

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN POR MEDIO DE PCR DE *Salmonella*  
Enteritidis FT 13 A Y *Salmonella* Issatschenko EN  
MUESTRAS DE POLLITOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**ISRAEL MONROY BECERRA**

Asesores:  
MVZ Odette Urquiza Bravo  
MVZ Néstor Ledesma Martínez

México, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Titulo

DETERMINACIÓN POR MEDIO DE PCR DE *Salmonella*  
Enteritidis FT 13 A Y *Salmonella* Issatschenko EN  
MUESTRAS DE POLLITOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE

## **Dedicatorias**

Dedico esta tesis a mis padres Irma Becerra Sánchez y Jesús Monroy Borja quien con su apoyo tanto moral como económico y sabios consejos soy la persona que soy en este momento y a mis hermanos Jesús Moisés Monroy Becerra y Luz Monroy Becerra con quienes he vivido grandes momentos.

Dedico este trabajo a todos mis amigos que me han acompañado a lo largo de mi vida y que aunque estén lejos siempre me acuerdo de ellos y todas las cosas que hicimos juntos en su momento.

Además a todos los maestros que fueron parte de mi formación académica y personal.

A todos los animales que me ayudaron en la formación de mi carrera como Médico Veterinario Zootecnista.

## **Agradecimientos**

A la Doctora Odette Urquiza Bravo quien gracias a su sugerencia, motivación y paciencia me ha ayudado mucho en el ingreso al departamento de aves y aprender diariamente cosas nuevas o reforzar las viejas, y ser una mejor persona en todos los sentidos.

Al Doctor Néstor Ledesma Martínez quien me brindo la oportunidad de aprender en este laboratorio todo lo que se hasta ahora.

Le agradezco muchísimo al Doctor Félix Sánchez Godoy todo lo que me enseñó durante la elaboración de mi trabajo, sin sus sabios consejos no hubiera sabido que hacer.

A mis compañeros de trabajo: Cristina Ortega, Genoveva Molina, Stivalis Cárdenas, Guillermo García, Jazmín Flores, Norma F. Santiago, Rosa Saldívar, José G. González y demás personal que labora en el Departamento de Producción Animal: Aves.

A todos los doctores del Departamento de Producción Animal: Aves que influyeron en mi formación y de todos los alumnos que han pasado por este maravilloso lugar.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	15
REFERENCIAS.....	23
CUADROS.....	27
FIGURAS .....	34

## RESUMEN

Monroy Becerra Israel. Determinación por medio de PCR de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A y *Salmonella* Issatschenko en muestras de pollitos infectados experimentalmente. (Bajo la dirección de M en C Dra. Odette Urquiza Bravo, M en C Dr. Néstor Ledesma Martínez).

Debido a que no existen estudios que demuestren a partir de que momento después de la ingesta *Salmonella* puede ser detectada en muestras de órganos de pollitos de engorda por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el objetivo del presente trabajo fue determinar por medio de la PCR la presencia de *Salmonella* Enteritidis FT-13A (SE) y *Salmonella* Issatschenko (SI) en diferentes muestras de órganos de pollitos de 4 días de edad infectados experimentalmente y su relación con el resultado del aislamiento bacteriológico y las lesiones histológicas.

Se emplearon órganos congelados de pollitos de 4 días de edad inoculados experimentalmente con SE y SI para la extracción del DNA para la realización de PCR clásica y anidada.

Los resultados obtenidos fueron que se logró evidenciar SE y SI desde las 6 horas post-infección experimental (PIE), pero conforme pasó el tiempo PIE los resultados positivos fueron variando, obteniendo resultados negativos hasta las 174 horas PIE.

Se concluyó que la PCR es útil para detectar a SE y SI en las primeras horas PIE, sin embargo la relación entre las pruebas de la PCR, la bacteriología y la histopatología fue pobre y además se sugiere utilizar pre-enriquecimiento de las muestras, para facilitar la extracción de DNA y la detección de *Salmonella* por medio de la PCR.

## Introducción

*Salmonella* spp es un patógeno capaz de colonizar una gran variedad de vertebrados. La infección producida por *Salmonella* en humanos y animales domésticos sigue siendo un serio problema en todo el mundo, como consecuencia hay desde portadores asintomáticos hasta a la más grave infección sistémica que puede dar lugar a una elevada mortalidad (1).

*Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos gram negativos, de 0.7 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0 a 5.0  $\mu\text{m}$  de largo, la mayoría de las salmonelas son móviles debido a flagelos distribuidos en forma peritrica. Son anaerobios facultativos y no forman esporas (2).

El género *Salmonella* consiste de sólo dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última está dividida en seis subespecies: *S. enterica*, subesp. *enterica*, *S. enterica*, subesp. *salamae*, *S. enterica*, subesp. *arizonae*, *S. enterica*, subesp. *diarizonae*, *S. enterica*, subesp. *houtenae* y *S. enterica*, subesp. *indica* (2,3,4). Popoff *et al.*, (2004), mencionaron de la existencia de 2541 serovariedades para el esquema de Kauffmann-White.

Sin embargo, como las serovares no tienen nivel taxonómico de especie, la forma de escribir sus nombres es con letras romanas (no itálicas) y con mayúscula como en *Salmonella* Enteritidis, que corresponde a: "*Salmonella enterica* subesp *enterica* serovariedad Enteritidis", por lo que para fines prácticos se usa directamente *Salmonella* Enteritidis (SE) (5).

Cabe mencionar que los productos avícolas han sido implicados como fuente de infecciones por las serovariedades de SE hacia especies animales incluyendo al ser humano (6, 7,8). Por otro lado, existen numerosas fuentes de

infección de *Salmonella* en las unidades de producción de pollo comercial, cuando no se procede a un control adecuado de plagas como: las aves silvestres, los artrópodos y los roedores, quienes a través de sus heces contaminan el agua, el alimento, el material de cama y el equipo, favoreciendo la permanencia de *Salmonella* en la naturaleza (9, 10,11).

Con relación al diagnóstico, a la fecha se han desarrollado métodos más rápidos y sensibles para detectar *Salmonella* spp en distintos tipos de muestras, entre ellas existen:

- 1.- **Aglutinación en placa (AP)** (12,13 ,14).
- 2.- **Prueba de microaglutinación (MA)** (14).
- 3.- ***Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)**. (15, 16,17).
- 4.- **Pruebas de Anticuerpos Fluorescentes (AF)** (12, 15, 16,17).
- 5.- **Prueba de inmunofluorescencia (IF)** (15, 16,).
- 6.- **Prueba de Microantiglobulina** (14).
- 7.- **Hibridación de ADN** (18, 19,20).
- 8.- **Aislamiento bacteriológico** (12, 13,22).
- 9.- **Histopatología** (23).
- 10.- **La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** (6, 8, 19, 21, 24, 25,26).

De las pruebas antes mencionadas no todas son utilizadas en el diagnóstico de *Salmonella*. Actualmente la PCR es una de las pruebas mas utilizadas.

La **Reacción en Cadena de la Polimerasa** (PCR) clásica. El procedimiento de la PCR puede ser empleado para varias especies microbiológicas sin previo aislamiento de especies individuales de bacterias. La capacidad de la PCR en detectar secuencias de genes en fracciones de minutos del DNA, es una ventaja, comparada con los métodos de detección microbiológica y la serológico. La técnica de la PCR ha sido aplicada para identificar varias especies microbiológicas incluyendo *Salmonella* de muestras clínicas y de alimento (6, 8, 19, 21, 24, 25,26).

La PCR es un método de ampliación de genes que puede emplearse por ser altamente sensible y específico en la detección de microorganismos en un amplio rango de muestras (6, 24, 26, 27, 28, 29, 30,32).

El actual procedimiento de laboratorio estándar para cultivar e identificar las serovariedades de *Salmonella* es laborioso y puede tardar hasta 7 días.

Existen varios métodos para la PCR entre los que destacan los siguientes:

1.- **RT-PCR** (RT-PCR del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) o Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (18).

2.- **PCR multiplex** (18).

3.-**PCR-RFLP** (Siglas en ingles de *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) o Reacción en Cadena de la Polimerasa con corte con endonucleasas de restricción de productos conocidos (18).

4.- **PCR seguido de SSCP** (Siglas en Ingles de *Polymerase Chain Reaction single-strand conformation polymorphism*) o Reacción en

Cadena de la Polimerasa seguido de polimorfismos conformacionales de una sola cadena de ADN (18).

5.- **Inmuno-PCR.** (18).

6.- **PCR en tiempo real.** (18).

7.- **PCR anidada.** En ocasiones, para asegurar que un producto de la PCR corresponde al esperado, El amplificado de una reacción primaria de la PCR clásica se le usa como molde para una segunda amplificación, en la cual se usan iniciadores cuya secuencia está hacia dentro del producto de la secuencia original (anidados). Con ese método se genera un producto más pequeño que el de la reacción primaria, pero de tamaño conocido (18).

### **La sensibilidad y especificidad de la PCR**

Con base en las pruebas de la PCR, trabajos anteriores sobre la detección de la concentración mínima detectable de *Salmonella* spp mencionan que existen factores que producen resultados falsos positivos o negativos debido a la alta concentración de ADN bacteriano y celular provenientes de las muestras biológicas y por la presencia de factores inhibitorios (provenientes de las mismas muestras). Por otro lado también se ha observado que las muestras mezcladas no difieren de las muestras individuales al realizar la PCR, garantizando el resultado. Alva (2005), mencionó que la sensibilidad de la PCR anidada para detectar SE es desde 10 Unidades Formadoras de Colonia (UFC), considerando que esta prueba es útil para el diagnóstico de *Salmonella* spp en muestras provenientes de aves y muestras negativas al aislamiento bacteriano (35).

Cabe mencionar que en la avicultura, se ha registrado el aumento del número de casos por *Salmonella* Typhimurium (ST) y SE. Se ha observado que las ratas llevan más frecuentemente esos serotipos, por lo que dichas bacterias son de las más estudiadas en todo el mundo. La salmonelosis en ratas puede ser un serio problema por que estas actúan como reservorio y vectores al tener convivencia estrecha con las aves de corral y a pesar del gran numero de estudios que se realizan para la detección de *Salmonella* incluyendo SE, existe poca información sobre *Salmonella* Issatschenko (SI), la cual se ha demostrado afectar a la familia Muridae y a pollos de engorda (4,5), por otra parte, estos estudios no han incluido a la PCR (4).

En la literatura, *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SI) se ha conocido también con diversos nombres como: S. Danysz, S. Gaerther, S. Liverpool, S. Ratin, S. Projorov y S. enterica variedad 17 F4, subgrupo I, grupo D; que mata a muridos. Esta *Salmonella* tiene los mismos antígenos somáticos y flagelares que S. Enteritidis según la clasificación de Kauffmann y White (grupo D, subgrupo I, O: 1, 9,12 y H: g, m) y ésta última serovariedad afecta a todas las especies, incluyendo al humano (4).

En el estudio realizado por Ruiz *et al.*, (2008), concluyeron que SI no sólo afecta a la familia *Muridae*, si no que también afecta a las aves. En dicho estudio se demostró la penetración de SI en enterocitos de pollo por medio de microscopia electrónica de transmisión desde las 6 horas post-infección experimental (PIE), sin embargo, a pesar de haberse observado lesiones histológicas, no se logró obtener aislamiento bacteriano positivo si no hasta las 42 horas PIE.

Estudios sobre la detección de *Salmonella* por medio de la PCR han demostrado que con esta prueba es posible obtener resultados positivos en muestras negativas al aislamiento bacteriano. Para la realización de la PCR para *Salmonella* se han empleado iniciadores como el gen amplificado *inv A* (31, 33,34). Cuyo tamaño del producto puede variar desde 485 pares de bases (pb) hasta 525 pb. La secuencia del iniciador *inv 1F*: 5'-CGT CAT TCC ATT ACC TAC CT-3', *inv 1R* CAA TAG CGT CAC CTT TGA TA-3', además de los siguientes iniciadores para la PCR anidada, con un tamaño del producto desde 284 hasta 329 pb y la secuencia del iniciador: *inv 2F* 5'-TGG TGT TTA TGG GGT CGT TCT A-3', *inv 2R* 5'-CCT TCA AAT CGG CAT CAA TAC TC-3' (35,37).

Con base en lo descrito anteriormente, se sugiere que las técnicas existentes para diagnosticar *Salmonella* son laboriosas, difíciles y consumen tiempo para llegar al diagnóstico microbiológico.

Aunque la PCR es una herramienta molecular útil para el diagnóstico de *Salmonella* no existen estudios que demuestren cual es el momento en el que *Salmonella* puede ser detectada en muestras de órganos de pollitos de engorda.

## **Justificación**

Con base en lo descrito anteriormente, se sugiere que las técnicas existentes para diagnosticar *Salmonella* son laboriosas, difíciles y consumen tiempo para llegar al diagnóstico microbiológico.

Aunque la PCR es una herramienta molecular útil para el diagnóstico de *Salmonella* no existen estudios que demuestren cual es el momento en el que *Salmonella* puede ser detectada en muestras de órganos de pollitos de engorda.

## **Hipótesis**

Mediante la técnica de PCR se podrá determinar la presencia de Salmonella enteritidis PT 13A y Salmonella issatschenko a partir de muestras de pollitos de 4 días de edad infectados experimentalmente.

## **Objetivo.**

Determinar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de *Salmonella* Enteritidis FT-13A y *Salmonella Issatschenko* en diferentes muestras de órganos de pollitos de 4 días de edad infectados experimentalmente y su relación con el resultado del aislamiento bacteriológico y las lesiones histológicas.

## **Material y métodos**

### **Muestras:**

Como parte de un estudio previo (Ruiz 2006), se obtuvieron muestras de 1 buche (B), 1 corazón (C), 1 pulmón (P), 1 hígado (H), 1 bazo (B), 1 duodeno (D), 1 yeyuno (Y), 1 íleon (I) y 1 ciegos (Ci) en 6 tiempos: a las 6, 18, 30, 42, 102, 174 horas post-inoculación experimental (PIE) de pollitos de 4 días de edad infectados experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis FT 13 y *Salmonella* Issatschenko, obteniendo un total de 42 muestras de SE y 42 muestras de SI, las muestras fueron almacenadas a -20° C hasta su empleo.

Los testigos positivos fueron los mismos órganos de pollitos infectados experimentalmente con SE [ $1 \times 10^8$ ] y SI [ $1 \times 10^9$ ] / ml por vía intraperitoneal. Los testigos negativos fueron obtenidos a partir de una inoculación con 250  $\mu$ l de Solución Salina Fisiológica (SSF) por vía oral en pollitos SPF (aves libres de patógenos específicos).

### **Diseño de investigación**

Cada muestra por separado fue procesada de la siguiente manera:

#### **Extracción de ADN de *Salmonella***

Se maceró 0.1 gramo de cada muestra anteriormente mencionada, dicha muestra fue homogenizada mediante el uso de un agitador tipo vortex<sup>A</sup> en 1 ml de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) estéril (0.324% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ <sup>B</sup>, 1.08% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ <sup>B</sup> y 16.1% de  $\text{NaCl}$ <sup>B</sup>), posteriormente se agregaron 4  $\mu$ l<sup>C</sup> de lisozima<sup>D</sup> [20 mg/ml] para tener un volumen final de 1004  $\mu$ l, incubándose en un

recirculador de agua<sup>E</sup> a 4° C durante 45 minutos. En seguida se dejó sedimentar la muestra y se tomaron 250 µl de la mezcla inicial y se depositó en un tubo nuevo al cual se adicionaron 12.5 µl de proteinasa K<sup>G</sup>, [20 mg/ml] y 250 µl de solución STEP (10 % de SDS<sup>H</sup>, 1M, pH8 TRIS<sup>I</sup>, 0.5M, pH 8 EDTA<sup>H</sup>) incubándose<sup>E</sup> por 2 horas a 37° C. del volumen resultante (512.5 µl) del paso anterior, se realizó la extracción de ADN con fenol-cloroformo isoamílico (FCI) (Fenol<sup>J</sup>, Cloroformo<sup>K</sup>, Alcohol Iso-amílico<sup>B</sup>) 25:24:1 y cloroformo isoamílico (CI), se agregó un volumen de FCI 25:24:1, después la muestra fue centrifugada<sup>L</sup> a 10 250 x G durante 10 min. a 4 °C, se recobró la fase acuosa y se puso un tubo nuevo al cual se le agregó un volumen de CI. Luego se centrifugó a 10 250 x G durante 10 min. a 4 °C, se recobró la fase acuosa y entonces se agregaron 2 volúmenes totales de alcohol comercial absoluto para precipitar el ADN, conservándose a -20 °C durante 30 minutos. Posteriormente la muestra se centrifugó a 10 250 x G<sup>E</sup> durante 15 min. a 4°C, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla de ADN a temperatura ambiente durante dos horas.

Finalmente al ADN fue resuspendido en agua bidestilada y se incubó entre 55° a 60° C<sup>M</sup> durante 10 minutos.

---

<sup>A</sup> Daigger Scientific industries, INC Bohemia, N.Y.11716, USA.

<sup>B</sup> J.T.Baker 55320, Xalostoc, Edo de Méx. México; (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Cat. 3246-01), (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Cat. 3828-01), (NaCl CaT. 3625-01).

<sup>C</sup> ThermoLabsystems, Altrincham, Cheshire, WA14 5TP.

<sup>D</sup> Sigma, St. Louis, MO63103 USA.

<sup>E</sup> Pharmacia Biotech-Multi Temp III, Germany Sweden.

<sup>G</sup> Fermentas International INC, Canadá, Ontario L7N 3N4.

<sup>H</sup> Research Organics, Inc, Cleveland, Ohio 44125 USA.

<sup>I</sup> GIBCO, Life Technologies, Grand Island, N.Y. 14072 U.S.A.

<sup>J</sup> J.T. BAKER. Phillipsburg, NJ 08865.

<sup>K</sup> Caledon Laboratories, Otn., Canada L7G 4R9.

<sup>L</sup> Sorvall Biofuge fresco, Kendro Laboratories, Alemania.

<sup>M</sup> Labnet International, INC. Woodbridge, NJ 07095 USA.

## Técnica de la PCR

Para hacer la PCR se tomaron 5 µl de ADN del proceso anterior y se adicionó en un tubo de PCR conteniendo: 2 µl de solución amortiguadora para la PCR<sup>G</sup> [1X], 0.4µl de desoxinucleótidos trifosfatados<sup>G</sup> (dNTP's) [0.2 mM], 2 µl de iniciadores<sup>N</sup> [1 mM], 1.2µl de MgCl<sup>G</sup> [1.5 mM] , 0.5 µl de Taq polimerasa<sup>G</sup> [2.5 unidades] y 8.9 µl de agua bidestilada.

En la PCR se utilizaron los siguientes iniciadores: *inv1F*: 5'-CGT CAT TCC ATT ACC TAC CT-3' e *inv1R*: 5'- CAA TAG CGT CAC CTT TGA TA-3' que amplificaron un segmento del gen *invA* de un tamaño de 525 pb (35,37). Con el siguiente protocolo de PCR: un ciclo de 95° C durante 5 min; 30 ciclos de 93° C durante 45 s, 59° C 45 s, 72° C 45 s, seguida de una extensión final por 4 min. a 72° C<sup>O</sup>.

PCR anidada se tomaron 5 µl de la PCR anterior, y se suspendieron con 2 µl de solución amortiguadora para la PCR<sup>G</sup> [1X], 0.4µl de dNTP's [0.2 mM] 1 µl de iniciadores<sup>N</sup> [0.5 mM] 1.2µl de MgCl<sup>G</sup> [1.5 mM] , 1µl de Triton<sup>P</sup> [0.10%], 0.3µl de BSA<sup>P</sup> [0.15 mg/ml Albúmina Sérica Bovina], 0.5 µl de Tap polimerasa<sup>G</sup> [2.5 unidades] y 8.6 µl de agua bidestilada. Para este proceso se utilizaron los siguientes iniciadores: *inv2F*: 5'-TGG TGT TTA TGG GGT CGT TCT A 3' e *inv2R*: 5'-CCT TCA AAT CGG CAT CAA TAC TC-3' que amplificó un segmento del gen *invA* de un tamaño de 329 pb (35,37).

---

<sup>N</sup> Bio. Synthesis, Lewisville, TX 75057.

<sup>O</sup> Thermo Hybaid limited, UK.

<sup>P</sup> Sigma Chemical CO. St. Louis. Mo 63178 USA.

Se realizó un ciclo de desnaturalización<sup>Q</sup> de 95° C durante 5 min.; 30 ciclos de 92° C durante 45s, 65° C 45s, 72° C 45s, seguida de una extensión final de 4 min. a 72° C.

Después de la realización de la PCR, a muestras de 3 µl se les agregó 1 µl de Azul de Bromofenol<sup>G</sup> y se depositaron cada una por separado en geles de agarosa al 2 %, depositando en cada gel un marcador de peso molecular<sup>Q</sup> de 622 pb (pares de bases) para llevar a cabo la electroforesis<sup>R</sup> durante de 30 min a 80 voltios. Posteriormente los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio<sup>P</sup> y visualizados mediante luz ultravioleta<sup>S</sup>.

---

<sup>Q</sup> Biogenica, Miami, FL 33186.

<sup>R</sup> Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Warwickshire, UK

<sup>S</sup> Upland, CD 91786 USA.

## **Análisis estadístico**

Se llevaron a cabo tablas de contingencia 2X2, para SE FT 13 A y SI y calcular sensibilidad y especificidad de la PCR con respecto de la bacteriología y los estudios histológicos (36).

Además de realizar tablas de contingencias 2X2 para calcular la sensibilidad y la especificidad de la histopatología con respecto de la bacteriología (36).

Para determinar la relación entre las pruebas se utilizó el método estadístico de  $\chi^2$  (36).

## **Resultados**

### ***Salmonella* Enteritidis FT 13 A**

#### **PCR CLÁSICA**

La prueba de la PCR para el fragmento de 525 pb resultó negativa para *Salmonella* Enteritidis FT 13 A en todos los órganos y tiempos de muestreo. En la figura (fig.) 1 se muestra un ejemplo de una PCR negativa.

#### **PCR ANIDADA**

Se encontraron resultados positivos al fragmento de 329 pb desde las 6 horas PIE hasta las 174 horas PIE en las diferentes muestras, sin embargo, los resultados positivos variaron conforme el tiempo PIE fue aumentando. Los resultados detallados de la prueba se presentan en la cuadro 1. Las figuras 2 a 7 muestran geles de agarosa que presentan bandas de 329 pb en diferentes órganos.

### ***Salmonella* Issatschenko**

#### **PCR CLÁSICA**

La prueba de PCR para el fragmento de 525 pb fue positivo a partir de las 6 horas post-infección hasta la hora 30 post-infección, sin embargo las demás muestras y tiempos resultaron negativas, ejemplo de PCR negativas en la fig. 8 y 9.

#### **PCR ANIDADA**

Se observaron resultados positivos al fragmento de 329 pb a partir de las 6 horas PIE en las muestras de los siguientes órganos: buche, corazón-

pulmón, yeyuno y ciegos, hasta las 174 horas PIE. También se obtuvieron resultados positivos de los diferentes órganos (B, C, P, H, B, D, Y, I y Ci) aunque hubo diferencias en los demás órganos y tiempos. Las demás muestras y tiempos están detalladas en el cuadro 2. Las figuras 10 a 15, presentan las bandas de 329 pb de los diferentes órganos y tiempos.

## **Coincidencias de las pruebas**

### ***Salmonella* Enteritidis FT 13 A**

En el caso de *Salmonella* Enteritidis a las 6 horas PIE hay un 29 % de coincidencias entre la PCR y el aislamiento bacteriano, entre la PCR y la histopatología se obtuvo 43% y entre los estudios bacteriológicos e histopatológicos 29% (35).

A partir de las 18 horas PIE la PCR y la Histopatología tuvieron 71% de coincidencias, la PCR y la bacteriología 14%, y la bacteriología y la histopatología un 43% (35).

A las 30 horas PIE la histopatología obtuvo un 0% de coincidencias con la PCR, mientras que con la bacteriología y la PCR se obtuvo con 86% de coincidencia (35).

Posterior a las 30 horas PIE, los resultados son variables y se presentan de manera detallada en los cuadros 3 al 8 (35).

### ***Salmonella* Issatschenko**

En el caso de *Salmonella* *Issatschenko* a las 6 horas PIE hay un 43 % de coincidencias tanto la PCR y la bacteriología, como en la PCR con la histopatología.

A las 18 horas post-infección las coincidencias entre la histopatología y la PCR fueron de 100 % y la bacteriología con la PCR la coincidencia fue del 14%.

Después de 30 horas post-infección las coincidencias de las pruebas es la siguiente: entre la histopatología y la PCR la coincidencia es del 100% y la bacteriología y la PCR es del 0%.

A partir de las 42 horas post-infección las coincidencias van variando constantemente, hasta el punto en donde la histopatología y la PCR no coinciden pero la bacteriología y la PCR sí coinciden (Cuadro 9 al 14) (33).

### **Relación de los resultados de las pruebas**

La tabla de contingencia 2 X 2, para SE FT 13 A, al comparar la PCR con la bacteriología se obtuvo 25% de sensibilidad y 54% de especificidad (Cuadro 15). La comparación del estudio histológico con el bacteriológico se encontró una sensibilidad de 100 % y 12% de especificidad (Cuadro 16), y en la tabla de contingencias de la histopatología con respecto a la PCR, la sensibilidad fue del 33% y la especificidad fue de 0% (Cuadro 17).

Los resultados sensibilidad y especificidad de SI en la tabla de contingencias de 2 x 2 comparando la PCR con la bacteriología, fue de 13% la sensibilidad y de 44% la de especificidad (Cuadro 18). La comparación de la histopatología con respecto de la bacteriología se encontró una sensibilidad de 100 % y 12% de especificidad (Cuadro 19) y en la tabla de contingencias de *Salmonella* Issatschenko para los estudios histopatológicos y la PCR tuvieron una sensibilidad de 47% y una especificidad de 50% (Cuadro 20).

### **Estadístico $\chi^2$**

Para *Salmonella* Issatschenko en la prueba de  $\chi^2$  se encontró que la PCR y la bacteriología fueron homogéneas ( $P < 0.05$ ). La histopatología y la PCR fueron heterogéneas ( $P < 0.05$ ) (36).

En la prueba de  $\chi^2$  se encontró que la PCR y la bacteriología fueron heterogéneas en el caso de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A ( $P < 0.05$ ). La histopatología y la PCR fueron homogéneas ( $P < 0.05$ ) (36).

## **Discusión**

Con los avances en biología molecular, particularmente en el desarrollo de pruebas como la PCR, se ofrece una alternativa sensible y específica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Las ventajas que existen es que se incrementa notablemente la sensibilidad y especificidad en la amplificación del ADN y del ARN, es sensible, hay selectividad de la amplificación, el producto posee características uniformes así como rapidez; sus desventajas son el riesgo de contaminación, además depende fuertemente de las condiciones de la reacción, es caro y se ve afectado por la presencia de inhibidores.

Los resultados de la PCR clásica para SE y SI fueron negativos, esto pudiera deberse a diversos factores entre los que se encuentran la presencia de sustancias inhibitorias como: la hemoglobina, la lactoferrina, los polisacáridos, las grasas o proteínas como lo expresaron González *et al.*, 2005, Schrank *et al.*, (2001), Kongmuang *et al.*, (1994), Way *et al.*, (1993), Rossen *et al.*, (1992) y Wilde *et al.*, (1990), mencionan que dichas sustancias causan problemas para usar la PCR al detectar organismos patógenos de muestras

clínicas o ambientales. Otro factor que pudiera interferir con la PCR es el grupo heme y sus metabolitos (44).

En el caso de la PCR anidada tanto para SE FT 13 A y SI, los resultados obtenidos para ambas bacterias fueron que hubo mayor número de muestras positivas con la PCR anidada que con la PCR clásica; lo anterior coincide con los hallazgos de Rychlik *et al.*, (1999), en donde utilizando muestras de heces de aves libres de *Salmonella* fueron homogenizadas y contaminadas experimentalmente con un número conocido de *Salmonella* Thyphimurium F98, para llevar a cabo la PCR con los mismos iniciadores que se utilizaron en el presente trabajo (485 pb para la PCR clásica y 284 pb) pero Rychlik *et al.*, (1999), utilizaron un pre-enriquecimiento con agua peptonada amortiguada y caldo semi-selectivo Rappaport-Vassiliadis por 24 horas y obtuvieron un incremento en la sensibilidad de 1000 veces comparado con el resultado de una PCR clásica.

La PCR anidada, usualmente incrementa la sensibilidad 1000 veces comparada con los resultados de una sola amplificación de la PCR (Rychlik 19), sin embargo, en el estudio de Rychlik *et al.*, (1999), después de estandarizar el protocolo para la PCR de heces, decidieron probarlo en muestras de carne. La sensibilidad sólo fue de 10 veces comparada con los resultados de una PCR clásica, comparándolo con el método de cultivo estándar para la detección de *Salmonella*.

Con relación al pre-enriquecimiento Myint *et al.*, (2006), indicaron que el pre-enriquecimiento de las muestras, tanto de carne molida, excretas y órganos, mejoran significativamente el desempeño de la prueba. En el presente estudio no se utilizó el pre-enriquecimiento al buscar una alternativa de

diagnóstico que fuera más rápida, ya que el pre enriquecimiento demora al menos 24 horas (19,20, 26, 47, 48, 49,50, 54).

### ***Salmonella Enteritidis* FT 13 A**

En este trabajo se obtuvieron resultados positivos a la PCR de muestras de diferentes órganos desde las 6 horas PIE, sin embargo a partir de las 30 horas PIE los resultados obtenidos fueron muy variables entre los diferentes órganos y tiempos. Lo anterior coincide con los resultados de los estudios histopatológicos obtenidos en el trabajo de Ruiz *et al.*, (2008), que reflejaron lesiones desde las 6 horas PIE, mientras que el aislamiento bacteriano resulto negativo.

Similares resultados los obtuvieron Deng *et al.*, (2007), en donde realizaron la PCR y utilizaron muestras de: duodeno, yeyuno, íleon y ciego que también fueron incluidos en el presente trabajo, revelaron que a partir de las 8 horas PIE comenzaron a presentar resultados positivos por medio de la PCR y a las 36 horas PIE fue donde se obtuvo mayor cantidad de SE a partir de los órganos anteriormente mencionados.

En el estudio bacteriológico de Ruiz *et al.*, (2008), obtuvieron aislamientos positivos a partir de las 18 horas PIE dependiendo del tejido, similar al trabajo de Turnbull y Snoeyenbos en 1973, en donde utilizaron aves de diferentes edades (1 día de edad, 2 semanas, 6 y 9 meses), e inoculadas a las 24 horas posteriores de su llegada a la granja con  $10^6$  células de SE y se tomaron muestras de sangre, hígado, bazo, duodeno, yeyuno, íleon, unión íleon-cecal y ciegos a diferentes tiempos dependiendo del grupo, pero en promedio los tiempos fueron: 3,5,10,24,48 y 72 h. PIE. En las primeras horas

PIE, los resultados de los aislamientos fueron variables dentro de los grupos y los órganos colectados pero hubo coincidencias en los aislamientos después de 3 horas PIE.

### ***Salmonella* Issatschenko**

En el caso de esta bacteria los hallazgos fueron similares a SE FT 13 A, con la prueba de la PCR clásica y anidada, debido a que sus mecanismos de virulencia pueden ser similares como lo mencionaron Poppe *et al.*, (1993); Montenegro, (1991); Gulic, (1990) y Poppe *et al.*, (1989), donde describieron que la virulencia asociados a plásmidos de diferentes serotipos de *Salmonella* poseen secuencias de genes similares, pero los mecanismos por los que estos genes contribuyen a la virulencia no están estudiados en detalle (53,55,56). Montenegro en 1991, sugirió que los plásmidos de virulencia de *Salmonella* spp deben ser adquiridos a partir de infecciones sistémicas en seres humanos y de animales.

### **Coincidencias entre la PCR y el aislamiento bacteriológico y lesiones histológicas**

#### ***Salmonella* Enteritidis FT 13 A**

Las coincidencias entre las pruebas de la PCR y los estudios bacteriológicos indicaron que hubo una relación del 29% en las muestras a las 6 horas post-infección, además de la sensibilidad de 25% y una especificidad del 54% respectivamente, esto sugiere relación baja entre las dos pruebas con las condiciones de este estudio. Al respecto, Whyte *et al.*, (2002), mencionaron que al utilizar las dos técnicas anteriores permiten una evaluación mas precisa de muestras contaminadas.

La sensibilidad y especificidad resultaron bajas en el presente estudio, en comparación al trabajo de Pérez *et al.*, (2008), en donde utilizando el mismo método estadístico de tabla de contingencias de 2 x 2 , obtuvieron una sensibilidad de 70.83% entre dos pruebas de PCR y una especificidad de 100%, en comparación con el trabajo de Myint *et al.*, (2006), donde utilizaron pruebas de PCR con y sin pre-enriquecimiento, los resultados fueron diferentes, la sensibilidad de la PCR sin pre-enriquecimiento fue de 0% y la especificidad del 100%, pero al usar el pre-enriquecimiento en las muestras obtuvieron una sensibilidad desde 79 a 100% y una especificidad del 100% para los tres medios de enriquecimiento: Agua Peptonada Amortiguada, medio Rappaport Vassiliadis y caldo Tetrionato-Hajna.

### ***Salmonella* Issatschenko**

En el presente estudio las coincidencias de la PCR comparada con los análisis bacteriológicos para SI fueron diferentes a SE. El pico de resultados positivos para SI en el caso de la PCR fue a las 30 horas. Conforme fue pasando el tiempo PIE los resultados positivos de la PCR fueron disminuyendo hasta llegar a ninguna muestra positiva. En contraste al trabajo realizado por Ruiz *et al.*, (2008), donde utilizaron SI hubo aislamientos positivos a las 42, 150,174 y 222 horas PIE, mientras que en las observaciones de lesiones histológicas del trabajo de Ruiz *et al.*, (2008), el pico fue desde las 30 horas PIE.

Con relación a la sensibilidad y especificidad de las pruebas de la PCR y los estudios bacteriológicos de esta trabajo fue de 13 % y 43% respectivamente mientras que los hallazgos del trabajo de Schrank *et al.*, (2001), encontraron una sensibilidad del 47% comparando estas dos pruebas

donde además se compararon diferentes medios de pre-enriquecimiento para *Salmonella* Typhimurium y SE.

Schrank *et al.*, (2001), observaron que la sensibilidad, fue mas alta que la obtenida en el presente trabajo y concluyeron que tiene mas eficacia el caldo tetrionato que el caldo selenito-cistina.

Se ha observado que con la prueba de la PCR se obtienen resultados inconsistentes cuando se trabaja con el género *Salmonella*, por lo que Poppe *et al.*, (1992), sugirieron llevar a acabo otras pruebas como la microaglutinación, que otorga el 81% de sensibilidad y 24% de especificidad

### ***Salmonella* Enteritidis FT 13 A**

En el presente estudio al comparar la histopatología y la PCR, la sensibilidad fue de 33% y la especificidad fue de 0%, por lo que esta prueba fue más sensible que la bacteriología para determinar la presencia de *Salmonella* spp en los órganos en los diferentes tiempos, pero menos especifica. Ruiz *et al.*, (2008), encontraron lesiones histológicas desde las 6 horas PIE en pollitos, sobre todo en la porción de íleon y ciegos corroborando mediante microscopia electrónica la presencia de SE FT 13 A. Kinde *et al.*, (2000), a partir de órganos de gallinas infectadas con SE FT 4, por vía oral e intravenosa, concluyeron de que la aves inoculadas con una cepa de campo mostraron positividad de los tejidos por un corto periodo, desapareciendo *Salmonella* la mayoría a los ocho días después de la inoculación. Los aislamientos de SE fueron mas frecuentes cuando las lesiones fueron evidentes, además demostró que el porcentaje de aves positivas al cultivo no se diferenció significativamente ( $P > 0.05$ ).

En contraste con los resultados positivos de lo que se obtuvo en el presente estudio por la PCR, relacionándolos con los hallazgos bacteriológicos e histopatológicos, se observó que las lesiones y la bacteriología indicaron que es más sensible la histopatología pero poco específica. En contraste, la bacteriología es menos sensible y más específica.

En el caso de SI y basado en el trabajo de Kinde *et al.*, (2000), los hallazgos de Ruiz *et al.*, (2008), y lo obtenido en el presente estudio, fueron más sensibles las observaciones de las lesiones histológicas, que los estudios bacteriológicos para detectar el daño del microorganismo en los tejidos y gracias a la PCR realizada en el presente trabajo detectó *Salmonella* en las primeras horas PIE reflejado en mayor cantidad de muestras positivas que la bacteriología.

## **CONCLUSIÓN**

La técnica de la PCR detectó *Salmonella* pero sólo durante las primeras horas post-infección.

La relación entre los resultados de la PCR, histopatología y bacteriología, presenta variaciones en función del tiempo post-inoculación y la bacteria estudiada.

Se sugiere realizar el pre enriquecimiento de las muestras para obtener resultados con la PCR clásica.

## Bibliografía

- 1 **Libby** SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J and Gyles CL. *Salmonella*. En: Gyles CL, Prescott FL, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3° ed. Ames, Iowa: Blackwell publishing, 2004.
- 2 **Lujan** TM. *Salmonella*. Oscar SN, editor. Microbiología Veterinaria: Argentina: Inter-medica, 2005.
- 3 **Popoff** MY, Bockemühl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no.46) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 2004;155: 568-570.
- 4 **Ruiz** FG, Constantino CF, Quintana LJA, Cedillo PC y Urquiza BO. Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollo de engorda. Vet Mex 2008; 39:145-160.
- 5 **Urquiza** BO. Salmonelosis Aviar. Los avicultores y su entorno 2008; 65: 90-97
- 6 **Cohen** ND, Wallis DE, Neibergs HL, McElroy AP., McGruder ED, Deloach JR *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction using genus-specific oligonucleotide primers and microbiologic culture for the detection of *Salmonella* in drag-swabs from poultry houses. Poult Sci 1994; 73: 1276-1281.
- 7 **Nguyen** AV, Khan MI, Lu Z. Amplification of *Salmonella* chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. Avian Dis 1994; 38: 119-126.
- 8 **Schrank** IS, Mores MAZ, Costa JLA, Frazzon APG, Soncini R, Schrank A *et. al.* Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. Vet Microbiol 2001; 82: 45-35.
- 9 **Aviña** GLT. 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). D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
- 10 **Espino** LLR., Monteno G, Bomonte J, Diaz M. Influencia de los factores ambientales sobre un biopreparado microbiológico contra roedores dañinos. Rev Cubana Cienc Vet 1989; 20: 267-278.
- 11 **Urquiza** BO. Patogenicidad e inocuidad de *Salmonella enteritidis* var.17f-4 en animales de laboratorio y determinación de proteínas con actividad enterotóxica. (Tesis de Doctorado). D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
- 12 **Morrison** TK. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. 3ra ed. México D.F: Manual Moderno, 1998.
- 13 **Norma Oficial Mexicana** NOM-005-ZOO-1993 Campaña nacional contra la Salmonelosis Aviar. DOF. 1 de Septiembre de 1994.
- 14 **Morilla** AG, Bautista GCR. Manual de inmunología. México: DIANA, 1986: 295-308.
- 15 **Sodikof** CH. Pruebas diagnósticas y de laboratorio en pequeños animales: Una guía para el diagnóstico de laboratorio. 3ra ed. México D.F. Harcourt, 2002.
- 16 **Thomason** BM. Rapid detection of *Salmonella* microcolonies by fluorescent antibody. Appl Microbiol 1971; 22: 1064-1069.
- 17 **Duffey** PS, Kani JC, Lee JO, Hill WJ, Kokka R. *Salmonella* serogroup C2 and C3 identified by agglutination using an immunoglobulin G3 (Kappa) monoclonal antibody (32-1-E3) reactive with a somatic factor 8- like polysaccharide antigen. J Clin Microbiol 1992; 30: 3050-3057.
- 18 **Cruz** HFC, Henry RM. Métodos diagnósticos en enfermedades infecciosas. En Mas OJ. Diagnóstico Molecular en Medicina. Ed. México D.F: Manual Moderno, 2004.
- 19 **Stone** GG, Oberst RD, Hays MP, McVey S, Chengappa MM. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1742-1749.

- 20 **Oliveira** SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW. Detección and identification of salmonelas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol* 2002; 87: 25-35.
- 21 **Persing** DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1281-1285.
- 22 **Pérez** MJA, Vázquez MJR, Rodríguez SMC, Miranda MRE, Romo GAL, *Et al.* Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. México D.F. 1989.
- 23 **Prophet** EB, Mills B, Arrington JB. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de Las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP), 1995.
- 24 **Cohen** ND, McGruder ED, Neibergs HL, Behle RW, Wallis DE, Hargis BM. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. *Poult Sci* 1994; 73: 354-357.
- 25 **Lampel** KA, Orlandi PA, Kornegay L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4539-4542.
- 26 **Whyte** P, Gill K Mc, Collins JD, Gormley E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet Microbiol* 2002; 89: 53-60.
- 27 **Burg** JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1787-1792.
- 28 **Olive** DM. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 261-265.
- 29 **Whipple** DL, Kapke PA, Andersen. Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Vet Diagnost Invest* 1992; 4: 23-27.
- 30 **Mandrell** RE, Wachtel MR, Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 273-278.
- 31 **Salyers** AA y Whitt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. 2ª ed. ASM Press, Washington, D.C. 2002, pag. 381-397.
- 32 **Wan** J, King K, Craven H, Mc Auley C, Tan SE, Coventry MJ, Probelia trade mark PCR system for rapid detection *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. *Lett. Appl. Microbiol* 2000;30: 267-271.
- 33 **Fidélma** BE, Jia L, Ochman H, Selander RK. Comparative genetics of the *inv-spa* invasion gene complex of *Salmonella* Enterica. *Journal of Bacteriology*, 1997: 6: 1985-1991.
- 34 **Espinal** MP, Prieto SE, Otero JV Máttar VS. Presencia del gen de invasividad *invA* en cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Revista Cubana Salud Pública* 2006; 32: 115-120.
- 35 **Alva** PJ. Determinación de la concentración mínima detectable por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR de *Salmonella* Enteritidis en órganos y heces de aves infectadas experimentalmente. (Tesis de Licenciatura). D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
- 36 **Smith** RD. Veterinary clinical epidemiology. 3ª ed. USA: Taylor Francis, 2006:33-55.
- 37 **Rychlik** I, Van Kesteren I, Cardova L. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. *Lett Appl Microb.* 1999; 29: 269-277.
- 38 **González** FT, Rojas HRA. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud publica de México*, 2005: 47 (5): 388-390.
- 39 **Ruiz** FG. Patogenia de *Salmonella* Enteritidis FT13a y *Salmonella*\_Enteritidis

- biovar Issatschenko en pollo de engorda. (Tesis de Maestría). D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- 40 **Pérez** CL, Nuñez EJF, Villagómez ZDA, Nicoli TM y Rubio LMS. Inocuidad Bacteriológica en camarón para exportación en México. *Vet Méx* 2005; 36(4): 411- 423.
  - 41 **Kongmuang** U, Luk JMC, Linberg AA. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B,C2 and D by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3072-3074.
  - 42 **Way** JS, Josephson KL, Pillai SD, Abbaszadagan M, Gesba CP, and Pepper IL. Specific detection of *Salmonella* spp By multiplex polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993; 39 : 1473-1479.
  - 43 **Rossen** LP, orskov K, Holmstrom and Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J Food Microbiol* 1992; 17: 37-45.
  - 44 **Wilde** J, Eiden J and Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1300-1307.
  - 45 **Widjoatmodjo** MN, Fluit AC, Torensma R, Verdonk GPHT and Verhoef J. The magnetic immunopolymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in faecal samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3195-3199.
  - 46 **Tuchili** LM, Kodama H, Sharma RN, *et al.* Detection of *Salmonella* DNA in chicken embryos and environmental samples by polymerase chain reaction. *J of Vet and Med Sci* 1996; 58: 881-884.
  - 47 **Myint** MS, Johnson YJ, Tablante NL, Heckert RA. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Micro* 2006; 26 : 599-604.
  - 48 **Asensi** GF, Reis EMF, Del Aguila EM, Rodriguez D dos P, Silvia JT and Paschoalin VMF. Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* in Chicken rinse carcasses. *Bri Food J* 2009; 6 (111):517-527.
  - 49 **Soumet** C, Ermel G, Salvat G and Colin P. Detection of *Salmonella* spp In food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. *Letters in Applied Micro* 1997; 24: 113-116.
  - 50 **Poppe** C, Johnson PR, Fosberg MC and Irwin JR. *Salmonella* enteritidis and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. *Can J Vet Res* 1992; 56: 226-232.
  - 51 **Deng** S, Cheng A, Wang M, Cao P. Gastrointestinal tract distribution of *Salmonella enteritidis* in orally infected mice with a species-specific fluorescent quantitative polymerase chain reaction. *World J Gastro* 2007; 13(48): 6568-6574.
  - 52 **Turnbull** PCB, and Snoeyenbos GH. Experimental Salmonellosis in the chicken. 1 Fate and host response in alimentary canal, liver and spleen. *Avian Dis* 1974; 18: 153-177.
  - 53 **Poppe** C, McFadden KA, Brouwer AM and Demczuk W. Characterization of *Salmonella enteritidis* strains. *Can J Vet Res* 1993; 57: 176-184.
  - 54 **Chiu** T, Chen T, Hwang W, Tsen H. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp In food *Inter J of Food Microbiol* 2005; 97: 259-265.
  - 55 **Montenegro** MA, Morelli G, Helmuth R. Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolations of defined sources. *Microb Pathog* 1991; 11: 391-397.
  - 56 **Gulic** PA. Mini-review. Virulence plasmids of *Salmonella* Typhimurium and other *Salmonella*. *Microb Pathog* 1990; 8 : 3 -11.
  - 57 **Poppe** C, Curtiss R III, Gulic PA, Gyles CL. Hybridization Studies with a DNA probe derived from the virulence region of the 60 MDa plasmid of *Salmonella* Typhimurium. *Can J Vet Res* 1989; 53: 378-384.

- 58 **Pérez** CM, Sánchez MM, Henao S, Cardona-Castro NM. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie enterica en huevos. Arch Med Vet 2008; 40: 235-242.
- 59 **Kinde** H, Shivasprasad HL, Daft BM, Read DH, Ardans A. *et al.* Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*, phage type 4. Avian Dis 2000; 44: 239-248.

**Cuadro 1. Resultados de la PCR anidada de *Salmonella* Enteritidis FT 13.**

PCR anidada							
Órganos							
Horas PIE	BUCHE	CORAZÓN/PULMÓN	HIGADO/ BAZO	DUODENO	YEYUNO	ILEON	CIEGOS
6	+	+	-	+	+	-	+
18	+	+	+	+	-	+	+
30	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	+	-	+	-
102	-	+	-	-	-	-	+
174	-	-	+	-	+	-	-

PIE: post-infección experimental.

**Cuadro 2. Resultados de la PCR anidada de *Salmonella* Issatschenko.**

PCR anidada							
Órganos							
Horas PIE	BUCHE	CORAZÓN/PULMÓN	HIGADO/ BAZO	DUODENO	YEYUNO	ILEON	CIEGOS
6	+	+	-	-	+	-	+
18	+	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	+	+	+	+
42	-	+	+	-	-	-	-
102	-	-	+	-	-	-	-
174	+	-	-	-	-	-	-

PIE: post-infección experimental.

**Cuadro 3. Resultados a las 6 horas post-infección experimental (PIE), de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	1	1
CORAZÓN/PULMÓN	1	1
HIGADO/ BAZO	0	1
DUODENO	1	0
YEYUNO	1	1
ILEON	0	1
CIEGOS	1	0
TOTAL	5	6
COINCIDENCIAS	3 / 7	
PORCENTAJES	43%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	1	0
CORAZÓN/PULMÓN	1	0
HIGADO/ BAZO	0	0
DUODENO	1	0
YEYUNO	1	0
ILEON	0	0
CIEGOS	1	0
TOTAL	5	0
COINCIDENCIAS	2 / 7	
PORCENTAJES	29%	

**Cuadro 4. Resultados a las 18 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Enteritidis PT 13 A y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
18 horas	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	1	1
CORAZÓN/PULMÓN	1	1
HIGADO/ BAZO	1	1
DUODENO	1	1
YEYUNO	0	1
ILEON	1	1
CIEGOS	1	0
TOTAL	6	6
COINCIDENCIAS	5 / 7	
PORCENTAJES	71%	

Tiempo	Análisis	
18 horas	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	1	0
CORAZÓN/PULMÓN	1	0
HIGADO/ BAZO	1	0
DUODENO	1	0
YEYUNO	0	1
ILEON	1	1
CIEGOS	1	0
TOTAL	6	2
COINCIDENCIAS	1 / 7	
PORCENTAJES	14%	

**Cuadro 5. Resultados a las 30 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Enteritidis PT 13 A y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo (horas)	Análisis	
30 horas	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	0	1
CORAZÓN/PULMÓN	0	1
HIGADO/ BAZO	0	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	0	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	0	7
COINCIDENCIAS	0 / 7	
PORCENTAJES	0%	

Tiempo (horas)	Análisis	
30 horas	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	0	0
CORAZÓN/PULMÓN	0	0
HIGADO/ BAZO	0	0
DUODENO	0	0
YEYUNO	0	0
ILEON	0	1
CIEGOS	0	0
TOTAL	0	1
COINCIDENCIAS	6 / 7	
PORCENTAJES	86%	

**Cuadro 6. Resultados a las 42 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Enteritidis PT 13 A y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	0	1
CORAZÓN/PULMÓN	0	1
HIGADO/ BAZO	0	1
DUODENO	1	1
YEYUNO	0	1
ILEON	1	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	2	7
COINCIDENCIAS	2 / 7	
PORCENTAJES	29%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	0	0
CORAZÓN/PULMÓN	0	0
HIGADO/ BAZO	0	0
DUODENO	1	0
YEYUNO	0	1
ILEON	1	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	2	3
COINCIDENCIAS	4 / 7	
PORCENTAJES	57%	

**Cuadro 7. Resultados a las 102 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Enteritidis PT 13 A y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	1	1
CORAZÓN/PULMÓN	0	1
HIGADO/ BAZO	0	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	0	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	1	7
COINCIDENCIAS	1 / 7	
PORCENTAJES	14%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	1	0
CORAZÓN/PULMÓN	0	0
HIGADO/ BAZO	0	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	0	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	1	5
COINCIDENCIAS	1 / 7	
PORCENTAJES	14%	

**Cuadro 8. Resultados a las 174 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Enteritidis PT 13 A y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
174 horas		
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	0	1
CORAZÓN/PULMÓN	0	1
HIGADO/ BAZO	1	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	1	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	2	7
COINCIDENCIAS	2 / 7	
PORCENTAJES	29%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
174 horas		
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	0	0
CORAZÓN/PULMÓN	0	0
HIGADO/ BAZO	1	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	1	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	2	5
COINCIDENCIAS	4 / 7	
PORCENTAJES	57%	

**Cuadro 9. Resultados a las 6 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Issatschenko y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
6 horas		
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	1	0
CORAZÓN/PULMÓN	1	1
HIGADO/ BAZO	0	1
DUODENO	0	0
YEYUNO	1	1
ILEON	0	1
CIEGOS	1	0
TOTAL	4	4
COINCIDENCIAS	3 / 7	
PORCENTAJES	43%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
6 horas		
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	1	0
CORAZÓN/PULMÓN	1	0
HIGADO/ BAZO	0	0
DUODENO	0	0
YEYUNO	1	0
ILEON	0	0
CIEGOS	1	0
TOTAL	4	0
COINCIDENCIAS	3 / 7	
PORCENTAJES	43%	

**Cuadro 10. Resultados a las 18 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Issatschenko y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
18 horas		
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	1	1
CORAZÓN/PULMÓN	1	1
HIGADO/ BAZO	1	1
DUODENO	1	1
YEYUNO	1	1
ILEON	1	1
CIEGOS	0	0
TOTAL	6	6
COINCIDENCIAS	7 / 7	
PORCENTAJES	100%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
18 horas		
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	1	0
CORAZÓN/PULMÓN	1	0
HIGADO/ BAZO	1	0
DUODENO	1	0
YEYUNO	1	0
ILEON	1	0
CIEGOS	0	0
TOTAL	6	0
COINCIDENCIAS	1 / 7	
PORCENTAJES	14%	

**Cuadro 11. Resultados a las 30 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Issatschenko y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	1	1
CORAZÓN/PULMÓN	1	1
HIGADO/ BAZO	1	1
DUODENO	1	1
YEYUNO	1	1
ILEON	1	1
CIEGOS	1	1
TOTAL	7	7
COINCIDENCIAS	7 / 7	
PORCENTAJES	100%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	1	0
CORAZÓN/PULMÓN	1	0
HIGADO/ BAZO	1	0
DUODENO	1	0
YEYUNO	1	0
ILEON	1	0
CIEGOS	1	0
TOTAL	7	0
COINCIDENCIAS	0 / 7	
PORCENTAJES	0%	

**Cuadro 12. Resultados a las 42 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Issatschenko y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	0	1
CORAZÓN/PULMÓN	1	1
HIGADO/ BAZO	1	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	0	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	2	7
COINCIDENCIAS	2 / 7	
PORCENTAJES	29%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	0	1
CORAZÓN/PULMÓN	1	0
HIGADO/ BAZO	1	0
DUODENO	0	0
YEYUNO	0	0
ILEON	0	0
CIEGOS	0	0
TOTAL	2	1
COINCIDENCIAS	4 / 7	
PORCENTAJES	57%	

**Cuadro 13. Resultados a las 102 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Issatschenko y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	0	1
CORAZÓN/PULMÓN	0	1
HIGADO/ BAZO	1	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	0	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	1	7
COINCIDENCIAS	1 / 7	
PORCENTAJES	14%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	0	0
CORAZÓN/PULMÓN	0	0
HIGADO/ BAZO	1	0
DUODENO	0	0
YEYUNO	0	0
ILEON	0	0
CIEGOS	0	0
TOTAL	1	0
COINCIDENCIAS	6 / 7	
PORCENTAJES	86%	

**Cuadro 14. Resultados a las 174 horas PIE, de las coincidencias por hora de cada clave de *Salmonella* Issatschenko y la comparación entre la histopatología y la bacteriología con la PCR anidada.**

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	HISTOPATOLOGÍA
BUCHE	0	1
CORAZÓN/PULMÓN	0	1
HIGADO/ BAZO	0	1
DUODENO	0	1
YEYUNO	0	1
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	0	7
COINCIDENCIAS	0 / 7	
PORCENTAJES	0%	

Tiempo	Análisis	
	PCR	
ÓRGANO	ANIDADA	BACTERIOLOGÍA
BUCHE	0	0
CORAZÓN/PULMÓN	0	0
HIGADO/ BAZO	0	0
DUODENO	0	0
YEYUNO	0	0
ILEON	0	1
CIEGOS	0	1
TOTAL	0	2
COINCIDENCIAS	5 / 7	
PORCENTAJES	71%	

**Cuadro 15. Resultados de la tabla de contingencias 2 x 2 entre la bacteriología y la PCR, de las muestras del estudio de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A**

PCR	BACTERIOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
	+	4	12
-	12	14	26
TOTAL	16	26	42

SENSIBILIDAD	25%
ESPECIFICIDAD	54%

**Cuadro 16. Resultados de la tabla de contingencias 2 x 2 entre la bacteriología e histopatología, de las muestras del estudio de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A.**

HISTO	BACTERIOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
	+	16	23
-	0	3	3
TOTAL	16	26	42

\*HISTO= histopatología

SENSIBILIDAD	100%
ESPECIFICIDAD	12%

**Cuadro 17. Resultados de las contingencias 2 x 2 entre la histopatología y la PCR, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Enteritidis FT 13 A.**

PCR	HISTOPATOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
	+	13	3
-	26	0	26
TOTAL	39	3	42

SENSIBILIDAD	33%
ESPECIFICIDAD	0%

**Cuadro 18. En esta tabla están los resultados de las contingencias 2 x 2 entre la bacteriología y la PCR, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Issatschenko.**

PCR	BACTERIOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
	+	1	19
-	7	15	22
TOTAL	8	34	42

SENSIBILIDAD	13%
ESPECIFICIDAD	44%

**Cuadro 19. Resultados de las contingencias 2 x 2 entre la bacteriología e histopatología, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Issatschenko.**

	BACTERIOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
HISTO	+	30	38
	-	4	4
TOTAL	8	34	42

\*HISTO= histopatología

SENSIBILIDAD	100%
ESPECIFICIDAD	12%

**Cuadro 20. Resultados de las contingencias 2 x 2 entre la histopatología y la PCR, de todas las muestras del estudio de *Salmonella* Issatschenko.**

	HISTOPATOLOGÍA		TOTAL
	+	-	
PCR	+	2	20
	-	2	22
TOTAL	38	4	42

SENSIBILIDAD	47%
ESPECIFICIDAD	50%

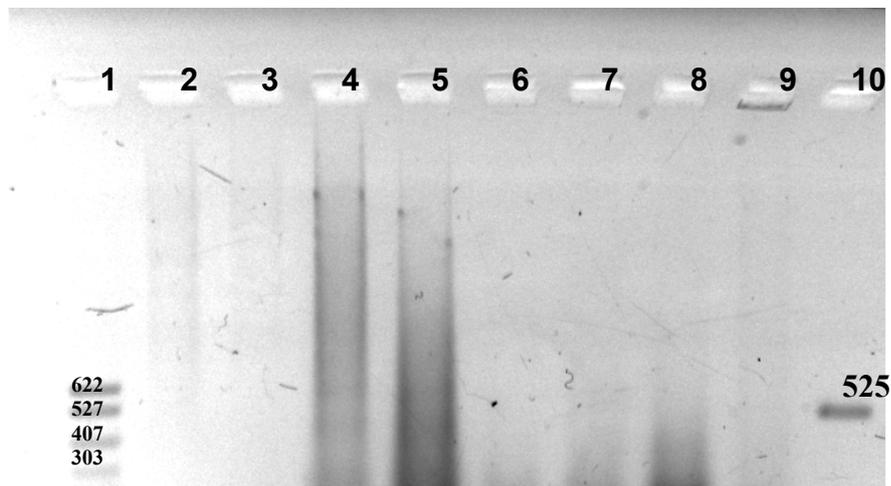


Fig. 1. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR negativos al fragmento 525 pb de SE FT 13 A. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo negativo, 10 testigo positivo, a las 174 horas PIE.

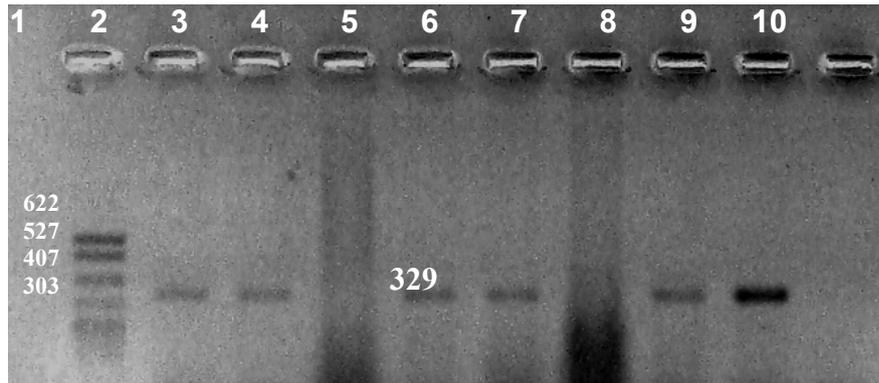


Fig. 2. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SE FT 13 A. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, a las 6 horas PIE.

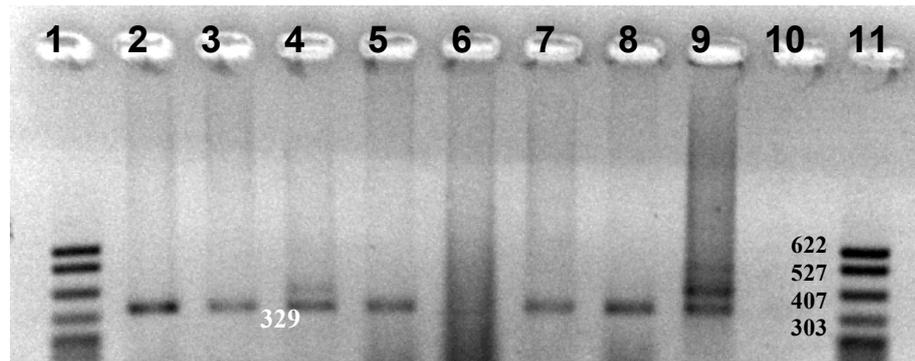


Fig. 3. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SE FT 13 A. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 18 horas PIE.

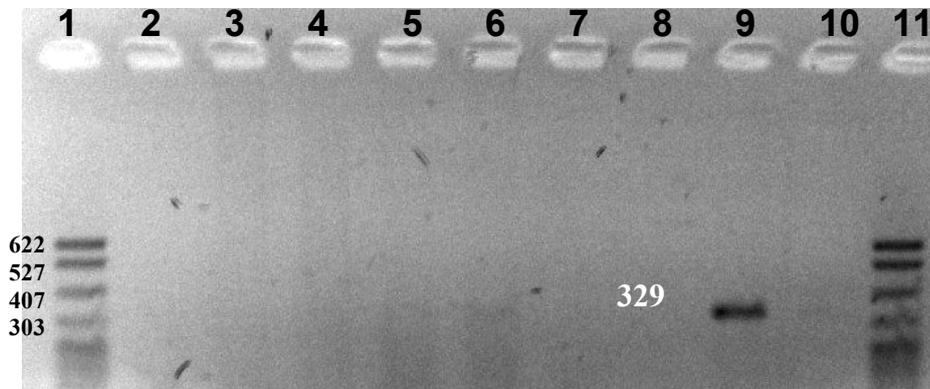


Fig. 4. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SE FT 13 A. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 30 horas PIE.

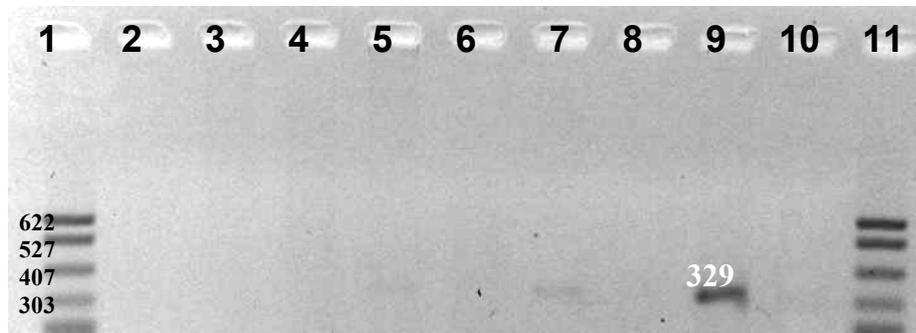


Fig. 5. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SE FT 13 A. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 42 horas PIE.

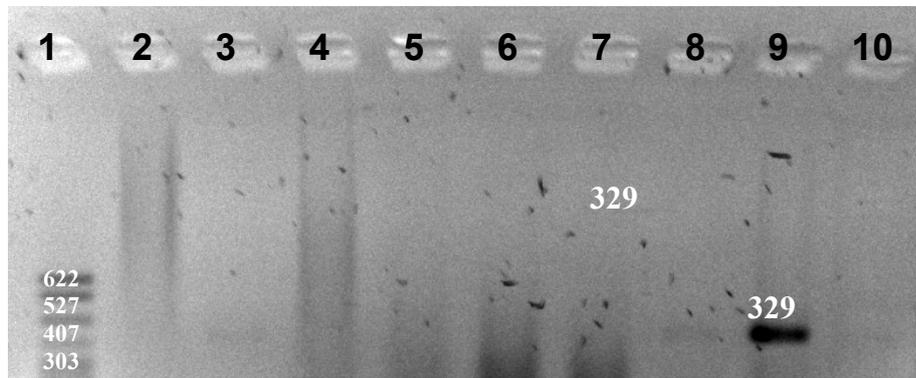


Fig. 6. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SE FT 13 A. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, a las 102 horas PIE.

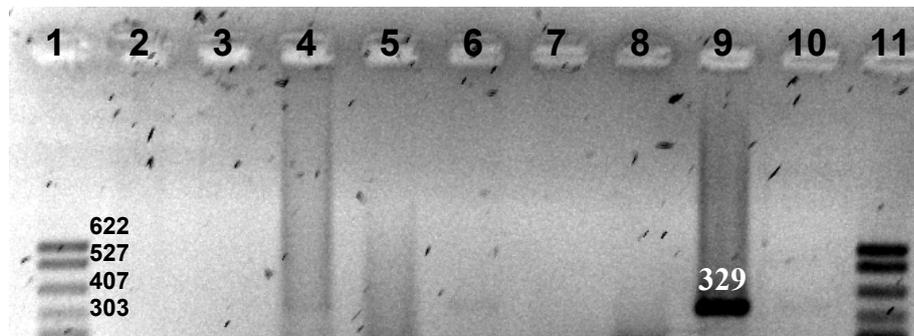


Fig. 7. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SE FT 13 A. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 174 horas PIE.

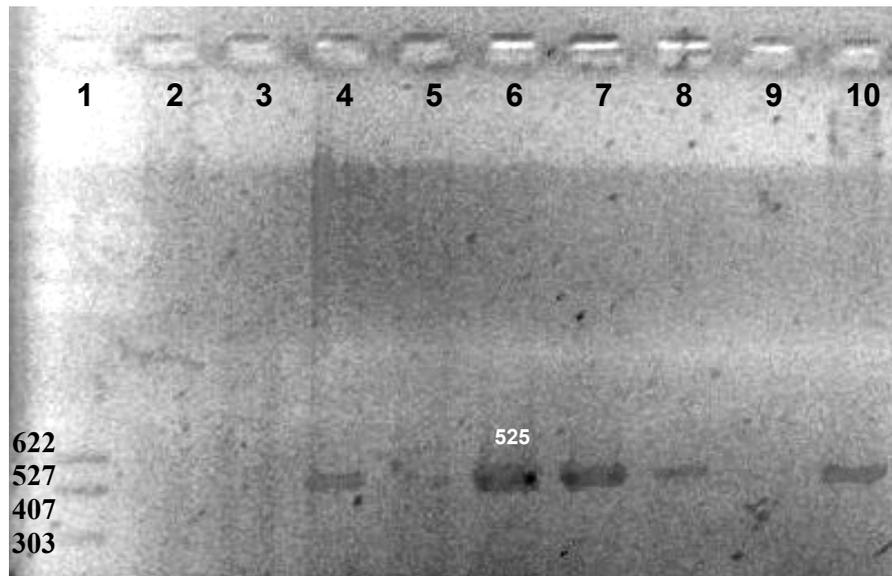


Fig. 8. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 525 pb de SI. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo negativo, 10 testigo positivo, a las 30 horas PIE.

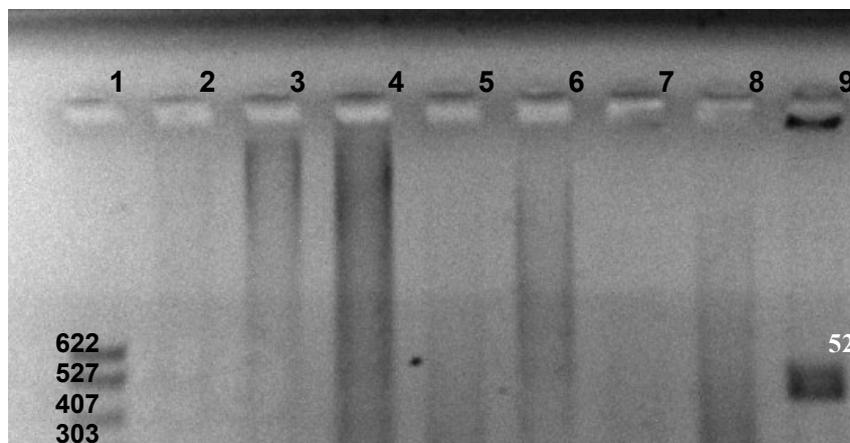


Fig. 9. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR negativos al fragmento 525 pb de SI. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo positivo, a las 102 horas PIE.

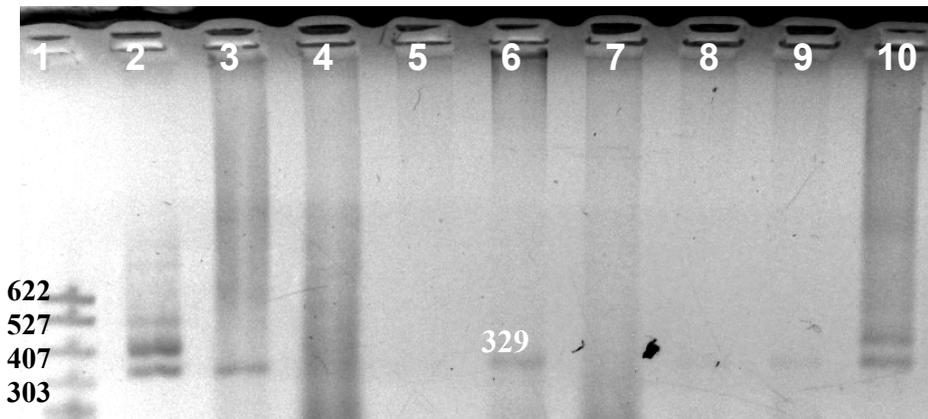


Fig.10. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SI. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 9 testigo negativo, 10 testigo positivo, a las 6 horas PIE.

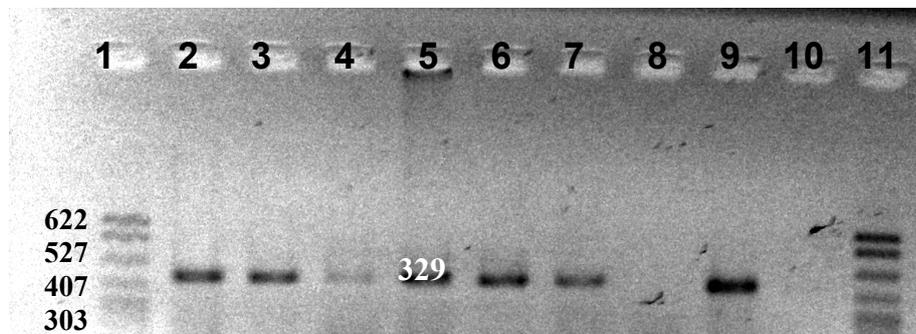


Fig.11. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SI. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 18 horas PIE.

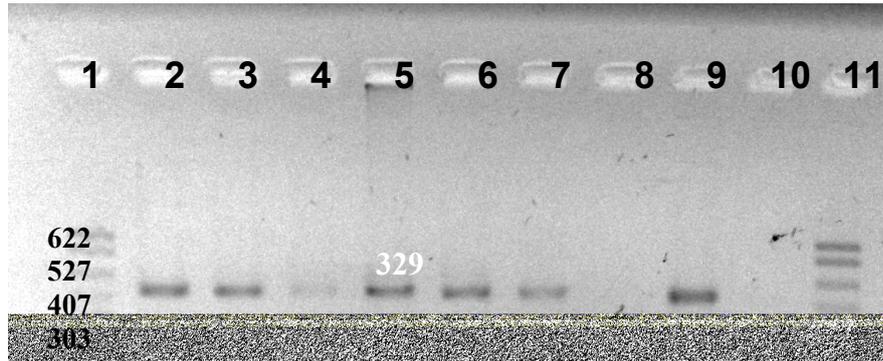


Fig.12. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SI. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 30 horas PIE.

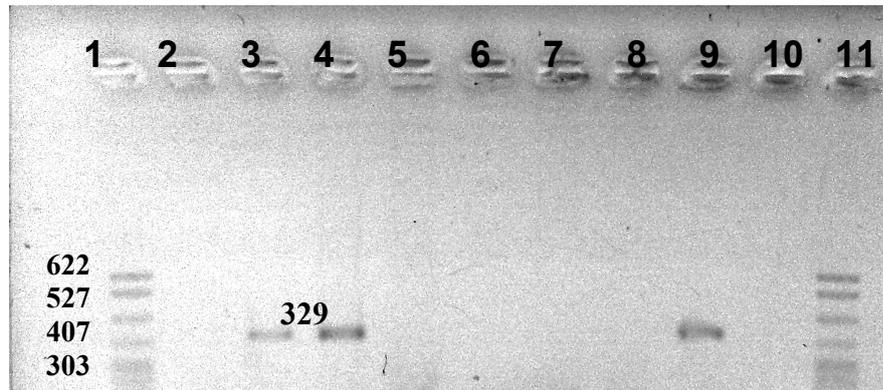


Fig.13. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SI. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 42 horas PIE.

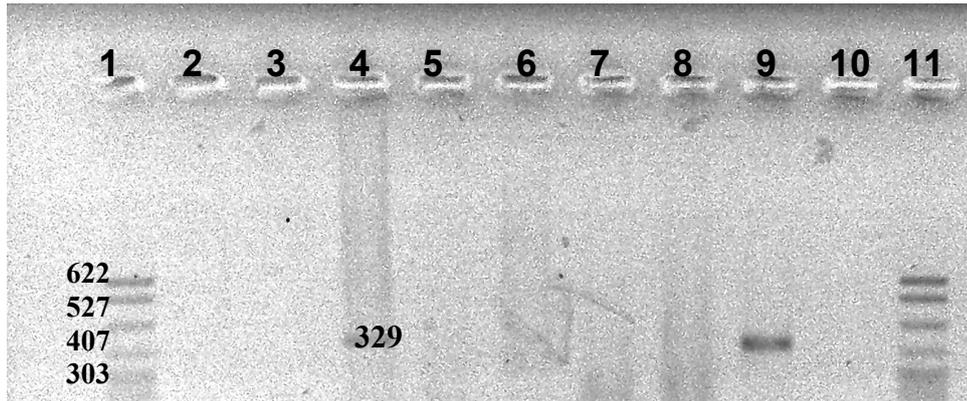


Fig.14. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329pb de SI. Carril: 1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 102 horas PIE.

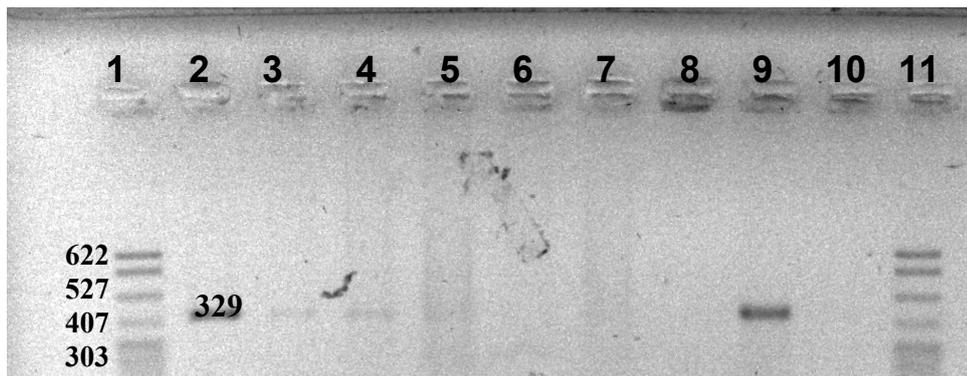


Fig.15. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra resultados de la PCR positivos al fragmento 329 pb de SI. Carril:1 marcador de peso molecular, 2 buche, 3 corazón-pulmón, 4 hígado-bazo, 5 duodeno, 6 yeyuno, 7 ileon, 8 ciegos, 8 ciegos, 9 testigo positivo, 10 testigo negativo, 11 marcador de peso molecular, a las 174 horas PIE.