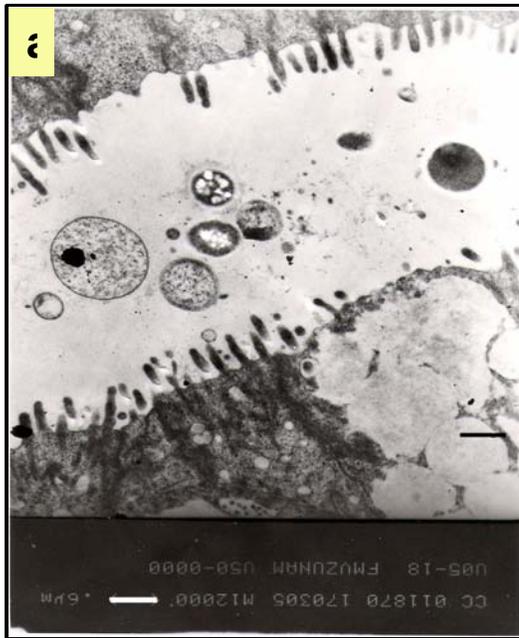


Fig.7.Íleon y ciego de pollitos infectados SE FT13a. Cambios ultraestructurales en enterocitos a) Ciego. 6 hpi. Bacterias en el lumen intestinal. U & P. Barra = 0.6μm. b) Ciego. 6 hpi. Bacteria en contacto con microvellosidades. U & P Barra = 0.4 μm. c) Pérdida de microvellosidades en el borde apical de un enterocito. U & P Barra = 0.6 μm. d) Íleon. 30 hpi. Enterocito en su borde apical con proyección de citoplasma hacia el lumen. U & P Barra = 1.1 μm.

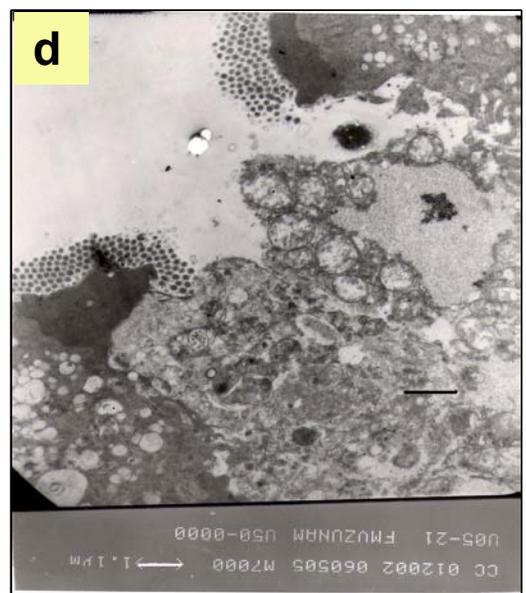
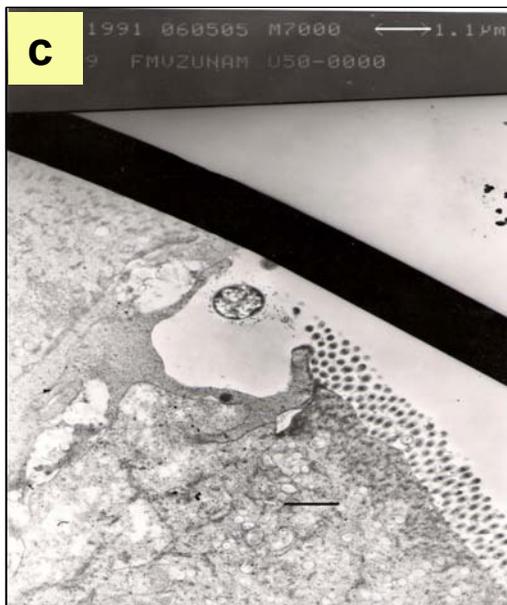
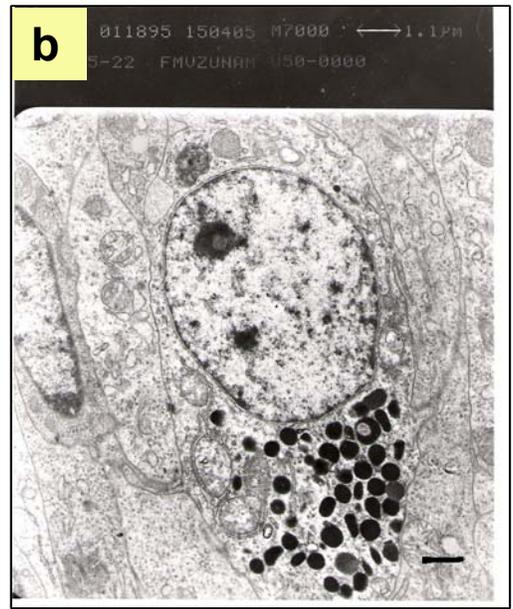


Fig.8. Íleon y ciego de pollitos infectados SE FT13a, 6 a 30 hpi. Cambios ultraestructurales, penetración e invasión de la bacteria a enterocitos a) Íleon. 6 hpi. Enterocito conteniendo bacteria en citoplasma. U & P. Barra= 0.6 µm. b) Heterófilo inmaduro. U & P. Barra = 1.1µm. c) Ciego, 30 hpi. Enterocito con invaginación y proyección de citoplasma, conteniendo una bacteria al centro. U & P. Barra = 1.1. µm. d) Íleon, 30 hpi. Mitocondrias con aumento de volumen. U & P. Barra = 1.1µm.

Figura 9. Número y frecuencia de aislamiento de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko por órganos

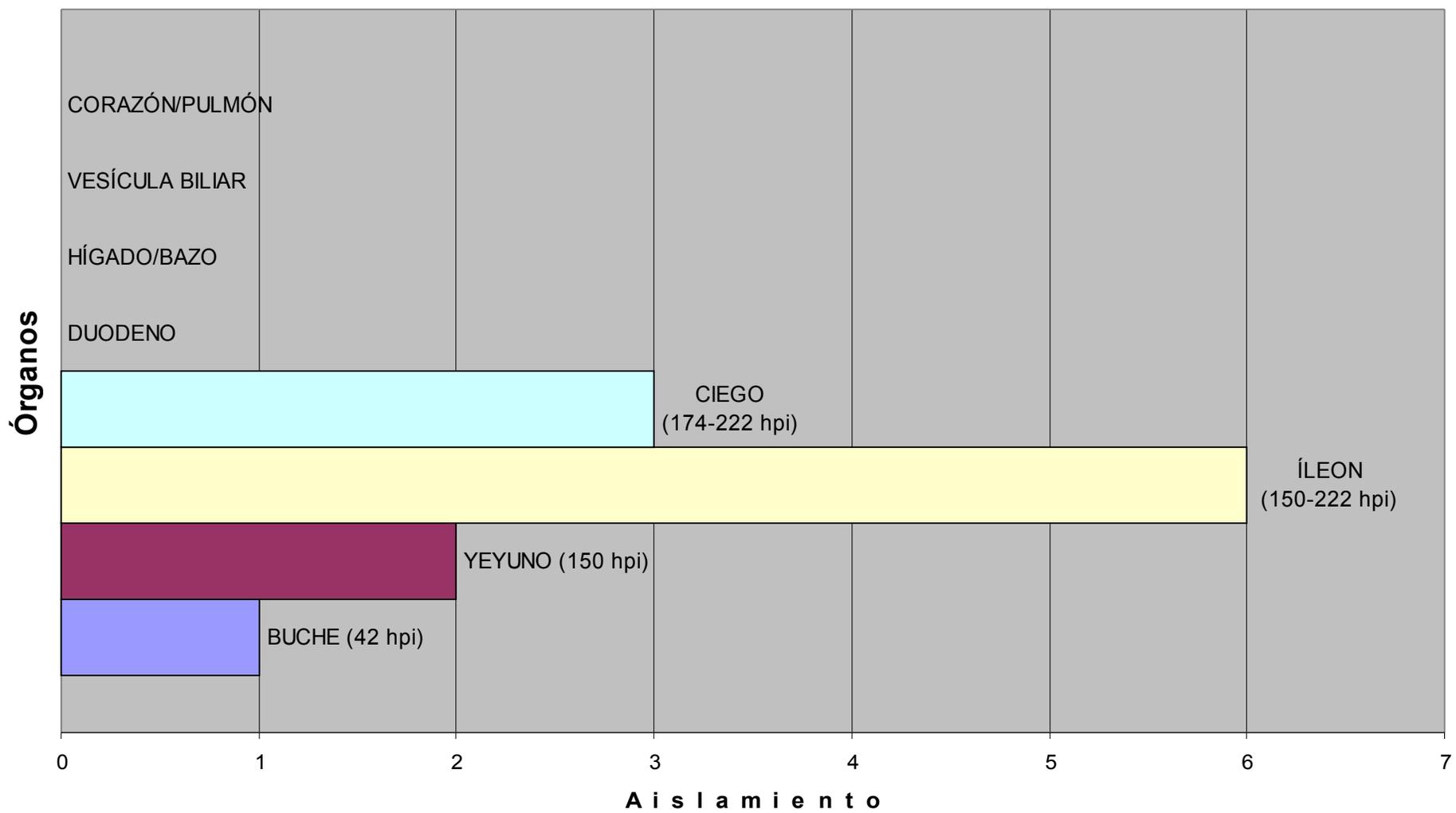
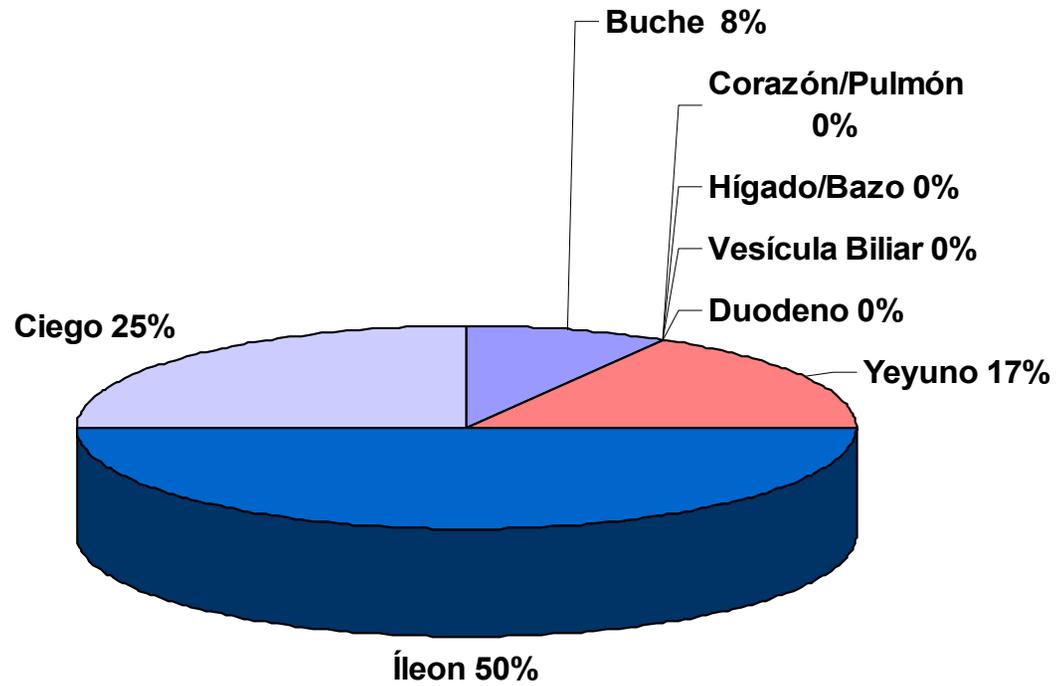


Figura 10. Porcentaje de aislamiento de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko por órganos



■ Buche ■ Corazon/Pulmón ■ Hígado/Bazo ■ Vesicula Biliar ■ Duodeno ■ Yeyuno ■ Ileon ■ Ciego

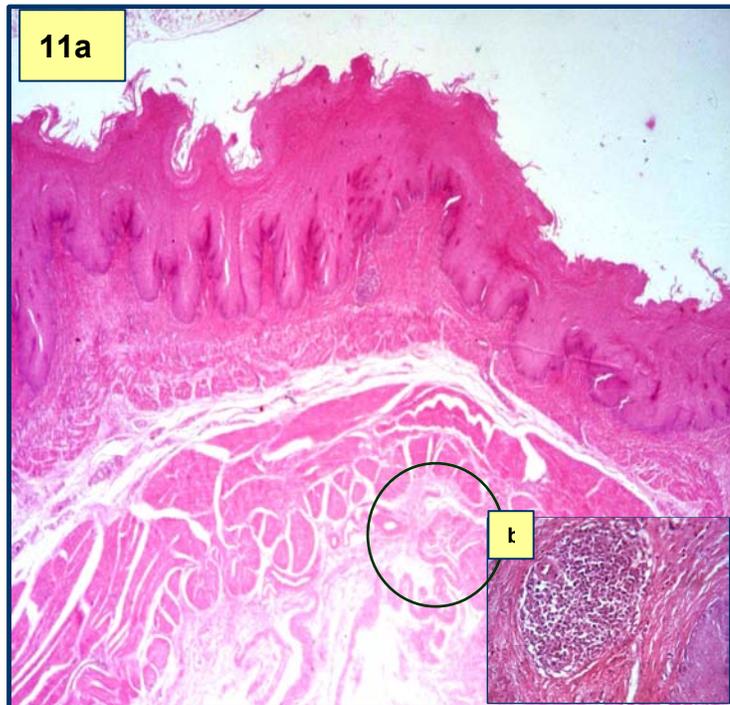


Fig. 11: a) Buche. 198 hpi. SI. Necrosis superficial del epitelio y áreas de infiltración de heterófilos y macrófagos (Círculo). H & E. 100x. b) Detalle del área de infiltración. H & E. 200X.

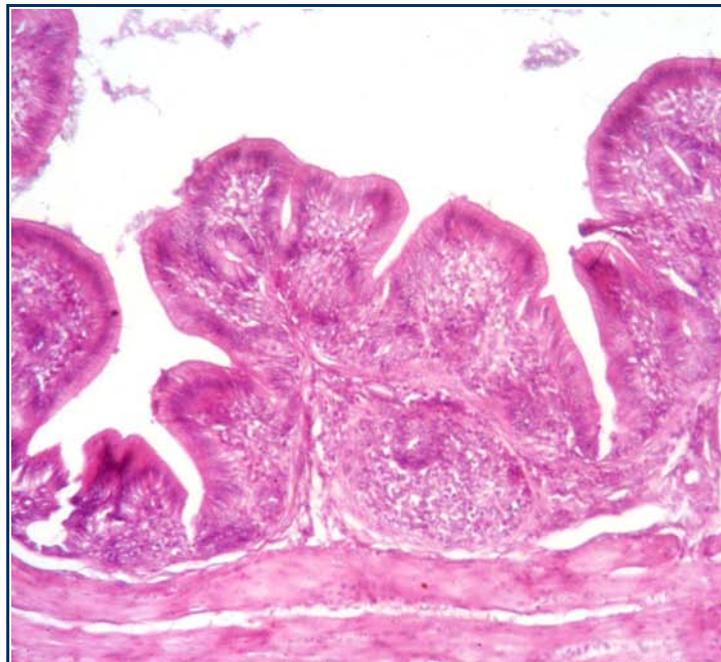


Fig. 12. Ciego. 222 hpi. Áreas focales de infiltración de heterófilos y macrófagos. H & E 100x. b) Detalle del área de infiltración. H & E. 200X.

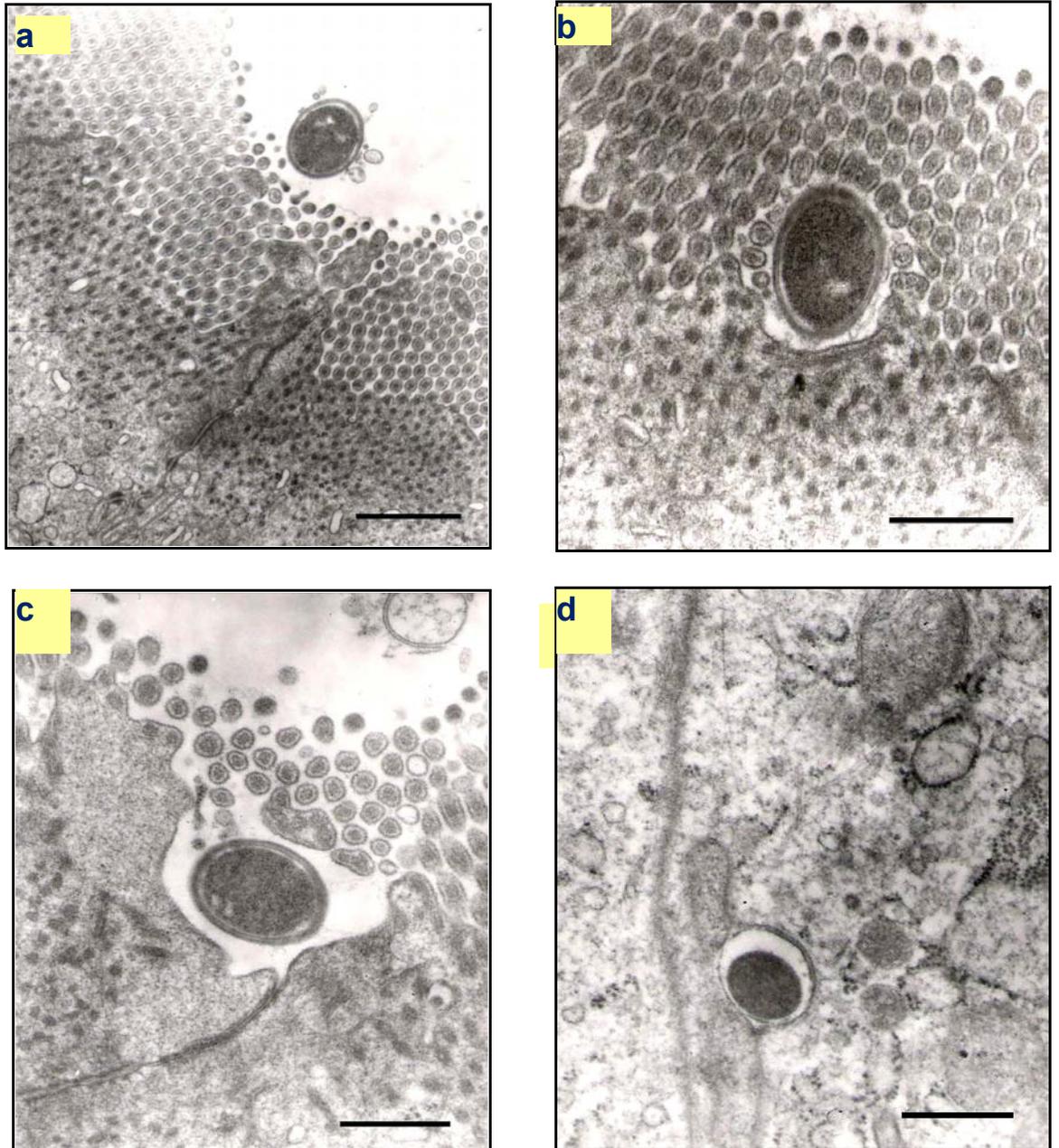


Figura 13: Ciego de pollitos infectados con SI. Morfología general de microvellosidades intactas después de las 6 hpi. Diferentes estados de penetración de la bacteria a través de los microvellosidades de enterocitos. a) Microvellosidades intactas en interacción con la bacteria. U & P. Barra = 0.12 $\mu$ m. b) Adherencia de la bacteria a la superficie apical de las microvellosidades. U & P. Barra = 0.8  $\mu$ m. c) Bacteria en contacto con el borde de cepillo de enterocitos y formación de la membrana arrugada (*ruffling*). U & P. Barra= 0.8 $\mu$ m. d) Enterocito conteniendo una bacteria dentro. U & P. Barra = 0.6  $\mu$ m.

# NO ME OLVIDES

COMO ESTAS?  
TENÍA QUE MANDARTE  
ESTA NOTA PARA DECIRTE LO  
MUCHO QUE ME IMPORTAS. AYER  
TE VI CUANDO CAMINABAS Y PLATICABAS  
CON TUS AMIGOS. YO ESPERE TODO EL DIA DE-  
SEANDO QUE TU QUISIERAS TAMBIEN HABLAR  
CONMIGO CONFORME AVANZABA EL DIA TE DI  
UNA CAIDA DE SOL PARA CERRAR TY DUA, TE DI  
BRISA SUAVE Y FRESCA PARA DESCANSARTE, ESPE-  
RE, PERO SIEMPRE TE AMO PORQUE SOY TU AMI-  
GO TE VI QUEDARTE DORMIDO ANOCHE Y TENIA  
GANAS DE TOCARTE LA FRENTE, ASI QUE DEJE QUE  
UN RAYO TE ACARICIABA EL ROSTRO.- ESPERE OTRA  
VEZ, QUERIENDO APURARME PARA QUE PUDIERAMOS HA-  
BLAR, TENGO TANTOS REGALOS PARA TI. TE LEVAN-  
TASTE EN ESTA MAÑANA MUY DE PRISA Y NO TUVISTE  
TIEMPO DE HABLARME, MIS LAGRIMAS ESTABAN EN LA LLU-  
VIA Y EL ROCIO DE ESTA MAÑANA.- HOY TE VES TAN  
TRISTE, TAN SOLO ME DUELE EL CORAZON DE VERTE,  
YO TE COMPRENDO PORQUE MIS AMIGOS TAMBIEN ME  
HAN DESILUCIONADO, PERO TE QUIERO..... YO TRATO  
DE DECIRTELO A TRAVES DEL CIELO AZUL Y EL PAS-  
TO VERDE DE LAS FLORES.- TE GRITO EN LOS RIA-  
CHUELOS DE LAS MONTAÑAS Y LES DOY A LOS PAJA-  
ROS CANCIONES DE AMOR PARA CANTARTE,  
TE VISTOCON CALIDOS RAYITOS DE SOL Y  
PERFUMO EL AIRE CON LAS ESENCIAS DE LA NA-  
TURALEZA.- MI AMOR POR TI ES MAS HONDO QUE  
LOS MARES Y MAS GRANDE QUE CUALQUIER NECESIDAD  
QUE TENGAS EN EL CORAZON.- OH, SI TAN SOLO SUPIERAS  
CUANTO ANHELO HABLAR Y CAMINAR CONTIGO, NOS PASARIA-  
MOS UNA ETERNIDAD JUNTOS EN EL CIELO. YO SE LO DU-  
RO QUE ES LA VIDA EN LA TIERRA. YO SI QUE LO SE Y  
QUIERO AYUDARTE, QUIERO QUE CONOZCAS A MI PADRE EL  
QUIERE AYUDARTE TAMBIEN. SOLAMENTE TIENES QUE LLAMARME Y  
PREGUNTARME, HABLAR CONMIGO, NO ME OLVIDES POR FAVOR,  
TENGO TANTO QUE COMPARTIR CONTIGO! YA NO TE MOLESTO  
MAS, ERES LIBRE DE ESCOGERME SI TU QUIERES, ES TU DE-  
CISION PERSONAL.- YO SI TE HE ESCOGIDO A TI POR ESTA  
RAZON SABRE ESPERAR PORQUE TE AMO.....

TU AMIGO JESUS