



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Preparación de proteínas de la membrana externa (PME) de *Salmonella choleraesuis* para el diagnóstico de la salmonelosis porcina por medio de un inmunoensayo enzimático (ELISA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ALDO RIVERA PÉREZ

DIRECTOR

DR. JESÚS VÁZQUEZ NAVARRETE

COASESORES:

DR. MIGUEL ANGEL CORNEJO CORTÉS

DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO



UNAM
CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2009



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Preparación de proteínas de la membrana externa (PME) de *Salmonella choleraesuis* para el diagnóstico de la salmonelosis porcina por medio de un inmunoensayo enzimático (ELISA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

ZOOTECNISTA

PRESENTA

ALDO RIVERA PÉREZ

DIRECTOR:

DR. JESÚS VÁZQUEZ NAVARRETE

COASESORES:

DR. MIGUEL ÁNGEL CORNEJO CORTÉS

DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2009

*Nosotros odiamos un mundo colmado de insectos,
Y aquellos que juran que éstos son hombres mienten:
La masa de perdición no ha sido jamás de hombres,
Sino de rechazados, y ¿desde cuando un autómata espermático
Debe ser mi prójimo?, yo digo que mi prójimo no existe
Y que mi deber es el de no asemejarme en nada.*

Albert Caraco

DEDICATORIAS

“Creo que los animales ven en el hombre un ser igual a ellos que ha perdido de forma extraordinariamente peligrosa el sano intelecto animal, es decir, que ven en él al animal irracional, al animal que ríe, al animal que llora, al animal infeliz”.

Friedrich Nietzsche

A mis padres. Ya que sin su incondicional amor nada de esto podría haberse realizado.

A Adriana. Gracias por ser el motor de mi vida en estos últimos tiempos. Te amo nena.

A mis amigos. Porque sin ellos las cosas no tendrían mucho sentido.

Y a toda mi familia. Por siempre brindarme su incondicional apoyo y amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jesús Vázquez Navarrete por el apoyo, los conocimientos y la experiencia otorgados para la realización de éste trabajo.

A los Doctores Francisco Aguilar, Víctor Tenorio, Efrén Díaz, Marco Santillán, Marisela Leal, Arturo Mancera por su disposición y apoyo durante mi trabajo en el CENID-Microbiología.

A Sara Nieto, Don Lupe, Tina, Adulfa, Gisela, y Juan por su ayuda en el trabajo con los animales, su apoyo en el laboratorio, sus ideas aportadas y sobre todo su amistad.

A la FES-Cuautitlán UNAM por los conocimientos adquiridos y por ampliar mi visión de las cosas.

Al CENID-Microbiología INIFAP por brindarme los recursos para la realización de este proyecto.

Trabajo parcialmente financiado por SAGARPA-CONACYT No. 12406
Alumno Becario

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Características del género <i>Salmonella</i>	6
1.2. Taxonomía.....	7
1.3. Morfología.....	8
1.4. Transmisión.....	8
1.5. Signos.....	9
1.6. Diagnóstico.....	9
1.7. Tratamiento.....	11
1.8. Aspectos epidemiológicos.....	12
1.9. Prevención y control.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
4.1. Cepas y medios de cultivo.....	16
4.2. Preparación de las proteínas de la membrana externa (PME).....	16
4.3. Cuantificación de las PME.....	17
4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida para análisis de proteínas (SDS-PAGE).....	18
4.5. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	18
4.6. Preparación de antígenos para las pruebas de aglutinación.....	19
4.7. Infección experimental en cerdos.....	20
4.8. Aislamiento bacteriológico.....	20
4.9. Pruebas serológicas.....	21

4.10. Estandarización del ELISA.....	23
4.11. Análisis estadísticos.....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Perfil electroforético de las PME.....	25
5.2. Concentración y cuantificación en $\mu\text{g/ml}$ de las diferentes preparaciones de PME de <i>S. choleraesuis</i> (CENID-M98), <i>S. enteritidis</i> (CENID-MA5) y <i>S. typhimurium</i> (CENID-M02).....	26
5.3. Hemocultivo en medio bifásico Ruiz-Castañeda.....	26
5.4. Cultivo a partir de heces.....	27
5.5. Aglutinación rápida en placa.....	27
5.6. Aglutinación con β -mercaptoetanol para determinar títulos de anticuerpos en los diferentes muestreos de los grupos de cerdos infectados.....	29
5.7. Resultados en la estandarización del ELISA.....	32
5.8. Resultados de los análisis estadísticos del ELISA. Punto de corte.....	33
5.9. Resultados de la determinación de la Sensibilidad, Especificidad e Índice de concordancia (kappa).....	37
5.10. Resultados del análisis de sensibilidad, Especificidad del ELISA de <i>S. choleraesuis</i> utilizando sueros de animales infectados experimentalmente.....	38
5.11. Resultados del análisis de sensibilidad, Especificidad del ELISA de <i>S. enteritidis</i> utilizando sueros de animales infectados experimentalmente.....	38
5.12. Resultados del análisis de sensibilidad, Especificidad del ELISA de <i>S. typhimurium</i> utilizando sueros de animales infectados experimentalmente.....	39
5.13. Índice de concordancia (kappa) obtenido de la comparación Del ELISA con las diferentes cepas usadas en este experimento.....	39
6. DISCUSIÓN.....	40
7. CONCLUSIONES.....	44
8. APÉNDICE.....	45
9. REFERENCIAS.....	46

RESUMEN

La salmonelosis es una enfermedad infectocontagiosa producida por bacterias del género *Salmonella*. Esta enfermedad está distribuida mundialmente y causa graves problemas de salud sobre todo en países subdesarrollados y en vías de desarrollo. Este microorganismo afecta el aparato digestivo de animales de sangre caliente y fría, siendo una de las zoonosis bacterianas más importantes. El objetivo del trabajo fue estandarizar una prueba de ELISA, utilizando como antígeno de captura una preparación de proteínas de la membrana externa (PME) de *Salmonella choleraesuis* (CENID-M98), para el diagnóstico de la salmonelosis porcina. Se determinó la concentración del antígeno la cual fue de $2.93 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se utilizaron $9 \mu\text{l}$ de PME diluidos en 12 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) por placa. Se utilizaron 10 sueros de animales infectados experimentalmente con *S. choleraesuis* (CENID-M98) y 10 sueros de animales negativos a las pruebas de aglutinación directa e indirecta en placa, así como al hemocultivo. Los sueros fueron diluidos en PBS a concentraciones de 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 y 1:500. Se utilizó una anti-IgG (*goat anti-porcine Us Biological*) a diluciones de 1:750, 1:1000, 1:1500 y 1:2000. El punto de corte se estableció con un intervalo de confianza de 95% y dos desviaciones estándar. Para determinar la sensibilidad y especificidad se trabajó con 20 sueros y se evaluaron por una prueba de sensibilidad y especificidad. La concentración de antígeno, de suero y anti-IgG en la que se observaron mayores diferencias entre positivos y negativos fue para *S. choleraesuis* de $2.93 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1:500 y 1:1000, respectivamente. El promedio de lectura de los sueros positivos utilizando una longitud de onda de 405 nm para *S. choleraesuis* fue de 0.330 OD y para los negativos fue de 0.1024 OD el punto de corte fue de 0.136 OD, la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia; el cual fue obtenido comparando el

ELISA de *S. choleraesuis* con otros dos ELISAS realizados conjuntamente con otras cepas de *Salmonella*, fue de 100%, 100% y 0.86 respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que se pueden obtener diferencias significativas entre los valores de los sueros positivos y negativos a salmonelosis, por lo que la ELISA elaborada con antígeno a base de PME, puede ser considerada como una prueba alterna para el diagnóstico de la enfermedad de salmonelosis en porcinos.

1. INTRODUCCIÓN

La porcicultura nacional tiene una población aproximada de 18.1 millones de cabezas y juega un papel importante en la industria pecuaria nacional de tal manera que, existe 1, 960, 000 unidades de criadores de cerdos en el país. México ha producido un promedio de 994,185 toneladas de carne en los últimos 8 años, siendo los estados de Jalisco, Sonora, Baja California Sur, Guanajuato, Yucatán, Veracruz, Puebla y Michoacán los estados con mayor producción. En México el consumo per cápita de carne de porcinos es de 15.1 kilogramos por año. **Figura 1 (1).**

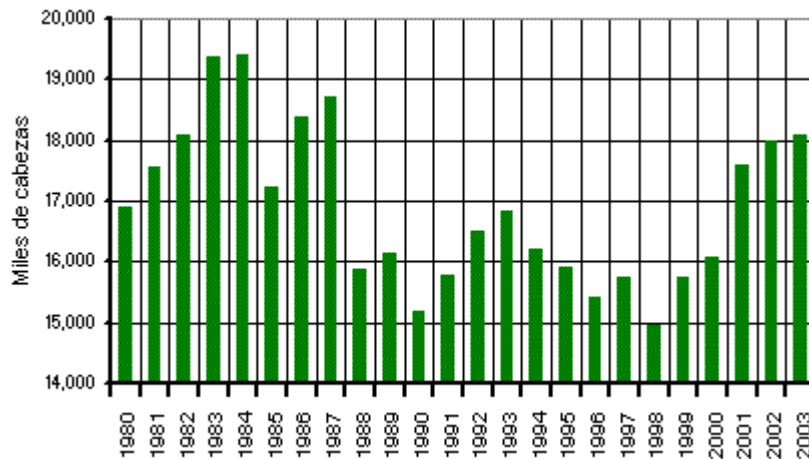


Figura 1. Se observa la producción porcina en México.

Fuente: FAOstat (1)

La porcicultura está constituida por diferentes sistemas de producción de acuerdo a su grado de tecnificación, por lo que se pueden mencionar a granjas altamente tecnificadas, poco tecnificadas y producción de traspatio donde las enfermedades bacterianas, virales y parasitarias causan graves problemas sobre todo en países en vías de desarrollo. Este hecho tiene una implicación en el aspecto zoonosario y la salud pública como lo informa en las disposiciones generales del código sanitario para los animales terrestres de la OIE (2).

Las bacterias del género *Salmonella* tienen morfología de bacilos y son Gram negativos, anaerobios facultativos, no forman esporas, reducen nitratos a nitritos, son móviles (con excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*) mediante flagelos peritricos, fermentan la glucosa, no forman indol, no producen ureasa, es negativa la reacción Voges-Proskauer y positiva la de rojo de metilo. Algunos miembros del género son potencialmente patógenos para los animales y el hombre (3).

La salmonelosis es una de las infecciones más comunes en las explotaciones porcinas, provocando importantes pérdidas económicas por mortalidad, morbilidad y costos de tratamientos inespecíficos. El género *Salmonella* ha sido reconocido como causante de una importante zoonosis alrededor del mundo, de significado económico para humanos y animales. En los cerdos se presenta causando septicemia y enterocolitis. Se han señalado también casos caracterizados por neumonías, meningitis, encefalitis, abortos y linfadenitis caseosa (4).

S. choleraesuis produce efectos clínicos con alta morbilidad y mortalidad caracterizada en su fase septicémica. La enfermedad generalmente ocurre después del destete y es más frecuente entre las 8 y 16 semanas de edad. La incidencia de la enfermedad está estrechamente relacionada con el sistema de manejo, particularmente los de tipo intensivo, lo cual contribuye a la diseminación de la infección e igualmente a diversas condiciones de estrés (4). La diarrea es común en las maternidades, destetes y en cerdos en finalización. Por otro lado, las infecciones subclínicas por *Salmonella* pueden generar pérdidas de hasta 18 kilogramos de peso a mercado, por cerdo, por cada ciclo de producción anual. La exposición crónica a *Salmonella* puede reducir la ganancia a todo un lote de finalización sin causar mortalidad (1). En países del norte de Europa la tasa de *Salmonella* spp. es aproximadamente un 1% que se registra en la carne de cerdo fresca producida (1). Los

trabajos enfocados a determinar la presencia de *Salmonella* en carne y granjas porcinas en México son pocos. Un ejemplo en este sentido; Carreón y col., aislaron *S. choleraesuis* y *S. enteritidis* a partir de hígado de cerdos entre 70 y 100 días de edad (5).

El diagnóstico de la salmonelosis se basa principalmente en la historia clínica de la granja, los hallazgos macroscópicos a la necropsia y el aislamiento de la bacteria (6). La prueba de aglutinación es otro método de diagnóstico en el cual se emplean antígenos hechos a base de células bacterianas completas, el cual se puede realizar de forma directa o con diluciones y tiene la ventaja de ser altamente sensible, aunque se cuestione su especificidad, debido a que frecuentemente presentan reacciones cruzadas, con otras bacterias gramnegativas que poseen antígenos de superficie altamente conservados esta técnica fue utilizada en pollos (7). Con los antecedentes antes mencionados se ha considerado desarrollar y evaluar un antígeno hecho a base de preparaciones de proteínas de la membrana externa de *S. choleraesuis* para realizar un inmunoensayo enzimático (ELISA) que sea sensible y específico y que pueda detectar la presencia de anticuerpos contra serotipos patógenos del género *Salmonella* en porcinos que ayudará al diagnóstico de esta enfermedad, lo anteriormente descrito se ha realizado en otros trabajos (8).

1.1. Características del género *Salmonella*

El género *Salmonella* está compuesto por un grupo serológica y bioquímicamente más complejo comparado con otros géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Algunos géneros de enterobacterias forman parte de la flora normal del tracto digestivo; mientras que otros tienen un papel patógeno ampliamente reconocido, como *Salmonella*. Las enterobacterias son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas, inmóviles o móviles, ya que poseen flagelos peritricos; son oxidasa negativos y catalasa positivos, son bacterias Gram negativas, producen ácido por fermentación de la glucosa y reducen los nitratos a nitritos. Todas las características descritas incluyen al género *Salmonella*. Este género es anaerobio facultativo, además se distingue por no formar indol, no producir ureasa, es negativo a la reacción Voges-Proskauer y positivo a la prueba de rojo de metilo (9, 10).

Clasificación serológica y química de las especies más comunes de *Salmonella* (según Kauffmann-White) mostrada en la siguiente tabla (3).

Tabla 1. Serotipos más comunes de *Salmonella* según Kauffmann-White.

Serotipo	Grupo	Antígeno O
<i>S. paratyphi</i>	A	2,12
<i>S. typhimurium</i>	B	4,12
<i>S. choleraesuis</i>	C	6,7
<i>S. Montevideo</i>	C	6,7
<i>S. newport</i>	C	6,8
<i>S. typhi</i>	D	9,12, Vi
<i>S. enteritidis</i>	D	9,12
<i>S. gallinarum</i>	D	1,9,12
<i>S. anatum</i>	E	3,10

1.2. Taxonomía

La *Salmonella* fue descrita por primera vez en 1880 por Eberth y cultivada cuatro años más tarde por Gaffy. El nombre genérico *Salmonella* fue propuesto por Lingnieres en 1900 en honor a D.E. Salmon, primer jefe del Bureau of Animal Industry de los Estado Unidos. Desde entonces se han identificado más de 2,400 serotipos, los principales antígenos utilizados para la tipificación de bacterias del género *Salmonella* son el antígeno somático termoestable (O) que es parte del lipopolisacárido de la membrana externa, similar a otras enterobacterias y el antígeno flagelar termolábil (H), el cual es difásico, es decir existen en dos fases; una específica, que es compartida por pocos microorganismos y reacciona sólo con antisueros homólogos y otra no específica, que comparten muchos microorganismos y pueden presentar reacción cruzada con antisueros heterólogos (11, 12).

Estos tipos antigénicos fueron organizados por Kauffmann-White y de acuerdo con este esquema, el género *Salmonella* se agrupa en base a los antígenos O formando grupos que son designados con letras mayúsculas que van de (A a I); además se lleva a cabo una subdivisión de los grupos principales en especies por la determinación del antígeno restante H (3).

El método Kauffmann-White designa a cada tipo antigénico como una especie; sin embargo, esta clasificación ha ido sufriendo varias modificaciones y actualmente el Centro para el Control de la Enfermedad (CDC) localizado en Atlanta, Estados Unidos sólo reconoce dos especies de *Salmonella*: *S. bongori* en la que están incluidos 20 serotipos y *S. entérica*, en donde se ubican 2443 serotipos, y se encuentra subdividida en seis subespecies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenaie*, *indica*; de las cuales solo *S. entérica* subespecie *entérica* se asocia con infecciones en el hombre y animales (13, 14).

1.3. Morfología

Es una bacteria en forma de bacilo de 0.6 a 0.7 por 2 a 3 μ , Gram negativa, se presenta en forma individual, en pareja y a veces en cadenas cortas, posee flagelos peritricos, los cuales le confieren movilidad (15). **Figura 2.**

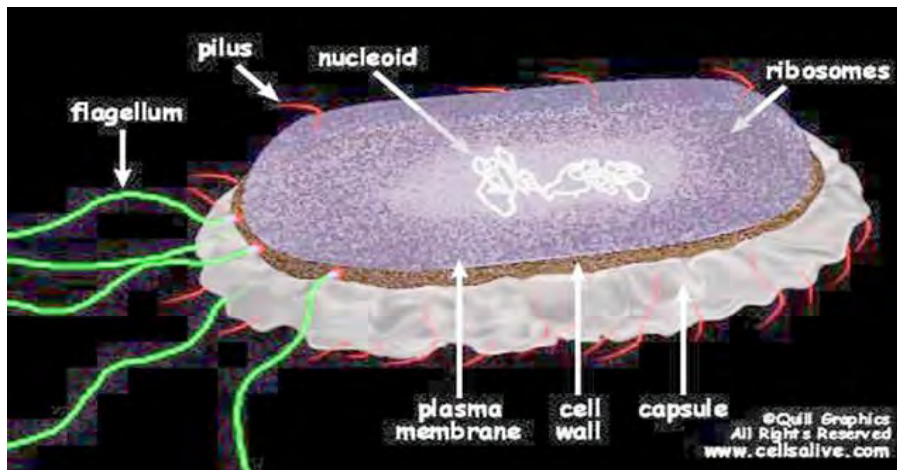


Figura 2. Esquema de *Salmonella* donde se muestran varios organelos (16).

1.4. Transmisión

Las infecciones con *S. choleraesuis*, se diseminan de cerdos infectados a cerdos susceptibles por el contacto mutuo. En contraste *S. typhimurium* y otras salmonelas que afectan a los porcinos carecen de especificidad de huésped, infectando a numerosas especies de animales, tales como aves, bovinos, ovinos, etc. Esto propicia que la infección en cerdos tenga diversos orígenes. La ingestión de alimentos contaminados es la vía más común de infección. Los animales afectados excretan en las heces grandes cantidades de salmonelas durante periodos prolongados, por lo cual se genera una rápida diseminación en toda la piara; esto se presenta aún sin manifestaciones clínicas en la explotación afectada (17, 18).

En Australia, India, China, Nueva Zelanda, Rusia, Bulgaria e Inglaterra, *S. choleraesuis* ha sido descrita como la causa más común de salmonelosis en cerdos (19, 20, 21, 22).

1.5. Signos

La forma de salmonelosis que causa mayor impacto en las explotaciones porcinas es la septicémica, la cual se presenta generalmente en animales entre el destete y los cinco meses de edad, principalmente causada por *S. choleraesuis* y es caracterizada por inapetencia, letargia, fiebre, disnea, diarrea amarillenta 4 días posteriores a la infección, además coincide con ictericia. Los brotes con alta mortalidad son comúnmente asociados a condiciones de estrés y los lechones que mueren presentan un color violáceo característico (cianosis) en las extremidades, orejas, nariz y abdomen. La histopatología muestra nódulos paratifoideos en hígado (septicemia), hiperplasia de las células reticulares del bazo y nódulos linfáticos, así como inflamación generalizada del endotelio y células histiocíticas típicas de sepsis por bacterias Gram negativas (22).

1.6. Diagnóstico

La historia clínica de la granja nos orienta hacia un diagnóstico presuntivo que se debe confirmar con: hallazgos macroscópicos a la necropsia en donde se observa principalmente enteritis necrótica, colitis y linfadenopatía mesentérica. Para el aislamiento de la bacteria las muestras deben tomarse de los órganos menos contaminados como los ganglios linfáticos mesentéricos. En la histopatología, en donde a nivel de intestino, se puede evidenciar necrosis de las criptas y de la superficie de los enterocitos que involucra la mucosa, y submucosa. Se observan úlceras en colon, así como necrosis de los ganglios

linfáticos, aunque en los casos crónicos se pueden observar hipertróficos. Luego de que la historia de la granja y la clínica nos orientan al origen del problema se debe utilizar la información generada a partir de las necropsias, la bacteriología y la histopatología para llegar al diagnóstico definitivo y establecer el plan de control específico. En el diagnóstico diferencial se deben incluir bacterias como *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ó *Actinobacillus suis*; además del virus de la Fiebre Porcina Clásica. Al realizar la necropsia es habitual observar congestión de la mucosa fúndica gástrica, esplenomegalia, hepatomegalia menos severa, adenomegalia mesentérica y gastrohepática, pulmones congestionados, bronconeumonía craneoventral, hemorragias petequiales en riñón y si la enfermedad alcanza la cronicidad se observan lesiones intestinales características de la enterocolitis, incluyendo las típicas úlceras botonosas en colon.

El aislamiento bacteriológico a partir de muestras de pulmón, hígado, bazo o ganglios linfáticos mesentéricos, integrado a la información aportada por la evaluación clínica y epidemiológica así como los hallazgos macro y microscópicos, nos permiten obtener el diagnóstico definitivo (6).

S. choleraesuis, requiere procedimientos especiales para poder ser aislada en el laboratorio ya que es muy susceptible a los medios de enriquecimiento; tanto el caldo selenito como el caldo tetrionato poseen efecto tóxico sobre esta bacteria, a menos que las concentraciones de yodo y tiosulfato de sodio sean reducidas de 7 a 4% y de 14 a 8% respectivamente (23).

El medio Rappaport se considera uno de los más efectivos cuando se desea aislar al microorganismo de tejidos (24). Algunos investigadores recomiendan emplear el medio de tetrionato de Muller-Kauffman conteniendo verde brillante y bilis de bovino, como medio de enriquecimiento, el cual debe ser incubado a 43° C; después de la incubación la muestra

puede cultivarse en medio sólido verde brillante. Al parecer, la incubación a esta temperatura inhibe el crecimiento de *Proteus* y *Pseudomonas*, favoreciendo el desarrollo de la *Salmonella* (25).

Los hemocultivos, las reacciones serológicas y hematológicas y las pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son solo algunas de las pruebas utilizadas para la detección del género *Salmonella* cuando se presenta septicemia; la elección de alguna de ellas depende de la cantidad de muestra disponible, el material y equipo necesario, así como del presupuesto con el que se cuente; aunque con mayor frecuencia se realizan pruebas serológicas, y posteriormente el aislamiento de la muestra para determinar la especie de la cual se trata (6).

1.7. Tratamiento

El tratamiento se lleva a cabo sólo en casos en los que se encuentra incremento de la mortalidad asociada con *S. choleraesuis*. Deben aplicarse rápidamente estrategias para medicar a los afectados, minimizando las pérdidas y evitando la diseminación de la enfermedad. El agente causal de la Salmonelosis habita intracelularmente lo cual dificulta la acción de una serie de antibióticos, además la mayoría de los estudios realizados para probar medicaciones en alimento han estado orientados a demostrar su eficacia profiláctica y no su valor terapéutico. Idealmente la elección del antibiótico debe sustentarse en el resultado del antibiograma de la cepa aislada en cada brote y en las experiencias previas en la granja. Esta medicación puede ser vía oral (alimento o preferiblemente agua) o parenteral (animales más afectados). Los antibióticos recomendados son: amikacina, gentamicina, neomicina, apramicina, ceftiofur y trimetropim sulfonamida. Sin embargo la sensibilidad

mostrada en los antibiogramas para Florfenicol, Enrofloxacin y algunos Nitrofuranos reflejan los mejores resultados a nivel de campo (26).

1.8. Aspectos epidemiológicos

Los cerdos son muy susceptibles a la salmonelosis la cual puede ser causada por un gran número de serotipos, pero predominantemente *S. choleraesuis* y *S. typhimurium* (20, 22, 27). Estos dos serotipos son responsables de aproximadamente el 65% de los casos de salmonelosis en cerdos siendo *S. choleraesuis*, el serotipo más común (28). Aunque esta bacteria es altamente específica para los porcinos, se ha aislado de otros huéspedes, incluyendo al hombre (22).

La transmisión de *Salmonella* en cerdos puede ocurrir también mediante la participación de numerosos organismos que actúan como portadores, como son: las moscas, roedores, borregos, perros, gatos, algunas aves y fauna silvestre. La transmisión por medio del alimento y agua contaminada es muy importante en el caso de *S. typhimurium* y otros serotipos. Esto no parece ocurrir con mucha frecuencia en el caso de *S. choleraesuis*, a pesar de que se ha demostrado que esta bacteria puede sobrevivir en el agua por más de siete meses (22).

1.9. Prevención y control

Las vacunas vivas atenuadas de *S. choleraesuis* administradas oralmente proporcionan la mejor protección contra *salmonella* debido a su habilidad para estimular de manera más efectiva la respuesta inmune mediada por células, en comparación con las preparadas con bacterias muertas (29). Se dispone de una vacuna viva atenuada contra *S. choleraesuis* de

que confiere cierta seguridad y eficacia con criterios clínicos, patológicos y microbiológicos; sin embargo, se han señalado variaciones en el grado de protección en algunas explotaciones, que son relacionados con altos niveles de exposición, a infecciones previas antes del establecimiento de la inmunidad vacunal o por estar otro serotipo actuando, por lo que se recomienda aplicarla en áreas donde la salmonelosis es enzoótica y producida por *S. choleraesuis* (30, 31, 32).

El control se basa en reducir la contaminación del medio ambiente por animales enfermos o portadores, encontrar y eliminar la fuente de infección. Dado que no es fácil eliminar totalmente la bacteria, se puede mantener en un mínimo controlable, evitando la máxima exposición de los animales y este objetivo se logra con adecuadas medidas de manejo que comprenden métodos de todo-dentro, todo-fuera, limpieza, desinfección, adecuada disposición de heces y aguas, bioseguridad, eliminación de fauna nociva como roedores, cuarentenas, vacunación y junto con estas medidas se deben realizar periódicamente monitoreos bacteriológicos y serológicos (33, 34, 35).

2. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico definitivo de una infección por *Salmonella* se realiza a través del aislamiento de la bacteria a partir de muestras de sangre, heces, orina, líquido aspirado de médula ósea, bilis o de órganos de animales sacrificados. El aislamiento bacteriológico es tardado y requiere por lo menos de 8 días en un hemocultivo para obtener el resultado y el éxito de tener un aislamiento positivo en promedio es del 40%, ya que existen varios factores que pueden influir como, la fase septicémica y el periodo de eliminación de este microorganismo en los animales (15). Por otro lado, las pruebas de aglutinación para determinar la presencia de anticuerpos en suero sanguíneo son rápidas, sencillas y altamente sensibles, sin embargo su especificidad se cuestiona ya que se presentan reacciones cruzadas con algunos géneros bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae*. Considerando lo mencionado anteriormente se desarrolló y estandarizó un inmunoensayo enzimático (ELISA) utilizando como antígeno de captura PME de *S. choleraesuis* para el diagnóstico de la salmonelosis en cerdos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Utilizar preparaciones de proteínas de la membrana externa (PME) de *Salmonella choleraesuis* (CENID-M98) para diagnosticar la salmonelosis porcina mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA).

3.2. Objetivos específicos

- Obtener una preparación de PME de *S. choleraesuis* (CENID-M98).

- Determinar el patrón electroforético de las PME de *S. choleraesuis* (CENID-M98).

- Estandarizar el ELISA, utilizando como antígeno de captura una preparación de PME de *S. choleraesuis* (CENID-M98).

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Cepas y medios de cultivo

Se utilizaron tres cepas previamente estudiadas y analizadas bioquímicamente en el CENID-Microbiología INIFAP. Las cepas fueron: *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5), *S. typhimurium* (CENID-M02). Dichas cepas se utilizaron para elaborar los antígenos para las pruebas de aglutinación, para obtener las PME y comparar la variabilidad electroforética de éstas, también fueron utilizadas para la infección de los cerdos en condiciones controladas. Los medios de cultivo utilizados para este trabajo fueron: agar MacConkey, agar Salmonella-Shigella, agar Sulfito de Bismuto, agar Xilosa-Lisina Desoxicolato, agar nutritivo, medio bifásico Ruíz-Castañeda (Hemocultivo), caldo nutritivo y medio de mantenimiento (agar nutritivo más glicerol) (8, 36).

4.2. Preparación de las proteínas de la membrana externa (PME)

Las bacterias fueron cultivadas a 37° C durante 24 horas hasta alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento, en caldo nutritivo, las PME fueron obtenidas de acuerdo a método descrito por Matsuyama *et al.* (1984), adaptado de *E. coli* a *Salmonella*; (37) y Verdugo-Rodríguez *et al.*(1984) (38). Los cultivos fueron cosechados en un amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4 en un volumen de 200 ml y posteriormente fueron centrifugados a 1,400 xg durante 15 minutos a 4°C. Las pastillas fueron resuspendidas en 30 ml de HEPES 10 mM, pH 7.4, EDTA 1mM y PMSF 2mM. Se sonicó para lisar las bacterias con 7 pulsos de 60 segundos cada uno a 20 kHz equivaliendo a 20,000 ciclos por segundo (*Vibra cell sonicator, Sonic & Material Co., Danbury, Connecticut. USA*). Las células lisadas fueron centrifugadas a 1,400 xg durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante fue ultra centrifugado

a 100,000 xg por 60 minutos a 4°C en una ultracentrífuga *Beckman J2-21* (rotor SW50.1), el sobrenadante obtenido fue desechado y a la pastilla obtenida se le agregaron 3 ml de HEPES, EDTA, PMSF y sarcosine al 1% y se incubó por 30 min a temperatura ambiente, nuevamente se ultracentrifugó la muestra a 100,000 xg durante 60 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 0.5 ml de PBS, EDTA y PMSF y se congeló a -20°C para su uso posterior (38).

4.3. Cuantificación de las PME

Las PME se descongelaron y se depositó una alícuota de 30 μ l en un tubo *ependorf* de 1.5 ml, enseguida se agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y se dejó precipitar en hielo 10 min. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 2, 800 xg en una microcentrífuga IEC (*Internacional Equipment Company, USA*), el sobrenadante se desechó y la pastilla se deshidrató al vacío en una centrífuga SC-Savant. La pastilla fue resuspendida en 1 ml de hidróxido de sodio al 0.4 N (solución fresca), y se mezcló durante 60 segundos aproximadamente para homogeneizar la proteína. Las mezclas se congelaron a -70°C durante 30 min y después se agitaron con vortex 60 seg evitando generar espuma. Las muestras fueron depositadas en una microplaca *MaxiSorp F96 (NUNC, Danemark)* de la siguiente manera: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μ l de proteína y 28, 26, 24, 22, 20 y 18 μ l de NaOH respectivamente, ajustando el volumen a 100 μ l. finalmente a cada pozo se le agregaron 100 μ l de solución de *Biuret* preparada con 50 mg de azul de *Coomasie G-25*, 25 ml de etanol al 95% y 50 ml de ácido fosfórico al 85%. La lectura se realizó en un lector de ELISA (*VICTOR 3 Wallac 1420, Perkin.Elmer, USA*) a una longitud de onda de 405 nm. La concentración de proteína se determinó utilizando como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina (37).

4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida para análisis de proteínas (SDS-PAGE)

Las preparaciones de PME de, *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5), *S. typhimurium* (CENID-M02), fueron separadas de acuerdo al método descrito por Laemmli (39). La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 14x10 cm y 0.75 mm de grosor en una cámara *slab gel unit* SE-400. El gel concentrador se preparó al 4% y el gel separador al 14%. Se depositaron 10 μg de PME de cada una de las cepas por carril, usando una solución amortiguada de tris-glicina con 0.1% de SDS. Los geles de PAGE-SDS se sometieron a 20 mA durante 1 hora para el gel concentrador y a 40 mA durante 4 horas para el gel separador (40). La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie al 0.001%, y se dejó en agitación durante 15 min, posteriormente el gel se destiñó con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 7%, calentándolo a ebullición 60 segundos y posteriormente dejándolo en agitación durante 15 min. Este paso se repitió tres veces hasta visualizar claramente las proteínas (41).

4.5. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las PME de *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5) y *S. typhimurium* (CENID-M02) fueron separadas de acuerdo al método descrito por Laemmli (39). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una cámara *slab gel unit* SE-400. El gel concentrador fue preparado al 4% y el gel separador al 14%.

Se depositaron 10 μg de PME de cada una de las cepas por carril, utilizando una solución amortiguada de tris-glicina con 0.1% de SDS. Los geles fueron cargados en la cámara y se sometieron a 20 mA durante 1 hora para el gel concentrador y 40 mA durante 4 horas para el gel separador (39).

4.6. Preparación de antígenos para las pruebas de aglutinación

Se cultivaron de manera independiente las siguientes cepas: *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5), *S. typhimurium* (CENID-M02), en agar nutritivo. Los cultivos de *Salmonella* se incubaron 24 horas a 37°C. Posteriormente las bacterias se sembraron en tubos conteniendo agar de soya tripticaseina (AST). Las bacterias se incubaron 24 horas a 37°C. Los cultivos se cosecharon con solución salina estéril (SSE) y se inocularon 5 ml del cultivo en botellas de *Roux* conteniendo AST. Se incubaron de 24 horas a 37°C y después el cultivo fue cosechado con 30 ml de solución salina estéril (SSE) la cual se agregó a cada botella de *Roux* con una jeringa estéril, después la suspensión bacteriana de todas las botellas fue vertida en un matraz estéril (800 ml aproximadamente). Las bacterias del género *Salmonella* cosechadas se incubaron en agitación 3 h a temperatura ambiente con 50 mg de sulfato ferroso y de azul de tetrazolium al 0.1%. Posteriormente la suspensión bacteriana fue inactivada con etanol al 100%. Las bacterias se centrifugaron a 1,400 xg durante 15 min, se resuspendieron en SSE y se lavaron dos veces con SSE por centrifugación. Finalmente el paquete celular se resuspendió en SSE con fenol (5%) con un pH de 6.8 a una concentración celular del 4% (36).

4.7. Infección experimental de cerdos

Se infectaron cerdos divididos en grupos de diez animales y se dejó un grupo control también con diez animales. La edad de los animales era de 6 semanas. Fueron obtenidos de una granja libre de la salmonelosis; con resultados negativos a las pruebas serológicas y de aislamiento bacteriológico realizados en el CENID-Microbiología INIFAP. Para este experimento se formaron cuatro grupos de diez animales cada uno. Los cerdos fueron infectados con una dosis 1×10^9 UFC/1ml por vía oral de la siguiente manera: grupo 1,

control tratado con 1 ml de PBS al 1X; grupo 2, *S. choleraesuis* (CENID-M98); grupo 3, *S. enteritidis* (CENID-MA5); grupo 4, *S. typhimurium* (CENID-M02) (8). Todos los cerdos fueron sangrados de la vena cava anterior en la parte baja del canal yugular y muestreados con hisopos rectales 8 días antes del tratamiento. Posteriormente todos los animales se muestrearon cuando llegaron y posteriormente a los 1, 7, 14, 21, 28 y 35 días post infección, obteniendo aproximadamente 10 ml de sangre sin anticoagulante; se inocularon 3 ml en medio doble Ruiz-Castañeda para el hemocultivo y el resto de la sangre se utilizó para la obtención de suero. Por otro lado, también se obtuvieron muestras con hisopos rectales para recuperar la bacteria inoculada en cada uno de los grupos de animales. Todos los sueros fueron separados por centrifugación a 1,000 xg durante 10 minutos y guardados a -20° C para realizar posteriormente las pruebas serológicas (15).

4.8. Aislamiento bacteriológico

a) Hemocultivo

Se inocularon 3 ml de sangre completa en medio bifásico Ruíz-Castañeda de manera aséptica, el medio bifásico se mezcló inclinando el frasco suavemente para impregnar la fase sólida del medio y se incubó a 37 C en posición vertical por tres semanas. Los hemocultivos se revisaron diario los primeros 8 días. Los hemocultivos que presentaron algún crecimiento de colonias fueron sembrados en medios selectivos para bacterias del género *Salmonella*, como son: agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella*, agar Sulfito de Bismuto y agar Xilosa-Lisina Desoxicolato. Posteriormente las bacterias aisladas de cada grupo de cerdos infectados, fueron identificadas por tinción de Gram, pruebas bioquímicas

y serológicas. Los medios de Ruíz-Castañeda que no presentaron crecimiento de colonias se mantuvieron hasta por 3 semanas y después se consideraron negativos (15).

b) Cultivo a partir de heces

Las muestras de heces obtenidas con hisopos con medio Ames (el cual contiene carbón activado), en cada uno de los seis muestreos que fueron realizados los días 0, 1, 7, 14, 21, 28 y 35 post infección fueron sembradas en agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella*, agar Sulfito de Bismuto y agar Xilosa-Lisina Desoxicolato. Los cultivos se incubaron 24 h a 37° C y posteriormente fueron separadas las colonias lactosa negativas y colonias con presencia de ácido sulfhídrico. Las bacterias aisladas de cada grupo de cerdos infectados, fueron corroboradas por tinción de Gram, pruebas bioquímicas y serológicas, finalmente las bacterias se conservaron en medio de mantenimiento (15).

4.9. Pruebas serológicas

a) Aglutinación rápida en placa

Utilizando los antígenos preparados de *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5), *S. typhimurium* (CENID-M02), se realizó una prueba de aglutinación directa para un diagnóstico presuntivo.

Las pruebas se realizaron sobre una placa de vidrio o de acrílico rectangular (30 X 20 cm.) dividida en cuadros (3 X 3 cm.), donde se depositaron 30 μ l de suero problema y enseguida se agregan 30 μ l de del antígeno sobre cada una de las muestras. Se mezclaron perfectamente con una manija de acero inoxidable o palillos de madera y la placa se sometió a movimientos oscilatorios suaves durante aproximadamente 3 min. Después la lectura se realizó entre 3 y 4 minutos sobre un transiluminador de luz blanca para observar

la presencia de aglutinaciones, al presentarse reacciones posteriores se consideraron negativas. La presencia de grumos finos indicó que hubo una reacción positiva y se interpretó por el grado de aglutinación. Se realizó al mismo tiempo una prueba con sueros controles positivos para corroborar las aglutinaciones de los sueros problema. Todos los sueros que fueron positivos a un grado de aglutinación se sometieron a una prueba complementaria para obtener títulos de aglutinación (7).

b) Aglutinación en placa modificada con β -mercaptoetanol (β -ME)

La prueba se realizó sobre una placa de vidrio cuadrículada, depositando en cada cuadro 80, 40, 20 y 10 μ l de suero problema y en seguida se agregaron 30 μ l de β -ME a cada una de las diferentes diluciones, se mezclaron perfectamente y se dejaron reaccionar 3 min., posteriormente se depositaron en cada dilución 30 μ l del mismo antígeno que se utilizó para la prueba de aglutinación directa. La mezcla se homogeneizó perfectamente con una manija de acero inoxidable, manteniendo la placa en movimiento giratorio durante cuatro minutos. La lectura se realizó sobre un transiluminador de luz blanca, considerando reacción positiva cuando hay presencia de aglutinación. La aglutinación se reportó como: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 (8). Este procedimiento es recomendado para conocer los títulos de anticuerpos, considerando que títulos superiores a 1:50 son presuntivos de infección. Esta prueba se realizó con todos de cerdos infectados con los tres serotipos del género *Salmonella*.

4.10. Estandarización del ELISA

El ELISA se realizó según los procedimientos realizados anteriormente Verdugo-Rodríguez *et al.* (1993) (40). La preparación de PME obtenida de la cepa *S. choleraesuis* (CENID-M98) fue adherido a las microplacas *Maxisorp* F-96 (*NUNC- inmunomodulo, Danemark*), usando 2, 3, 4 y 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PME diluida en PBS (pH 7.4). El tiempo de fijación del antígeno a la placa fue de 24 horas a 4°C. al momento de realizar el ensayo los pozos de las placas fueron lavados 3 veces con PBS-tween-20 (pH 7.4) al 0.05%. Las placas se bloquearon con 150 μl por pozo con leche descremada (*skim milk DIFCO™*) preparada al 5% durante 60 min a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron los pozos 3 veces con PBS-tween-20 y se colocaron los sueros de forma pareada 100 μl por pozo previamente diluidos (1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:1000) en PBS, obtenidos de cerdos infectados experimentalmente con, *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5), *S. typhimurium* (CENID-M02), así como suero de cerdos no infectados. Las placas se incubaron 60 min a 37°C, se lavaron 3 veces y después se agregó 100 μl por pozo de IgG de cabra anti-Ig de cerdo (UsBiological, Inc. USA) a diluciones de 1:1000, 1:2000 y 1:3000; la placa se incubó nuevamente 60 min a 37°C lavándose 3 veces posteriormente. Por último se agregó el ABTS diluido en amortiguador citrato sódico al 0.1 M y peróxido de hidrógeno al 7% 100 μl por pozo, se incubó a temperatura ambiente y se realizaron lecturas a los 5, 10, 15, 20, 25, 30,35, 40 y 45 min a 405 nm para poder establecer el tiempo óptimo de lectura (40).

4.11. Análisis estadístico

Determinación de los puntos de corte del ELISA con PME de animales infectados experimentalmente

Para establecer el punto de corte (**M**) se utilizaron sueros de cerdos infectados experimentalmente positivos al ELISA y sueros de cerdos del grupo control negativos a todas las pruebas. Se determinó con un intervalo de confianza 0.95 y dos desviaciones estándar, utilizando la siguiente fórmula en la cual se realizaron los cálculos para *S. choleraesuis* la cual es la misma fórmula utilizada para los otros antígenos:

Tabla 2. En la que se observa la fórmula para determinar el punto de corte.

$M = x \pm Z (0.5 - \frac{0.05}{2})(\delta/\sqrt{n})$
n (población)= 92
M (Media)= 0.2162
δ (Desviación estándar)= 0.13717268
$M = 0.216255 \pm 1.96 (0.274345 / \sqrt{n})$
$M = 0.216255 \pm 1.96 (0.079282)$
M= 0.1369

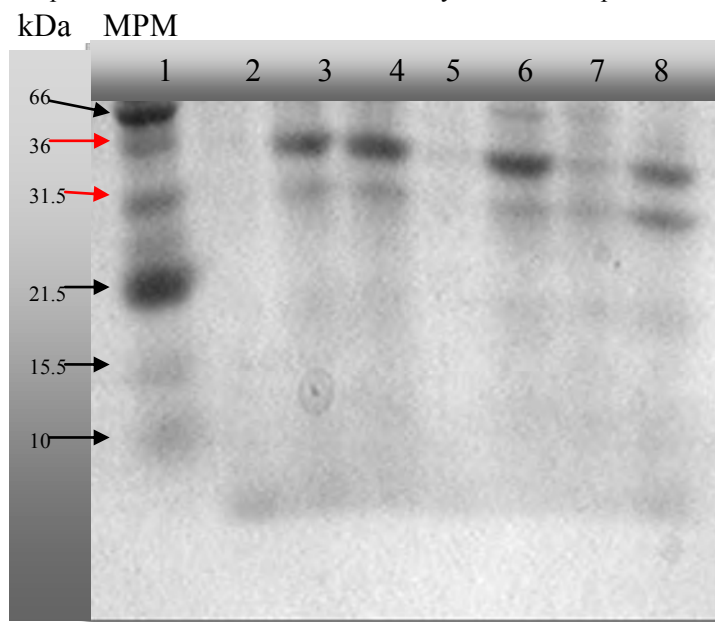
Los resultados de la estandarización, del ELISA, la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia, están dados en porcentajes y fueron analizados según la fórmula estadística en una tabla de 2x2 dada para determinar sensibilidad y especificidad (41, 42).

5. Resultados

5.1 Perfil electroforético de las PME

Fueron extraídas y visualizadas PME en geles (SDS-PAGE), 4 cepas dentro de las cuales se encuentran: *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5), *S. typhimurium* (CENID-M02) y *S. typhi* IMSS-1 las cuales se encuentran entre un peso de 31.5 y 36 kDa. Éstas fueron seleccionadas para diseñar, estandarizar y evaluar el ELISA como se muestra en la figura 3.

Figura 3. Gel de poliacrilamida-SDS (14%) en el que se muestran PME. Carril 1, MPM (Mark 2); carril 2, *S. gallinarum* (cepa: 591); carril 3, *S. choleraesuis* (CENID-M98); carril 4, *S. enteritidis* (CENID-MA5); carril 5, *S. pullorum* (cepa: 47); carril 6, *S. typhimurium* (CENID-M02); carril 7, *S. typhi* IMSS-1; carril 8, *Brucella suis*. Nota: algunas cepas fueron incluidas arbitrariamente y no se contemplan en este trabajo.



Se observan 2 bandas que corresponden a las PME con mayor concentración, con un peso molecular de aproximadamente 31.5 y 36 kDa. La PME de 36 kDa fue la más evidente en todas las cepas.

5.2. Concentración y cuantificación en $\mu\text{g/ml}$ de las diferentes preparaciones de PME de *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5) y *S. typhimurium* (CENID-M02).

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de *Biuret* en microplaca BCA (*Pierce, Biotechnology, Meridian Road, USA*) usando como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA), realizando la lectura a 562 nm en un lector de ELISA. Tabla 3.

Tabla 3. Se observan las concentraciones de proteínas determinadas mediante una curva estándar de albúmina sérica bovina por el método de Biuret.

Serotipo	Cepa	Concentración de proteína
<i>S. choleraesuis</i>	CENID-M98	2.93 $\mu\text{g/ml}$
<i>S. enteritidis</i>	CENID-MA5	2.5 $\mu\text{g/ml}$
<i>S. typhimurium</i>	CENID-M02	2.87 $\mu\text{g/ml}$

5.3. Hemocultivo en medio bifásico Ruíz-Castañeda

El crecimiento bacteriano en el medio Ruíz- Castañeda se observó entre los 7 y 18 días post inoculación del medio y los resultados, para el grupo de diez animales infectados experimentalmente con *S. choleraesuis* se obtuvieron 5 aislamientos, para los del grupo infectado con *S. enteritidis* se obtuvieron 4 aislamientos y para los infectados con *S. typhimurium* se lograron 4 aislamientos. Como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentajes de aislamientos obtenidos mediante la técnica de Ruíz-Castañeda para aislar bacterias de sangre.

Grupo control	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
No hubo crecimiento bacteriano	5/10 aislamientos 50%	4/10 aislamientos 40%	4/10 aislamientos 40%

5.4. Cultivo a partir de heces

Mediante este método se obtuvo un mayor número de aislamientos respecto al hemocultivo los cuales fueron logrados a partir del día 3 y 4 post infección. El grupo infectado con *S. choleraesuis* se obtuvieron 8 aislamientos, para los del grupo infectado con *S. enteritidis* se obtuvieron 7 aislamientos y para los infectados con *S. typhimurium* se lograron 9 aislamientos. Los resultados se muestran en porcentajes como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. En esta tabla se observan los porcentajes de aislamientos obtenidos mediante la técnica de coprocultivo.

Grupo control	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
No hubo crecimiento de patógenos bacterianos	8/10 aislamientos 80%	7/10 aislamientos 70%	9/10 aislamientos 90%

5.5. Aglutinación rápida en placa

Resultados de las pruebas de aglutinación rápida en placa de los sueros de los animales en cada muestreo realizado en los diferentes grupos de cerdos infectados y grupo control en la que se muestran los porcentajes de aglutinación obtenidos. En el muestreo basal el 100% de los animales fueron negativos a la prueba de aglutinación directa en todos los grupos de animales, el grupo control fue negativo a esta prueba tamiz durante todo el muestreo, en los grupos infectados con *S. choleraesuis*, *S. enteritidis* y *S. typhimurium* entre el 20 y 22.2% reaccionaron positivamente a los 7 días post infección, a los 14 días el grupo infectado con *S. choleraesuis*, y el infectado con *S. typhimurium* fueron positivos entre el 88% y el 77.7% respectivamente excepto el grupo infectado con *S. enteritidis* que reaccionó el 100%. En los muestreos realizados a los 21, 28 y 35 días el 100% de los sueros fueron positivos, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Se observa aglutinación a partir del día 14 post infección indicada con el signo +, (La cantidad de cruces es arbitraria y es cuestión de apreciación por parte del intérprete) los sueros negativos se indican con el signo (-). Algunos animales murieron en el transcurso del experimento y están indicados en la tabla.

GRUPO		BASAL	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS	35 DIAS
Sueros	Control PBS						
1		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
2		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
3		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
4		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
5		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
6		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
7		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
8		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
9		NEG.	Murió				
10		NEG.	Murió				
	<i>Salmonella choleraesuis</i>						
11		-	+++	++++	++++	+++	++
12		-	+++	++++	++++	+++	++
13		-	Murió				
14		-	-	-	+	++	+
15		-	-	++	+++	++	++
16		-	-	+++	+++	++	++
17		-	-	++++	++++	++	+
18		-	-	++	++	++	+
19		-	-	+	++	++	+
20		-	-	+++	+++	+++	++
Total	Porcentaje de aglutinaciones	0%	22.2%	88.8%	100%	100%	100%
	<i>Salmonella enteritidis</i>						
21		-	-	+++	++++	+++	++
22		-	++	++++	+++	++++	+++
23		-	-	+++	+++	++++	+++
24		-	++	++++	+++	+++	++
25		-	-	+++	++++	++	++
26		-	+	++++	++++	+++	++
27		-	-	++	+++	++	++
28		-	-	+++	++++	+++	+++
29		-	-	++	+++	+++	+++
30		-	-	++++	++++	++	++
Total	Porcentaje de aglutinaciones	0%	20%	100%	100%	100%	100%
	<i>Salmonella typhimurium</i>						
31		-	-	-	++	++	++
32		-	-	+	++	+	+
33		-	-	-	Murió		
34		-	-	++	+++	+++	++

35		-	-	++	++	+++	++
36		-	-	++	++	+++	++
37		-	+	+++	+++	+++	++
38		-	++	++++	+++	++++	+++
39		-	-	++	+++	+++	++
40		-	Murió				
Total	Porcentaje de aglutinaciones	0%	22.2%	77.7%	100%	100%	100%

La sensibilidad calculada para la prueba de aglutinación rápida en placa en el grupo de sueros de cerdos infectados con *S. choleraesuis* fue del 100%, la especificidad resultó en 84%, el valor predictivo positivo fue del 82% y el valor predictivo negativo fue del 100%, la sensibilidad calculada para el grupo de *S. enteritidis* fue del 100%, la especificidad fue del 87%, el valor predictivo positivo fue del 86% y el valor predictivo negativo del 100%, la sensibilidad para *S. typhimirium* fue del 100%, la especificidad del 82%, el valor predictivo positivo fue del 80% y el valor predictivo negativo fue del 100%. Los resultados antes mencionados fueron obtenidos utilizando la tabla de 2x2 para calcular sensibilidad y especificidad (41, 42).

5.6. Aglutinación con β -mercaptoetanol, para determinar títulos de anticuerpos en los diferentes muestreos de los grupos de cerdos infectados.

En los siguientes resultados se observan los títulos encontrados en los sueros de los diferentes grupos. Se observa un mayor porcentaje de aglutinación en todos los grupos lo cual indica el aumento de la sensibilidad y la especificidad de la prueba cada muestreo realizado. Los diferentes grupos de cerdos infectados y grupo control se observó que porcentajes de aglutinación obtenidos en el muestreo basal el 100% de los animales fueron negativos a la prueba de aglutinación con β -mercaptoetanol en todos los grupos de

animales, el grupo control fue negativo a esta prueba de titulación durante todo el muestreo, en los grupos infectados con *S. choleraesuis*, *S. enteritidis* y *S. typhimurium* el 66.6, 80 y 77.7% respectivamente, reaccionaron positivamente a los 7 días post infección, a los 14 días el grupo infectado con *S. choleraesuis*, y el infectado con *S. enteritidis* reaccionaron positivos al 100%, excepto el grupo infectado con *S. typhimurium* que reaccionó el 88.8%. En los muestreos realizados a los 21, 28 y 35 días el 100% de los sueros fueron positivos a esta prueba. Los títulos en el grupo infectado con *S. enteritidis* fueron en promedio de 1:200, en el grupo infectado con *S. choleraesuis* fueron en promedio de 1:100 y para el grupo infectado con *S. typhimurium* fueron en promedio de 1:200. Ver tabla 7.

Tabla 7. Pruebas de aglutinación con β -mercaptoetanol en grupos de cerdos infectados experimentalmente y grupo control. Algunos animales murieron durante el experimento y están registrados en la tabla.

GRUPO		BASAL	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS	35 DIAS
Sueros	Control PBS						
1		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
2		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
3		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
4		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
5		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
6		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
7		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
8		NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.	NEG.
9		NEG.	Murió				
10		NEG.	Murió				
Total %		100%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>S. choleraesuis</i>						
11		NEG.	1:100	1:100	1:100	1:200	1:200
12		NEG.	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
13		NEG.	Murió				
14		NEG.	1:50	1:100	1:200	1:100	1:100
15		NEG.	1:50	1:100	1:100	1:100	1:100
16		NEG.	0	1:100	1:100	1:100	1:100
17		NEG.	0	1:100	1:100	1:100	1:50
18		NEG.	100	1:100	1:100	1:200	1:100
19		NEG.	100	1:100	1:25	1:100	1:200
20		NEG.	0	1:100	1:100	1:100	1:100
Total %		100%	66.6%	100%	100%	100%	100%
	<i>S. enteritidis</i>						
21		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
22		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
23		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
24		NEG.	0	1:100	1:200	1:200	1:200
25		NEG.	1:100	1:200	1:200	1:200	1:200
26		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
27		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
28		NEG.	1:100	1:200	1:200	1:200	1:200
29		NEG.	0	1:200	1:200	1:200	1:200
30		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
Total %		100%	80%	100%	100%	100%	100%
	<i>S. typhimurium</i>						
31		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
32		NEG.	0	1:200	1:200	1:200	1:200
33		NEG.	1:200	1:200	Murió		
34		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
35		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
36		NEG.	0	0	1:25	1:50	1:100
37		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
38		NEG.	1:200	1:200	1:100	1:200	1:200
39		NEG.	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
40		NEG.	Murió				
Total %		100%	77.7%	88.8%	100%	100%	100%

La sensibilidad obtenida en la prueba de aglutinación con 2- β -mercaptoetanol para el grupo infectado con *S. choleraesuis* fue del 100%, la especificidad resultó en 93.7%, el valor predictivo positivo fue del 93.3% y el valor predictivo negativo fue del 100%, la sensibilidad calculada para el grupo de *S. enteritidis* fue del 100%, la especificidad resultó del 96.1%, el valor predictivo positivo fue del 96% y el valor predictivo negativo del 100% y, la sensibilidad para *S. typhimurium* resultó en 100%, la especificidad del 93.3%, el valor predictivo positivo del 92.2% y el valor predictivo negativo del 100%. Los análisis estadísticos fueron los mismos utilizados para determinar sensibilidad y especificidad en el ELISA y con el mismo número de sueros (41, 42).

5.7. Resultados en la estandarización del ELISA

Se determinó la concentración de la preparación de proteínas PME el cual fue de 293 μ_g por pozo y se utilizaron 9 μl en 12 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) por placa. Se utilizaron sueros de animales infectados y positivos a aislamiento de *S. choleraesuis* y sueros de animales negativos a serología y aislamiento. Los sueros fueron diluidos en PBS a concentraciones de 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 y 1:500. Se utilizó una anti-IgG de porcino a diluciones de 1:750, 1:1000, 1:1500 y 1:2000. La concentración de antígeno de suero y anti-IgG en la que se observaron mayores diferencias entre positivos y negativos fue para *S. choleraesuis* de 293 μ_g por pozo, 1:500 y 1:1000, para *S. enteritidis* de 2.5 μ_g por pozo 1:300 y 1:1000 y para *S. typhimurium* 2.87 μ_g por pozo, 1:200 y 1:1000 respectivamente.

5.8. Resultados de los análisis estadísticos del ELISA. Punto de corte.

El punto de corte se estableció con un intervalo de confianza de 95% y dos desviaciones estándar a continuación se observa ejemplificado en las figuras 4, 5, 6 para cada grupo de cerdos infectados experimentalmente con su respectivo serotipo.

Figura 4. Valor mínimo y máximo de desviación estándar utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%. Los animales con valores iguales o mayores a 0.1369 OD fueron considerados como positivos y los menores fueron considerados como negativos en el caso de *S. choleraesuis*.

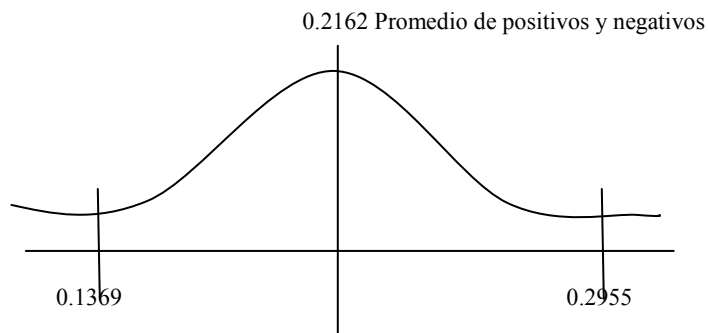


Figura 5. Valor mínimo y máximo de desviación estándar utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%. Los animales con valores iguales o mayores a 0.165 OD para *S. enteritidis* fueron considerados como positivos y los menores fueron considerados como negativos.

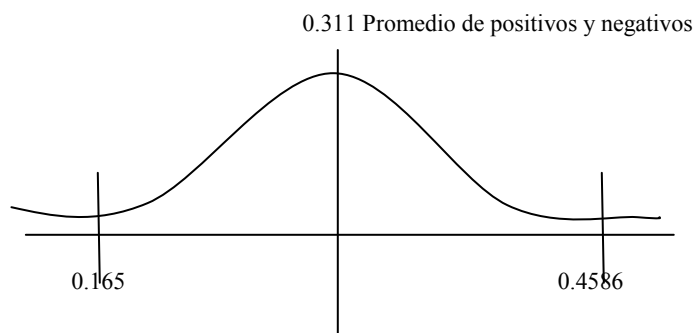
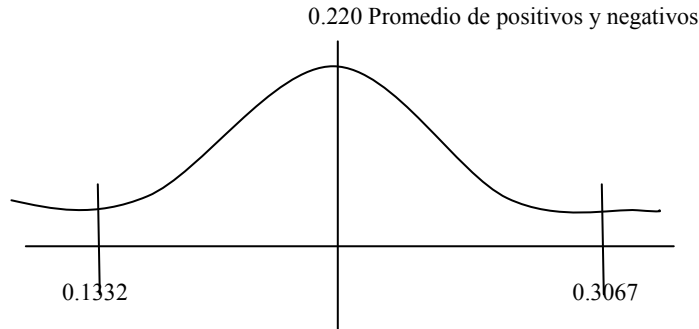


Figura 6. Valor mínimo y máximo de desviación estándar utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%. Los animales con valores iguales o mayores a 0.1332 OD para *S. typhimurium* fueron considerados como positivos y los menores fueron considerados como negativos.



El promedio de lectura de los sueros positivos para *S. choleraesuis* fue de 0.330 OD y para los negativos fue de 0.102 OD (figura 7) Para *S. enteritidis* los promedios fueron; positivos: 0.504 OD, negativos 0.119 OD (figura 8) y para *S. typhimurium* los promedios fueron; positivos: 0.329 OD, negativos: 0.110 OD (Figura 9).

Figura 7. Gráfica que muestra los promedios positivos y negativos de *S. choleraesuis* de todos los muestreos post infección. En eje X se muestra el valor de las densidades ópticas (OD) y en el eje Y los valores obtenidos OD de los sueros.

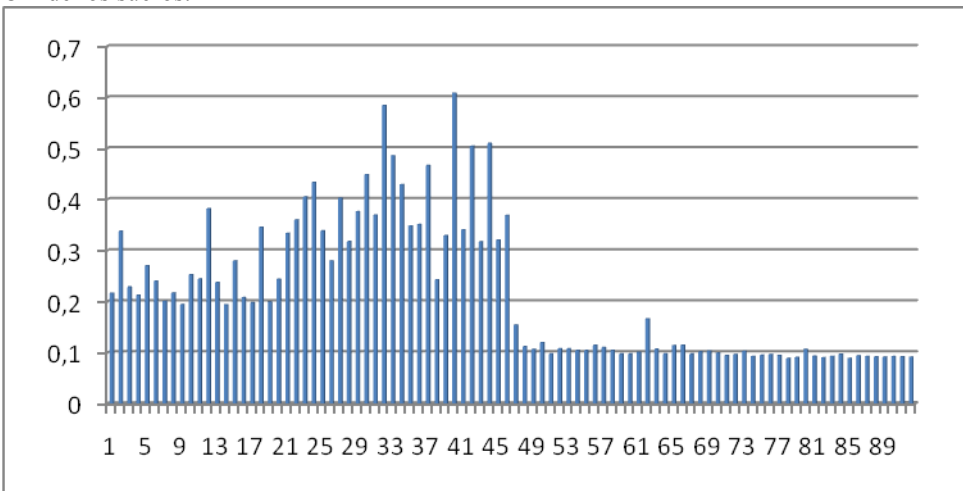


Figura 8. Gráfica que muestra los promedios positivos y negativos de *S. enteritidis* de todos los muestreos post infección. En eje X se muestra el valor de las densidades ópticas (OD) y en el eje Y los valores obtenidos OD de los sueros.

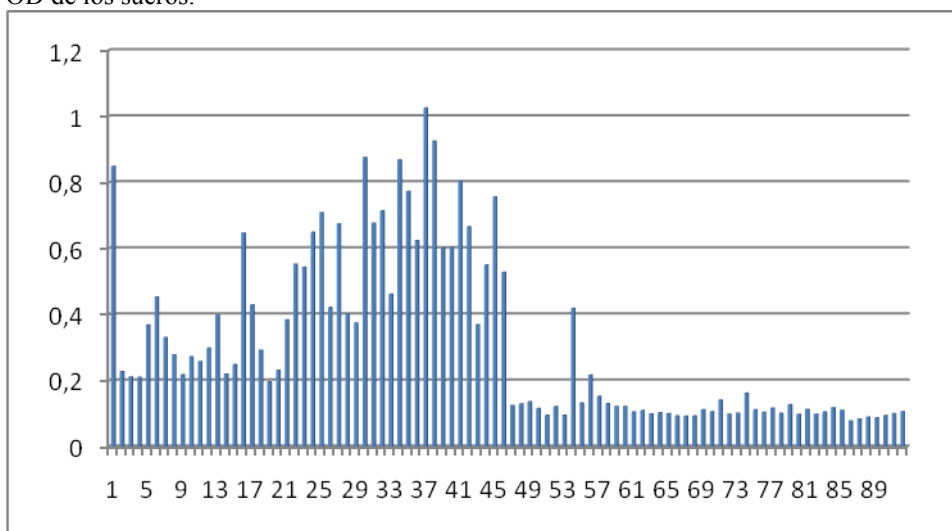
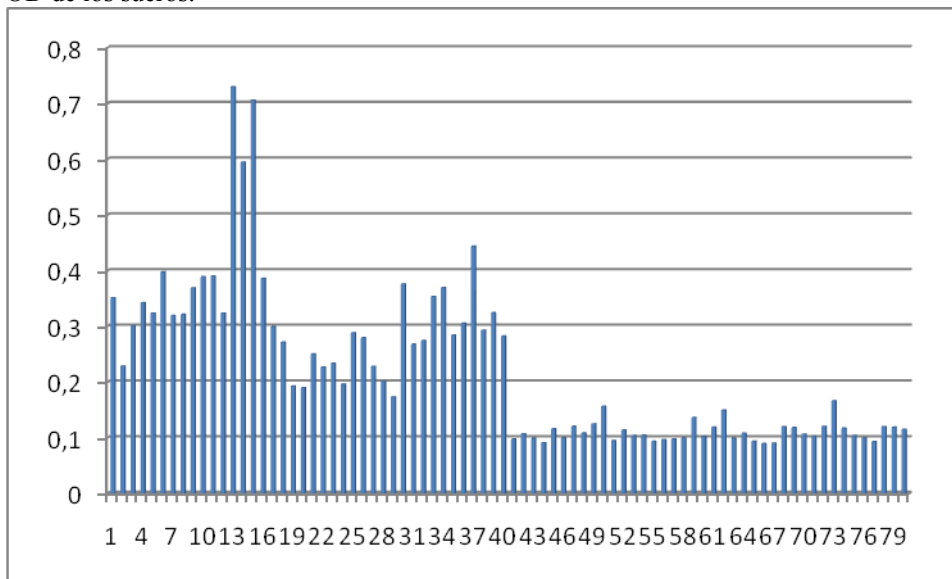


Figura 9. Gráfica que muestra los promedios positivos y negativos de *S. typhimurium* de todos los muestreos post infección. En eje X se muestra el valor de las densidades ópticas (OD) y en el eje Y los valores obtenidos OD de los sueros.



El punto de corte en el caso de *S. choleraesuis* fue de 0.136 OD, para *S. enteritidis* el punto de corte fue de 0.165 OD y para *S. typhimurium* el punto de corte fue de 0.133 OD. Figuras 10, 11, 12.

Figura 10. Gráfica que muestra el punto de corte de 0.1369 OD de *S. choleraesuis*, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, que divide a los valores positivos de los negativos.

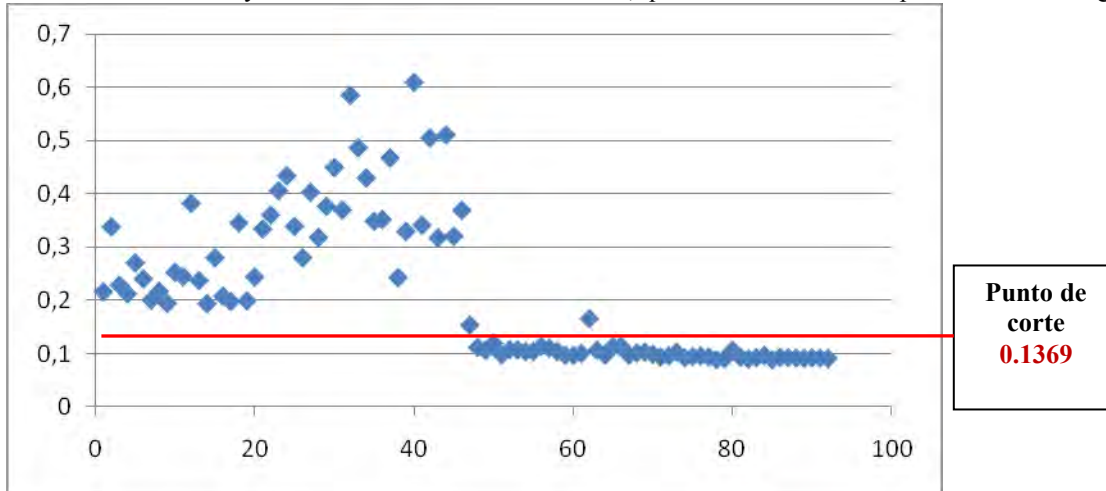


Figura 11. Gráfica que muestra el punto de corte de 0.165 OD de *S. enteritidis*, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, que divide a los valores positivos de los negativos.

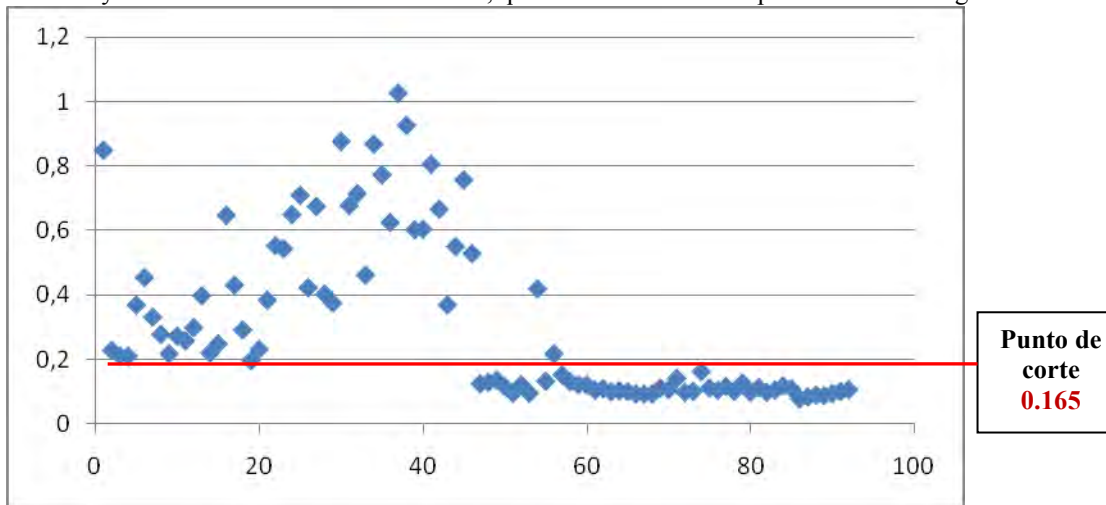
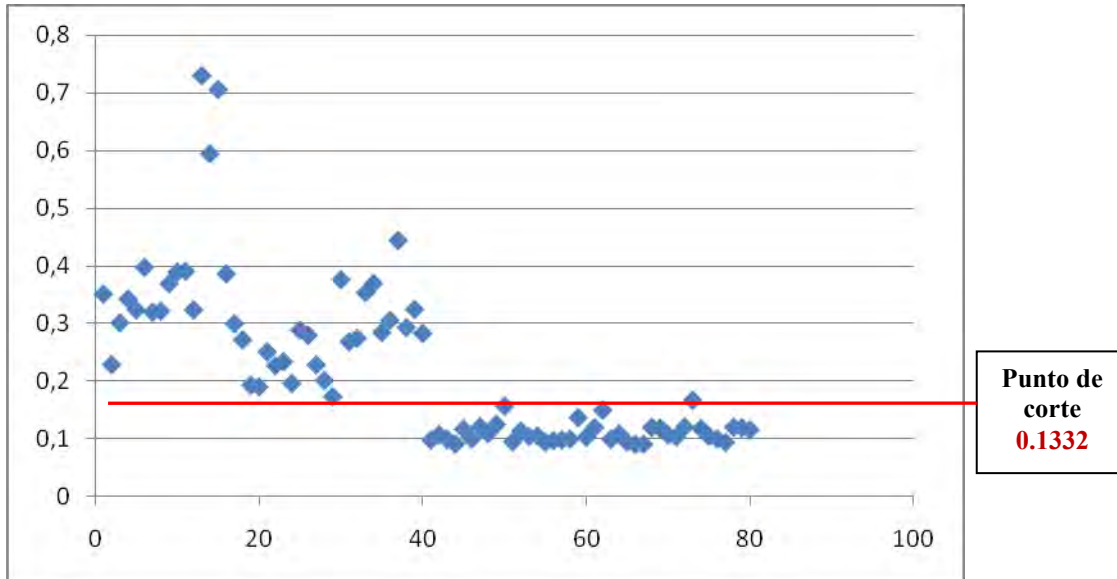


Figura 12. Gráfica que muestra el punto de corte de 0.1332 OD de *S. typhimurium*, utilizando dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95%, que divide a los valores positivos de los negativos.



5.9. Resultados de la determinación de la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia (kappa)

Se calculó la sensibilidad y especificidad (mediante una prueba del mismo nombre) con los resultados de los sueros evaluados con la ELISA ya estandarizada utilizando las preparaciones de PME obtenidas de las cepas de *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5), *S. typhimurium* (CENID-M02). Los resultados se evaluaron por una prueba de kappa o índice de concordancia, para determinar si existía diferencia estadística entre las tres pruebas de ELISA de las 3 cepas de *Salmonella*, en donde si el valor de X^2 es menor a 0.05, quiere decir que existe diferencia estadística y si el valor es mayor a 0.05 quiere decir que no hay diferencia estadística (41, 42).

5.10. Resultados del análisis de sensibilidad y especificidad del ELISA de *S. choleraesuis* utilizando sueros de animales infectados experimentalmente.

		ELISA PME <i>S. choleraesuis</i>		TOTAL
		+	-	
Verdadero positivo	+	10	0	Falso Positivo
Falso Negativo	-	0	10	Verdadero negativo
TOTAL		10	10	20

Sensibilidad (Se) = 100%

Especificidad (Esp) = 100%

Valor predictivo positivo (Vp+) = 100%

Valor predictivo negativo (Vp-) = 100%

5.11. Resultados del análisis de sensibilidad y especificidad del ELISA de *S. enteritidis* utilizando sueros de animales infectados experimentalmente.

		ELISA PME <i>S. enteritidis</i>		TOTAL
		+	-	
Verdadero positivo	+	10	1	Falso positivo
Falso negativo	-	0	9	Verdadero negativo
TOTAL		10	10	20

Sensibilidad (Se) = 100%

Especificidad (Esp) = 90%

Valor predictivo positivo (Vp+) = 90%

Valor predictivo negativo (Vp-) = 100%

5.12. Resultados del análisis de sensibilidad y especificidad del ELISA de *S. typhimurium* utilizando sueros de animales infectados experimentalmente.

		ELISA PME <i>S. typhimurium</i>		TOTAL
		+	-	
Verdadero positivo	+	10	1	Falso positivo
Falso negativo	-	0	9	Verdadero negativo
TOTAL		10	10	20

Sensibilidad (Se) = 100%

Especificidad (Esp) = 90%

Valor predictivo positivo (Vp+) = 90 %

Valor predictivo negativo (Vp-) = 100%

5.13. Índice de concordancia Kappa obtenido de la comparación del ELISA con las diferentes cepas usadas en este experimento.

Fórmula: Índice de concordancia (Kappa) = índice obtenido (Io)- índice esperado (Ie)/1- índice esperado (Ie).

Resultado de la comparación entre la ELISA de *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*: 0.9347

Resultado de la comparación entre la ELISA de *S. choleraesuis* y *S. typhimurium*: 0.8492

Resultado de la comparación entre la ELISA de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*: 0.8761

6. Discusión

Las tres cepas *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5) y *S. typhimurium* (CENID-M02) mostraron un perfil electroforético similar donde los pesos moleculares fueron de 31.5 a 36 kDa aproximadamente en geles de SDS-PAGE. Con estas cepas de tres diferentes serotipos, no se detectó una proteína especie-específica por lo que la similitud entre estas es alta y por lo tanto, pueden reconocer anticuerpos contra estos serotipos del género *Salmonella*, resultados similares fueron observados en varios serotipos de *S. enteritidis* y *S. gallinarum* donde se reportaron perfiles muy similares entre estos serotipos en condiciones de alta y baja osmolaridad (7).

Por medio de la técnica de hemocultivo se obtuvo en promedio de las tres cepas de *Salmonella* un porcentaje de aislamientos del 43.3% entre los días 7 y 18 post infección lo cual se reporta en la bibliografía (15). En la técnica del coprocultivo se logró un mayor número de aislamientos el promedio de las tres cepas fue del 80% debido a que los animales excretan la bacteria durante los primeros días post infección prolongándose la eliminación de la bacteria en heces por largos periodos (15). Como es sabido realizar el aislamiento bacteriológico en el 100% de animales en experimentación es complejo, debido a diferentes factores como: el desarrollo del microorganismo dentro del animal, periodo de eliminación, la virulencia del microorganismo y la resistencia natural de los animales, por lo cual el éxito en los aislamientos bacteriológicos solo se logra en el aproximadamente el 80% de los individuos en condiciones controladas (15).

En el presente estudio se mencionó la preparación de PME de *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5) y *S. typhimurium* (CENID-M02) para usarlas como

antígeno en el desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA. Para tal fin se evaluaron diferentes concentraciones del antígeno, encontrándose que para *S. choleraesuis* una concentración de PME de $2.93 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, una dilución de suero de 1:500 y una dilución del conjugado 1:1000, para *S. enteritidis* una concentración de PME de $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, una dilución del suero de 1:300 y para *S. typhimurium* una concentración de PME de $2.87 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, una dilución del suero de 1:200, se pueden diferenciar sueros de cerdos infectados de no infectados cuando la lectura se realiza a una longitud de onda de 405 nm y un tiempo de lectura de 30 min. En este sentido Vázquez *et al* (7), estandarizó un ELISA indirecto para la detección de *S. gallinarum* en pollos infectados experimentalmente usando PME de *S. gallinarum* con una concentración de $3 \mu\text{g}$, una dilución del conjugado 1:3,000 y una dilución del suero de 1: 9, 375, donde pudo diferenciar pollos infectados de no infectados, a los 35 min de la reacción enzima sustrato. En otro estudio Verdugo-Rodríguez *et al* (40) estandarizó un ELISA indirecto, usando como antígeno de captura PME de *S. typhi* para detectar anticuerpos contra fiebre tifoidea, encontrando que con una concentración de $5 \mu\text{g}$, puede diferenciar pacientes infectados de no infectados usando una dilución del suero de 1:3, 125 (38, 40).

En los resultados obtenidos en el experimento se encontró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100% el cual fue similar a otro estudio realizado en el que se infectaron grupos de cerdos con *Salmonella choleraesuis var Kunzendorf* en el que se desarrollaron 4 ELISAS, 2 con lipopolisacárido y 2 con PME encontrándose una sensibilidad del 88.8% al 100% y una especificidad del 93.3% al 100%; dicho trabajo resultó ser más sensible y específico que el desarrollado por nosotros debido a que se extrajeron las PME del gel que son antigénicas por lo que se infiere que esto lo hace más específico y sensible (8).

Al analizar la capacidad para detectar títulos de anticuerpos en los primeros días post infección, se encontró que el ELISA fue más sensible, a partir del día 7, que la prueba de aglutinación en placa con antígeno monovalente en los grupos de cerdos infectados experimentalmente con las tres cepas de *Salmonella*, sin embargo después del día 14 post infección la sensibilidad de la prueba de aglutinación igualó a la del ELISA aunque la especificidad fue menor, sin embargo, en la prueba de aglutinación con β -mercaptoetanol, aunque la sensibilidad fue menor, a partir del día 7, la especificidad de la prueba mostró valores muy similares a los del ELISA a partir del día 14 post infección lo cual puede deberse a que el mercaptoetanol destruye los puentes de disulfuro de las IgM que son los primeros anticuerpos que se producen en infecciones, quedando principalmente IgG (dichas inmunoglobulinas son las que principalmente detecta el ELISA) aumentando la especificidad de la prueba con β -mercaptoetanol al detectar principalmente IgG. La sensibilidad igualó a la del ELISA. Vázquez *et al* (7) encontró que el ELISA fue más sensible a partir del día 7, que la prueba de aglutinación aunque con antígeno K-polivalente en los grupos de pollos infectados, sin embargo, la prueba de aglutinación para los pollos infectados con *S. enteritidis* fue más sensible que el ELISA a los 7 días debido a que *S. enteritidis* fagotipo 13 es altamente invasiva en pollos. Aunque no hay muchos puntos de comparación entre los dos resultados obtenidos en los experimentos antes mencionados es importante mencionar los datos encontrados, ya que, aún así, se observan similitudes entre ambos experimentos lo cual puede ser una referencia para validar este trabajo.

Al comparar el ELISA estandarizado y evaluado en este experimento utilizando cada una de las PME obtenidas de las tres cepas: *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5) y *S. typhimurium* (CENID-M02) cada una con su respectiva concentración de proteína, dilución de anti IgG porcina y dilución del suero, se presentó una sensibilidad

y especificidad similar entre los serotipos lo que demuestra la presencia de PME que tienen un peso molecular equivalente entre las tres cepas, sin embargo, cuando cada antígeno PME fue utilizado para determinar si existía reacción cruzada entre los grupos de sueros de animales infectados con las tres diferentes cepas de *Salmonella* se observó poca reacción cruzada entre las tres cepas, lo cual puede indicar que a pesar de la similitud entre las PME encontradas y visualizadas en el gel SDS-PAGE, depende en gran medida de la respuesta inmunológica que el animal tenga hacia los diferentes serotipos de *Salmonella* ya que se detectaron mediante el ELISA un menor título de anticuerpos cuando se hicieron dichas pruebas que cuando se utilizó la PME y el suero homólogo donde los títulos de anticuerpos detectados fueron altos. En este trabajo los animales fueron monitoreados periódicamente por medio de pruebas serológicas de aglutinación y ELISA mostrando que los títulos de anticuerpos en cada muestreo post infección se fueron elevando. Esto fue corroborado con los aislamientos bacteriológicos realizados en coprocultivo y hemocultivo.

El desarrollo y estandarización del ELISA para el diagnóstico de la salmonelosis porcina usando PME es importante y debe ser evaluado en diferentes explotaciones porcinas a nivel nacional ya que el ELISA al ser altamente sensible específico y detectar en forma temprana los títulos de anticuerpos IgG, puede tener un valor potencial como prueba de escrutinio para detectar anticuerpos en los animales de las granjas de producción y poder tomar las medidas necesarias para el control de la enfermedad en nuestro país. Sin embargo, deben realizarse investigaciones más profundas para esclarecer, cuales son las PME más involucradas en la respuesta inmune y la respuesta cruzada con diferentes serotipos de *Salmonella* que afectan la industria de la porcicultura nacional.

7. Conclusiones

1. En este trabajo se demostró que el perfil electroforético de PME de *S. choleraesuis* (CENID-M98), *S. enteritidis* (CENID-MA5) y *S. typhimurium* (CENID-M02) es común al de otros serotipos del género *Salmonella* donde es frecuente observar bandas de 31.5 a 36 kDa.
2. Utilizando estas preparaciones de PME como antígeno de captura para el ELISA, este mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% en suero de cerdos infectados experimentalmente con *S. choleraesuis* (CENID-M98).
3. El ELISA fue más sensible y específico para detectar anticuerpos ya que diferenció animales positivos de animales negativos en la primera semana post infección y sólo hasta los 14 días post infección las pruebas de aglutinación presentaron porcentajes similares.
4. Los promedios de los títulos de anticuerpos detectados por el ELISA, fueron diferentes en cerdos infectados experimentalmente y no infectados.

8. Apéndice

1. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) 0.15 M ph 7.2 (ELISA)

Cloruro de Sodio (NaCl).....	8.0 g
Cloruro de Potasio (KCl).....	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄).....	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄).....	0.24 g
Agua destilada c.b.p.....	1000 ml

2. SOLUCIÓN DE BLOQUEO 5%

Leche descremada (Skim Milk Difco™).....	5 g
Agua destilada.....	100 ml

3. SOLUCIÓN DE LAVADO PBS-Tween 20 pH 7.4

Cloruro de Sodio (NaCl).....	8.0 g
Cloruro de Potasio (KCl).....	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄).....	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄).....	0.24 g
Tween 20.....	500 μ l

9. Referencias

- 1) FAOSTAT: <http://www.porcicultura.com/estadística.php>. Consultado el 7 de Mayo del 2009.
- 2) Sarganga MV., Salas JG., Mariscal VA., Estrella HQ., Ruiz AF., González MA., Juárez Z. Impacto de TLCAN en la cadena de valor porcina. Chapingo, México. 2003.
- 3) Salyers A. Bacterial pathogenesis. 2ª ed. Ed ASM Press. Washington. pp.381, 382. 2002.
- 4) Carter G R and Chengappa, M.M. Microbial Diseases: A Veterinarian's Guide to Laboratory Diagnosis. Iowa State University Press. pp. 207-211. 1993.
- 5) Carreón NR., Rodríguez GR., Doporto DJM., Trujillo ME., Díaz RC. y García RA. Interacción del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS) y *Salmonella choleraesuis*. Memorias de XXXVI congreso AMVEC; 2001 abril. pp. 10-12 Querétaro (Querétaro) México. 2001.
- 6) J. P. Cano MV, Z. Márquez MV, D. Fuentes MV, L. Zannin MV (Diagnóstico y Consultoría Veterinaria, C.A.) V. Utrera MV PhD, F. Cordero MV y E. Sogbe MC, PhD (Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV) Maracay, Edo. Aragua. Venezuela. pp. 1-10. 2001.
- 7) Vázquez N. J. Preparación de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. (Tesis de maestría). México D. F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.

- 8) Srinand S, Robinson RA, Collins JE, Nagaraja KV. Serologic studies of experimentally induced *Salmonella choleraesuis var kunzendorf* infection in pigs. Am J Vet Res. Sep; 56 (9):1163-8. 1995.
- 9) Edwards-Ewing "Identification of Enterobacteriaceae 2° Edition. Editorial Burges Publishing Company USA. pp. 127-132. 1995.
- 10) Mac Fadin. Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia Clínica 3° Edición. Editorial Panamericana. Argentina. pp. 114-126. 2003.
- 11) Brenner F.W. *et al.* *Salmonella* nomenclature. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 38 pp. 2465-2467. 2000.
- 12) Burrows W. "Textbook of Microbiology" 7° Edition. The W.B. Saunders. Philadelphia, USA. pp. 57-63. 1999.
- 13) Acha N. Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2° Edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington. pp. 158-165. 1990.
- 14) Wray C. and Wray A. *Salmonella* in domestic animals. 1° Edition. Editorial CABI. USA. pp. 41-59, 83-99. 2000.
- 15) Terragno R, Caffer M, Bruno S, Binztein N. Manual de procedimientos para el aislamiento, serotipificación y diagnóstico de *Salmonella*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina. pp. 1-18. 2003.
- 16) www.cellsalive.com. Consultado el 7 de Mayo del 2009.
- 17) Frobisher, M. R. D. Hindsdill, R. T. Crabtree, and C. R. Goodhear. Fundamentals of Microbiology, 9th. Ed. Sauders Co., Philadelphia, pp. 501:528, 1974.
- 18) Timoney; J; *Salmonellae* in Irish pigs at slatighfer. Irish vet., (24): 141-145, 1970.
- 19) Thomas, P. *Salmonella Cholerae suis* infection in pigs with special reference to England and Wales. The Vet. Bull., 47(10): 731-739; 1977.

- 20) Riley, M. G. The incidence of *Salmonella* in normal slaughtered pigs: Aust. Vet. J., 46: 40-43, 1990.
- 21) Bhatia, A. K., and R. C. Pathak. *Salmonella* serotypes from pigs: Indian J. Microbiol., 11 (3): 5-8, 1991.
- 22) Jeffrey T, Paula J, Thomas J, and Theodore T. Natural Transmission of *Salmonella choleraesuis* in Swine. Applied And Environmental Microbiology, Jan., pp. 141–146. 1996.
- 23) Smith, H. W. The evaluation of culture media for the isolation of *Salmonellae* from feces. J. Hyg., Camb., 50: 21-36, 1952.
- 24) Rappaport, F., N. Konforti, and B. Navon. A new enrichment médium for certain *Salmonellae*. J. Clin. Path., 9: 261-266, 1966.
- 25) Heard, T. W., N: E. Vennett, and A. H. Linton. The incidence of *Salmonella* excretion in various pig populations. Brit. Vet. J., 125: 634-644, 1969.
- 26) D. C. Blood, O. M. Radospits. Medicina Veterinaria. 7a. Edición. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. Vol.1. pp. 698-703. 1992.
- 27) Buxton, A., and G. Frazer. Animal Microbiology. Vol. 1. Blakwell Scientific Publications, Oxford, London, 1997.
- 28) Richard E. Isaacson, David Bane, Laura Hungerford and H. Fred Troutt. Detection and Epidemiology of *Salmonella* in Swine - Year 02. From the 1995 Research Investment Report. pp. 1-5. 2002.
- 29) House D, Bishop A, Parry C, Dougan G, Wain J. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis*. Pub Med. 14(5): 573 - 578. 2001.
- 30) Kramer, T.T.; Roof, M.B.; Matheson, R.R. Safety and efficacy of attenuated strain of *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine. Am. J. Vet. Res. 53(4):444-448. 1992.

- 31) Loynachan, A.T.; Nugent, J.M.; Erdman, M.M., Harris, D.L.. Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. *J. Food Prot.* 67(7):1484-1488. 2004.
- 32) Maes, D.; Gibson, K.; Trigo, E.; Saszak, A.; Grass, J.; Carlson, A. Blaha, T. Evaluation of cross-protection afforded by a *Salmonella choleraesuis* vaccine against *Salmonella* infections in pigs under field conditions. *Berl. Munch Tierarztl Wochenschr.* 114(9-10):339-341 Abstract. 2001.
- 33) Clarke, R.C.; Gyles, C.L. *Salmonella*. Second edition Iowa State University Press, Ames. pp. 133-153. 1993.
- 34) Letellier, A.; Messier, S. Lessard, L.; Quessy, S.. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Can. J. Vet. Res.* 64(1):27-31. 2000.
- 35) Wilcock B.P.. *Diseases of swine*. Sixth edition Iowa State University Press, Ames. pp. 508-519. 1986.
- 36) Vázquez N. J. Preparación de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. (Tesis de maestría). México D. F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
- 37) Matsuyama, S. I., Inokuchi, K. and Mizushima S., Promoter Exchange between OmpF and OmpC, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *E. coli* K/12. *J. Bacteriol.* 158: pp. 1041-1047.1984.
- 38) Verdugo- Rodríguez A., Sierra, J., Ruíz, P. G. M. and Calva, E. Early diagnosis of typhoid fever by detection of specific serum antibodies to *Salmonella typhi* outer membrane proteins preparations. *Abstr. Annu. Meet. ASM.* C-139, 1989.
- 39) Laemli U K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- 40) Verdugo- Rodríguez A., López, V. Y., Puente, L. J., Ruíz-Palacios, G. M. y Calva E.,

Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane proteins preparations. Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis. 12: 258-254. 1993.

41) Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas. Manual de la OIE sobre animales terrestres. pp. 21-32 2004-capitulo actualizado mayo 2006.

42) Dawson-Saunders B, Trapp RG. Bioestadística médica. México D.F.-Santa Fé de Bogotá, Colombia. Ed. El Manual Moderno. pp. 172-176. 1993.