



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DE ADN
CONTRA LA PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA A (OmpA)
DE *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS PARA
AVES DE POSTURA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:

ILANE HERNÁNDEZ MORALES

Asesores:

M EN C. INDA MARCELA FIGUEROA OCHOA
DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA

MEXICO, D.F.

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi Madre por darme todo; tu amor, tus enseñanzas y tus sacrificios.

A Tatiana por enseñarme a ser hermana, en las buenas y en las malas, por enseñarme la alegría de la vida.

A Cuauhtemoc por ser que con tu forma de ver la vida me enseñas a complementar la mía.

A mi Familia: Mamá, Tatiana, Cuate, Nala, Kiara y Reina, por ser el pilar de mi existencia. Sin ustedes no sería quién soy. Gracias por comprenderme y quererme. LOS AMO. "Ohana"

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de recorrer este camino tan apasionante que es la vida, el cuál me ha dado infinidad de satisfacciones que me han llevado hasta este momento.

A la UNAM, mi alma máter, por darme una identidad como mexicana y como profesionista.

A la FMVZ por poner a mi disposición educación de calidad, por darme la oportunidad de transmitir mis conocimientos, porque bajo su abrigo pase los mejores momentos de mi vida estudiantil.

A los miembros del jurado: Dra. Patricia Noe, Dr. Nestor Ledesma, Dra. Laura Cobos y Dr. Daniel Martínez, por sus amables y acertadas correcciones a este trabajo, por su disposición y su tiempo.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, por permitir mi desarrollo como investigadora dentro de tu laboratorio, por tu apoyo moral y económico, por tus inigualables e inequívocas enseñanzas, por confiar en mí.

A Marcela Figueroa Ochoa por incursionarme en el área de la microbiología molecular, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por escucharme y consentirme, por ser mi “Mamá” y mi amiga. Te quiero mucho.

A Francisco Basurto Alcántara por adoptarme como tesista, por compartir tus conocimientos conmigo, por ser la “consentida”, por ser mi “Padrecito”, porque yo también te voy a extrañar. Te quiero mucho.

Al Dr. Daniel Martínez por todas las aportaciones hechas a este trabajo, por compartirme un poco de todo ese gran conocimiento que posees, por apoyarme siempre que lo necesité.

Al Dr. Alfredo Castañeda por toda la amabilidad que me brindaste, por compartir tus conocimientos y por todo el tiempo dedicado a mí y a este trabajo.

A mis amigos del LMM: Gaby, Jimena, Emilio, Adolfo, Mauricio, Edith, Luis, Julio “Hermanito”, Miriam, Larisa, Lauro, Sra. Francis; por todo el apoyo durante la fase experimental de mi trabajo, pero sobre todo por llenar de alegría todos los momentos vividos, por aguantar mi carácter, por escuchar mis problemas y secar mis lágrimas, por ser AMIGOS.

A todo el Departamento de Microbiología e Inmunología por todo el apoyo durante mi estancia, en especial a Rosalba Rincón por todo el amable tiempo que me dedicaste; Raúl segura porque siempre me ayudaste incondicionalmente como compañero y como amigo; Fabiola Rodríguez por toda tu alegría, tu amistad y tus valiosas enseñanzas; al Dr. Iturbe, Male y José Manuel por su

disposición a mis visitas diarias del animalario; Dra. Rosa Elena por sus brillantes consejos y agradables conversaciones. A todos, GRACIAS.

Al Dr. Fernando Galindo Ramírez porque sin conocerme confió en mí, compartió sus conocimientos conmigo y por su amable donación de las gallinas que se utilizaron en esta investigación.

Al MVZ. Salvador Velázquez Cano y a AVITEC, por abrirme las puertas de sus granjas y permitirme conocer la realidad de la zootecnia aviar.

A mis amigas y compañeras de aula en la FMVZ: Selina, Vicky, Ale, Cristina, Adriana y Circe. ¿Qué hubiera sido de mi sin ustedes? Muchas gracias por su compañerismo, por las horas de estudio, por los momentos tristes, pero más por los momentos alegres.

A Daniela y Marina porque son y siempre serán mis fieles amigas, mis compañeras de la vida, porque los lazos de hermandad que nos unen son más fuertes que el tiempo y la distancia.

A mi familia: Tío José Luis, Tía Dalia, Tía María Eugenia, Tía Soledad, Josafar; por sus palabras de aliento y por creer en mí.

A Luis Carlos Calleja y a la familia Calleja González por todo su cariño y apoyo durante toda mi época de estudiante, sin ustedes seguro no habría entregado muchas tareas. Gracias Gord.

A Efren Carmona Urbano por todo tu amor, por enseñarme cómo es la vida de un Médico Veterinario de campo y por no permitir que despegara mis pies de la tierra para no olvidar “lo práctico”.

A Juan Ignacio Pérez Espíritu por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por apoyarme en los momentos de angustia, porque con tus consejos y tu tiempo este trabajo fue mejor. Gracias por tu amor. No olvides a la “Gran Coat!”.

A todas las personas que participaron directa e indirectamente en este trabajo.

Este trabajo fue financiado con los proyectos PAPITT-UNAM IN223398 “Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar. Fase III” y CONACYT 27669B “Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar”

CONTENIDO

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Salmonelosis	2
1.1.1 Epidemiología	3
1.1.2 Impacto Económico	6
1.2. Características del género <i>Salmonella</i>	7
1.2.1 Morfología	7
1.2.2 Características del cultivo	7
1.2.3 Metabolismo	8
1.2.4 Resistencia al medio ambiente y a los desinfectantes	8
1.2.5 Resistencia a quimioterapéuticos	8
1.2.6 Taxonomía y Nomenclatura	9
1.3. <i>Salmonella enteritidis</i> (SE)	10
1.3.1 Mecanismos de patogenicidad	10
1.3.2 Patogenia	13
1.3.3 Lesiones macroscópicas	14
1.3.4 Lesiones microscópicas	14
1.3.5 Signos	15
1.4. Inmunidad contra Salmonelosis	16
1.5. Proteínas de la Membrana Externa	19
1.5.1 Proteína de la Membrana Externa A (OmpA)	19
1.6. Prevención y control contra SE	22
1.7. Inmunógenos	23
1.7.1 Vacunas de ADN	24
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	28
4.1. Objetivo General	28
4.2. Objetivos Específicos	28
5. Material y Métodos	29
5.1. Cepas	30
5.2. Extracción de ADN genómico de SE, por el método de tiocianato de guanidina.	31
5.3. Diseño de iniciadores	32
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
5.5. Clonación del producto de la PCR en el vector pCR2.1 TOPO	35
5.6. Extracción de plásmidos bacterianos	36
5.7. Ensayo de restricción para el plásmido pCR2.1 TOPO con el inserto del producto de PCR <i>ompA</i> (pIHM1).	38

5.8. Purificación del inserto <i>ompA-EcoRI</i> del vector pHM1	39
5.9. Clonación del producto <i>ompA-EcoRI</i> en el vector pVAX1.	40
5.10. Ensayo de restricción de la clonación de <i>ompA-EcoRI</i> en el vector pVAX1.	41
5.11. Obtención y purificación de los plásmidos pVAX1 y pIHD428	42
5.12. Inoculación de la vacuna de ADN pIHD28 a gallinas de postura.	44
5.13. Variables estudiadas durante el experimento	47
5.13.1. UFC de SE/g de órgano	47
5.13.2. Presencia de SE en intestino	49
5.13.3. Presencia de SE en huevo	50
5.13.4. Detección de anticuerpos aglutinantes	51
5.13.5. Producción de huevo a lo largo del experimento	52
6. Resultados	54
6.1 Determinación de la pureza e identidad de la cepa de <i>Samonella enteritidis</i> (SE)	54
6.2 Extracción de ADN de SE	55
6.3 Amplificación del gen <i>ompA</i> de SE	55
6.4 Clonación del producto de la PCR en el vector pCR2.1 TOPO	56
6.5 Clonación del producto <i>ompA-EcoRI</i> en el vector pVAX1.	57
6.6 Obtención y purificación de los plásmidos pVAX1 y pIHD428	61
6.7 Variables estudiadas durante el experimento	61
6.7.1 UFC de SE/g de órgano	61
6.7.2 Presencia de SE en intestino	63
6.7.3 Presencia de SE en huevo	63
6.7.4 Detección de anticuerpos aglutinantes	64
6.7.5 Producción de huevo a lo largo del experimento.	64
7. Discusión	66
8. Conclusiones	77
9. Prospectiva	77
Anexo 1. Medios de cultivo	78
Anexo 2. Soluciones	79
Anexo 3. Análisis estadísticos	81
Referencias	82

Índice de Figuras

Figura 1.1 Estructura de <i>OmpA</i>	20
Figura 1.2 Mapa del pVAX1	26
Figura 5.1 Metodología general	29
Figura 5.2 Condiciones de la PCR	34
Figura 5.3 Mapa del plásmido pIHM1	39
Figura 5.4 Mapa del plásmido pIHD428	43
Figura 5.5 Mapa del plásmido pIHD8	43
Figura 5.6 Evaluación de hígado, bazo y ovario	48
Figura 5.7 Evaluación de intestino y huevo	51
Figura 6.1 ADN genómico de SE	55
Figura 6.2 Producto de la PCR para <i>ompA</i>	56
Figura 6.3 Predicción del análisis de restricción del pIHM1	59
Figura 6.4 Análisis de restricción del pIHM1	59
Figura 6.5 Predicción del análisis de restricción de pIHD428 y pIHD8	60
Figura 6.6 Análisis de restricción de pIHD428 y pIHD8	60
Figura 6.7 Purificación de los plásmidos pVAX1 y pIHD428	61
Figura 6.8 Producción de huevo	64

Índice de Cuadros

Cuadro 5.1 Gen <i>ompA</i>	33
Cuadro 5.2 Reactivos utilizados para la PCR de <i>ompA</i>	34
Cuadro 5.3 Diseño experimental	46
Cuadro 5.4 Cronograma del diseño experimental	46
Cuadro 6.1 Tipificación bioquímica de SE	54
Cuadro 6.2 UFC de SE/g de órgano	63

ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	Grados Celsius
g	Gravedades
Gl	Grados de libertad
h	Hora
Kb	Kilobase
kDa	KiloDaltones
kg	Kilogramo
Km	Kanamicina
Lb	Libras
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
pM	PicoMolar
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
v/v	Volumen/volumen
%	Porcentaje

RESUMEN

HERNÁNDEZ MORALES ILANE. Elaboración y evaluación de una vacuna de ADN contra la proteína de membrana externa A (OmpA) de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis para aves de postura. (Bajo la dirección de: M en C Inda Marcela Figueroa Ochoa y Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara).

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa importante ya que causa grandes pérdidas económicas en el sector avícola y por su impacto sobre la salud pública. *Salmonella enteritidis* (SE) es la serovariedad más aislada a partir de huevo contaminado por vía transovárica. En gallinas, se ha demostrado la producción de anticuerpos contra la proteína de membrana externa A (OmpA) durante la infección, inoculando la bacteria completa y la proteína sola. El empleo de vacunas de ADN se basa en la expresión en células eucariotas de un gen que codifica para un antígeno proteico específico, el cual es insertado en un plásmido, que permite inducir una inmunidad efectiva. El objetivo del presente trabajo fue diseñar una vacuna de ADN contra OmpA de SE y evaluar el nivel de protección conferido a gallinas de postura desafiadas con SE patógena, para lo cual se amplificó el gen *ompA* de SE, utilizando iniciadores diseñados a partir de la secuencia reportada del mismo gen de *S. typhimurium*, para clonarlo en el vector pCR2.1 TOPO® y subclonarlo en el pVAX1®, el plásmido resultante se identificó como pIHD428. Para la evaluación de la vacuna se utilizaron 4 grupos de gallinas de estirpe ligera Bovans. Dos grupos testigos fueron inoculados con el vector pVAX1 sin el inserto *ompA* y los otros dos grupos con el pIHD428. Las vías de aplicación fueron intramuscular e intradérmica. La vacunación se realizó el día 0 y el día 21 del experimento. Se obtuvieron muestras de sangre los días 0, 21 y 28 para determinar la presencia de anticuerpos por medio de aglutinación en placa. Se determinó el porcentaje de postura semanal a lo largo del experimento. El día 32 se desafiaron con 2.3×10^9 bacterias de SE Fagotipo 13. A partir del desafío, se monitoreó la presencia de SE en huevo. El día 46 se colectaron los hígados, bazos, ovarios e intestinos de cada animal, para determinar la población de SE en cada uno de los órganos. Los resultados se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. No se detectaron anticuerpos en la prueba de aglutinación, así mismo no se aisló SE a partir de huevo ni ovarios. El comportamiento productivo de los grupos no fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$). No se encontró diferencia estadística entre los cuatro tratamientos con respecto a la población de SE en órganos ($P \leq 0.05$); sin embargo, se logró aislar SE a partir de los bazos de los grupos control, observando nula colonización de los bazos de los grupos vacunados, con lo que se sugiere evaluar nuevamente a la vacuna bajo diferentes condiciones experimentales.

INTRODUCCIÓN

1.1 Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera una de las zoonosis más importantes, así como la enfermedad más frecuente transmitida por alimentos contaminados ^{1,2}.

En general, en la salmonelosis se presenta un cuadro gastrointestinal de medio a grave, o hasta una infección sistémica que puede comprometer la vida del hospedero ³. Después de una infección clínica por *Salmonella*, el individuo permanece como portador asintomático durante meses o incluso años y la bacteria se elimina por heces; siendo éste, el reservorio más importante de la enfermedad ¹.

Salmonella tiene la capacidad de infectar una amplia variedad de hospedadores, se encuentra en todos los mamíferos y aves domésticas, así como en mamíferos, aves y reptiles silvestres ⁴.

Algunas serovariedades de *Salmonella* se encuentran adaptadas a un hospedador específico, como es el caso de *Salmonella enterica* serovariedad Typhi en el humano; otras, tienen una amplia gama de especies susceptibles como *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium y *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ⁵.

1.1.1 Epidemiología

Anualmente se presentan 16 millones de casos de Salmonelosis a nivel mundial¹. En el pasado, *S. typhi* fue la serovariedad aislada con mayor frecuencia a partir de casos reportados de salmonelosis en humano; sin embargo, desde los años ochenta, los casos de salmonelosis no tífica han aumentado en todo el mundo y las serovariedades mayormente implicadas son *Salmonella enteritidis* (SE) y *Salmonella typhimurium* (ST)¹. Únicamente en Estados Unidos (EU) se reportan 1.4 millones de casos de salmonelosis no tíficas, cada año^{6,7}.

La salmonelosis no tífica en humanos es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA); el alimento principalmente involucrado es el huevo, cuando es consumido crudo o mal cocido^{1, 2}. Numerosos estudios han demostrado la contaminación del huevo a través de transmisión transovárica y contaminación del cascarón con heces contaminadas con SE^{8, 9, 10, 11, 12}.

La salmonelosis no tífica causada por SE es considerada una enfermedad emergente a nivel mundial, debido a que en las últimas tres décadas, esta serovariedad ha sido responsable de la mayoría de los casos reportados, incluso sobrepasando la incidencia de la serovariedad Typhimurium¹. Durante el año 2007, fueron reportados 25, 400 casos confirmados de salmonelosis, causados por SE, en todo el mundo¹³.

En el continente Americano, durante el 2007, SE fue la segunda serovariedad más aislada a partir de muestras de humanos, animales y alimentos

^{2, 13}. En México, un estudio realizado por Gutiérrez-Cogco y col.¹⁴, demostró que la serovariedad de *Salmonella* más aislada en los servicios de salud desde 1991 hasta 1999 fue SE. En el 2007, los servicios de salud de nuestro país, reportaron 43,814 casos de salmonelosis no tíficas, de los cuales 6,183 fueron causados por la serovariedad Enteritidis ¹⁵.

El aumento en los casos reportados de salmonelosis no tífica, se correlaciona positivamente con los aislamientos de SE. Estudios realizados por Zaidi y col.¹⁶, en donde se trabajaron muestras de pacientes con diarrea, además de muestras de carne de pollo, puerco y res, para el aislamiento de *Salmonella*; demostraron que el 12.8% de los aislamientos fueron de *Salmonella* no Typhi, de los cuales el 14.5% correspondió a la serovariedad Enteritidis, la cual se encontró principalmente en pollo ¹⁶.

Con la finalidad de determinar cuantitativamente la presencia de SE en huevo para consumo humano, así como estimar su participación en la transmisión de la enfermedad, se han realizado muestreos del producto a nivel comercial. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA), reporta que uno de cada 10,000 huevos, está contaminado con SE; por lo tanto, se calcula un consumo de 4.5 millones de huevos contaminados ¹⁷. Sin embargo, diferentes estudios a nivel mundial presentan resultados variables al tratar de aislar SE a partir de huevo; un ejemplo de ello, es un estudio en Polonia donde, en un primer muestreo de 400 huevos, no se aisló SE; pero en un segundo muestreo de 300 huevos, se recuperaron 3 cepas de SE, a partir del cascarón ¹⁸. En México, Mancera y col. ¹²

realizaron un estudio en el que evaluaron 400 huevos de diferentes fuentes, de los cuales, sólo obtuvieron un aislamiento de SE, el cual fue no fagotipificable. Ellos calculan que en México 25 de cada 10,000 huevos estarían contaminados con SE. Con una producción anual de dos mil cien millones de toneladas ¹⁹, se estiman 84 mil millones de huevos contaminados.

SE es una de las serovariedades de *Salmonella* que más se aísla a partir de huevo, aproximadamente 33% de los aislamientos, corresponden a esta serovariedad ²⁰. Clavijo y col. ²¹ demostraron que esta particularidad se debe a que SE sobrevive un 70% más, en medios de cultivo adicionados con clara de huevo, que ST. Así mismo, Keller y col. ²² demostraron que SE es la única serovariedad capaz de sobrevivir en el huevo, después de su ovo-posición. Éstas son características epidemiológicas fundamentales para su transmisión al humano ^{23,24}.

Con fines epidemiológicos, los aislamientos de SE han sido clasificados mediante fagotipificación. Hasta ahora se han aislado los fagotipos 2, 4, 6, 6^a, 8, 12, 13, 13^a, 18 y 28 a nivel mundial ^{25,26}. En el occidente de Europa predomina el fagotipo (FT) 4; en el Reino Unido los FT más frecuentes, aislados de animales y humanos son 4, 6, 6a y 7 ^{27, 28}. En Canadá, los fagotipos frecuentemente encontrados en aves hasta 1994 fueron el 8,13 y 13a ^{25,26}. En EU predominan los FT 8, 1 y 13a. A partir de 1995, la mayoría de los fagotipos de SE que se aíslan a partir de casos de salmonelosis en humanos son el 4 y el 8 ^{1,25}. Estos fagotipos también son los que se aíslan con mayor frecuencia a partir de huevo o de aves

infectadas. En México, García-Meneses y col.²⁹ demostraron la presencia de SE en aves de producción, los fagotipos más aislados son el 4 y el 8³⁰, siendo el 4 el más común^{31, 32}.

1.1.2 Impacto Económico

Las pérdidas económicas derivadas de la salmonelosis toman radical importancia y éstas se deben a la disminución de la productividad; a gastos en la prevención, control y erradicación de la enfermedad en aves y humanos; disminución de la demanda de productos avícolas; dificultad para el comercio nacional e internacional, entre otras^{2, 3, 33, 34}.

En el caso de aves domésticas, la salmonelosis causada por SE es conocida como paratifoidea aviar. En pollitos entre el cuarto y doceavo día de edad, la mortalidad va desde escasa hasta un 100% de la población afectada^{34, 35, 36, 37, 38}. En aves adultas se percibe una disminución productiva hasta del 30%; incluyendo una baja en la fertilidad e incubabilidad^{34, 38}. En México, la avicultura participa con un 63.3% en la actividad pecuaria de todo el país. Así mismo, es el quinto productor mundial de huevo, además de ser el primer consumidor mundial de huevo fresco con 22.4 kg. *per capita* por año¹⁹. Estos datos demuestran la importancia del control de SE, en primer lugar, debido al elevado consumo de huevo, hecho que predispone a un mayor riesgo de infección para el humano; segundo, por las pérdidas económicas debidas a la disminución de la productividad en los animales.

En nuestro país no se tienen reportes de las pérdidas monetarias debidas a la salmonelosis. En otros países, como en EU, donde se ha logrado disminuir la incidencia de dicha enfermedad, durante el 2006 se registraron pérdidas de 3 millones de dólares³⁹; sin embargo, en países con una prevalencia elevada de la enfermedad, como Dinamarca, el costo anual registrado en el 2001 fue de 15 millones de dólares¹.

1.2 Características del género *Salmonella*

1.2.1 Morfología

Salmonella enteritidis (SE) es un bacilo Gram-negativo, móvil, aerobio facultativo, que no forma esporas ni presenta cápsula⁴⁰.

1.2.2 Características de cultivo

Salmonella se puede aislar de diferentes fuentes, como sangre, heces, ojo, líquido sinovial, órganos, agua, alimento, entre otras. Para poder aislar a *Salmonella* de las diferentes muestras clínicas, es necesario utilizar medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento. Dentro de los medios de cultivo selectivos se encuentran: agar MacConkey (McC), agar citrato desoxicolato, agar *Salmonella-Shigella*, agar verde brillante (VB), medio Hektoen. Los medios de enriquecimiento más utilizados son: caldo selenito, caldo tetrionato, medio Müller modificado por Kauffman y medio Rappaport-Vassiliadis. En crecimiento *in vitro*, *Salmonella* desarrolla colonias redondas de 2-4 mm de diámetro^{33, 40, 41, 42, 43}.

1.2.3 Metabolismo

Algunas de las características metabólicas de *Salmonella* son: reduce los nitratos a nitritos, produce gas a partir de glucosa, en triple azúcar hierro (TSI) produce ácido sulfhídrico, no produce triptofanasa por lo que no forma anillo de indol en el medio ácido sulfhídrico-indol-motilidad (SIM), utiliza al citrato como única fuente de carbono, descarboxila a la lisina y a la ornitina, no produce ureasa, no cataliza la desaminación oxidativa de la fenilalanina, no fermenta a la sacarosa, salicin, inositol y amigdalina y no produce lipasa ni desoxirribonucleasa ⁴⁰.

1.2.4 Resistencia al medio ambiente y a los desinfectantes.

Salmonella es capaz de crecer a temperaturas desde 8°C hasta 45°C, en pH de 4 a 9. Es susceptible a la desecación, calor, ebullición durante 5 min y a los desinfectantes comunes como fenol al 0.1%, formol al 2%, cloro con una concentración de 100 a 150 ppm, iodóforos con una concentración de 25 a 50 ppm, ácidos fuertes, bases fuertes y surfactantes anfotéricos . Puede 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, 30 semanas en cama de casetas desocupadas, uno o dos años en detritus de incubadora y en el ambiente, además de resistir concentraciones de sal hasta del 20% ^{35, 44}.

1.2.5 Resistencia a quimioterapéuticos.

Los quimioterapéuticos recomendados para tratar una infección con *Salmonella* en aves, son flouroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y como alternativa fluorfenicol, amoxicilina y sulfas-trimetoprim. El mayor problema en el tratamiento de la salmonelosis, tanto en las aves como en el humano, es que el

microorganismo es capaz de adquirir plásmidos que le confieren resistencia a diferentes antibióticos, generando un estado de multiresistencia, sobre todo en ambientes donde se presenta un uso indiscriminado e incorrecto de dichas sustancias. Uno de los factores que han contribuido a la selección de cepas resistentes, es el uso de los quimioterapéuticos a niveles subterapéuticos en el alimento para los animales ^{1, 35}.

1.2.6 Taxonomía y Nomenclatura

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* ^{40, 45}. El género se divide en dos especies: *S. entérica* y *S. bongori*; a su vez, *S. enterica* se subdivide en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* ^{46, 47, 48}.

La primera clasificación del género *Salmonella*, adoptada por los investigadores, fue el esquema serológico de Kauffmann-White, utilizado actualmente. En dicha clasificación, los organismos se nombran de acuerdo a la presencia de cierto tipo de antígenos somáticos (O), capsulares (Vi) y flagelares (H) ^{40, 47}. De acuerdo a este esquema de clasificación, hasta el 2004, se reconocen 2,501 serovariedades de *Salmonella*. SE pertenece al grupo D, subgrupo 1 con antígenos O: 1, 9, 12 y H: g, m ⁴⁰.

La nomenclatura utilizada actualmente para el género *Salmonella*, se basa en las recomendaciones de la OMS. De manera que se nombra el género, la especie, la subespecie y la serovariedad, por ejemplo *Salmonella enterica*

subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis. La abreviación de este sistema como *Salmonella enteritidis* se hace toda vez que el nombre completo ha sido utilizado una vez en el texto^{46, 47}.

El 59% del total de las serovariedades conocidas, pertenecen a la subespecie *enterica* y el 99% de las infecciones por *Salmonella* en animales de sangre caliente, son debidas a serovariedades de esta subespecie⁴⁸.

1.3 *Salmonella enteritidis* (SE)

1.3.1 Mecanismos de patogenicidad

Salmonella es un microorganismo intracelular facultativo. Dentro de los pasos que se presentan en un proceso infeccioso se encuentran: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daños al hospedero³.

El primer paso en la infección es la adhesión; las adhesinas bacterianas tienen estructuras que les permiten reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, pueden ser fimbriales o afimbriales; en las bacterias gram negativas hay varios tipos: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS) y cápsula. *Salmonella* expresa una gran cantidad de fimbrias con diferente especificidad de unión, por ejemplo LPF (*long polar fimbria*) cuyo receptor es manosa de las células M; Pef (*fimbria encoded plasmid*) la cual participa en la adherencia a enterocitos. Una vez adherida, *Salmonella* invade las células del hospedero mediante un mecanismo conocido como disparo (*trigger*). Con lo cual la bacteria envía señales a la célula que inducen rearrreglos del citoesqueleto

dando lugar a la formación de un ondulamiento (*ruffling*) en su superficie. Se han descrito varias proteínas efectoras que participan en este evento, como SipA, SopE, SopE2 y SopB; la mayoría de los genes que las codifican se encuentran en la Isla de patogenicidad I (SPI-I). Las proteínas efectoras carecen de receptores de unión en la célula huésped, por lo que son incapaces de tener acceso directo a su sitio de acción si no es por la contribución del Sistema de Secreción Tipo III (SSTIII)^{3,49}.

Salmonella puede invadir varias líneas celulares y se considera que puede estimular más de un camino de transducción de señales para promover su entrada a las células del hospedero^{3,50}.

Salmonella produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de células M y la invasión de enterocitos adyacentes, tanto por la cara apical como por la basolateral, induce apoptosis de macrófagos activados mediante la proteína efectora SipB y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para poder ser transportada al hígado y al bazo. Después de un periodo de adaptación dentro de la célula, en las vacuolas de células fagocíticas o no fagocíticas, *Salmonella* se replica a pesar del ambiente limitado en Mg²⁺ y Fe⁺ y un pH ácido. Contradictoriamente, la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular. Se ha demostrado que SopB es esencial en el establecimiento intracelular y replicación intracelular, al estar involucrado en la formación de los compartimentos vacuolares, mantiene niveles altos de fosfatidilinositol trifosfato en la membrana del fagosoma, lo que impide la unión

con los lisosomas y permite la unión con otras vacuolas acarreadoras de nutrientes, con la finalidad de establecer un microambiente fagosomal que permita la supervivencia. Adicionalmente, *Salmonella* expresa enzimas que inactivan directamente radicales libres de oxígeno y nitrógeno³.

Las proteínas efectoras SopB/SigD estimulan la secreción de cloro lo cual favorece la presentación de diarrea, ésta es provocada por el incremento de la permeabilidad vascular que acompaña a la inflamación en combinación con la pérdida de la integridad epitelial de la mucosa intestinal, en consecuencia hay salida de líquidos y electrolitos al lumen intestinal. Además, *Salmonella* induce la migración de neutrófilos y macrófagos, así como la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-8, GM-CSF, IFN γ , TNF α , entre otras³.

SE es capaz de producir diarrea así como infecciones sistémicas debido a los mecanismos de patogenicidad anteriormente descritos^{44, 51}. Además, posee mecanismos únicos que le permiten sobrevivir en el ambiente microbicida presente en la clara del huevo^{21, 52}.

El ambiente adverso de la clara de huevo es debido a: 1) limitación del desarrollo bacteriano a través de la quelación de hierro por la ovo-transferrina, 2) muerte bacteriana debido a la acción de proteínas formadoras de poros, como la lisozima y otros péptidos catiónicos, además de un ambiente hiperosmótico⁵².

Lu y col. ⁵² reportaron la presencia de genes específicos de SE que le permiten sobrevivir dentro del ambiente antimicrobiano de la clara de huevo. Uno de ellos, *yafD*, participa en la reparación del ADN dañado por la actividad endonucleasa y exonucleasa de enzimas que se encuentran en el huevo. YafD se considera un miembro de la familia fosfatasa-endonucleasa-exonucleasa. Los productos de otros genes, como *waaJ*, involucrado en la síntesis de LPS; *glnH* y *proY* que participan en el transporte hacia la membrana externa de glutamina y prolina, respectivamente; *cadA* y *lysC* involucrados en el metabolismo de la lisina y la cadaverina, respectivamente; dan mayor estabilidad a la membrana externa, al cambiar su carga de negativa a positiva y de esta manera evitan la unión de péptidos catiónicos formadores de poros ^{21, 52}.

En el caso del ambiente hiperosmótico, SE optimiza el transporte de prolina hacia la membrana externa a través de la proteína ProY, por lo que este aminoácido es considerado un osmoprotector ²¹.

1.3.2 Patogenia

La transmisión de SE puede ser vertical u horizontal. La transmisión vertical ocurre desde la maduración del folículo, de una madre infectada a la nueva progenie. También se considera transmisión vertical cuando el huevo se contamina al pasar a través del oviducto o la cloaca, y el microorganismo atraviesa el cascarón. La transmisión horizontal es cuando el microorganismo se transmite por el contacto con aves infectadas o material contaminado ^{34, 35, 36}.

El periodo de incubación es variable, se pueden presentar signos clínicos desde las 6 hasta las 48 h post infección ⁵¹. Después de la infección, *Salmonella* resiste el pH ácido del estómago y luego coloniza el intestino delgado, penetra las células epiteliales, migra a la lámina propia de la región ileocecal y se multiplica en folículos de la región linfoide ⁵³. Una vez en tejido linfoide induce su fagocitosis en macrófagos no activados o heterofilos, con lo que se facilita su diseminación a todo el organismo y coloniza órganos, principalmente hígado y bazo ^{3, 45}.

1.3.3 Lesiones macroscópicas

Los animales muestran una infección generalizada; los órganos internos están aumentados de tamaño (hepatomegalia, esplenomegalia) y muestran estrías hemorrágicas o pequeñas manchas blancas correspondientes a necrosis multifocal; este tipo de lesiones se encuentran principalmente en hígado, riñón, bazo y miocardio, los cuales también presentan una coloración bronceada. Se observa enteritis, congestión y edema en mesenterio, hígado y bazo; adelgazamiento de las paredes del ileon y ciego con acumulación de líquidos, gas y petequias. En pollitos, el saco vitelino puede observarse reseco y caseoso ^{41, 53}. Se puede observar inflamación crónica degenerativa en ovario; salpingitis, pericarditis, orquitis y artritis ^{34, 44}.

1.3.4 Lesiones microscópicas

En buche, duodeno, yeyuno, íleon y ciego; las lesiones microscópicas son descamación epitelial, congestión y hemorragias, posteriormente se encuentra infiltración leucocitaria en la mucosa, para finalmente encontrar necrosis

coagulativa así como hiperplasia de tejido linfoide. En intestino se encuentran hemorragias causadas por úlceras necróticas⁵¹.

En hígado, bazo, corazón y pulmón se observa congestión, hemorragias, infiltración leucocitaria y necrosis coagulativa. Se presenta hepatitis necrótica, infartos con necrosis fibrinoide y esclerosis del miocardio, enteritis, focos múltiples de inflamación y necrosis de otros órganos⁴⁴, inflamación de la vesícula biliar e inflamación focal en pulmón, médula ósea y periostio⁵¹.

1.3.5 Signos

La naturaleza y la severidad de la infección está estrechamente relacionada con el serotipo de *Salmonella*, la especie hospedadora y la dosis infectante. La salmonelosis es primordialmente una enfermedad de los animales muy jóvenes, viejos, debilitados o inmunológicamente comprometidos^{35, 41, 54, 55}. En las aves recién nacidas se presenta un síndrome general de depresión y debilidad que se manifiesta por la posición colgante de las alas y de la cabeza, por caminar vacilante; hay pérdida de apetito y diarrea que se adhiere alrededor de la cloaca. Los animales están temblorosos y se apiñan unos contra otros como si tuvieran frío y cuando los pulmones se infectan, la respiración se torna difícil. Las infecciones agudas en las aves, son esporádicas, observándose comúnmente la forma crónica de la infección, con poca mortalidad y signología clínica. En estos animales el ovario puede estar afectado y la infección transmitirse por el huevo. Este tipo de transmisión resulta en una fertilidad e incubabilidad muy bajas, y

grandes pérdidas por mortalidad que empieza un día después del nacimiento de los polluelos que si sobreviven pueden estar débiles o deformes^{34, 36, 38, 41}.

1.4 Inmunidad contra Salmonelosis

La respuesta inmunitaria de las gallinas hacia infecciones paratíficas minimiza la severidad y la duración de los signos clínicos y ayuda a proteger contra reinfecciones³⁴.

En gallinas infectadas naturalmente con SE, se han detectado anticuerpos tanto séricos como secretores; también se han detectado a partir de yema de huevo^{56, 57, 58, 59}. Altos niveles de anticuerpos se correlacionan con una menor morbilidad, mortalidad, disminución en la colonización de órganos, así como la disminución en la excreción de SE en heces y en huevo^{60, 61}.

Lee y col.⁶² demostraron que un alto nivel de anticuerpos contra *Salmonella* no es un factor imprescindible para evitar la colonización de órganos, tampoco favorece la eliminación de los microorganismos; en cambio, cuando hay una fuerte respuesta inmune celular contra el microorganismo la eliminación de la bacteria es más eficiente. Aunque menos estudiada, la respuesta inmune celular también aumenta en respuesta a una infección con *Salmonella*, Hasan y col.⁵⁶ detectaron una fuerte hipersensibilidad mediada por células usando la bacteria completa y proteínas de membrana externa de ST. En el caso de SE, los heterófilos se vuelven altamente fagocíticos y bactericidas en respuesta a la infección⁶³ y aparentemente juegan un papel importante al restringir la invasión a

diferentes órganos, durante las primeras fases de la infección ⁶⁴. Las citocinas producidas por linfocitos T sensibilizados, son importantes al conferir inmunidad a las gallinas, debido a que aumentan el número de heterófilos circulantes y facilitan su reclutamiento en los sitios de infección ^{65, 66}. El uso experimental de estas linfocinas, ha demostrado proteger a las gallinas contra la invasión de SE en diferentes órganos ⁶⁷.

El interferón gamma (IFN γ) es una citocina crítica para la defensa del organismo ante una invasión con *Salmonella*. Dicha citocina estimula la activación de macrófagos; de manera que ayuda a optimizar la internación de la bacteria, así como su depuración mediante mecanismos oxidativos dentro del fagolisosoma ⁶⁸. Así mismo, el IFN γ induce la producción de Interleucina 12 (IL-12) en macrófagos ⁶⁸, con lo que la respuesta inmunitaria se torna principalmente celular ⁶⁹.

Salmonella posee diversas estructuras que pueden inducir inmunidad protectora en gallinas infectadas experimentalmente ⁷⁰. Con la finalidad de detectar la antigenicidad de algunos componentes de la membrana externa de SE durante la infección natural de gallinas de postura, Ochoa-Repáraz y col. ⁷¹ midieron la cantidad de anticuerpos producidos mediante inmunotransferencia, para las porinas, proteína de la membrana externa A (OmpA), fimbria de SE (SEF) 14, SEF21, lipopolisacárido (LPS) y flagelina. Ellos encontraron que hubo una alta frecuencia de sueros reactivos cuando se enfrentaron con porinas (97.3%), LPS (81.8%), Omp de 22.1 kDa (66.2%), OmpA (64.7%), SEF21 (60.8%), SEF14 (50%) y flagelina (47.3%). Sin embargo, también hubo reacción

de LPS y porinas con sueros provenientes de gallinas no infectadas. Por lo cual, concluyen que los componentes inmunogénicos e inmunoespecíficos de SE son OmpA, SEF y flagelina, de los cuales OmpA fue la que reaccionó con un mayor número de sueros de gallinas infectadas naturalmente con SE. Con lo que demostraron que diferentes componentes de SE pudieran ser herramientas útiles para el diagnóstico y/o inmunoprofilaxis ⁷².

Actualmente, varios grupos de investigación, evalúan la respuesta inmune inducida por las vacunas de proteínas de la membrana externa ^{72, 73, 74, 75, 76}. Con *S. enteritidis*, se ha comprobado la producción de anticuerpos contra OmpA durante la infección, inoculando la bacteria completa y la proteína sola ^{77, 78}.

En el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM, Huerta L y col. ⁷⁹ demostraron la liberación de una OMP de 30 kDa al medio de cultivo que contenía *Salmonella gallinarum* (SG); dicho fenómeno se observó, cuando al cultivo se le agregó suero anti-SG de pollos libres de patógenos específicos (SPF). Posteriormente, esta proteína fue purificada, y se utilizó en una prueba de Inmunoensayo enzimático (ELISA), para el diagnóstico de tifoidea aviar. Se demostró que la OMP de 30 kDa era reconocida por sueros de aves SPF infectadas con SG ⁸⁰. Finalmente, Vega D.X. ⁸¹ caracterizó parcialmente esta proteína y encontró que era OmpA. Así mismo reporta que la homología en la secuencia de aminoácidos entre SG y ST es del 98%; correlacionando el hecho de que es una proteína altamente conservada dentro del género *Salmonella*. Con base en la información

obtenida, se propone a OmpA como candidato para el diseño de un inmunógeno.

1.5. Proteínas de la Membrana Externa (OMP)

Las OMP constituyen el 47% del total de la membrana externa (OM). Se clasifican, con base en el número de copias que existen dentro de la bacteria, en principales y menores ⁸².

Dentro de las proteínas mayoritarias o principales se encuentran: la lipoproteína mureína, cuya función es estructural, ya que estabiliza la arquitectura del complejo OM-peptidoglicano; las porinas como OmpF, OmpC y PhoE, las cuales participan en el proceso de difusión de pequeños solutos o iones como el fósforo; también existen proteínas involucradas en la difusión específica de solutos como LamB, la cual permite el paso de maltosa y maltodextrinas a través de la OM; por último se encuentran las proteínas estructurales que dan estabilidad a la OM, como es el caso de OmpA ⁴⁵.

Las proteínas minoritarias de la OM se encuentran únicamente en momentos específicos de ciclo celular, un ejemplo de ello es la proteína G que está asociada a la elongación de la pared celular ⁴⁵.

1.5. 1 Proteína de la Membrana Externa A (OmpA)

OmpA se encuentra altamente conservada dentro de la familia Enterobacteriaceae ⁴⁵ y dentro del género *Salmonella* ⁸¹. Se encuentran 10⁵ copias por célula,

aproximadamente ⁴⁵ y pesa 34 kDa en SE ⁷¹. Es una proteína termolábil que pertenece a la familia de proteínas que forman láminas β plegadas. Está compuesta por una región N-terminal, la cual se ensambla en la membrana externa por medio de 8 plegamientos beta, de manera que quedan 4 asas expuestas hacia el espacio extracelular. La región C- terminal permanece en el espacio periplásmico ^{83, 84}. En la **Figura 1.1** se muestra un esquema de OmpA.

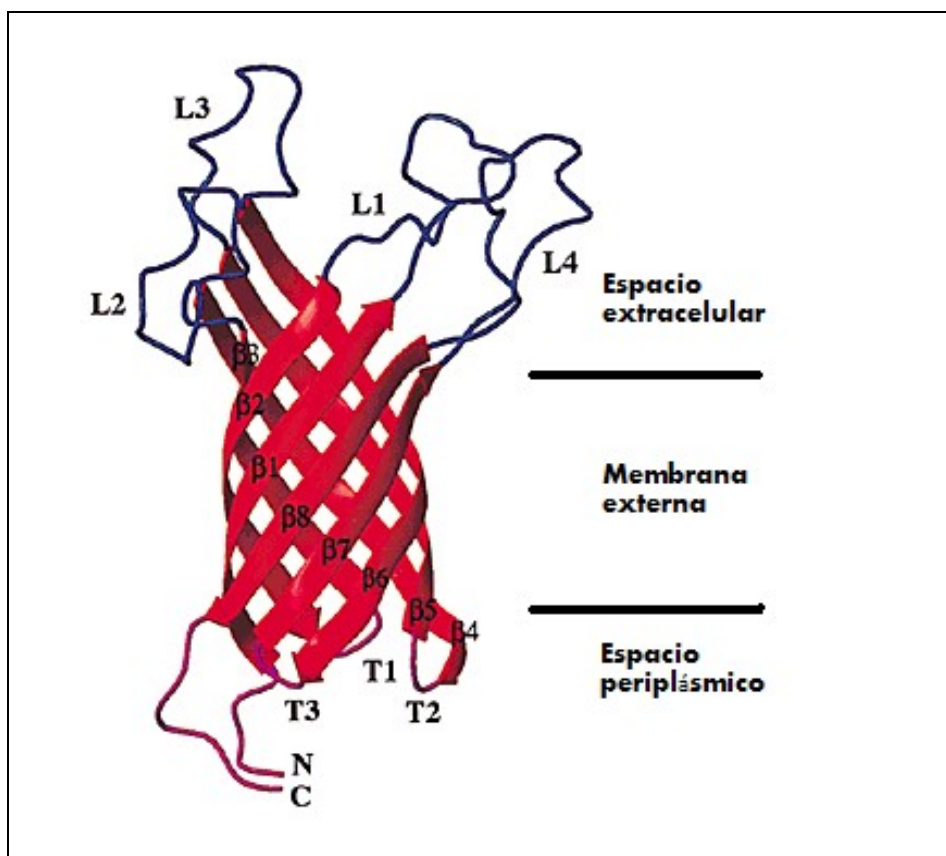


Figura 1.1 Estructura de OmpA. Representación en cintas de la estructura de OmpA, en micelios de dodecilsulfocolina (DPC), producida con el programa MOLMOL, tomado de Arora, 2001 ⁸⁵. La región N- terminal transmembranal, con sus 8 plegamientos β , se muestra en rojo, las cuatro asas expuestas al espacio extracelular se muestran en azul y la región C-terminal, que permanece en el espacio periplásmico, se muestra en morado.

OmpA participa en diversas funciones ^{86, 87, 88, 89}, como:

- Receptor para: colicinas L y K, bacteriocina 4-59 y bacteriofagos.
- Proteína estabilizadora de OM
- Mediador para la conjugación
- Crecimiento celular

OmpA es un monómero en su estado nativo, el cual se consideraba sin poros; sin embargo, estudios con la proteína en bicapas lipídicas, demuestran que es capaz de formar canales de difusión para pequeños solutos ⁹⁰.

OmpA se transloca a la membrana interna (IM) de manera no plegada con ayuda del sistema de exportación de proteínas SecA/E/Y/G. Una vez en el espacio periplásmico, peptidasas separan el péptido señal de la proteína y la proteína Skp se une al extremo amino terminal de OmpA y junto con el LPS colaboran para su correcto plegamiento e inserción en la membrana externa ⁹¹.

Inmunológicamente, OmpA se considera un Patrón Molecular Asociado a Patógenos (PAMP), lo cuales son reconocidos por Receptores de Reconocimiento de PAMPs (PRRs), que se encuentran en células de la respuesta inmune innata como las células dendríticas (DC) e inician la respuesta inmune adaptativa. Se ha demostrado que OmpA de diferentes especies bacterianas, induce inmunidad humoral y celular, aún sin adyuvante. Estudios hechos con OmpA recombinante de *K. pneumoniae* revelan inducción de producción de citocinas en macrófagos y DC y maduración de DC ⁹².

1.6 Prevención y control contra SE

Como parte de las medidas preventivas contra SE, es preciso establecer normas para su control, en México, no existe ningún documento de referencia para el control de este microorganismo en aves o en humanos.

Con la finalidad de disminuir el riesgo de adquirir a *Salmonella* en una parvada o en una explotación avícola, se requiere introducir aves certificadas como libres de la enfermedad, así como establecerse sistemas de producción “todo dentro todo fuera” de manera conjunta con buenas prácticas de limpieza, desinfección y medidas de bioseguridad eficaces^{35, 93}.

Los principales factores de contaminación son: personal infectado, mascotas, fauna silvestre, roedores⁹⁴, agua y alimento contaminado³⁵.

En caso de brotes, se debe limitar el contagio, así como optimizar el diagnóstico de las parvadas infectadas. En USA, una vez que una parvada ha sido diagnosticada como infectada, solo se permite la comercialización del huevo que produce a destinos en donde el huevo será pasteurizado³⁵.

La vacunación de aves contra SE ha dado resultados satisfactorios en la disminución de la incidencia de la enfermedad^{60, 61, 95, 96}.

1.7 Inmunógenos

En Europa y EUA se utilizan bacterinas de SE en emulsión de aceite para el control de la enfermedad en aves de postura comercial. Estas bacterinas disminuyen la gravedad de los signos clínicos en una infección contra SE mediante la disminución de la colonización de órganos y facilitando la eliminación del microorganismo ^{60, 61}. Sin embargo, no eliminan el estado de portador asintomático, es decir, una gallina que ha sido vacunada con una bacterina de SE, se puede infectar con una cepa de campo; dicha cepa puede colonizar los tejidos del hospedero sin causar signos clínicos de la enfermedad pero sí alojarse en el intestino del hospedador y eliminarse en heces durante periodos indefinidos. Con lo que la infección se disemina y afecta a aves no vacunadas o la bacteria se perpetúa a través del material que contamina. Además, estas bacterinas no confieren una protección satisfactoria, ante desafíos con cepas de campo de SE ^{60, 96}.

También se han utilizado bacterias vivas atenuadas como vacunas, con las que se han obtenido resultados satisfactorios; sin embargo, existe un riesgo de reversión de su virulencia, mediante transferencia horizontal de genes de patogenicidad ^{97, 98}.

Debido a que no existe ningún producto biológico eficaz contra SE, se han propuesto inmunógenos alternativos que sean efectivos, económicos, específicos y que mantengan una respuesta inmunitaria duradera ^{99, 100}.

1.7.1 Vacunas de ADN

El desarrollo de las vacunas de ADN surgió a través de los esfuerzos por estimular la inmunidad celular, partiendo del principio de que los antígenos procesados en las células somáticas generan péptidos que se asocian con moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHCI), los cuales son presentados a linfocitos CD8⁺, con lo que inducen su activación¹⁰¹.

Ascadi y col.¹⁰² hicieron el primer reporte de que una proteína extraña, codificada por un plásmido transfectedo a células eucariotas, podía ser inmunogénica. Trabajaron con un gen reportero contenido en un plásmido, el cual inocularon en músculo cardíaco de ratas, y observaron que al tratar a los animales con inmunosupresores, la expresión del gen reportero era más duradera, con lo que concluyeron que la proteína expresada por el gen reportero era capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Dicho experimento, tuvo como base, un estudio realizado por Felgner y col.¹⁰³ en el que demostraron la expresión de una proteína exógena, en células musculares, transfectedas con un plásmido bacteriano, el cual contenía un promotor de expresión para células de mamífero. Posteriormente, éste hecho fue corroborado, con la inoculación a animales, de plásmidos que codificaban para proteínas como la hormona del crecimiento humana y la antitripsina, en los cuales se detectó una respuesta inmunitaria contra dichas proteínas^{104, 105}.

Actualmente, se sabe que la vacunación con ADN consiste en la aplicación de un plásmido que contiene un gen que codifica para una proteína antigénica.

Una vez dentro del núcleo de las células transfectadas, el plásmido dirige la síntesis de la proteína. La proteína extraña es procesada y presentada por las células, somáticas o presentadoras de antígeno, lo que desencadena una respuesta inmune celular y/o humoral .

La respuesta inmunitaria que induce la vacunación con ADN, puede ser humoral, en cuyo caso se ha demostrado un patrón de anticuerpos IgG que indican que se desencadena una respuesta inmunitaria timo dependiente. También puede ser celular; en este tipo de respuesta inmunitaria se observa una proliferación de linfocitos T y una producción de citocinas, principalmente IL-2 e IFN γ . La inmunidad citotóxica mediada por células se puede activar, ya sea por la transfección directa del plásmido en células presentadoras de antígeno o por la captación de la proteína libre por las mismas células ¹⁰⁶.

En la actualidad se emplean diversos plásmidos como vectores vacunales. En la **Figura 1.3** se muestra un vector comercial para vacunas de ADN. Los plásmidos utilizados como vectores poseen varios componentes genéticos importantes ¹⁰⁷:

- promotor de algún virus patógeno, el cual sirve para dirigir la sobre-expresión del gen que codifica para la proteína antigénica, ejemplos: citomegalovirus humano (CMV), virus 40 del simio y virus de la leucemia murina.
- señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), para asegurar una transcripción eficiente, así como la poliadenilación del RNAm.

- sitio *oriC* de replicación para promover la replicación del plásmido dentro de una célula bacteriana.
- gen para la selección del plásmido, generalmente se usan genes de resistencia a quimioterapéuticos, con la finalidad de asegurar la herencia del plásmido a las nuevas células bacterianas.

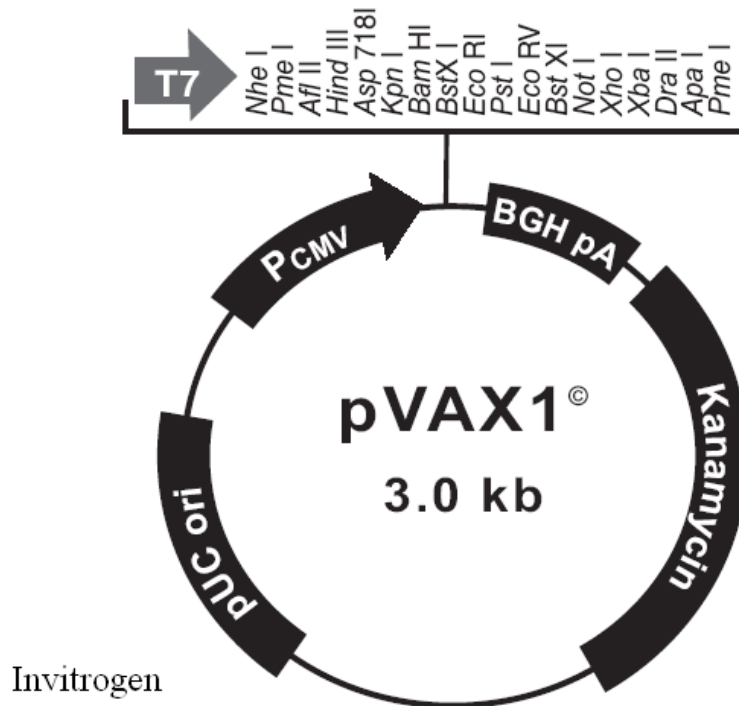


Figura 1.2 Mapa del pVAX1. Esquema del vector comercial pVAX1[®] (Invitrogen). Se muestra el sitio *ori* para la replicación, el promotor de CMV, el sitio múltiple de clonación donde se mencionan las enzimas de restricción útiles para la clonación, la señal de poliadenilación de la BGH y el gen de resistencia a Kanamicina.

Las vías de inoculación del plásmido vacunal son: intramuscular, intradérmica, intranasal, cutánea, subcutánea, tópica, intramucosal ¹⁰⁶; los métodos de inoculación, incluyen inyección, bombardeo con partículas de oro coloidal (pistola de ADN- *gene gun*), partículas intranasales y liposomas ^{105, 106, 107,}

¹⁰⁶ ¹⁰⁹. Las dosis de inoculación van desde los 50 ng cuando se utiliza la pistola de ADN y de 100 a 400 µg cuando se inoculan por inyección ¹⁰⁸.

Algunas de las ventajas de la vacunación con ADN son: la capacidad para inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular, la facilidad en su diseño genético ¹⁰⁷, son incapaces de revertir su virulencia y son más estables a temperatura ambiente ¹⁰⁵.

La vacunación con plásmidos como vectores de genes que codifican para proteínas antigénicas bajo el control del promotor del CMV, inducen una inmunidad protectora contra diferentes patógenos importantes que afectan a los animales de producción, como: Newcastle, Fiebre porcina clásica, Aujesky, Influenza ¹¹⁰.

JUSTIFICACIÓN

Se requiere de mejores medidas preventivas contra la Salmonelosis y las vacunas de ADN son una alternativa. La utilización de una vacuna de ADN con el gen *ompA* de *S. enteritidis* podría disminuir la contaminación de huevo por infección vertical; con lo cual la incidencia de la enfermedad en el humano sería menor.

HIPÓTESIS

La vacuna de ADN con el gen *ompA* de *Salmonella enteritidis*, inoculada en gallinas de postura, será capaz de generar inmunidad protectora ante un desafío.

OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto protector de una vacuna de ADN contra *Salmonella Enteritidis* que contenga el gen *ompA*, mediante su diseño, elaboración y aplicación en gallinas de postura, a fin de contribuir a la eficiencia productiva de las aves y a la salud pública

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Amplificar el gen *ompA* de *Salmonella enteritidis* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- II. Clonar el producto de la PCR en un plásmido, para utilizarlo como vacuna de ADN.
- III. Inmunizar gallinas, para evaluar el índice de protección, ante un desafío con *Salmonella enteritidis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental se muestra en el diagrama de flujo de la **Figura 5.1**

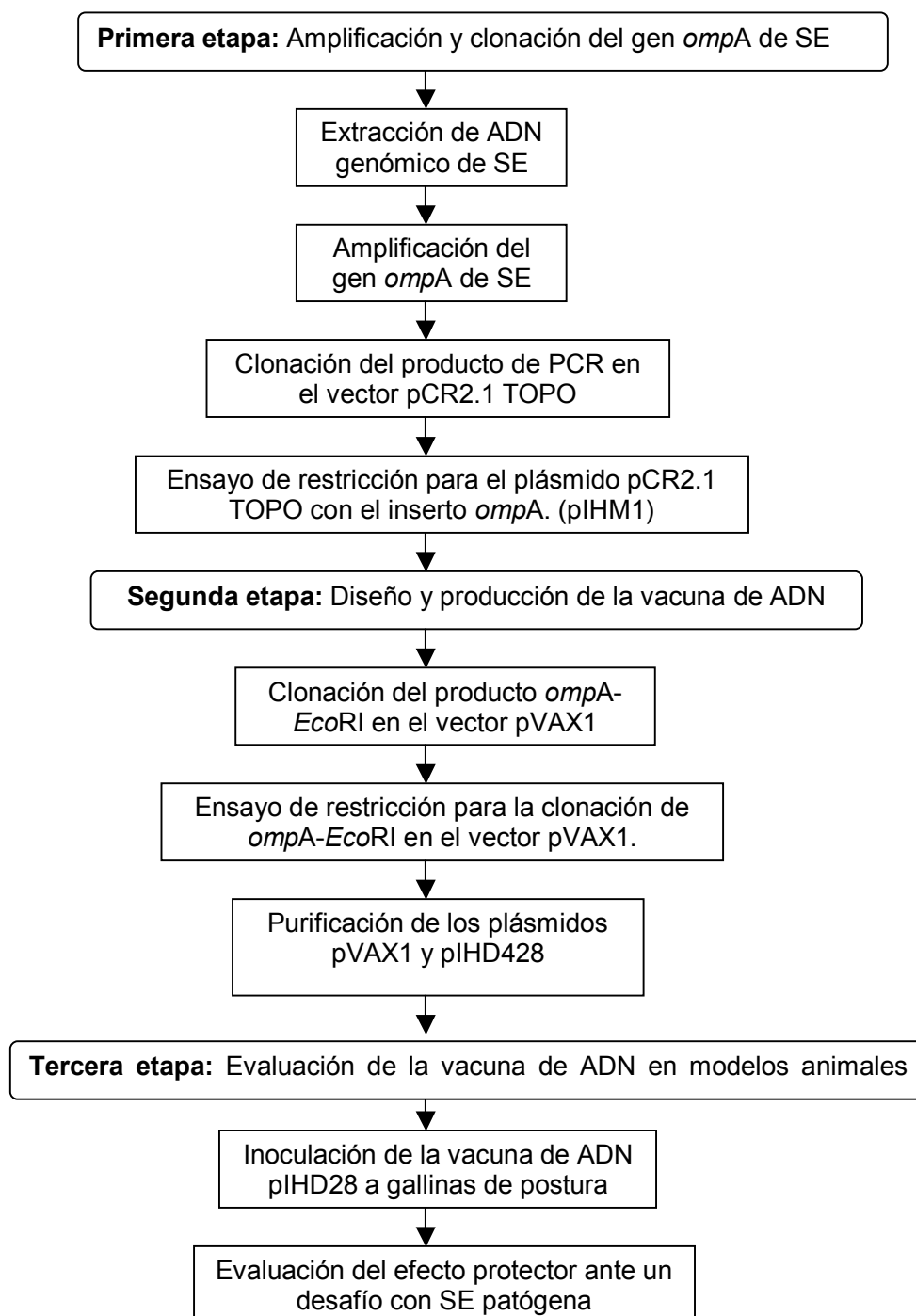


Figura 5.1 Metodología general. Diagrama de flujo en donde se muestra la metodología utilizada para el trabajo experimental.

5.1 CEPAS

Se utilizó una cepa de SE Fagotipo 13, proporcionada por el Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Así mismo se utilizaron las cepas *E. coli* TOP10F'®^I y *E. coli* DH5α, como vectores para los plásmidos utilizados.

Todas las cepas fueron almacenadas en un ultracongelador^{II} a -70°C en viales con 1mL de leche descremada adicionada con 20% de glicerol (Anexo 1). Brevemente, se sembraron 5 colonias bacterianas en 10 mL de caldo LB (Anexo 1), se incubaron durante 16 a 24 h, a 37°C en un el agitador orbital a 150 rpm^{III}. Posteriormente, el cultivo se centrifugó^{IV} durante 15 min a 3000 X g; se decantó el sobrenadante y la pastilla bacteriana resultante, se resuspendió en 1mL de leche descremada con 20% de glicerol. Cuando se requirió utilizar las cepas, éstas fueron cultivadas en agar LB (Anexo 1) o caldo LB, a una temperatura de incubación de 37°C durante 24 h.

Se confirmó la pureza e identidad de la cepa de SE mediante cultivo en medios selectivos y diferenciales así como con pruebas bioquímicas, las cuales incluyeron: oxidasa, triple azúcar hierro (TSI), ácido sulfhídrico/ indol/ motilidad (SIM), citrato, urea, lisina descarboxilasa (LD), ontinina descarboxilasa (OD), arginina, ortonitrofenil galactosido (ONPG), utilización de lactosa y glucosa ¹¹¹. Adicionalmente, se realizó una prueba de identificación utilizando el sistema

^I Invitrogen ®

^{II} Harris, DL5-14L90BDa, USA

^{III} Lab-Line Instruments Inc.® modelo 3525, Illinois, USA

^{IV} IEC ®, modelo PR-2, Mass, USA.

BBL™ Crystal™ Enteric/nonfermenter ID Kit^V con la finalidad complementar la tipificación bioquímica de la cepa.

5.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE SE CON TIOCIANATO DE GUANIDINA

La obtención del ADN genómico de la cepa de SE, se realizó utilizando la metodología descrita por Pitcher DG y col.¹¹². Brevemente, se utilizó un cultivo de SE de 10 a 20 mL en caldo LB de 16 h de incubación a 37°C en agitación a 150 rpm^{VI}. El cultivo bacteriano fue centrifugado durante 10 min a 3,000 X g^{VII}. El sobrenadante se decantó. A la pastilla bacteriana resultante, se le agregaron 500 µL de solución de lisis (Anexo 2). Se mezcló durante 5-10 min en un agitador^{VIII}. Se adicionaron 250 µL de acetato de amonio^{IX} 7.4 M, se mezcló nuevamente y se incubó en hielo 10 min. Se agregaron 500 µL de cloroformo^X-alcohol isoamílico^{XI} (24:1 v/v) (Anexo 2), nuevamente se mezcló vigorosamente en un agitador^{VIII} durante 4-5 min. Se centrifugó a 10,000 g^{XII} durante 5 min; el sobrenadante se recuperó y se le agregó nuevamente cloroformo-alcohol isoamílico. Posteriormente, el sobrenadante se precipitó con 0.7 volúmenes de etanol^{IX} absoluto, se centrifugó durante 10 min a 10,000 g^{XII} para obtener una pastilla de ADN; dicha pastilla se lavó con etanol al 70%, de la misma manera que el paso anterior. Finalmente, la pastilla se secó 5 min en un desecador de ADN^{XIII} y se resuspendió en 50-100 µL de agua desionizada estéril.

^V BD® USA

^{VI} Lab-Line Instruments Inc.® modelo 3525, Illinois, USA

^{VII} IEC ®, modelo PR-2, Mass, USA.

^{VIII} Lab-Line Instruments Inc.®, Super-Mixer, Ill, USA

^{IX} Merck®, Alemania.

^X EM®, Alemania

^{XI} JT Baker®, México

^{XII} IEC®, modelo Micromax, Mass, USA.

^{XIII} Savant, Speed-Vac®, modelo SC110, NY, USA.

El ADN fue evaluado en un gel de agarosa al 1%, con amortiguador TAE (Tris-acetato-EDTA) (Anexo 2), fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV^{XIV}.

5.3. DISEÑO DE INICIADORES:

Se tomó como base la secuencia del gen *ompA* de *Salmonella typhimurium*⁸⁷ (GenBank: X02006) los iniciadores fueron diseñados con el software Vector NTI 10.0®^{XV} y se seleccionaron con base en la temperatura de alineamiento (Tm), proporción G+C y ubicación de la secuencia Kozak¹¹³ en fase con el codón ATG de inicio.

- Sentido (*ompA-S*): 5' TGACGGAGTTCACACTTGT 3'
- Antisentido (*ompA-A*): 3' AATCCTGCTTT AACGTGG 5'

El la **Cuadro 5.1** se muestra la secuencia nucleotídica del gen *ompA* de *S. typhimurium* obtenida del GenBank.

5.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los reactivos utilizados en la PCR, así como su concentración se muestran en el **Cuadro 5.2**.

^{XIV} Fluor-S ® Multilmager,

^{XV} Invitrogen

1 GTTTTTTTTT ACATGTCTGA **CGGAGTTCAC** **ACTTG**TAAAGT TTCCAAC TAC GTTGTAGACT TTACATCGCC AGGGGTGCTC
CAAAAAAAAAAG TGTACAGACT GCCTCAAGTG TGAACATTCA AAGGTTGATG CAACATCTGA AATGTAGCGG TCCCACGAG
81 AGCATAAGCC GTAGATATCG GTAGAGTAAC TATTGAGCAG ATCCCCGGT GAAGGATTTA ACCGTGTTAT CTCGTTGGAG
TCGTATTCCG CATCTATAGC CATCTCATTG ATAACTCGTC TAGGGGGCCA CTTCTAAAT TGGACAATA GAGCAACCTC
161 ATATTCATGG CGTATTTTGG ATGATAACGA GGC GCAAAA **ATG**AAAAGA **CAGCTATCGC** **GATTGCRGTG** **GCRC**TGGCTG
TATAAGTACC GCATAAAACC TACTATTGCT CCGCGTTTTT TACTTTTTCT GTCGATAGCG CTAACGTAC CGTGACCGAC
241 **GTTTCGCTAC** **CGTAGCGCRG** **GCCG**CTCCGA AAGATAACAC CTGGTACGCT GGTGCTAAAC TGGGCTGGTC TCAGTACCAT
CAAAGCGATG GCATCGCGTC CGGCGAGGCT TTCTATTGTG GACCATGCGA CCACGATTTG ACCCGACCGAG AGTCATGGTA
321 GACACCGGCT TCATTACAAA TGATGGCCCG ACTCATGAAA ACCAACTGGG CGCAGGTGCT TTTGGTGGTT ACCAGGTTAA
CTGTGGCCGA AGTAAAGTGT ACTACCGGGC TGAGTACTTT TGGTTGACCC GCGTCCACGA AAACACCAA TGGTCCAATT
401 CCCGTATGTT GGCTTTGAAA TGGGCTACGA CTGGTTAGGC CGTATGCCGT ACAAAGGCGA CAACATCAAT GGCCTTATA
GGGCATACAA CCGAAACTTT ACCCGATGCT GACCAATCCG GCATACGGCA TGTTCGCT GTTGTAGTTA CCGCGAATAT
481 AAGCTCAGGG CGTTCAGTTG ACCGCTAAAC TGGGTTATCC AATCACTGAC GATCTGGACT TTTATACCCG TCTGGGTGGT
TTCGAGTCCC GCAAGTCAAC TGGCGATTTG ACCCAATAGG TTAGTACTG CTAGACCTGA AAATATGGGC AGACCCACCA
561 ATGGTATGGC GTGCAGACAC CAAGTCTAAC GTCCCTGGCG GCCCGTCTAC TAAAGACCAC GACACCGGCG TTTCCCCGGT
TACCATAACCG CACGTCTGTG GTTCAGATTG CAGGGACCGC CGGGCAGATG ATTTCTGGTG CTGTGGCCGC AAAAGGGCCA
641 ATTCCGGGGC GGTATCAGT ATGCTATCAC CCCTGAAATC GCAACCCGTC TGGAAATACCA GTGGACTAAC AACATCGGTG
TAAGCGCCCG CCATAGCTCA TACGATAGTG GGGACTTTAG CGTTGGGCAG ACCTTATGGT CACCTGATTG TTGTAGCCAC
721 ATGCCAACAC CATCGGCACC CGTCCGGACA ACGGCCTGCT GAGCGTAGGT GTTTCCTACC GTTTCGGCCA GCAAGAAGCT
TACGGTTGTG GTAGCCGTGG GCAGGCCGTGT TGC CGGACGA CTCGCATCCA CAAAGGATGG CAAAGCCGGT CGTTCTTCGA
801 GCTCCGGTAG TAGCTCCGGC ACCAGCTCCG GCTCCGGAAG TACAGACCAA GCACCTCACT CTGAAGTCTG ACGTACTGTT
CGAGGCCATC ATCGAGGCCG TGGTCGAGGC CGAGGCCTTC ATGTCTGGTT CGTGAAGTGA GACTTCAGAC TGCATGACAA
881 CAACCTCAAC AAATCTACCC TGAAGCCGGA AGGCCAGCAG GCTCTGGATC AGCTGTACAT CCAGCTGAGC AACCTGGATC
GTTGAAGTTG TTTAGATGGG ACTTCGGCCT TCCGGTCGTC CGAGACCTAG TCGACATGTA GGTGACTCG TTGGACCTAG
961 CGAAAAGCGG TTCCGTTGTC GTTCTGGGCT TCACTGACCG TATCGGTTCT GACGCTTACA ACCAGGGTCT GTC CGAGAAA
GCTTTCTGCC AAGGCAACAG CAAGACCCGA AGTACTGGC ATAGCCAAGA CTGCGAATGT TGGTCCCAGA CAGGCTCTTT
1041 CGTGCTCAGT CTGTTGTTGA TTACCTGATC TCCAAAAGTA TTCCGTCTGA CAAAATCTCC GCACGTGGTA TGGGCGAATC
GCACGAGTCA GACAACAAC AATGGACTAG AGGTTTCCAT AAGGCAGACT GTTTTAGAGG CGTGCACCAT ACCCGCTTAG
1121 TAACCCGGTT ACCGGCAACA CCTGTGACAA CGTGAAACCT CCGCCTGCCG TGATCGATTG CCTGGCTCCG GATCGTCGCG
ATTGGGCCAA TGGCCGTTGT GGACACTGTT GCACTTTGGG GCGCGACGGG ACTAGCTAAC GGACCGAGGC CTAGCAGCGC
1201 TAGAGATCGA AGTTAAAGGC GTTAAAGACG TGGTAACTCA GCCGCAGGCT **TAR**GTTTCCG TCTGATAAAA AACCCCGCGT
ATCTCTAGCT TCAATTTCCG CAATTTCTGC ACCATTGAGT CCGCGTCCGA ATTCAAAGGC AGACTATTTT TTGGGGCGCA
1281 CGCGGGTTTT TTGCTCTGGT CTGGATGACA ACGCCTTTCA GCGTTACTTC TTGCCTAATA ACGCCTGTAA ATCCTGCTTT
GCGCCAAAAA AACGAGACCA GACCTACTGT TCGGAAAAGT CGCAATGAAG AACGGATTAT TGGGACATT **TAGGACGARR**
1361 AACGTGGTCA TTTGCCGTGG CATATTTCTC TTTATGCTCC AA
TTGCRCCAGT AAACGGCACC GTATAAAGAG AAATACGAGG TT

Cuadro 5.1 Gen ompA. Secuencia nucleotídica del gen ompA de *S. typhimurium*. Codón de inicio y de término en rojo, en azul los iniciadores, en morado la secuencia para el péptido señal y en verde el sitio kozak en fase +1.

Reactivo	Concentración
Taq polimerasa	1 U/μl
Magnesio	2.5 mM
Amortiguador 10X	50 mM
ATP, GTP, TTP, CTP	Equimolar: 10 mM
<i>ompA-S</i>	220 pM
<i>ompA-F</i>	220 pM
ADN	100 ng
Vol. final	50 μl

Cuadro 5.2 Reactivos utilizados para la PCR de *ompA*. Se señalan las concentraciones utilizadas de cada uno de los reactivos. Reactivos de la marca Invitrogen®.

Las condiciones establecidas en el termociclador ^{XVI} para la PCR se muestran a continuación (**Figura 5.2**):

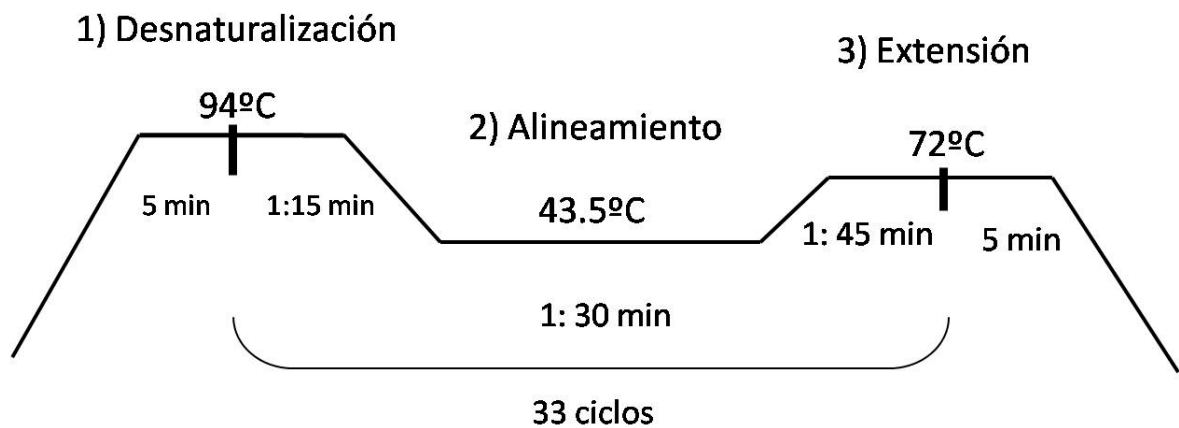


Figura 5.2 Condiciones de la PCR. Condiciones de temperatura y ciclos, en la PCR para *ompA* y *sopE*, establecidas en el termociclador.

Como control positivo se utilizó al gen de *sopE* y los iniciadores utilizados fueron:

^{XVI} Techne, Techgene®, Inglaterra

- Sentido (*sopE-S*): 5' GTG ACA AAA ATA ACT TTA TCT 3'
- Antisentido (*sopE-A*): 3' GGG AGT GTA TTG TAT ATA TTT 5'

Dichos iniciadores amplifican un fragmento del gen de aproximadamente 700 pb.

La PCR para el control positivo se realizó de la siguiente manera: la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL ; dicha reacción contenía 5 μL de amortiguador 10X^{XVII} (50 mM), 2 μL de MgCl_2 ^{XVII} (2.5 mM), 1 μL de dinucleótidos trifosfatados^{XVII} (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (10 mM equimolar), 2 μL de cada oligonucleótido (220 pM), 2 μL de ADN (200 ng), 1 μL de Taq polimerasa^{XVII} (2 U), agua libre de pirógenos cbp 50 μL ¹¹⁴. Las condiciones establecidas en el termociclador^{XVI} fueron las mismas que se utilizaron para la PRC de *ompA*.

El producto de la PCR fue evaluado en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE, el gel fué teñido con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador de luz UV^{XVIII}.

5.5. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR en el vector pCR2.1 TOPO

El producto de PCR *ompA* de SE fue clonado en el vector pCR 2.1 TOPO TA cloning^{XIX}, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la mezcla para ligar el producto de PCR se realizó de la siguiente manera: 1 μL de vector, 3 μL de producto de PCR, 1 μL de solución amortiguadora; los componentes fueron mezclados gentilmente. Se dejó incubar 5 min a

^{XVII} Invitrogene®

^{XVIII} Fluor-S® Multilmager,

^{XIX} Invitrogen®

temperatura ambiente y posteriormente se incubó en baño de hielo. La construcción resultante se utilizó para transformar células TOP10F^{XX}, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, a un vial con células TOP10F' se le agregaron 2 µL de reacción de ligazón mezclando gentilmente. La reacción se incubó 30 min en hielo. Posteriormente se le dió un choque térmico de 30 seg a una temperatura de 42°C^{XXI}. La reacción fué transferida inmediatamente a hielo; se añadieron 250 µL de medio SOC (Anexo 1) a temperatura ambiente y se incubó 1 h a 37°C, en posición horizontal, con agitación de 200 rpm^{XXII}. Finalmente se sembraron 100 µL de células transformadas en agar LB atemperado a 37 °C y adicionado con 50 µg/mL de kanamicina (Km)^{XXIII}, 1.6 mg de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido)^{XXIV} y 0.8 mg de IPTG (Isopropylthio-β-D-galactosido)^{XXV}. Las cajas, con las células transformadas, se incubaron a 37°C, durante 16 a 24 h. Después del periodo de incubación, fueron refrigeradas^{XXVI} a 4°C toda la noche. Las clonas transformadas se seleccionaron por complementación alfa¹¹⁵ y se conservaron las colonias blancas.

5.6. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS BACTERIANOS

La extracción de plásmidos bacterianos se realizó con el método de lisis alcalina, mini-prep, descrito por Sambrook J y col.¹¹⁵ con algunas modificaciones. Brevemente, una colonia bacteriana fue cultivada en 10 mL de

^{XX} Invitrogen®

^{XXI} Precision Scientific, modelo 26, III, USA.

^{XXII} Lab-Line Instruments Inc.® modelo 3525, III, USA.

^{XXIII} Invitrogen®, China.

^{XXIV} Promega®, USA

^{XXV} Invitrogen®, Italia.

^{XXVI} Nieto®, modelo REB450.

caldo LB con Km^{xxvii} a una concentración de 50 µg/mL, a 37°C y agitación de 150 rpm,^{xxviii} durante 16 a 24 h. El cultivo se centrifugó^{xxix} durante 10 min a 3000 X g. El sobrenadante se decantó y se eliminaron las gotas residuales por aspiración. Una vez que se obtuvo una pastilla bacteriana lo más seca posible, se agregaron 100 µL de solución I (Anexo 2) y se mezcló vigorosamente en un agitador^{xxx}, se incubó 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 200 µL de solución II (Anexo 2) recién preparada, se mezcló gentilmente invirtiendo el tubo 5 veces, se incubó 10 min en baño de hielo. Se adicionaron 150 µL de solución III fría (Anexo 2), nuevamente se mezcló en un agitador^{xxx}, colocando el tubo en posición invertida, durante 10 seg y se incubó en baño de hielo durante 3 a 5 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 X g^{xxxI}, 5 min a 4°C y el sobrenadante fue colectado en un micro tubo nuevo. El ADN contenido en el sobrenadante, se precipitó con dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente, se mezcló vigorosamente en un agitador^{xxx} y se centrifugó nuevamente con las condiciones anteriores. El sobrenadante se decantó y la pastilla de ADN resultante, se dejó lo más seco posible, posteriormente se agregó etanol al 70% frío, se mezcló y se centrifugó como en el paso anterior. Finalmente, el sobrenadante fue desechado y la pastilla fue desecada 5 min en un desecador para ADN^{xxxII} y se resuspendió en 20 µL de agua desionizada estéril. De esta manera se conservó a 4°C hasta su uso.

^{xxvii} Invitrogen®, China.

^{xxviii} Lab-Line Instruments Inc.® modelo 3525, Ill, USA.

^{xxix} IEC ®, modelo PR-2, Mass, USA.

^{xxx} Lab-Line Instruments Inc.®, Super-Mixer, Ill, USA.

^{xxxI} Eppendorf ®, modelo 5415 R,

^{xxxII} Savant, Speed-Vac®, modelo SC110, NY, USA

Las extracciones de los plásmidos fueron evaluadas en un gel de agarosa al 1%, con amortiguador TAE, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV^{XXXIII}.

5.7. ENSAYO DE RESTRICCIÓN PARA EL PLÁSMIDO pCR2.1 TOPO CON EL INSERTO DEL PRODUCTO DE PCR *ompA* (pIHM1).

El diseño de los ensayos de restricción se realizó con el programa Vector NTI 10.0®^{XXXIV}, se tomaron como referencia la secuencia del gen *ompA* de *S. typhimurium* reportada por Freudl R y Cole ST⁸⁷ con número de acceso al GenBank: X02006, además de la secuencia del plásmido pCR2.1 TOPO®^{XXXIV} reportada por el fabricante. Al plásmido con el inserto del producto de la PCR para *ompA* de SE, le identifiqué como pIHM1, del cual se muestra un mapa en la **Figura 5.3**, obtenido con el programa Vector NT 10.0®.

Con la finalidad de corroborar que el producto de la PCR se hubiera clonado en el pCR2.1, se diseñó un ensayo de restricción, el cual incluyó a la enzima *EcoRI*^{XXXIV}. Esta enzima liberó al inserto, producto de la PCR, del pCR2.1. Así mismo se diseñaron ensayos de restricción con las enzimas *EcoRV*^{XXXIV} y *BamH1*^{XXXIV} con el objetivo de determinar que el producto de la PCR conservara los sitios de restricción de la secuencia nucleotídica del gen *ompA* de ST registrada en el GenBank.

^{XXXIII} Fluor-S® Multimager,
^{XXXIV} Invitrogen®

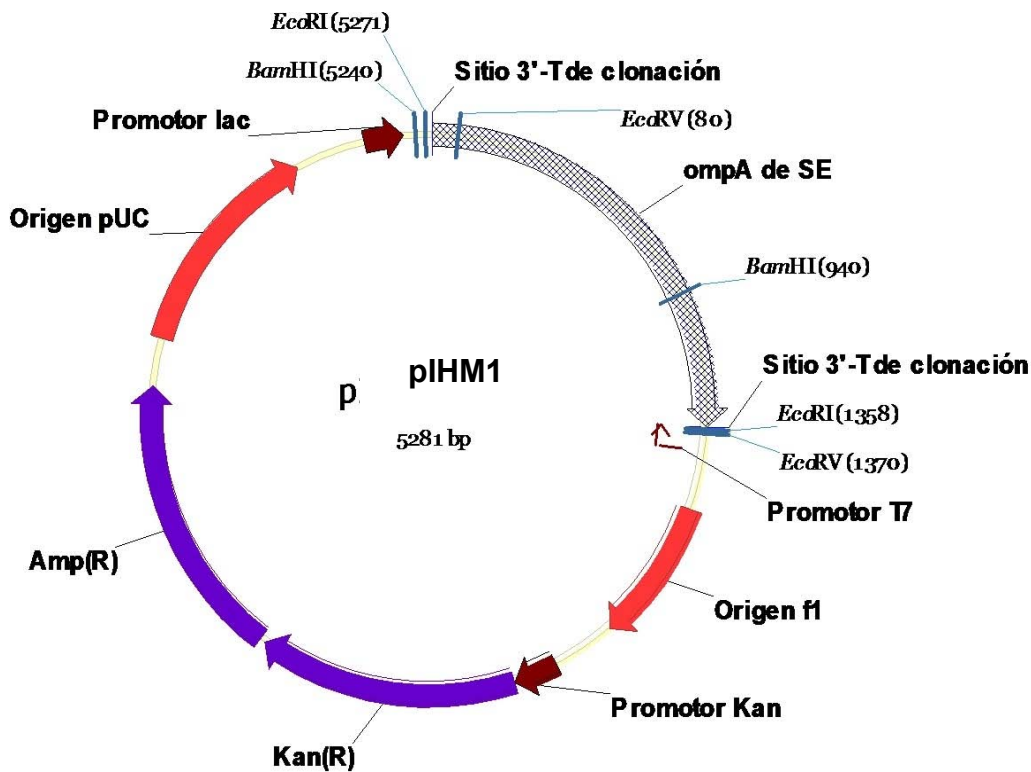


Figura 5.3 Mapa del plásmido pIHM1. El plásmido contiene al inserto del producto de la PCR para *ompA* de SE. Se muestran las enzimas de restricción que digieren al plásmido dentro del producto de PCR y fuera de él. Se resalta la enzima *EcoRI* la cual libera al producto de PCR

La digestión de los plásmidos se llevó a cabo de la siguiente manera: en un volumen total de 10 μL , fueron colocados 2 μL de plásmido, 1 μL de enzima, 1 μL de amortiguador específico para cada enzima y 6 μL agua desionizada estéril. La reacción se incubó durante 1 h a 37°C en baño María^{xxxv}.

5.8. PURIFICACIÓN DEL INSERTO *ompA-EcoRI* del vector pIHM1.

El plásmido pIHM1, fue digerido con *EcoRI*^{xxxvi}, de la misma manera en que se describió anteriormente. El producto de la digestión, *ompA-EcoRI*, fue purificado de un gel de agarosa al 1% mediante la utilización de un paquete

^{xxxv} Fisher Scientific®, modelo 5L-M, Pitts, USA

^{xxxvi} Invitrogen®

comercial ^{xxxvii} y con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio. Una vez identificado el fragmento liberado en el gel, éste fue cortado y se colocó en un micro tubo y se le agregó la solución amortiguadora QG en una proporción 3:1. Se dejó incubar ^{xxxviii} durante 10 min a 50°C. El contenido fue mezclado cada 2 min para licuar el gel. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló en un agitador ^{xxxix}. La mezcla resultante fue transferida a una columna de purificación, la cual fue centrifugada ^{xl} durante 1 min a 17,900 X g, el líquido obtenido fue desechado y a la columna se le agregaron 0.75 mL de amortiguador PE. La columna fue centrifugada nuevamente y el líquido resultante se conservó en un microtubo nuevo a -20°C, hasta su uso. El material genético resultante, *ompA-EcoRI*, fue cuantificado en un espectrofotómetro ^{xli}, con una longitud de onda de 280 nm.

5.9. CLONACIÓN DEL PRODUCTO *ompA-EcoRI* en EL VECTOR pVAX1.

El vector pVAX1® ^{xlII} se linearizó, mediante una digestión con *EcoRI* ^{xlII}, como se describió anteriormente. Posteriormente se realizó una reacción de ligazón con una proporción inserto:vector (*ompA-EcoRI*: pVAX1) de 4:1 con una unidad de enzima T4 ligasa ^{xlII}. Se dejó incubar durante 24 h a 12°C ^{xlIII}. La reacción de ligazón resultante se utilizó para transformar células *E. coli* DH5α por el método de transformación química con cloruro de calcio ¹¹⁵. La transformación se llevó a cabo con la metodología utilizada para la transformación de células TOP10F', descrita anteriormente. Finalmente se sembraron 100 µL de células

^{xxxvii} QIAGEN®

^{xxxviii} Precision Scientific, mod. 26, Ill, USA

^{xxxix} Lab-Line Instruments Inc.®, Super-Mixer, Ill, USA

^{xl} Eppendorf®, modelo 5415 R,

^{xli} Ultrospec 3000, Pharma Biotech, Inglaterra

^{xlII} Invitrogen®

^{xlIII} Haaek Fisions, mod. K20, Alemania

transformadas en agar LB, atemperado a 37°C y con 50 µg/mL de Km^{XLIV}. Las células fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Las clonas transformadas se seleccionaron por resistencia a la Km y se les realizó una extracción de plásmido siguiendo la metodología anteriormente descrita.

5.10. ENSAYO DE RESTRICCIÓN DE LA CLONACIÓN DE *ompA-EcoRI* EN EL VECTOR pVAX1.

Con la finalidad de corroborar que el gen *ompA* se encontrara dentro del vector y de conocer la dirección en la que se clonó el marco abierto de lectura (ORF) del gen, se diseñó un ensayo de restricción para *ompA-EcoRI* clonado en el vector pVAX1^{XLIV}, con la utilización del software Vector NTI 10.0®^{XLIV} y tomando como referencia la secuencia de *ompA-EcoRI* del plásmido pIHM1, además de la secuencia del plásmido pVAX1® reportada por el fabricante.

Los mapas de los plásmidos esperados, fueron elaborados con base en la dirección de lectura del ORF de *ompA*, para determinar los sitios de restricción presentes en la secuencias nuclotídicas y con esto determinar el sentido de clonación del ORF. En las **Figuras 5.4 y 5.5** se muestran los mapas de los plásmidos esperados, los cuales se obtuvieron con el software Vector NTI 10.0®. Se muestran los sitios de restricción para diferentes enzimas, además del fragmento *ompA-EcoRI* clonado con su ORF en dirección correcta de lectura y en dirección inversa, con respecto a la dirección de lectura del promotor de CMV, los plásmidos se identificaron como pIHD428 y pIHD8, respectivamente.

^{XLIV} Invitrogen ®

El ensayo de restricción incluyó a las enzimas *EcoRI*^{XLV}, *EcoRV*^{XXLV} y *BamHI*^{XXLV}. Las condiciones de digestión fueron las mismas utilizadas para el plásmido pIHM1.

5.11. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pVAX1 y pIHD428

Se utilizó el método Maxi-prep de lisis alcalina, descrito por Sambrook y col. **Error! Bookmark not defined.** Brevemente, se realizó un cultivo primario, donde se inocularon 2 colonias bacterianas en 30 mL de caldo LB con Km^{XLVI} (50 µg/mL), el medio fue incubado de manera estándar y su densidad óptica (OD₆₀₀)^{XLVII} se monitoreó hasta que alcanzó 0.6. Posteriormente, 50 mL de cultivo primario, fueron sembrados en un litro de caldo LB con Km. Se incubó durante 18 h de manera estándar. El cultivo fue centrifugado durante 15 min, 4°C y 3,500 X g^{XLVIII}. El sobrenadante se decantó, la pastilla bacteriana se resuspendió con 500 mL de amortiguador STE (Anexo 2) y nuevamente se centrifugó. La pastilla resultante se resuspendió con 36 mL de Solución I (Anexo 2), se le agregaron 4 mL de lisozima^{XLIX} (10 mg/ mL), posteriormente se agregaron 80 mL de Solución II (Anexo 2) y después se agregaron 40 mL de Solución III (Anexo 2). La mezcla se centrifugó^{XLVIII} durante

^{XLV} Invitrogen®

^{XLVI} Invitrogen®, China.

^{XLVII} Pharmacia Biotech, mod. Ultraspec 3000, Inglaterra

^{XLVIII} Beckman, mod. J2-21, Rotor JA-10, USA

^{XLIX} Boehringer Mannheim, Alemania

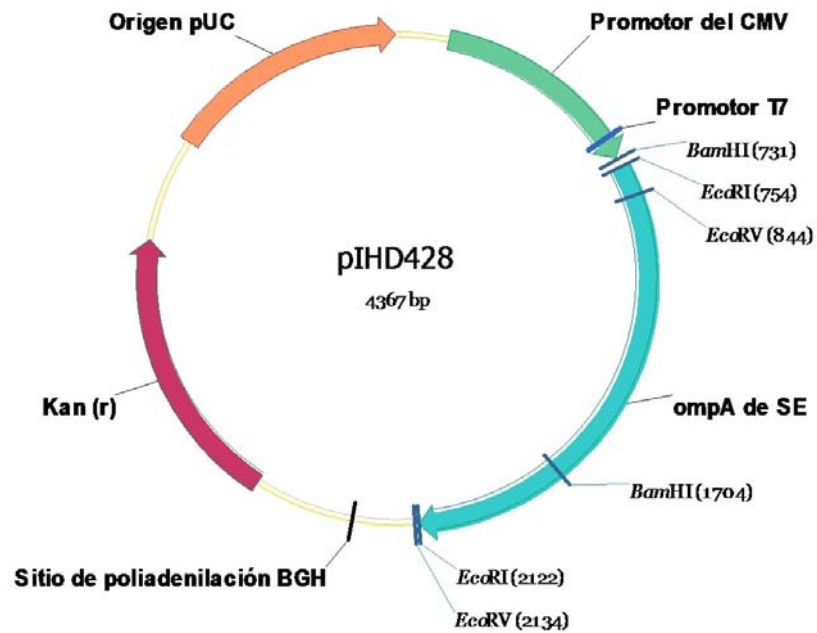


Figura 5.4 Mapa del plásmido pIHD428. El plásmido está formado por el vector pVAX1 con el inserto *ompA-EcoRI*, en el cual el ORF del gen se clonó en dirección correcta de lectura con respecto a la dirección de lectura del promotor de CMV. Se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI*, *EcoRV* y *BamHI*.

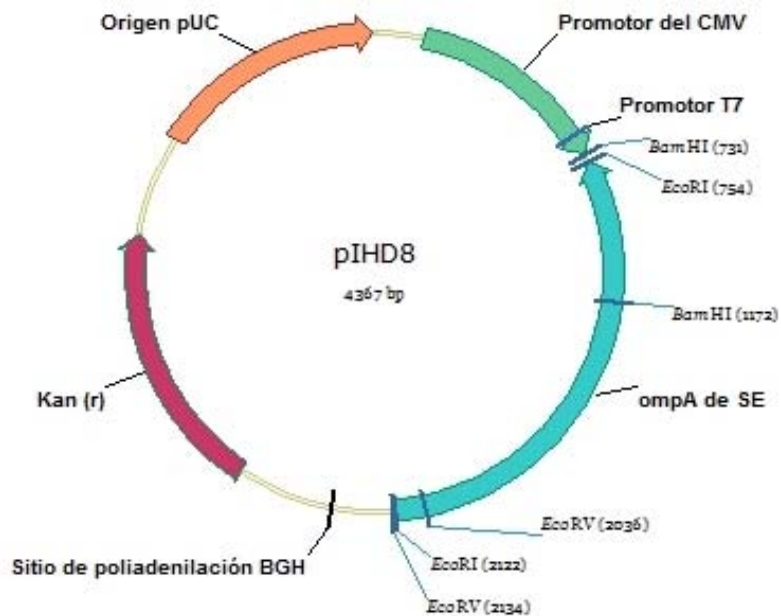


Figura 5.5 Mapa del plásmido pIHD8. El plásmido está formado por el vector pVAX1 con el inserto *ompA-EcoRI*, en el cual el ORF del gen se clonó en dirección incorrecta de lectura con respecto a la dirección de lectura del promotor de CMV. Se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI*, *EcoRV* y *BamHI*.

una hora a 4°C y 10,000 X g, el líquido resultante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó ^L 20 min, a 18,000 X g y 4°C. El plásmido fue precipitado con 0.6 volúmenes de isopropanol ^{LI} y se centrifugó. La pastilla de ADN resultante fue lavada con 1 volumen (10 mL) de etanol ^{LII} frío al 70%. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 500 µL de amortiguador Tris-EDTA (TE) (Anexo 2). Los plásmidos fueron purificados mediante lavados con fenol-cloroformo ^{LIIS}.

5.12. INOCULACIÓN DE LA VACUNA DE ADN pIHD28 A GALLINAS DE POSTURA.

Se utilizaron 40 gallinas de la línea comercial Bovans, de 25 semanas de edad. Se comprobó que las aves estuvieran libres de *Salmonella* sp mediante la prueba de aglutinación en placa con el antígeno K polivalente ^{LIIIS}. Las aves fueron alojadas en la unidad de aislamiento del animalario del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

Se evaluó el efecto de la vacunación y la revacunación (V+R) utilizando la vacuna de ADN pIHD428 (grupos experimentales) y el plásmido pVAX1 (grupos controles) en dos formas de inoculación: intradérmica (ID) e intramuscular (IM), lo que generó 4 tratamientos. Para cada uno de ellos se consideró que la unidad experimental fue una gallina y el número de repeticiones fue igual a 10.

^L Beckman, mod. J2-21, Rotor JA-10, USA

^{LI} J.T. Baker, México

^{LII} Merck®, Alemania

^{LIIIS} PRONABIVE

Las 40 gallinas fueron agrupadas en cada uno de los 4 tratamientos, con base en el diseño experimental completamente aleatorizado ¹¹⁶; a continuación se describen:

Tratamiento 1 (T1). Control/ inoculación intradérmica. 10 gallinas fueron inoculadas con 300 µg de plásmido pVAX1 por vía intradérmica en el pliegue del ala.

Tratamiento 2 (T2). Control/ inoculación intramuscular. 10 gallinas fueron inoculadas con 300 µg de plásmido pVAX1 por vía intramuscular en el músculo pectoral.

Tratamiento 3 (T3). Grupo experimental/ inoculación intradérmica (ID). 10 gallinas fueron inoculadas con 300 µg de vacuna de ADN pIHD28 por vía intradérmica en el pliegue del ala.

Tratamiento 4 (T4). Grupo experimental/ inoculación intramuscular (IM). 10 gallinas fueron inoculadas con 300 µg de vacuna de ADN pIHD28 por vía intramuscular en el músculo pectoral.

Los animales se vacunaron el día 0 y se revacunaron el día 21 del experimento.

En el **Cuadro 5.3** se muestran los cuatro tratamientos utilizados y en la **Cuadro 5.4** se resumen las actividades realizadas a lo largo del experimento.

Vacuna (V + R)	Vía de Inoculación (VI)	
	Intradérmica (ID)	Intramuscular (IM)
pVAX1 (Grupos control)	T1 (300 µg)	T2 (300 µg)
pIHD428 (Grupos experimentales)	T3 (300 µg)	T4 (300 µg)

Cuadro 5.3 Diseño experimental. Esquema del diseño experimental para la vacunación (V+R) de las unidades experimentales, donde se utilizó el plásmido pIHD428 como vector vacunal (experimental) y el pVAX1 como control negativo de la vacunación, además se probaron por dos diferentes vías de inoculación (VI), intradérmica (ID) e intramuscular (IM). Se inocularon 300 µg de plásmido a cada gallina.

ACTIVIDAD \ DÍA	0	21	28	32	46
Vacunación	X	X			
Aglutinación	X *	X *	X *		
Desafío				X **	
Sacrificio					X ***
Colección de órganos					X
Muestreo de huevo				A partir del desafío y hasta el final, cada tercer día.	
Monitoreo de la producción de huevo	Durante todo el experimento				

Cuadro 5.4 Cronograma del diseño experimental. Cuadro donde se muestran las actividades realizadas durante el experimento. * Antígeno K polivalente, ** 2.3×10^9 UFC de SE, *** dislocación cervical.

5.13. VARIABLES ESTUDIADAS DURANTE EL EXPERIMENTO

Con la finalidad de evaluar la respuesta inmunitaria protectora conferida a las gallinas después de la vacunación con el pHD428 y ante el desafío con SE patógena, se midieron las siguientes variables:

5.13.1. UFC de SE/g de órgano

En la **Figura 5.6** se resume la metodología que se siguió para medir la cantidad de UFC/g de órgano, de SE en hígado, bazo y ovario.

Metodología

- a. **Colección de órganos:** el día 32 del experimento, los animales fueron desafiados con una suspensión de SE viva patógena por vía oral y con un título de 2.3×10^9 UFC/mL. Catorce días después las aves fueron sacrificadas mediante dislocación cervical de acuerdo con las especificaciones del *Manual de manejo de animales de laboratorio*¹¹⁷ y de la NOM-062-ZOO-1999¹¹⁸. De cada ave se colectó el bazo, hígado y ovarios y fueron utilizados como unidades de observación.
- b. **Procesamiento de los órganos colectados:** los órganos se congelaron a -20° C hasta su utilización. Para trabajarlos, primero se pesaron y con base en su peso, se hizo una dilución 1/10 de todo el órgano con solución salina fisiológica estéril (SSF). Posteriormente fueron triturados por compresión, de manera que se hiciera una suspensión, de la cual se pudiera tomar 1 mL. El mililitro obtenido fue sembrado en 9 mL de caldo selenito. Los cultivos fueron incubados a 42° C durante 18 h. Pasado el tiempo de incubación, se tomó 1 mL del

cultivo y a partir de él, se hicieron diluciones décuples seriadas con SSF, de 10^{-4} hasta 10^{-7} . De las diluciones, se tomaron 100 μL , y se plaquearon en agar verde brillante (VB). Dichos cultivos fueron incubados a 37°C durante 24 h. Una vez incubados se hizo el conteo de UFC. Todos los órganos se trabajaron por duplicado.

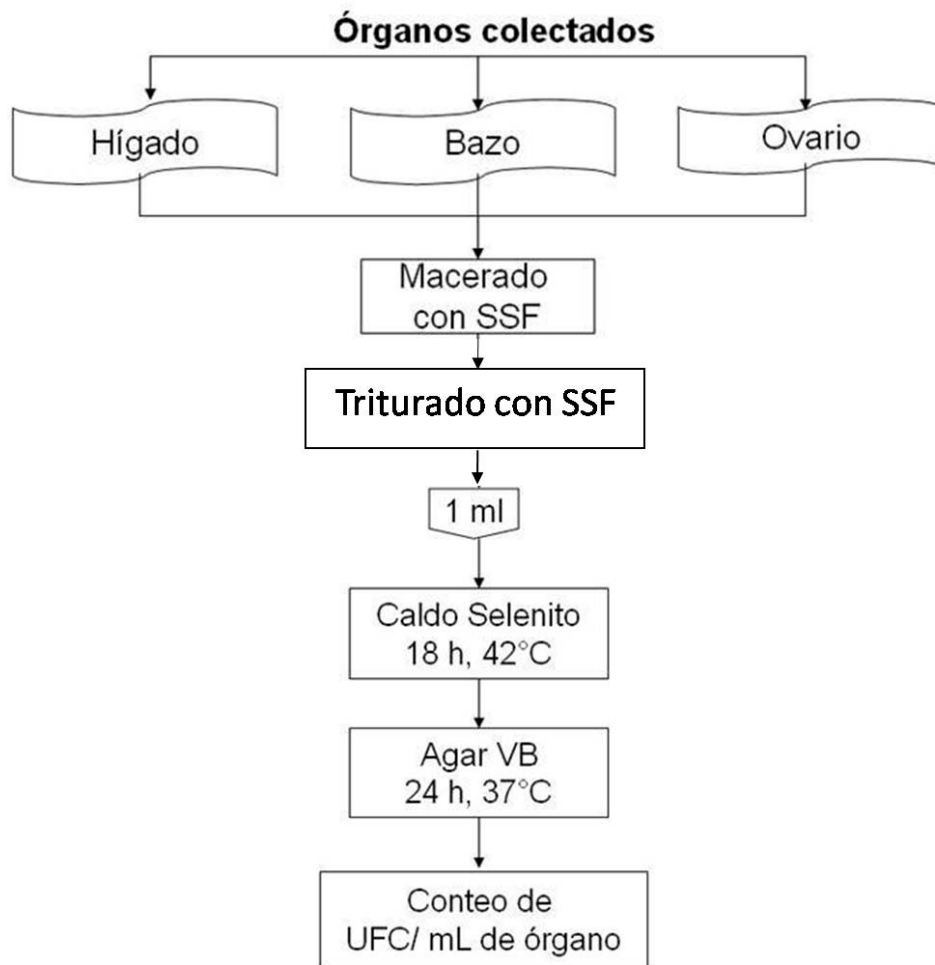


Figura 5.6 Evaluación de hígado, bazo y ovario. Diagrama de flujo en donde se ilustra la metodología utilizada para la evaluar la cantidad de UFC/g, a partir de hígado, bazo y ovario, expresada en UFC/g de órgano

- c. **Análisis estadístico:** Para analizar los resultados de los cuatro tratamientos, donde la unidad de análisis fue UFC/g de órgano se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, basada en intervalos^{LIV, 119}

5.13.2. Presencia de SE en intestino

En la **Figura 5.7** se resume la metodología utilizada para aislar SE a partir de muestras de intestino.

Metodología:

- a. Al momento del sacrificio, también se tomaron muestras de intestino delgado, con la finalidad de determinar si había presencia de SE y de ésta manera inferir su eliminación en heces.
- b. Los intestinos se trabajaron de la siguiente manera: se tomó 1 g de intestino de cada muestra y se sembró en 9 mL de caldo selenito. Los cultivos fueron incubados a 42° C durante 18 horas, posteriormente se tomó una asada del caldo selenito y se sembró en agar MacConkey (McC) y VB. Las cajas de Petri con agar se incubaron a 37° C durante 24 h. Se buscaron colonias lactosa negativas como sugerentes a *Salmonella* sp y posteriormente se tipificaron bioquímicamente utilizando las pruebas de: TSI, SIM, citrato, urea, LD, OD, arginina y ONPG.

^{LIV} Por intervalo de una observación se entiende lo siguiente. Sean n observaciones x_1, x_2, \dots, x_n , si las observaciones se ordenan de menor a mayor valor, el intervalo de una observación es la posición que ocupa esa observación en la muestra ordenada.

Ejemplo: Muestra: 20 (1), 30 (2), 15 (3)
M. ordenada: 15 (3), 20 (1), 30 (2)
Intervalo: 3, 1, 2

5.13.3 Presencia de SE en huevo

En la **Figura 5.7** se resume la metodología utilizada para determinar la presencia de SE en huevo.

Metodología:

- a. A partir del desafío se tomaron 2 huevos de cada grupo experimental cada tercer día. Los huevos fueron lavados con agua y jabón. Posteriormente se desinfectaron con alcohol, a los 2 huevos se les rompió el cascarón y el contenido fue vaciado en un recipiente estéril, las claras y las yemas se homogenizaron y de ahí se tomó 1 mL para sembrarlo en 9 mL de caldo selenito, los cultivos se incubaron durante 18 horas a 42°C. Una vez pasado el tiempo de incubación se tomó una asada del caldo selenito y se sembró en agar McC y VB. Las cajas de Petri se incubaron a 37°C durante 24 h. Se buscaron colonias lactosa negativas como sugerentes a *Salmonella* sp y posteriormente se tipificaron bioquímicamente utilizando las pruebas anteriormente mencionadas.

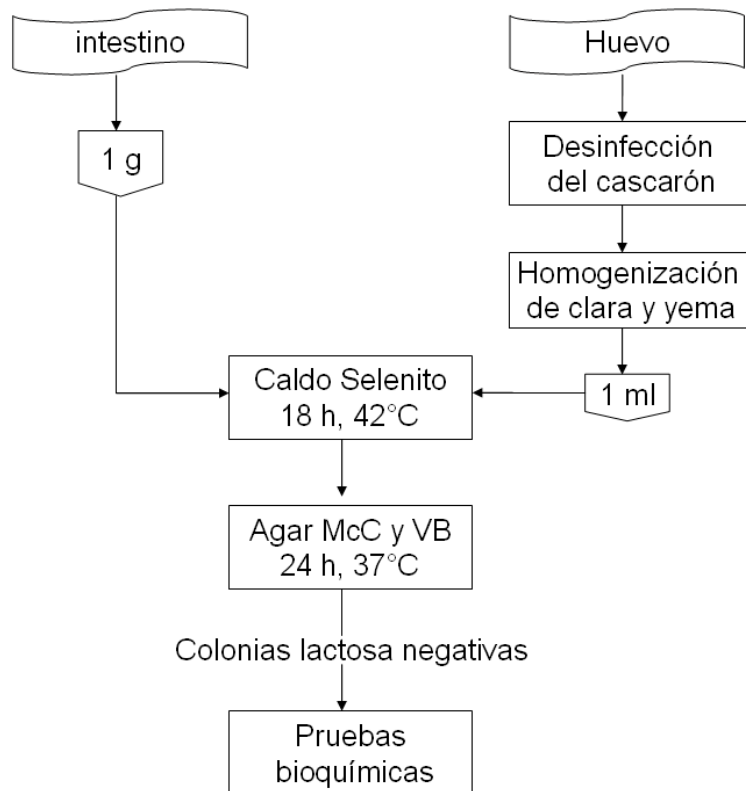


Figura 5.7 Evaluación de intestino y huevo. Diagrama de flujo en donde se muestra la metodología que se siguió para evaluar la presencia de SE en intestino y la de SE en huevo.

5.13.4 Detección de anticuerpos aglutinantes

Se determinó la presencia de anticuerpos capaces de dar una reacción de aglutinación positiva; donde la unidad de observación es la muestra de sangre de cada gallina y la unidad de análisis fue positivo o negativo.

Metodología:

- a. Los días 0, 21 y 28 del experimento, se tomaron muestras de sangre completa de la vena radial a todos los animales, para determinar la presencia de anticuerpos contra SE mediante aglutinación con el antígeno K polivalente^{LV, 135}.

^{LV} PRONABIVE

5.13.5 Producción de huevo a lo largo del experimento.

Metodología:

- a. La producción de huevo se registró diariamente para cada grupo experimental.
- b. Se determinó el porcentaje de postura semanal (PPS), basado en la ecuación propuesta por Quintana-López JA, 1978 ¹²⁰. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\text{PPS \%} = 100 * [(\text{Total de huevos por semana} / 7) / \text{número de gallinas}]$$

- c. Análisis estadístico: se compararon las proporciones de los porcentajes de postura semanal entre los cuatro grupos en estudio (Tx 1. Control/ vía intradérmica, Tx 2. control/vía intramuscular, Tx 3. vacuna + refuerzo/v. intradérmica, Tx 4. vacuna + refuerzo/v. intramuscular), esto es, se realizaron las comparaciones por parejas (tipo comparaciones múltiples de medias), resultando 6 comparaciones de proporciones ¹¹⁶. El estadístico de prueba fue el de Z_c ¹¹⁹. A manera de proteger el error por experimento α_E se utilizó el principio de Bonferroni, el cual consiste en dividir el nivel de significancia $\alpha=0.05$ entre el número de comparaciones **Error! Bookmark not defined.** lo cual resultó en un $\alpha_E=0.008$. Dado que la hipótesis a contrastar fue:

$$H_0: \pi_1 = \pi_2 \text{ vs } H_a: \pi_1 \neq \pi_2; \quad 1 \leq i \neq i' \leq 6$$

El $\alpha_c = 0.008$ se dividió nuevamente entre dos, por ser una prueba de dos colas, obteniéndose un $\alpha = 0.004$. En consecuencia, las tablas de la distribución normal estándar proporcionaron un valor crítico $Z_{(0.004)} = 2.71$

RESULTADOS

6.1 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA E IDENTIDAD DE LA CEPA DE *Salmonella enteritidis* (SE).

El cultivo de SE mostró ser puro ya que desarrolló colonias redondas, lisas, opacas, de borde entero y 2 mm de diámetro aproximadamente. Las pruebas bioquímicas realizadas, así como la prueba de BBL Crystal®, indican que la cepa de SE no se encontró contaminada y que además pertenece a *Salmonella enterica* del subgénero I, dentro del cual se encuentra SE. En el **Cuadro 6.1** se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	RESULTADO
Oxidasa	-
Lactosa	-
Crecimiento en agar McC	+
Crecimiento en agar VB	+
TSI	Reacción 2
SIM	+/-/+
Citrato	+
Urea	-
Lisina	+
ONPG	-
Arginina	-
Dulcitol	+

Cuadro 6.1 Tipificación bioquímica de SE. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa de SE.

6.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE SE

En la **Figura 6.1** se muestra el ADN genómico de la cepa de SE. El rendimiento, a partir de 2.25 mL de cultivo bacteriano, fue de 975 ng/ μ L de ADN.

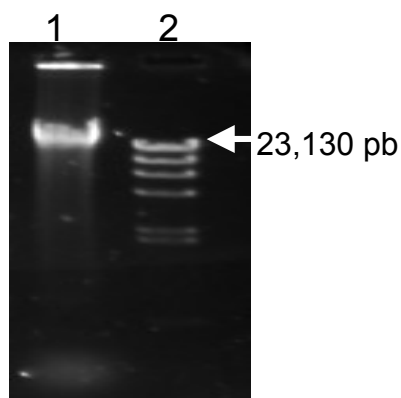


Figura 6.1 ADN genómico de SE. Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el ADN genómico de SE. Carril 1: ADN genómico de SE, carril 2: marcador de peso molecular λ Hind III.

6.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *ompA* DE SE

En la PCR se amplificó un fragmento de 1350 pb aproximadamente, que corresponde con el esperado del gen *ompA* de SE. Con base en el diseño de iniciadores y en la secuencia del gen *ompA* de ST (GeneBank: X02006), dicho fragmento contiene la secuencia para el péptido señal y el sitio Kozak, como se muestra en el **Cuadro 5.1**

Como control positivo de la PCR, se amplificó una secuencia del gen *sopE* de *Salmonella* sp que tiene un tamaño aproximado de 700 pb. Los productos de amplificación de la PCR, *ompA* y *sopE*, se muestran en la **Figura 6.2**

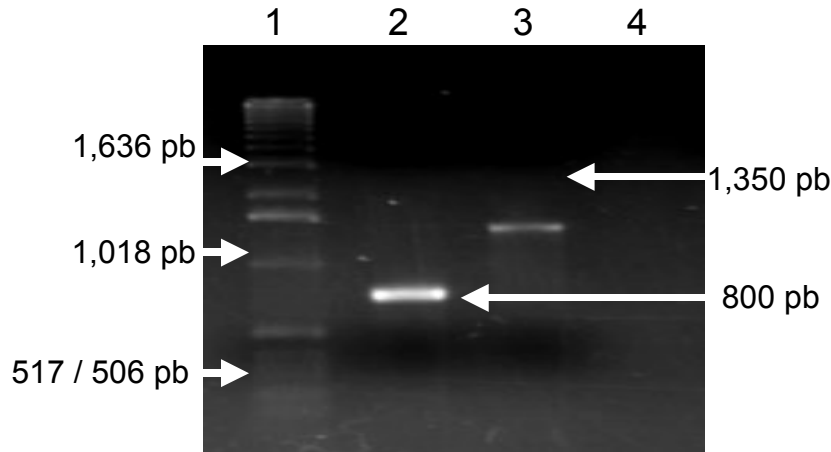


Figura 6.2 Producto de la PCR para *ompA*. Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra la amplificación del gen *ompA* de SE. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2: control positivo *sopE* de SE, carril 3: *ompA* de SE, carril 4: control negativo.

6.4 CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR EN EL VECTOR pCR2.1 TOPO

Se seleccionaron colonias blancas de las células TOP10F' transformadas con el vector pCR2.1 TOPO TA. A partir de las clonas seleccionadas, se extrajeron plásmidos con el método de lisis alcalina y se les realizó un análisis de restricción; los productos de la digestión fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%, en amortiguador TAE. Con la enzima *EcoR1*, se visualizaron dos fragmentos, uno de ellas de 1368 pb aproximadamente que correspondió al producto de PCR de *ompA*, el otro fragmento correspondió al plásmido pCR2.1 en su forma linear, con un peso de 3913 pb. También se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *BamH1* y *EcoRV*, con la finalidad de determinar que el producto de PCR tuviera los sitios de restricción reportados para la secuencia del gen *ompA* de ST. Se obtuvieron dos plásmidos pIHM1, uno de ellos con el inserto clonado en dirección correcta de lectura y el otro en dirección inversa. Con la enzima *BamH1* se

obtuvieron dos fragmentos, uno de 4,300 pb y otra de 981 pb; para el plásmido con el inserto en dirección correcta de lectura. Con la misma enzima, pero para el plásmido con el inserto en dirección inversa de lectura, se obtuvieron dos fragmentos, uno de 4,832 pb y otro de 449 pb. Con *EcoRV* se obtuvieron dos fragmentos, uno de 3,991 pb y otro de 1,290 pb, para el plásmido en dirección correcta de lectura; para el plásmido con el inserto en dirección inversa, se obtuvieron dos fragmentos, uno de 5,183 pb y otro de 98 pb.

Estos resultados fueron comparados con la simulación electrónica del patrón electroforético de las digestiones enzimáticas, el cual se muestra en la **Figura 6.3**. Así mismo, en la **Figura 6.4** se muestra el gel de agarosa en el que se visualizaron las digestiones enzimáticas del plásmido.

Con base en estos resultados se confirma la amplificación del gen *ompA* de SE, así como su clonación en el vector pCR2.1, con lo que se obtuvo el plásmido pIHM1, a partir del cual se obtuvo el fragmento *ompA-EcoRI*, mediante la digestión del plásmido con la enzima *EcoRI*.

6.5 CLONACIÓN DEL PRODUCTO *ompA-EcoRI* EN EL VECTOR pVAX1®

El gen *ompA* de SE, flanqueado por sitios de corte *EcoRI*, se subclonó en el vector pVAX1, de tal manera que se obtuvieron dos plásmidos, pIHD428 y pIHD8, los cuales contenían el gen *ompA* en dirección correcta de lectura y dirección inversa de lectura, respectivamente, con respecto a la localización del promotor de citomegalovirus (CMV) del pVAX1.

Para determinar la dirección del ORF se diseñó un ensayo de restricción con las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *EcoRV* y se obtuvo una simulación electrónica del patrón electroforético de las digestiones enzimáticas. Dicho resultado se muestra en la **Figura 6.5**. Para el plásmido pIHD428 (ORF en dirección correcta de lectura), la digestión con la enzima *EcoRV* generó dos fragmentos, uno de 1,290 pb y la otro de 3,077 pb; la digestión con *BamHI* generó dos fragmentos uno de 973 pb y otro de 3,394 pb; la digestión con *EcoRI* generó dos fragmentos, un de 1,368 pb correspondiente al fragmento *ompA-EcoRI* y el otro de 2,999 pb correspondiente al pVAX1. En el caso de la digestión del plásmido pIHD8 (ORF en dirección inversa de lectura), la digestión con la enzima *EcoRV* generó dos fragmentos, uno de 98 pb y otro de 4,269 pb; con la digestión con *BamHI* se obtuvieron dos fragmentos, uno de 441 pb y otro de 3,926 pb; la digestión con *EcoRI* fue igual que para el pIHD428.

Después de digerir los plásmidos, los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, con amortiguador TAE. En la **Figura 6.6** se muestra la foto de un gel donde se corroboran los resultados provenientes de la predicción electrónica de la digestión de los plásmidos y se puede observar el patrón electroforético real de las digestiones de los plásmidos pIHD428 y pIHD8, el cual coincide con el esperado.

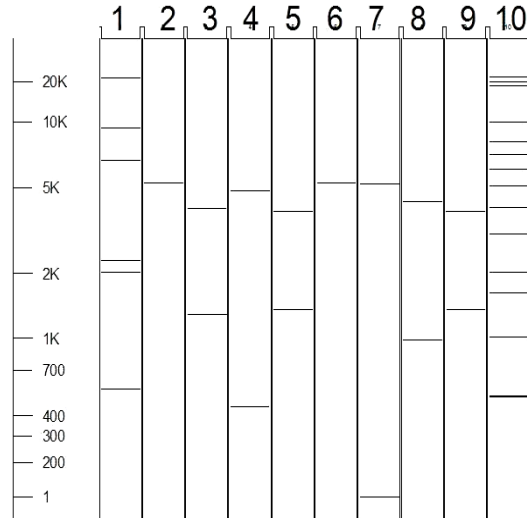


Figura 6.3 Predicción del análisis de restricción del pIHM1. Carril 1: marcador de peso molecular Lambda *Hind* III, carril 2: pIHM1 sin digerir, carriles 3 a 5: pIHM1 con el inserto *ompA* clonado en dirección correcta de lectura, el plásmido fue digerido con las enzimas *EcoRV*, *Bam*HI y *EcoRI*, respectivamente; carril 6: pIHM1 sin digerir, carriles 7 a 9: pIHM1 con el inserto *ompA* en dirección inversa de lectura, digerido con las mismas enzimas y mostrado en el mismo orden; carril 10: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder

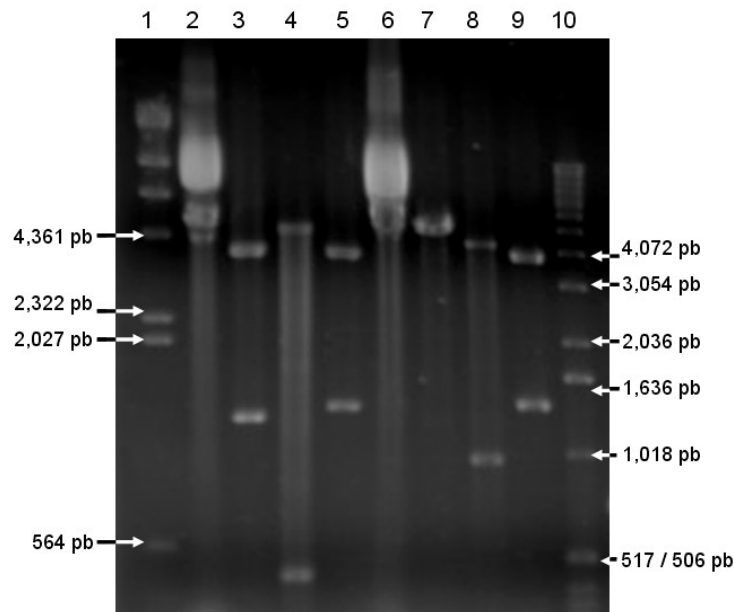


Figura 6.4 Análisis de restricción del pIHM1. Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el análisis de restricción del plásmido pIHM1. Carril 1: marcador de peso molecular Lambda *Hind* III, carril 2: pIHM1, carriles 3 a 5: pIHM1 con el inserto *ompA* clonado en dirección correcta de lectura, el plásmido fue digerido con las enzimas *EcoRV*, *Bam*HI y *EcoRI*, respectivamente; carril 6: pIHM1, carriles 6 a 9: pIHM1 con el inserto *ompA* en dirección inversa de lectura, digerido con las mismas enzimas y mostrado en el mismo orden; carril 10: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder

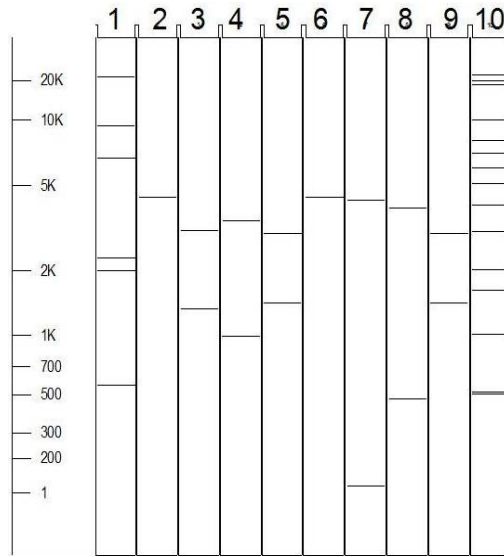


Figura 6.5 Predicción del análisis de restricción de pIHD428 y pIHD8. Carril 1: marcador de peso molecular Lambda *Hind* III, carril 2: pIHD428 sin digerir, carril 3: pIHD428 digerido con *EcoRV*, carril 4: pIHD428 digerido con *Bam*HI, carril 5: pIHD428 digerido con *EcoRI*, carril 6: pIHD8 sin digerir, carril 7: pIHD8 digerido con *EcoRV*, carril 8: pIHD8 digerido con *Bam*HI, carril 9: pIHD8 digerido con *EcoRI* y carril 10: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder

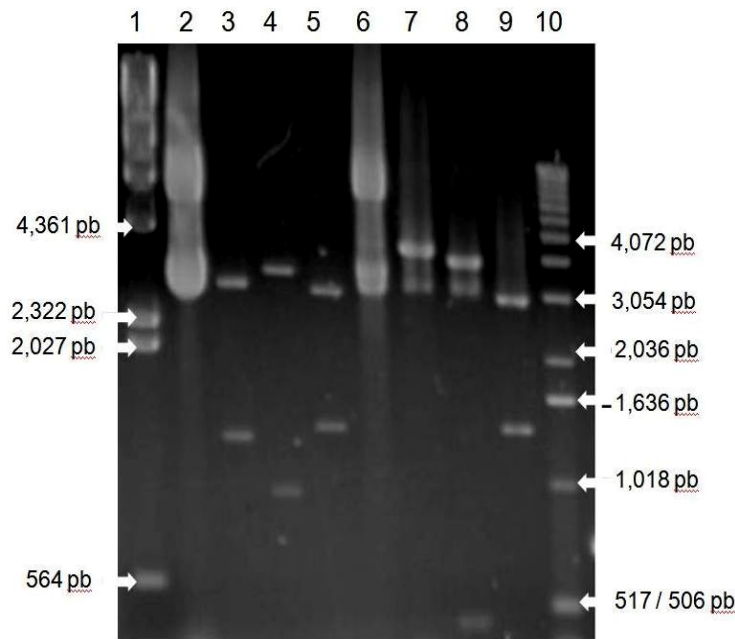


Figura 6.6 Análisis de restricción de pIHD428 y pIHD8. Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el análisis de restricción de los plásmidos pIHD428 y pIHD8. Carril 1: marcador de peso molecular Lambda *Hind* III, carril 2: plásmido pIHD428, carril 3: pIHD428 digerido con *EcoRV*, carril 4: pIHD428 digerido con *Bam*HI, carril 5: pIHD428 digerido con *EcoRI*, carril 6: plásmido pIHD8, carril 7: pIHD8 digerido con *EcoRV*, carril 8: pIHD8 digerido con *Bam*HI, carril 9: pIHD8 digerido con *EcoRI* y carril 10: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder

6.6 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pVAX1 y pIHD428

Los plásmidos, pIHD428 y pVAX1, fueron obtenidos a través del método de mega extracción por lisis alcalina. El rendimiento de plásmido obtenido por litro de cultivo fue de 2 mg para el plásmido pIHD428 y 3 mg del plásmido pVAX1.

Posteriormente los plásmidos se purificaron con fenol-cloroformo. En la **Figura 6.7** se muestran los productos de la extracción de los plásmidos, así como su estado, posterior a la purificación con fenol cloroformo.

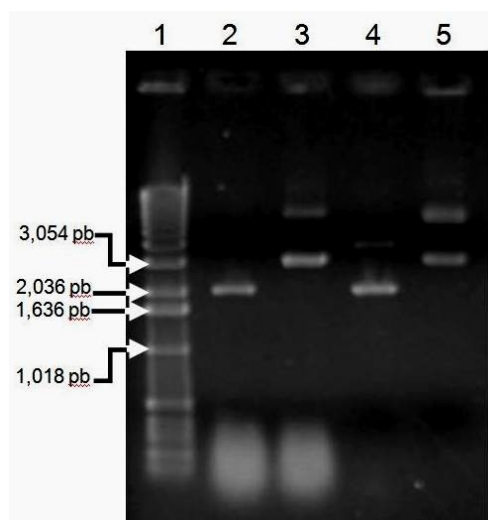


Figura 6.7 Purificación de los plásmidos pVAX1 y pIHD428. Fotografía de un gel de agarosa al 1% donde se muestra la extracción de plásmidos utilizados para la inoculación, así como su purificación. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder, carril 2: plásmido pVAX1 , carril 3: plásmido pIHD428, carril 4: pVAX1 purificado con fenol cloroformo, carril 5: pIHD428 purificado con fenol cloroformo.

6.7 VARIABLES ESTUDIADAS DURANTE EL EXPERIMENTO

6.7.1 UFC de SE/g de órgano

Para determinar la cantidad de UFC de SE en órganos, se cultivaron muestras de hígado, bazo y ovario de cada gallina de cada grupo experimental. En el **Cuadro**

6.2 se muestran los resultados de los aislamientos de SE de los cuatro grupos experimentales, para hígado, bazo y ovario.

Para hígado: en el tratamiento 1 (control/v. intradérmica) se aisló SE de 2 gallinas, en el tratamiento 2 (control/v. intramuscular) no se aisló SE de ninguna gallina, en el tratamiento 3 (vacuna + refuerzo/v. intradérmica) se aisló SE de una gallina y en el tratamiento 4 (vacuna + refuerzo/v. intramuscular) se aisló SE de una gallina.

Para bazo: en el tratamiento 1 (control/v. intradérmica) se aisló SE de 1 gallina, en el tratamiento 2 (control/v. intramuscular) se aisló SE de una gallina, en los tratamientos 3 (vacuna + refuerzo/v. intradérmica) y 4 (vacuna + refuerzo/v. intramuscular) no se aisló SE de ninguna gallina.

En ovario, no se aisló SE de ninguna muestra de ninguno de los tratamientos.

El análisis estadístico de los resultados, se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, basada en intervalos, la cual no detectó diferencia significativa entre los cuatro tratamientos en estudio ($P \leq 0.05$). (Anexo 3)

Tratamiento	Hígado		Bazo		Ovario	
	Identificación del animal	UFC/g (x 10 ⁶)	Identificación del animal	UFC/g (x 10 ⁶)	Identificación del animal	UFC/g (x 10 ⁶)
1 Control/ vía intradérmica	381	1,000	380	150	_____	0
	371	1,484				
2 Control/ vía intramuscular	_____	0	7	1,085	_____	0
	_____	0	10	871		
3 Experimental/ intradérmica	398	1,468	_____	0	_____	0
4 Experimental/ intramuscular	388	4.5	_____	0	_____	0

Cuadro 6.2 UFC de SE/g de órgano. Resultados de la cuantificación de UFC de SE por gramo de órgano para hígado, bazo y ovario, en los cuatro tratamientos.

6.7.2 Presencia de SE en intestino

Se determinó si SE fue eliminada en heces, mediante el aislamiento del microorganismo a partir de intestino. Únicamente una muestra de intestino resultó positiva y correspondió a una gallina del tratamiento 3 (Vacuna + refuerzo/v. intradérmica).

6.7.3 Presencia de SE en huevo

Ninguna de las muestras procesadas fué positiva a SE.

6.7.4 Detección de anticuerpos aglutinantes

No se observó reacción de aglutinación en ninguna de las gallinas de los 4 tratamientos, a los 0, 21 y 28 días.

6.7.5 Producción de huevo a lo largo del experimento.

Se determinó el porcentaje de postura semanal (PPS) para cada grupo experimental durante las 6 semanas que duró el experimento. En la **Figura 6.8** se muestra el porcentaje de postura semanal, del comportamiento registrado para cada tratamiento.

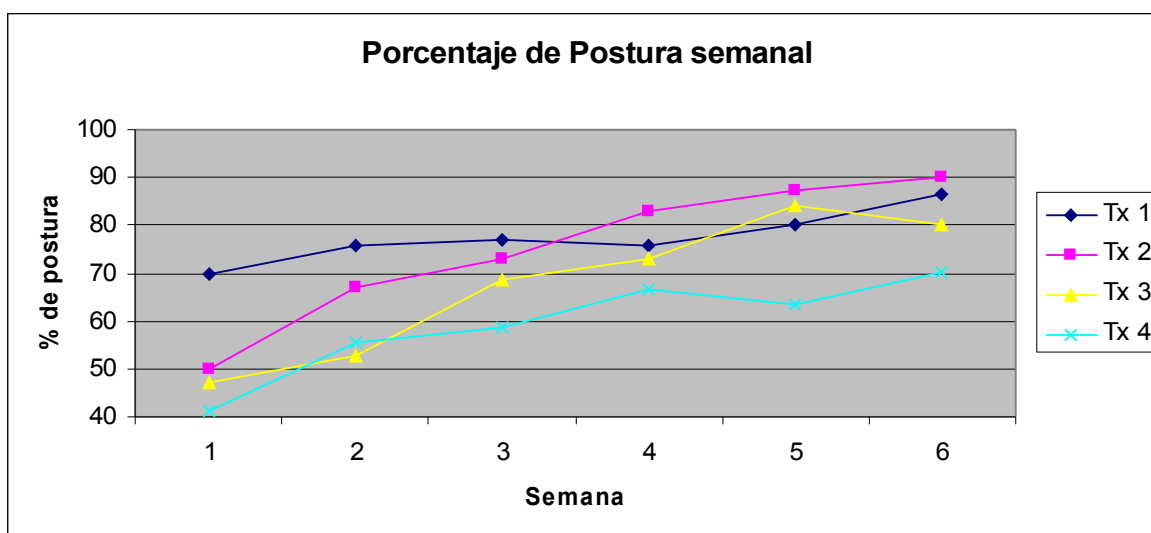


Figura 6.8 Producción de huevo. Gráfica en el que se muestra la producción de huevo durante el experimento, expresado en porcentaje de gallinas que pusieron huevo en cada semana, para cada uno de los cuatro tratamientos; donde Tx 1 = control/v. intradérmica, Tx 2 = control/v. intramuscular, Tx 3 = vacuna + refuerzo/v. intradérmica y Tx 4 = vacuna + refuerzo/v. intramuscular.

En la gráfica se observa un comportamiento productivo ascendente dentro de los cuatro tratamientos, hasta las 3 semanas del experimento, para la cuarta semana los tratamientos siguen el mismo comportamiento excepto el tratamiento 1 (control/v. intradérmica). En la quinta semana el PPS se mantiene ascendente excepto para el tratamiento 4 (vacuna + refuerzo/v. intramuscular). En la sexta semana los cuatro tratamientos continuaron aumentando el PPS. En general, los tratamientos control 1 y 2 tuvieron un mayor PPS que los tratamientos 3 y 4. El tratamiento con menor PPS a lo largo del experimento fue el 4.

Utilizando el análisis estadístico basado en comparaciones las proporciones de los cuatro grupos en estudio, no se encontró diferencia significativa entre los cuatro tratamientos con respecto al porcentaje de postura registrado a lo largo del experimento ($P \leq 0.05$). (Anexo 3)

DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrolló una vacuna de ADN contra la proteína de membrana externa OmpA de *Salmonella enteritidis* y se evaluó el efecto protector en gallinas de postura ante un desafío con SE patógena; con las condiciones experimentales utilizadas, no se logró demostrar un efecto protector manifiesto.

La vacuna de ADN se fabricó utilizando el vector comercial pVAX1®, el cual es un plásmido que contiene la información genética necesaria para dirigir la expresión correcta de una proteína exógena, dentro de una célula eucariótica, debido a que posee un promotor de Citomegalovirus (CMV) humano. Existen diversos experimentos en donde se demuestra la expresión de una proteína exógena, en células eucarióticas, a partir de plásmidos que contienen dicho promotor ^{108,121,122,123,124,125,126,127}. En el caso específico del pVAX1, Rout y col. elaboraron una vacuna de ADN contra el virus del Síndrome de la Mancha Blanca en camarones y demostraron la expresión de las proteínas virales VP15, VP28, VP35 y VP281 en células CHO ¹²¹.

En un estudio realizado por Natesan y col. ¹²², en donde se evaluó el efecto antineoplásico de la apoptina viral del virus de la anemia de las aves, se utilizó el pVAX1 como vector para la expresión de dicha proteína exógena. Los experimentos demostraron la expresión de la apoptina viral en fibroblastos de embrión de pollo, así como el efecto antineoplásico de esta proteína *in vivo*, en pollos inoculados con el plásmido recombinante. Dicho resultado es importante,

debido a que es el único trabajo en donde se demuestra la eficacia del pVAX1 en modelos aviares, además de que sirvió como antecedente para inferir la expresión de proteínas exógenas en células de ave, utilizando este plásmido, debido a que en el presente trabajo no se determinó la expresión del gen *ompA*. Para experimentos posteriores, se sugiere demostrar la expresión del gen *ompA* clonado en el Vector pVAX1, en fibroblastos de embrión de pollo.

En aves se han desarrollado vacunas de ADN contra patógenos virales, como es el caso de la hemaglutinina viral del virus de influenza ¹²⁸ y la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle ¹²⁹. Los resultados de estos experimentos mencionan una protección de 60 y 80%, respectivamente, ante un desafío con el virus patógeno. El índice de protección en estos trabajos, fue evaluado a través del número de animales que sobrevivieron ante un desafío letal.

En el presente trabajo se elaboró y evaluó una vacuna de ADN contra un patógeno bacteriano, por lo cual la respuesta inmune que se desencadena, así como la evaluación de la misma, es más compleja ⁶⁹.

El índice de protección se evaluó mediante la cuantificación de las UFC/g de órgano, a partir de hígado, bazo y ovario, después del desafío. Debido al nivel de bioseguridad de nuestro laboratorio y del animalrario, la cepa utilizada para el desafío, fue SE FT 13a, uno de los fagotipos menos virulentos para las aves y para el humano ^{7, 25}; razón por la cual el índice de colonización de órganos estuvo por debajo del 30% de los animales de los grupos control. En otras

investigaciones, en las que se ha desafiado con cepas de *Salmonella* patógenas o resistentes a algún antibiótico, como el ácido nalidíxico, se ha logrado un porcentaje de recuperación del microorganismo hasta del 100%^{61,94,130,131}. Es el caso de la evaluación de la eficacia de la cepa vacunal R9 realizada por Lee y col.¹³² en donde al desafiar a las gallinas que no fueron vacunadas, con una cepa silvestre de *Salmonella gallinarum*, lograron el reaislamiento en un 95 y 100% de las muestras de hígado y bazo. De manera similar, Gantois y col.⁶², al evaluar la protección conferida a aves de postura por una bacterina emulsionada de SE, recuperaron a la cepa de SE de desafío, en un 80% de las muestras de bazo de las aves no vacunadas. Por lo tanto, se propone realizar otros experimentos de desafío de aves vacunadas con el pHD428, utilizando una cepa de SE más virulenta o una cepa resistente al ácido nalidíxico.

Estadísticamente, no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el índice de protección, entre lo grupos vacunados y los controles, evaluado mediante el conteo de UFC/g de órgano (hígado, bazo y ovario) de SE. Sin embargo, en el caso de bazo, no hubo aislamiento del microorganismo a partir de animales vacunados; contrario a los grupos controles en los que se aisló SE en una muestra del tratamiento 1 (Control/vía intradérmica) y en dos muestras del tratamiento 2 (Control/vía intramuscular) (Cuadro 3.2). Estos resultados sugieren una evaluación posterior de la vacuna elaborada con diferentes condiciones experimentales, ya que diversas investigaciones han demostrado que la vacunación contra SE disminuye la colonización de órganos internos^{60,62,132}.

En el caso de ovario, la cepa de SE FT13a fue incapaz de colonizar este órgano, en las condiciones experimentales que se utilizaron en este trabajo, ya que no se logró reaislar la cepa de desafío, en ninguno de los animales. En contraste, se han reportado otros experimentos en donde se demuestra la colonización de ovario por SE, en donde se han utilizado los fagotipos 4 y 8 ^{8,10,22}.

Cabe mencionar que la resistencia natural de algunas líneas de aves comerciales, afecta la colonización de los órganos internos ^{132, 133}. En un estudio realizado por Van Hemert y col. ¹³⁴ se menciona la mayor susceptibilidad de las líneas ligeras de gallinas de postura a la infección con SE, en contraste con las líneas pesadas para producción de carne. En los experimentos realizados se observa un 40 y 90% de colonización del hígado en la línea pesada y ligera, respectivamente, de una cepa patógena de SE. Así mismo, dentro de las líneas de gallinas para postura, se ha demostrado diferente grado de susceptibilidad a la infección con SE ¹³⁵. En éste trabajo, se utilizó la línea Bovans, de la cual no existen reportes con respecto a su resistencia natural a la infección con SE. Con base en los resultados obtenidos, se propone evaluar la resistencia natural de esta estirpe de ave a la infección con *Salmonella* dado que los resultados obtenidos lo sugieren.

Numerosos estudios han demostrado la colonización del ovario y la consecuente contaminación del huevo con SE ^{8, 9, 10, 11, 12}. Sin embargo, esto depende en gran medida de la virulencia de la cepa, como se mencionó anteriormente. Aunque en muchas investigaciones se ha aislado al

microorganismo a partir de huevo, hay una discrepancia significativa con grupos de investigación en los que no se ha logrado aislar ^{9, 18, 134}. Un ejemplo de ello, es un estudio en Polonia donde, en un primer muestreo de 400 huevos, no se aisló SE; pero en un segundo muestreo de 300 huevos, se recuperaron 3 cepas a partir del cascarón ¹⁸; en México, Mancera y col. realizaron un estudio en el que evaluaron 400 huevos de diferentes fuentes, de los cuales, sólo obtuvieron un aislamiento de SE que no se logró fagotipificar ¹². En el presente trabajo, no se obtuvo ningún aislamiento de la cepa de desafío, a partir de la mezcla de clara y yema, con lo cual se hace evidente la incapacidad de la cepa de desafío para colonizar ovario y contaminar el huevo.

Los animales infectados son los principales reservorios del microorganismo, ya que éste se disemina, principalmente, por heces contaminadas. Se ha comprobado la disminución de la eliminación de SE a través de heces, en gallinas previamente vacunadas ^{34, 61, 62}. En un estudio realizado por Gantois y col, al desafiar gallinas previamente vacunadas contra SE, no se aisló al microorganismo a partir de ninguna muestra de ciego, en muestreos realizados semanalmente durante tres semanas pos-desafío ⁶². En el presente trabajo, no se aisló el microorganismo de ninguno de los animales, únicamente de una gallina del grupo experimental inoculada por vía intradérmica. Se requieren otros experimentos, en donde los muestreos de heces se realicen a diferentes tiempos pos- infección, para determinar si la vacuna de ADN elaborada, reduce la eliminación del microorganismo por heces.

Durante el periodo de inmunización, fueron tomadas muestras de sangre a los 21 y 28 días, con la finalidad de detectar anticuerpos aglutinantes. En el presente trabajo, no se detectó la presencia de anticuerpos aglutinantes en ninguno de los dos muestreos. El método de aglutinación en placa, es el método de diagnóstico oficial para la tifoidea aviar ¹³⁵; este método detecta anticuerpos que reaccionen contra estructuras como la cápsula y el LPS. La respuesta a la vacunación con el pHD428, no generó anticuerpos anti-LPS, debido a que el antígeno que se expresa en las células transfectadas es OmpA. Dicho resultado evidencia que la vacunación con el pHD428 no induce la producción de anticuerpos detectables mediante la prueba de aglutinación en placa utilizando el antígeno K polivalente, hecho que sugiere que la vacunación con este plásmido no interfiere con el diagnóstico de tifoidea aviar.

La vacunación mediada por ADN, es capaz de inducir inmunidad humoral y celular ^{104, 105, 106, 110, 136, 137}; ésto depende del mecanismo de procesamiento de antígeno, el cual está estrechamente ligado con el tipo de células que fueron transfectadas en el momento de la inmunización. En caso de que una célula presentadora de antígeno sea transfectada, el antígeno será procesado tanto por vía endógena como por la vía exógena; con lo que se inducirán respuestas inmunitarias Th1 y Th2, respectivamente. Si fuese una célula somática la que captara al plásmido, la respuesta inmunitaria que se desencadena sería celular. Sin embargo, en este trabajo no se evaluó la respuesta inmunitaria y el no haber detectado presencia de anticuerpos aglutinantes, no significa que no hubo desarrollo de respuesta inmunitaria, por lo cual, se sugiere evaluar la respuesta

inmune celular generada por la aplicación del pIHD428, mediante ensayos de proliferación de células T y evaluar la respuesta inmune humoral mediante ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*), utilizando OmpA recombinante, como antígeno de captura. Otro indicador del tipo de respuesta inmunitaria producida y de su intensidad, es evaluar el patrón de citocinas producidas por células T y macrófagos.

La evaluación de la eficacia del vector pIHD428, se hizo mediante la aplicación del plásmido en gallinas de postura, con la utilización de dos vías de inoculación, intradérmica e intramuscular. Las vacunas de ADN han sido probadas con diferentes vías de inoculación, intramuscular, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal, tópica ^{108, 110, 136, 137}. De las diferentes vías, la intradérmica es la que ha mostrado tener mayor efecto sobre el desarrollo de respuesta inmunitaria, en segundo lugar se encuentra la vía intramuscular ^{108, 137}, Pokorna y col., utilizaron el tatuado como método de vacunación intradérmica, y compararon ésta vía con la intramuscular. Observaron que hay una mayor respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, en los grupos de ratones vacunados, con la aplicación intradérmica de la vacuna ¹³⁸. Con los resultados obtenidos en este trabajo no se encontró diferencia significativa entre los grupos experimentales, vacunados con las dos diferentes vías de inoculación. Sin embargo, se sugiere evaluar nuevamente el índice de protección utilizando la aplicación intradérmica, con un método de inoculación que asegure el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral y celular, como lo es el tatuado.

Se han descrito diversos métodos de aplicación de vacunas de ADN, tales como: inyección con aguja hipodérmica, inoculación con pistola de ADN y perlas de oro, electrotransfección *in vivo*, vía tópica, aerosoles y tatuaje. Cada una de ellas tiene una eficacia diferente para inducir una respuesta inmunitaria, lo cual depende del número de células transfectadas ^{106, 107, 108}. La más utilizada es la inyección con aguja hipodérmica; en un estudio realizado por Fynan E y col., se demostró que con la utilización de este método, se puede aumentar la sobrevivencia de ratones desafiados con virus de influenza, aunque su eficiencia sea menor a la de la pistola de ADN ¹¹⁰. En el presente trabajo se eligió este método de inoculación, debido a su bajo costo, la facilidad de aplicación y a la disponibilidad con que se podría utilizar a nivel de granja.

A cada gallina se le inocularon 300 µg de plásmido, esta dosis fue elegida con base en diferentes trabajos revisados ^{110, 112}. El intervalo de dosis descritas se encuentra entre 50 ng hasta 500 µg y éstas dependen, por un lado, de la especie destino y por otro, del método de inoculación. Algunos estudios mencionan que a mayor cantidad de plásmido inoculado, el índice de protección ante un desafío, es mayor ^{105, 106, 108}. En un estudio realizado en ratones y gallinas, en el que se inmuniza contra un tipo de hemaglutinina del virus de la influenza aviar, se demostró que a mayor dosis de plásmido, aumenta la sobrevivencia en los grupos vacunados ante un desafío con el virus patógeno. La dosis más alta utilizada en dicho trabajo, para inmunizar gallinas, fue de 300 µg de plásmido ¹¹⁰.

La cantidad de revacunaciones, así como la frecuencia de las mismas, es importante en la duración y la potencia de la inmunidad. Se ha demostrado que a mayor número de refuerzos, la inmunidad es más duradera y potente. Caso contrario con la frecuencia, en donde a mayor intervalo entre un refuerzo y otro, la inmunidad y su duración son mejores ^{106, 108, 110}.

En este trabajo se vacunó y se revacunó en una sola ocasión, lo cual de alguna manera limita la respuesta inmune a dos únicas dosis del vector y el intervalo entre cada una de ellas fue de 15 días. En otros estudios realizados con vacunas de ADN en gallinas, el intervalo entre cada vacunación fue de 30 días, con lo que se consiguió un índice de protección hasta del 100%. Se sugiere evaluar nuevamente la vacuna diseñada, con diferentes intervalos entre cada vacunación y con un mayor número de refuerzos.

Las gallinas se vacunaron a las 25 semanas de edad, cinco semanas después de romper postura, ya que se ha demostrado que el inicio de la postura es un factor importante de inmunosupresión. En la mayoría de las aves de líneas ligeras, dicho condición inicia entre las 18 y 22 semanas de edad, dependiendo del peso de las gallinas, la dieta y las horas luz. Una vez que las gallinas, rompen postura, inicia una fase de adaptación que compromete al sistema inmunológico, mismo que alcanza su homeostasis, cuando la gallina alcanza el pico de postura, el cual es entre las 22 y 25 semanas ^{138, 139, 140}.

Existen estudios en los que se evalúa la eficacia de bacterinas emulsionadas contra SE en aves jóvenes ^{61, 62, 96, 97}. Es el caso de Gantois y col. en el que se inmunizan aves de 6 semanas de edad y revacunan a las 16 semanas de edad ⁶². Así mismo, Gast y col. inmunizan pollitos de un día de edad ⁹⁷. En ambos experimentos se registraron índices de protección del 80 hasta 100% de las aves desafiadas. En el caso de la vacunación con ADN, se ha sugerido que la vacunación de animales jóvenes induce una respuesta inmunitaria mayor que la observada para animales adultos ^{104, 105, 106}.

En experimentos posteriores se sugiere inmunizar pollas, a diferentes edades, para determinar la edad óptima de vacunación en la cual se obtenga un mejor índice de protección.

La purificación del vector vacunal de la cepa bacterina que lo alberga se ha realizado mediante gradientes con cloruro de cesio ¹¹⁰ y columnas de intercambio iónico ^{121, 136}. Debido a los altos costos que representa la purificación del plásmido vector con estos sistemas, se decidió utilizar lavados con fenol-cloroformo ¹¹⁵. Con ninguno de los métodos de purificación antes mencionados se ha logrado eliminar el 100% de los contaminantes ¹⁰⁷. Uno de los principales contaminantes de los plásmidos, es el LPS, el cual es un componente altamente inmunogénico y tóxico ¹⁰⁹. Sin embargo, los anticuerpos anti-LPS, no representan una interferencia en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, ni en la evolución de la misma. Lo anterior fue demostrado por Isibasi y col. en donde se evaluó la respuesta humoral inducida por diferentes porinas de *Salmonella typhi* en ratones, y determinaron la

actividad de los anticuerpos anti-LPS que se produjeron en respuesta al LPS contaminante presente en las preparaciones de las proteínas, utilizadas como inóculo. Ellos detectaron anticuerpos anti-LPS mediante ELISA; sin embargo la duración de los mismos fue corta, hasta los 19 días pos-inmunización, en cambio los anticuerpos anti porinas fueron detectados hasta 300 días después de la inmunización. Así mismo, los anticuerpos anti-LPS fueron utilizados en ensayos bactericidas, en cuyo caso no hubo resultados positivos, con lo que se concluye que dichos anticuerpos no participan en la eliminación del microorganismo ⁷⁴.

. CONCLUSIONES

- I. En el presente trabajo se elaboró una vacuna de ADN contra OmpA de *Salmonella enteritidis*.
- II. Con las características del diseño experimental utilizado, no se logró demostrar algún efecto protector en gallinas de postura ante un desafío con SE patógena.
- III. La vacunación con pIHD428 no produjo anticuerpos detectables con la prueba de aglutinación con el Antígeno K polivalente.

. PROSPECTIVA

- Obtener la secuencia completa de nucleótidos del gen *ompA* de SE y evaluar el grado de homología con los genes reportados de otras especies de *Salmonella*.
- Evaluar la expresión de OmpA en fibroblastos de embrión de pollo transfectados con pIHD428
- Evaluar la respuesta inmune humoral de las gallinas utilizadas en este trabajo.
- Evaluar la respuesta inmunitaria celular
- Inmunizar gallinas con el pIHD428 en diferentes edades, desde la inoculación *in ovo* hasta la semana 17 (antes del período de postura)

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO

Leche Descremada con glicerol al 20%

10% de leche descremada (DIFCO)
20% de glicerol (Gibco BRL)

Esterilizar en autoclave, 10 min, 10 lb, 115°C

Caldo LB (Luria-Bertani)

Cloruro de sodio (Merck)	10 g
Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
Agua desionizada	950 mL

Disolver los componentes en agua desionizada y ajustar el volumen a 1 litro.
Esterilizar en autoclave 15 min, 15 lb de presión a 115°C

Agar LB

Se realiza de la misma manera que el caldo LB, solo que se le adicionan 15 g de agar agar (Merck), para 1 litro de medio.

Medio SOB

Triptona (Difco)	20 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
Cloruro de sodio (Merck)	0.5 g
Agua desionizada	950 mL

Disolver los componentes en agua desionizada, agregar 10 mL de una solución de KCl a una concentración de 250mM, ajustar el pH a 7.0 y aforar el volumen a 1 litro. Esterilizar en autoclave 20 min, 15 lb a 115°C. Antes de usar, agregar 5 mL de una solución de MgCl₂ a una concentración de 2 M.

Medio SOC

El medio SOC es igual al medio SOB, únicamente se le agrega 20mM de glucosa. Después de esterilizar el medio SOB, se deja enfriar hasta 60°C y se le agregan 20 mL de una solución de glucosa estéril, a una concentración 1 M.

ANEXO 2. SOLUCIONES

Buffer de lisis (Pitcher y col.):

- Tiocianato de Guanidina 5M (Sigma)
- EDTA 0.1M (Invitrogen)
- Sarkosyl 0.5% (P/V) (Sigma)

Acetato de amonio 10 M:

Disolver 770 g de acetato de amonio en 800 mL de agua desionizada. Ajustar el volumen a 1 litro y esterilizar por filtración.

Cloroformo alcohol isoamílico (V/V)

- Cloroformo 24 mL
- Alcohol isoamílico 1 mL

Buffer TE (Tris/EDTA-ácido etilendiaminotetracético-)

10 mM de Tris Cl, pH 8.0

1mM EDTA, pH 8.0

X-gal

Disolver 20 mg de X-gal en 1 mL de dimetilformamida. Guardar la solución a -20°C, protegida de la luz.

Isopropiltio-β-galactosido (IPTG)

Disolver 2 g de IPTG en 8 mL de agua desionizada, ajustar el volumen a 10 mL y esterilizar por filtración a través de membranas de 0.22 micras. Guardar a -20°C.

Solución TAE

Solución 50X, pH 8.5:

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.2 g

Aforar con agua desionizada a 1 litro.

Solución de trabajo 1X

Tris acetato	40 mM
EDTA	2 mM

Soluciones para extracción de plásmido por el método de lisis alcalina

Solución I

50 mM glucosa
25 mM Tris-cloro (pH 8)
10 mM EDTA (pH 8)

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 10 libras de presión. Conservar a 4°C

Solución II

0.2 N NaOH (de una solución stock 10 N)
1 % SDS

Solución III

5 M acetato de potasio	60 mL
Ácido acético glacial	11.5 mL
Agua desionizada	28.5 mL

Referencias

Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid Extraction of bacterial genomic DNA with Guanidinium Thiocyanate. *Left Appl. Microbiol.* 1989; 8:151-156.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

ANEXO 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

1. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, basada en rangos, para determinar la diferencia entre grupos, de la población de SE en hígado, bazo y ovario. Análisis realizado con el programa JMP7.

a) Prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para hígado.

Ji cuadrada	gl	Prob>Ji cuadrada
11.5248	9	0.2414

b) Prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para bazo.

Ji cuadrada	gl	Prob>Ji cuadrada
8.2709	9	0.5071

c) Prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para ovario.

Ji cuadrada	gl	Prob>Ji cuadrada
0.0000	9	1.0000

2. Comparaciones de las proporciones del PPS, para los cuatro grupos en estudio, en donde el valor crítico del estadístico Z_c fue de $Z_{(0.004)} = 2.71$. Las comparaciones se realizaron con el programa Excel™ y los resultados se cotejaron con la tabla del estadístico Z_c .¹²¹

Tx	Proporción	q	n	Varianza	Z calculada	Z (0.004)		Comparación
4	0.41	0.59	9	0.0269	0.26365597	2.71	NS	TX 4 VS 3
3	0.47	0.53	10	0.0249	0.39514076	2.71	NS	TX 4 VS 2
2	0.5	0.5	10	0.0250	1.27323133	2.71	NS	TX 4 VS 1
1	0.7	0.3	10	0.0210	0.13428499	2.71	NS	TX 3 VS 2
					1.07343114	2.71	NS	TX 3 VS 1
					0.93250481	2.71	NS	TX 2 VS 1

q: probabilidad, n: número de repeticiones dentro del tratamiento, NS: no significativo

REFERENCIAS

¹ Organización Mundial de la Salud. 2007. Disponible en URL: <http://www.who.int/topics/salmonella/es/>

² Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2005. Disponible en URL: [http://www.rlc.fao.org/prensa/activi/codex/pdf/global.pdf#search=%22 salmonella %20enteritidis%22](http://www.rlc.fao.org/prensa/activi/codex/pdf/global.pdf#search=%22%20salmonella%20enteritidis%22)

³ Figueroa-Ochoa IM, Verdugo-Rodríguez A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Rev Lat Microbiol. 2005; 47:25-42

⁴ Lobby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles CL. *Salmonella*, In: Gyles C L, Prescott J F, Songer J G, Thoen C O, editores. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames, Iowa: Blackwell Publishing: 1986:143-167.

⁵ Holt JG, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol I. USA: Williams & Wilkins, 1984. 21. Guard-Bouldin J, Gast R K, Humphrey T J, Henzler D J, Morales C A, Coles K. Subpopulation characteristics of egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis as defined by the lipopolysaccharide O chain. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 2756-2763.

⁶ Center for Disease Control (CDC). 2008 .Disponible en URL: www.cdc.gov

⁷ Velgue P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergente of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet Res. 2005; 36: 267-288.

⁸ Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. Environ Microbiol. 2001; 3: 421-430.

⁹ Leyva-Castillo V, Valdés-Amey E, Cisneros-Despaigne E, Pérez-Rodríguez O. Determinación de salmonella y enterobacterias totales en huevos frescos de gallinas. Revista Cubana Aliment Nutr. 1999; 10 (2): 1-4

¹⁰ Morales C A, Porwollik S, Frye J G, Kinde Hailu, McClelland M, Guard-Bouldin J. Correlation of phenotype with the genotype of egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 4388-4399.

¹¹ Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. Identification of Genes Associated with Survival of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen. Appl Environ Microbiol 2006; 72:1055-1064.

¹² Mancera MA, Vázquez NJ, Ontiveros CL, Durán S, López D, Tenorio GV. Identificación de *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México. Tec Pec. 2005; 43: 229-237.

¹³ Organización Mundial de la Salud. *Global Salm-Surv*. Disponible en URL: <http://www.who.int/salmsurv/en/>

¹⁴ Gutierrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México. 2000; 42: 490-495.

¹⁵ Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México. Disponible en URL: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem21/pdf/cua4.pdf>

¹⁶ Zaidi MB, López-Macías C, Calva E. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. Rev. Vet. Microbiol. 2006; 48: 121-125.

¹⁷ USDA-FSIS. United Status Departamento of Agricultura-Food safety and inspection service. *Salmonella enteritidis* in eggs: advanced notice of proposed rulemaking. 7 CFR part 59. Department of health and human services. Food and drug administration. 21 CFR Part 100. USA. 1998.

¹⁸ Radkowski M. Ocurrence of *Salmonella* sp. in hens eggs. Medycyna Weterynaryjna. 1990; 46: 332-333.

¹⁹ Unión Nacional de Avicultores. Disponible en [URL:www.una.org.mx](http://www.una.org.mx)

²⁰ Jong B, Ekdahl K. The comparative burden of salmonellosis in the European Union members states, associated and candidate countries. BMC Public Health. 2006; 6: 4

²¹ Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. Identification of Genes Associated with Survival of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen. Appl Environ Microbiol 2006; 72:1055-1064.

²² Keller LC, Benson K, Krotec K, Eckroade R. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. Infect. Immun. 63;2443 -2449

²³ Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. Environ microbial. 2001; 3: 421-430.

-
- ²⁴ Henzler D J, Ebel E, Sanders J, Kradel D, Mason J. *Salmonella Enteritidis* in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks. *Avian Dis.* 1994; 38: 37-43
- ²⁵ 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
- ²⁶ Borie PC, Sánchez ML. *Salmonella enteritidis*: un nuevo desafío. *Tecno Vet.* 1998; 4: 1-3
- ²⁷ Sánchez JM, Cardona CN. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología.* 2003; 7: 22-29.
- ²⁸ Ontiveros CML, Mancera MA, Vázquez NJ, Tenorio GRV. Determinación de la existencia de plásmidos en aislamientos de *Salmonella enteritidis* (Fagotipos 4 y 8) y su análisis en la resistencia antimicrobiana. *Tec Pec Méx.* 2004; 42: 325-332
- ²⁹ García –Meneses A. determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* serotipo enteritidis a partir de 95 aislamientos de *Salmonella* sp de brotes de campo en aves domésticas. Tesis de licenciatura. 1995 UNAM, FMVZ
- ³⁰ Mancera MA, Vázquez NJ, Heneidi ZA. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en Méico. *Tec Pecu Méx.* 2004; 42: 287-294.
- ³¹ Mancera MA, Vázquez NJ, Ontiveros CL, Valladares J, Tenorio GV. Identificación de fagotipos de *Salmonella enteritidis* en aves comerciales de México. XV Congreso Latinoamericano de Avicultura. Cancún, Q. Roo. 1997: 139.
- ³² Mancera MA, Vázquez NJ, Ontiveros CL, Valladares J, Tenorio GV. Resultados de la fagotipificación de *Salmonella enteritidis* en el INIFAP de 1994 a 2000. 2° Congreso Internacional de Epidemiología. Veracruz, Veracruz. 2002: 113-116
- ³³ OIE Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para animales terrestres. Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible en URL: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00129.htm
- ³⁴ Calnek BW, editor. *Diseases of Poultry.* 10ª ed. USA: Iowa State University Press, 1997.
- ³⁵ Guthrie K K. *Salmonella.* CRC Press. USA: 1992.
- ³⁶ North MO, Bell D. *Manual de producción avícola.* 3ª ed. México: El Manual Moderno, 1993.

-
- ³⁷ Jordan FT, Pattison M. editores. Enfermedades de las aves. 3^a ed. México. Manual Moderno, 1998: 9-21.
- ³⁸ Castro MI, editor. Examen General de Calidad Profesional para Medicina Veterinaria y Zootecnia. Material de estudio. Area: Aves. México D.F.: FMVZ, UNAM, 1996
- ³⁹ USDA-ERS. United States Department of Agriculture-Economic Research Service. Foodborne Illness Cost Calculator. Disponible en URL: <http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/>
- ⁴⁰ Holt JG, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol I. USA: Williams & Wilkins, 1984.
- ⁴¹ Cottral G E. Manual de Métodos estandarizados en Microbiología Veterinaria. Ed. Copilco. México: 1986.
- ⁴² Lennette HE, Balows A, Hsusler WJ Jr, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. USA: American Society for Microbiology, 1985.
- ⁴³ Ericsson E, Aspan A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Vet Res. 2007; 3: 21. disponible en URL: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/3/21>
- ⁴⁴ Gast RK. Paratyphoid infections. In Saif YM. Diseases of poultry. 11 ed. Iowa State: Press Ames Iowa 2003: 583-613.
- ⁴⁵ Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Celular and Molecular Biology. Vol. 1. 2nd ed. USA: American Society for Microbiology. 1996.
- ⁴⁶ Le Minor L, Popoff M Y. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1987; 37: 465-468.
- ⁴⁷ Popoff M Y, LeMinor L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France. 1997.
- ⁴⁸ Brenner F W, Villar R G, Angulo F J, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2465-2467.
- ⁴⁹ Galán JE. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. Mol Microbiol. 1996; 20: 263-271.

-
- ⁵⁰ Méndez-Olvera ET. Identificación y caracterización parcial de los genes del operon de la fimbria polar larga (*lpf*) de *Salmonella gallinarum*. (Tesis de Maestría). México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2003.
- ⁵¹ Ruiz . Patogenia de la infección con *Salmonella enteritidis* FT 13^a en gallinas de postura. (Tesis de Maestría). México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2006.
- ⁵² Lu S, Killoran P B, Riley W L. Association of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis YafD with resistance to chicken egg albumen. *Infect Immun*. 2003; 71: 6734-6741.
- ⁵³ Santos RL, Tsolis RM, BräumLer AJ, Adams LG. Pathogenesis of *Salmonella* induced enteritis. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36: 3-12.
- ⁵⁴ Salyers AA, Whitt DP. Bacterial Pathogenesis. A molecular approach of *Salmonella* infections American Society for Microbiology Press. Washington (DC). 2000.
- ⁵⁵ Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol*. 2000; 36: 997-1005
- ⁵⁶ Hassan JO, Mockett APA, Catty D, Barrow PA. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: Bacteriology and immune responses. *Avian Dis*. 1991; 35: 809-819.
- ⁵⁷ Barrow PA, Novell MA. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Avian Pathol*. 1991; 20: 335-348.
- ⁵⁸ Corkish JD, Davis RH, Wray C, Nicholas RAJ. Observations on a broiler breeder flock naturally infected with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Vet Rec*. 1994; 134: 591-594.
- ⁵⁹ Gast RK, Beard CW. Detection of *Salmonella* serogroup D-specific antibodies in the yolks of eggs laid by hens infected with *Salmonella enteritidis*. *Poult Sci*. 1992; 70: 1273-1276.
- ⁶⁰ Gast R, Stone H, Holt P. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. *Av Dis*. 1993; 37: 1085-1091.
- ⁶¹ Gantois I, Ducatelle R, Timbermont L, Boyen F, Bohez L, Haesebrouck F, Pasmans F, Van Immerseel F. Oral immunization of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella vac*® E and TAD *Salmonella vac*® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vacc*. 2006; 24: 6250-6255.

-
- ⁶² Lee GM, Jackson GDF, Cooper GN. The role of serum and biliary antibodies and cell-mediated immunity in the clearance of *S. typhimurium* from chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 1981; 2: 233-252.
- ⁶³ Stabler JG, McCormick TW, Powell KC, Kogut MH. Avian heterophils and monocytes: Phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet Microbiol.* 1994; 38: 293-305.
- ⁶⁴ 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. *Microb Pathog.* 1994; 16:141-151.
- ⁶⁵ Kogut MH, McGruder ED, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. Dynamics of avian inflammatory response to *Salmonella*-immune lymphokines: Changes in avian blood leukocyte populations. *Inflammation.* 1994; 18: 373-388.
- ⁶⁶ Kogut MH, McGruder ED, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. Characterization of the pattern of inflammatory cell influx in chicks following the intraperitoneal administration of live *Salmonella enteritidis* and *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. *Poult Sci.* 1995; 74: 8-18.
- ⁶⁷ Tellez GI, Kogut MH, Hargis BM. Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn chicks. *Avian Dis.* 1993; 37: 1062-1070.
- ⁶⁸ Gordon MA, Jack DL, Dockrell DH, Lee ME, Read RC. Gamma Interferon enhances internalization and early nonoxidative killing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by human macrophages and modifies cytokine responses. *Infect Immun.* 2005; 73: 3445-3452.
- ⁶⁹ Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular.* 3ª ed. McGraw-Hill Interamericana. España. 2001.
- ⁷⁰ Liu W, Yang Y, Chung N, Kwang J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. *Avian Dis.* 2001; 45: 797-806
- ⁷¹ Ochoa-Repáraz J, Sesma B, Álvarez M, Renedo MJ, Irache JM, Gamazo C. Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella Enteritidis* against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet Res* 2004; 35:291-298.
- ⁷² Salazar-González RM, Maldonado-Bernal C, Ramírez-Cruz NE, Ríos-Sarabia N, Beltrán-Nava J, Castañón-González J, Castillo-Torres N, Palma-Aguirre JA, Carrera-Camargo M, Lopez-Macias C, Isibasi A. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar Typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol. Lett.* 2004; 93:115-122.

-
- ⁷³ Secundino I, López-Macías C, Cervantes-Barragán L, Gil-Cruz C, Ríos-Sarabia N, Pastelín-Palacios R, Villasis-Keever MA, Becker I, Puente JL, Calva E, Isibasi A. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 2006; 117:59-70.
- ⁷⁴ Henriksen AZ, Maeland JA. Serum antibodies to outer membrane proteins of *Escherichia coli* in healthy persons and patients with bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 2181-2188.
- ⁷⁵ Henriksen AZ, Maeland JA, Brakstad OD. Monoclonal antibodies against three different enterobacterial outer membrane proteins. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1998; 97:559-568.
- ⁷⁶ Huerta L, López-Vidal Y, Suárez F, Willms K, Verdugo-Rodríguez A. Detección de proteínas de membrana externa de *Salmonella gallinarum* útiles para el diagnóstico. Memorias de XXI Congreso Internacional de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. III Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia 1996; 62: Guadalajara (Jal) México.
- ⁷⁷ Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ microbial.* 2001; 3: 421-430.
- ⁷⁸ Henzler D J, Ebel E, Sanders J, Kradel D, Mason J. *Salmonella Enteritidis* in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks. *Avian Dis.* 1994; 38: 37-43
- ⁷⁹ Huerta L, López-Vidal Y, Suárez F, Willms K, Verdugo-Rodríguez A. Detección de proteínas de membrana externa de *Salmonella gallinarum* útiles para el diagnóstico. Memorias de XXI Congreso Internacional de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. III Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia 1996; 62: Guadalajara (Jal) México.
- ⁸⁰ Vásquez J. Preparaciones de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. (Tesis de Maestría) DF (México) UNAM, FMVZ. 1995
- ⁸¹ Vega-Manriquez DX. Caracterización parcial del gen *ompA* de *Salmonella gallinarum*. (Tesis de Maestría). México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2000.
- ⁸² Korn A, Rajaba Z, Wassum B, Ruiner W, Nixdorff K. Enhancement of uptake of lipopolysaccharide in macrophages by the major outer membrane protein OmpA of gram-negative bacteria. *Infect Immun.* 1995; 63: 2697-2705.

-
- ⁸³ Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 2000;37: 239-253.
- ⁸⁴ Pautsch A, Schulz GE. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol.* 1998; 5: 1013-1017.
- ⁸⁵ Arora A, Abildgaard F, Bushweller J, Tamm LK. Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol.* 2001; 8: 334-338.
- ⁸⁶ Puohiniemi R, Karvonen M, Vuopio-Varkila J, Moutiala A, Helander I, Sarvas M. A strong antibody response to the periplasmic C-terminal domain of the OmpA protein of *Escherichia coli* is produced by immunization with purified OmpA or with whole *E. coli* or *Salmonella typhimurium* bacteria. *Infect Immun.* 1990;
- ⁸⁷ Freudl R, Cole ST. Cloning and molecular characterization of the *ompA* Gene from *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* 1983; 134: 497-502.
- ⁸⁸ Stocker B, Nurminen M, Makela P. Mutants defective in the 33 K outer membrane protein of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1979; 139: 376-383
- ⁸⁹ Weiser JN, Gotschlich EC. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect Immun.* 1991; 59: 2252-2258
- ⁹⁰ Bond PJ, Faraldo-Gómez JD, Sansom M. OmpA: A pore or not a pore? Simulation and modeling studies. *Biophys J.* 2002; 83: 763-775.
- ⁹¹ Bulieris P, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt J. Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 2003; 278: 9092-9099.
- ⁹² Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Roni A, Rusnati M, Presta M, Maina V, Magistrelli G, Haeuw JF, *et al.* Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity.* 2002; 22: 551-560
- ⁹³ Mollenhorst H, Van Woudenberg CJ, Bokkers EGM, Boer IJM. Risk factors of *Salmonella Enteritidis* infections in laying hens. *Poul Sci.* 2005; 84: 1308-1313.
- ⁹⁴ 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

-
- ⁹⁵ Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu U, Heckert R. Antigen-Specific lymphocyte proliferation and interleukin production in chickens immunized with killed *Salmonella enteritidis* vaccine or experimental subunit vaccines. *Avian Dis.* 2003; 47: 1331-1338.
- ⁹⁶ Gast RK, Stone HD, Holt PS, Beard CW. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for protecting chickens against *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis.* 1992; 36: 992-999.
- ⁹⁷ Curtis R. Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J. Clin. Invest.* 2002; 110:1061-1066.
- ⁹⁸ Capozzo A, Cuberos L, Levine MM, Pasetti M. Mucosal delivery *Salmonella* live vector vaccine elicit potent immune response against a foreign antigen in neonatal mice born to naive and immune mothers. *Infect immune.* 2004; 72: 4302-4308
- ⁹⁹ Salazar-González RM, Maldonado-Bernal C, Ramírez-Cruz NE, Ríos-Sarabia N, Beltrán-Nava J, Castañón-González J, Castillo-Torres N, Palma-Aguirre JA, Carrera-Camargo M, Lopez-Macias C, Isibasi A. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar Typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol. Lett.* 2004; 93:115-122.
- ¹⁰⁰ Secundino I, López-Macías C, Cervantes-Barragán L, Gil-Cruz C, Ríos-Sarabia N, Pastelín-Palacios R, Villasís-Keever MA, Becker I, Puente JL, Calva E, Isibasi A. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 2006; 117:59-70
- ¹⁰¹ Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges. *The J Immunol.* 2005;175:633-639
- ¹⁰² Ascadi G, Dickson G, Love DR. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature.* 1991; 352: 815-818.
- ¹⁰³ Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Ascadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990; 247: 1464-1468.
- ¹⁰⁴ Tang D, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992;356:152-154.
- ¹⁰⁵ Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68:793-806.
- ¹⁰⁶ Whalen RG. DNA vaccines for emerging infectious diseases: What if?. *Emerging Infectious Diseases.* 1996; 2: 168-175.

-
- ¹⁰⁷ Glenting J, Wessels S. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*. 2005; 4: 26.
- ¹⁰⁸ Fynan E, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90: 11478-11482.
- ¹⁰⁹ Leitner W, Ying H, Restifo P. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*. 1999; 18: 765-777
- ¹¹⁰ Díaz JC, Barrera M. Las vacunas de ADN: una promisoría medicina para el paciente veterinario. *Revista electrónica de Veterinaria REDVET*. 2006; VII: 2
- ¹¹¹ Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. Spain: Mosby, 1998.
- ¹¹² Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid Extraction of bacterial genomic DNA with Guanidinium Thiocyanate. *Left Appl. Microbiol*. 1989; 8:151-156.
- ¹¹³ Kozak M. An anlysis of 5' –noncoding sequences from 699 vertebrate Messenger RNAs. *Nucleic acids Research*. 1987; 15: 8125-8148.
- ¹¹⁴ Díaz AA. Tesis de Licenciatura. Manuscrito en preparación.
- ¹¹⁵ Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- ¹¹⁶ Kuehl R O. *Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. 2^a ed. México. Thomson Learning, 2000.
- ¹¹⁷ “Report of the AVMA Panel on Eutanasia” 2000. *JAVMA*, Vol. 218, No. 5, 1, 2001.
- ¹¹⁸ Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999. Disponible en URL: www.sagarpa.gob.mx
- ¹¹⁹ Daniel W W. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4^a ed. México: Limusa, 2002:794.
- ¹²⁰ Quintana-López J A. *Sistemas de registros*. FMVZ, División del Sistema de Universidad Abierta. UNAM, 1978.
- ¹²¹ Rout N, Kumar S, Jaganmohan S, Murugan V. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confers protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine*. 2007; 25: 2778-2786.

-
- ¹²² Natesan S, Kataria JM, Dhama K, Bhardwaj N, Sylvester A. Anti-neoplastic effect of chicken anemia virus VP3 protein (apoptin) in Rous sarcoma virus-induced tumors in chickens. *J General Virology*. 2006; 87: 2933-2940.
- ¹²³ Chauhuan N, Kumar R, Badhai J, Preet A, Kumar YP. Immunogenicity of cholera B epitope inserted in *Salmonella* flagelin expressed on bacteria and administered as a DNA vaccine. *Mol Cell Biochem*. 2005; 276: 1-6
- ¹²⁴ Ocurra Y, Miyakoshi A, Kohyama K, Park I, Staufienbiel M, Matsumoto Y. Nonviral A β DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: long-term effects and safety. *PNAS*. 2006; 103, 9619-9624.
- ¹²⁵ Wozniak TM, Ryan AA, Triccas JA, Britton WJ. Plasmid Interleukin-23, but not plasmid IL-27, enhances the protective efficacy of a DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2006; 74:557-565.
- ¹²⁶ Thomsen L, Topley P, Daly M, Brett S, Tite J. Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvant for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery. *Vacc*. 2004; 22: 1799-1809.
- ¹²⁷ Huali J, Yijie L, Zhenghai M, Fuchun Z, Qingge X, Dengfeng G, Bin W. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vacc*. 2004; 22: 2925-2935.
- ¹²⁸ Robinson HL, Huni LA, Webster RG. Protection against a letal influenza challenge by immunization with a heamagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine*. 1993; 11: 957-960.
- ¹²⁹ Sakaguchi M, Nakamura H, Sonoda K, Hamada P, Hirai K. Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. *Vaccine*. 1996; 14: 747-752.
- ¹³⁰ Lee Y, Mo P, Kang M. Protective efficacy of live *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in commercial layer flocks. *ISSN*. 2007; 1465-.. 60495-4
- ¹³¹ Vicente Salvador JL. Efecto de la administración prolongada de semilla de páprika en la diete, sobre la infección de SE en pollos de engorda. (Tesis de Licenciatura).DF (México) UNAM, FMVZ. 1994
- ¹³² Van Hemert S, Hoekman JW, Smits MA, Rebel MJ. Immunological and gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine. *Vet Res*. 2007; 38: 51- 63

-
- ¹³³ Guillot JF, Beaumont C, Bellatif F, Mouline C, Lantier F, Colin P, Protais J. Comparison of resistance of various poultry lines to infection by *Salmonella Enteritidis*. Vet Res. 1995; 26: 81-86
- ¹³⁴ Chapero Tovar E. Identificación de *Salmonella enteritidis* mediante el uso de pruebas serológicas y bacteriológicas en huevos comerciales. (Tesis de licenciatura). DF (México) UNAM, FMVZ. 2004
- ¹³⁵ Diario Oficial de la Federación, 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. Disponible en [URL:http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/establecimientos_habilitados_exportar/normativa/mexico/005zoo1993.pdf](http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/establecimientos_habilitados_exportar/normativa/mexico/005zoo1993.pdf)
- ¹³⁶ Basurto-Alcántara JF. Elaboración de un inmunógeno experimental contra la Bordetelosis de los perros. (Tesis Doctorado). México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2005.
- ¹³⁷ Pokorna D, Rubio I, Müller M. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. BioMed Central. 2008; 6: 4
- ¹³⁸ Bell DD, Weaver WD, editores. Comercial chicken meat and egg production. 5a ed. Springer. New York:USA. 2002.
- ¹³⁹ Parkhurst CR, Mountney GJ. Poultry meat and egg production. Avi. New York:USA. 1988.
- ¹⁴⁰ Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, Hara-Kudo Y. Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* Serovar Pollorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. Infect Immun. 2005; 73: 2986-2990