



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
CAMPO 1

Evaluar la estabilidad de una vacuna de *Salmonella choleraesuis* para cerdos.

TESIS

Que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biológico

Presenta: GONZÁLEZ JARAMILLO MÓNICA YANETH

ASESORES: Dra. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA.

Dr. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN.

Dr. JOSE ABEL CIPRIAN CARRASCO



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.

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS:

Por darme la vida y brindarme una familia llena de amor, por lo que soy ahora, por traer a mi vida amigos y conocer personas que me ayudaron a realizar mis metas, por estar conmigo en todos los momentos más difíciles y por compartir mis alegrías y mis tristezas brindándome su apoyo y su amor incondicional y por permitirme cerrar este ciclo de mi vida.

Gracias.

A MIS PADRES:

Por darme su amor, su cariño, su paciencia, sus desvelos, sus preocupaciones, sus angustias por enseñarme a ser mejor persona, por sus consejos, por darme su apoyo y confianza y sobre todo por creer en mí. A mis padres les dedico este trabajo que con gran sacrificio sacaron a sus hijas adelante. Los amo.

Gracias.

A LA DOCTORA SUSI:

Por creer en mi, por darme una oportunidad de trabajar a su lado, por las enseñanzas que me brindó, por compartir su conocimiento conmigo, por su mano amiga, por los consejos y llamados de atención que me dió, por preocuparse por mi bienestar, por ser más que mi amiga y por estar a mi lado en los momentos que más la necesite.

Gracias.

A MIS HERMANAS.

Adriana, Nora y Liliana, porque sin ustedes no habría llegado a ser lo que soy y por el amor y la confianza que depositan en mi, por ser mis hermanas, quererme y aceptarme como soy, por aguantarme todo lo que hago, por sus regaños y por hacer mi vida llena de felicidad, por el apoyo y la constancia hacia mi, por ser como son las quiero mucho.

Gracias.

AL DOCTOR ELISEO:

Por darme la oportunidad de trabajar a su lado dándome consejos y brindándome su confianza, por el apoyo que me dio durante el servicio y la tesis, por sus asesorías y la paciencia que me tuvo, por ser un amigo más en mi vida.

Gracias.

AL DOCTOR ABEL:

Por permitirme trabajar a su lado y los consejos y apoyo que me brindó a lo largo del servicio.

Gracias.

A MVZ FRANCISCO ROSALES:

Por otorgarme la oportunidad de trabajar con las vacunas que nos proporcionó y por su confianza, sin usted no habría sido posible realizar este trabajo.

Gracias.

A MIS AMIGOS DEL SERVICIO:

Claus, Lore, Erika, Ara, Nambo, Carlitos, Maite, Zaret, Julieta, Moni, por estar a mi lado y brindarme su cariño y apoyo incondicional en este tiempo que los conocí sin ustedes no hubiera sido posible terminar este trabajo.

Gracias

.

A MVZ DAVID TRUJILLO.

Por las palabras de aliento y apoyo que me dió, por estar al pendiente de mí, por hacer ameno nuestra estancia en el servicio y por permitirnos llegar a ser parte de su vida, por su amistad.

Gracias.

A GABINO:

Por estar a mi lado, por prestarme su ayuda y su apoyo en todo momento, por ser un buen compañero, por dejarme trabajar a su lado, por darme consejos y asegurarse de que no me faltara material para trabajar y por ser un amigo más.

Gracias.

A MIS ASESORES DE TESIS:

Por tomarse el tiempo de revisarme mis fallas y corregirlas, por las molestias que les di, por los consejos y sugerencias que me dieron por su apoyo su paciencia y su confianza.

Gracias.

A MIS AMIGOS DE CARRERA.

Ivett, Humberto, Mariano, Juan, Jesús, Armando, José, Miriam, Norma, Minerva, Gerardo, Víctor, Ricardo, Deisy, Claudia, Humberto 27, Samuel, Andrés, Miguel, José Luís, Mónica, Isabel, Lluvia y a todos mis compañeros de generación por los momentos que pasaron a mi lado dándome su amistad, su ayuda y apoyo a lo largo de la carrera.

Gracias.

INDICE GENERAL.

	Pagina.
Indice general	5
Indice de tablas	6
Indice de gráficas	7
Indice de figuras	9
Lista de fotos.	9
Lista de abreviaturas.	10
Resumen.	11
1.0 Introducción.	12
1.2 Antecedentes Históricos.	13
1.3 Características morfológicas.	15
1.4 Estructuras antigénicas.	15
1.4.1. Antígeno Flagelar H.	15
1.4.2. Antígeno somático O.	16
1.4.3. Antígeno capsular K.	17
1.5 Variación.	17
1.6 Determinantes de patogenicidad.	17
1.6.1 Antígeno de superficie.	17
1.6.2 Invasividad.	17
1.6.3 Endotoxina.	18
1.6.4 Enterotoxinas.	18
1.7 Preparación de antisueros.	18
1.8 Clasificación.	19
1.9 Resistencia.	20
1.10 Reservorio	20
1.11 Transmisión	20
1.12 Etiología y Epidemiología.	21
1.13 Patogenia.	22
1.14 Enfermedad en cerdos.	22
1.14.1 Signos clínicos	23
1.14.2 Salmonelosis septicemia	23
1.14.3 Enterocolitis por salmonella.	23
1.15 Diagnostico.	24
1.16 Tratamiento.	24
1.17 Prevención y Control.	24
1.18 Vacunas.	25

1.19 Inmunidad.	26
2.0 Justificación.	27
3.0 Hipótesis.	27
4.0 Objetivos.	28
4.1 Objetivos particulares.	28
6.3 Métodos.	29
6.3.1 Obtención del título de la vacuna por medio de dos diluyentes diferentes.	29
6.3.1.1 Obtención del título de la vacuna usando el diluyente azul.	29
6.3.1.2 Obtención del título de la vacuna usando el diluyente lechoso.	29
6.3.1.3 Obtención del título de la vacuna aplicada a bebederos utilizando agua destilada.	30
4.0 Resultados.	35
5.0 Discusión.	51
6.0 Conclusiones.	55
8.0 Bibliografías	63

ANEXOS.

Índice de tablas.

A Frecuencia y distribución de serotipos de <i>Salmonella choleraesuis</i> en los Estados Unidos (enero 1957- julio 1961)	13
B Esquema de Kauffman- White, ejemplos de formas Ag de <i>Salmonella</i> .	14
C Clasificación de <i>Salmonella</i> en serogrupos.	19
D Clasificación serologica y química de especies de <i>Salmonella</i> mas frecuentes	20

Tablas de resultados de la vacuna usando el diluyente lechoso.

4.1 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el diluyente lechoso y sembrando por estría, primer muestreo.	56
4.2 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el diluyente lechoso y sembrando por estría, segundo muestreo.	56
4.3 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el diluyente lechoso y sembrando por gota, primer muestreo.	56
4.4 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el diluyente lechoso y sembrando por gota, segundo muestreo.	56

Tablas de resultados de la vacuna usando el diluyente azul

4.5 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el diluyente azul y sembrando por estría, segundo muestreo.	57
4.6 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el diluyente azul y sembrando por estría, segundo muestreo.	57
4.7 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el diluyente azul y sembrando por gota primer muestreo.	57
4.8 Resultados de los títulos de la vacuna en UFC, logaritmo y porcentajes usando el	

diluyente azul y sembrando por gota segundo muestreo	57
Tablas de resultados de la vacuna aplicada a bebederos usando agua destilada.	
4.9 Resultados de los títulos de la bacteria viva avirulenta en UFC y porcentajes usando el diluyente Azul en la superficie del garrafón y sembrando por estría.	58
4.10 Resultados de los títulos de la bacteria viva avirulenta en UFC y porcentajes usando el diluyente Azul el intermedio del garrafón y sembrando por estría.	58
4.11 Resultados de los títulos de la bacteria viva avirulenta en UFC y porcentajes usando el diluyente Azul en el fondo del garrafón y sembrando por estría.	59
4.12 Resultados de los títulos de la bacteria viva avirulenta en UFC y porcentajes usando el diluyente Azul en la superficie del garrafón y sembrando por gota.	59
4.13 Resultados de los títulos de la bacteria viva avirulenta en UFC y porcentaje usando el diluyente Azul en el intermedio del garrafón y sembrando por gota.. . . .	60
4.14 Resultados de los títulos de la bacteria viva avirulenta en UFC y porcentajes usando el diluyente Azul en el fondo del garrafón y sembrando por gota.	60

Indice de graficas.

VII Graficas del diluyente lechoso.

7.1 Grafico. Titulo de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por estría primer muestreo.	35
7.2 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por estría primer muestreo.	35
7.3 Grafico. Titulo de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por estría segundo muestreo.	36
7.4 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por estría segundo muestreo.	36
7.5 Grafico. Titulo de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por gota primer muestreo.	37
7.6 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por gota primer muestreo.	37
7.7 Grafico. Titulo de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por gota, segundo muestreo.	38
7.8 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por gota, segundo muestreo.	38

VII Graficas del diluyente azul

7.9 Grafico. Titulo de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por estría, primer muestreo.	39
7.10 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por estría, primer muestreo.	39
7.11 Grafico. Titulo de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y	

sembrando por estría, segundo muestreo.	40
7.12 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por estría, segundo muestreo.	40
7.13 Grafico. Título de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por gota, primer muestreo.	41
7.14 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por gota, primer muestreo.	41
7.15 Grafico. Título de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por gota, segundo muestreo.	42
7.16 Grafico. Porcentaje de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por gota, segundo muestreo.	42
VII Graficas de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul aplicado a bebederos usando agua destilada.	
7.17 Grafico Títulos de la bacteria viva avirulenta de la superficie del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por estría.	43
7.18 Grafico Porcentaje de la bacteria viva avirulenta de superficie del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por estría.	43
7.19 Grafico Títulos de la bacteria viva avirulenta del fondo del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por estría.	44
7.20 Grafico Porcentaje de la bacteria viva avirulenta del intermedio del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por estría.	44
7.21 Grafico Título de la bacteria viva avirulenta del fondo del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por estría.	45
7.22 Grafico Porcentaje de la bacteria viva avirulenta del fondo del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por estría.	45
7.23 Grafico Títulos de la bacteria viva avirulenta de la superficie del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por gota.	46
7.24 Grafico Porcentaje de la bacteria viva avirulenta de superficie del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por gota.	46
7.25 Grafico Títulos de la bacteria viva avirulenta del fondo del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por gota.	47
7.26 Grafico Porcentaje de la bacteria viva avirulenta del intermedio del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por gota.	47
7.27 Grafico Título de la bacteria viva avirulenta del fondo del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por gota.	48
7.28 Grafico Porcentaje de la bacteria viva avirulenta del fondo del garrafón usando el diluyente azul y sembrando por gota.	48

VII Graficas comparativas de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul.

7.29 Grafico. Títulos de los diferentes muestreos de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por estría y gota.	49
7.30 Grafico. Títulos de los diferentes muestreos de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por estría y gota.	49
7.31 Grafico. Títulos de los diferentes muestreos de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por estría de la superficie, intermedio y fondo del garrafón.	50
7.32 Grafico. Títulos de los diferentes muestreos de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul y sembrando por gota de la superficie, intermedio y fondo del garrafón.	50

Indice de figuras.

Figura No1 Metodología de la obtención de los títulos de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente azul.	32
Figura No 2 Metodología de la obtención de los títulos de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso.	33
Figura No3 Metodología de la obtención de los títulos de la bacteria viva avirulenta en el garrafón usando agua destilada.	34

Indice de fotos.

Foto No 1 Gram - de la bacteria <i>Salmonella choleraesuis</i>	61
Foto No 2 Bacteria de <i>Salmonella choleraesuis</i> en medio AST	61
Foto No 3 Cuenta viable difusión en placa.	61
Foto No 4 Cuenta viable difusión en placa	61
Material De laboratorio.	62

Lista de abreviaturas.

Ac.	Anticuerpo
Ag.	Antígeno
Ag O	Antígeno somático
Ag H	Antígeno flagelar
Ag Vi	Antígeno capsular
ml.	Mililitros
L	Litros
UFC	Unidades formadoras de colonias
%	Porcentaje
<i>ul.</i>	Microlitros
AST	Agar soya tripticaseína
BHI	Agar infusión corazón
SSF	Solución salina fisiológica
PBS	Solución de fosfatos
IMViC	Indol., Voges-proskauer Rojo de metilo, Citratos
LPS	Lipopolisacárido
Log	Logaritmo

RESUMEN.

La salmonelosis es un problema de sanidad pública. Hoy en día ha causado pérdidas económicas en el sector porcicultor junto con las otras Enterobacterias. Por tal motivo se han desarrollado diferentes alternativas para el control y prevención de la enfermedad, una de ellas es la vacunación.¹¹

Este estudio está enfocado en analizar la vacuna de *Salmonella choleraesuis* en un ambiente semejante a las condiciones en las que esta se utiliza, se administra por vía oral a los lechones manteniendo a estos en un ayuno de agua de 8 horas por lo menos. Además de homogenizar la bacteria en los bebederos correspondientes que se van a utilizar para la inmunización es recomendable utilizar agua destilada para dicha finalidad. La vacuna de salmonella choleraesuis cuenta con 100 dosis normalmente en una granja porcicultora, con normatividad estipulada por la secretaria de salud.

Así mismo se evaluó la estabilidad que presenta la vacuna en un lapso de tiempo y en que tiempo es más recomendable administrar el biológico a los cerdos.

Se evaluó la estabilidad de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* dividiendo el estudio en dos partes, en la primera se compararon dos diluyentes (azul y lechoso). En la segunda se simuló las condiciones de vacunación de una granja. La titulación de la vacuna se evaluó mediante cuentas viables (UFC/ml).

En la primera etapa al utilizar el diluyente lechoso para la reconstitución de la vacuna liofilizada de *Salmonella choleraesuis* viva avirulenta, donde hubo una variación en la técnica de sembrado en la placa de agar Agar Soya y Trypticaseina (TSI), se realizó por estría y por difusión en placa (gota) ambos por duplicado.

Los títulos (ver tablas 1 y 2 de anexos) que se presentan en la técnica de sembrado por estría son mayores que los de sembrado por gota, ambos títulos se encuentran por arriba del título mínimo inmunizante proporcionado por el laboratorio interesado (53, 000,000.00 UFC, o en su caso $10^{7.3}$ UFC). Los títulos obtenidos por la técnica de sembrado por gota (ver tablas 3 y 4 de anexos) son menores en las cuentas viables entre 10 y 15 UFC, sin embargo se encuentran por arriba del título mínimo inmunizante. Por lo que en el tiempo que duró el experimento la vacuna se mantiene estable. A diferencia que con el diluyente azul se determinó que existe una estabilidad proporcional a la del diluyente lechoso solo que en este caso los títulos de la vacuna se mantuvieron por debajo del título mínimo protector.(ver tablas 5,6,7,8 anexos)

En la segunda etapa, se emularon las condiciones de una granja en el laboratorio, al colocar la vacuna en bebederos, se puede ver que tanto en la superficie, intermedio y fondo del bebedero los títulos obtenidos de la vacuna se encuentran por debajo del título mínimo protector por dos logaritmos, pero mantuvo su estabilidad ya que las gráficas son lineales. Esto se debe a que el volumen que se tomó para el análisis en el garrafón fue despreciable, porque la vacuna se diluyó en 20 L de agua de los cuales solo se tomaron 500 *ul* para realizar los sistemas.(Cabe mencionar que la vacuna está dosificada para 100 lechones).

La viabilidad de la vacuna, se consideró en el tiempo que duró el experimento, al presentarse porcentajes de bacteria viva avirulenta en las diferentes etapas del experimento. (Ver tablas, resultados anexos)

Los resultados presentes en este trabajo, muestran que la vacuna de *Salmonella choleraesuis*, es una alternativa en la prevención y control de la enfermedad.

1.- INTRODUCCIÓN

En México las enfermedades infecciosas que afectan al aparato respiratorio y digestivo del cerdo son las principales responsables de una gran cantidad de las pérdidas económicas de las exportaciones porcinas. Las bacterias llevan en la tierra más de 3500 millones de años y tienen una gran capacidad de adaptación, por lo tanto los cambios en los sistemas de producción pueden contribuir a controlar algunas bacterias, pero siempre habrá nichos ecológicos adecuados para otras bacterias que pueden ejercer su acción patógena cuando se eliminan algunas competidoras.³ *Salmonella sp.* es una bacterias con una gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales y por lo tanto con una enorme difusión en el ambiente. Actualmente se conocen más de 2400 serotipos.⁶

El cerdo es el huésped primario de *Salmonella choleraesuis* aunque este microorganismo se encuentra también en otros animales y en el hombre.⁶ Las salmonelosis es una zoonosis principalmente de origen alimentario en el cerdo tienen doble importancia ya que causa enfermedades en el cerdo y por otra parte, la infección de los cerdos es la principal fuente de contaminación de la carne y de los productos cárnicos, a través de los cuales puede llegar al hombre.⁴²

Dentro de la industria farmacéutica, uno de los principales requisitos es obtener productos que cuenten con estabilidad adecuada.¹ En el área de la salud es de suma importancia la estabilidad que presenta un producto debido a que es factor determinante en sus características inmunizantes.^{1,12}

Una vacuna es la preparación antigénica específica, cuya administración provoca en el organismo la inmunidad activa contra la enfermedad determinada. En la actualidad existen diferentes tipos de vacunas, las cuales se fabrican con fracciones proteicas, agentes atenuados o microorganismos muertos.⁹

Existen especies virulentas que son capaces de multiplicarse en el interior de la célula, mientras que las especies avirulentas no lo hacen.¹¹ Hay una serie de procedimientos que evitan la descomposición de una vacuna, entre ellos tenemos que las vacunas se deben conservar entre 2 y 8 °C, se recomienda el uso de refrigerantes y cajas térmicas para el transporte de biológicos.¹ Debido a la importancia que tienen los biológicos en el área de salud, estos deben cumplir con requisitos estrictos en su control de calidad, entre los que se pueden mencionar, la titulación, inocuidad, cuenta viable, disociación y pureza. Se llevan a cabo también determinaciones físico-químicas como son pH, humedad y vacío.¹ Además debe establecerse una fecha de caducidad y esta ser corroborada al término por el laboratorio productor. La determinación de la fecha de caducidad se basa en la estabilidad del producto y para esto es necesario evaluarlo a lo largo del tiempo de vigencia establecido. Otra forma más rápida es mediante el empleo de pruebas de estabilidad acelerada, las cuales poseen la ventaja de que permiten llevar a cabo la evaluación del producto ante una serie de variables como pH, humedad y temperatura en un menor tiempo.¹ Tomando estos aspectos, es de suma importancia, tomar conciencia de lo importantes que son los biológicos en la industria porcina.

En Europa existen vacunas vivas avirulentas que son de gran utilidad al administrarse 2 semanas antes de la exposición con el agente infeccioso.⁴⁵ Las vacunas con bacterinas no son recomendables debido a que no causan la inmunidad esperada en los cerdos. Otras medidas de control incluyen el adquirir alimentos de compañías que controlen el microorganismo de sus productos. Comprar animales de granjas sin problemas, retirar y aislar a los animales infectados, eliminar la fuente original de infecciones ya sean los tanques de suministro de agua, el alimento y otros animales infectados.

1.2 ANTECEDENTES HISTORICOS

El primer germen representativo del grupo de *Salmonella* fue aislado en 1885 por Smith y Salmon de cerdos muertos de peste. Creyeron que el germen era la causa de la enfermedad, por lo que le dieron el nombre de *Bacillus choleraesuis*.⁶ Hasta 1904 se creyó que este microbio producía la peste porcina. En este año, Schweinitz y Dorset descubrieron que la verdadera causa de la enfermedad era un virus filtrable. El germen es un agente invasor secundario. El segundo germen del grupo fue aislado por Gartner en 1888, a partir de un joven muerto de gastroenteritis por haber comido carne cruda procedente de una vaca enferma. El germen se denominó *Bacillus enteritidis*. El nombre genérico *Salmonella* fue propuesto por Lignieres, en 1900, en honor a D. E. Salmon, primer jefe del Bureau of Animal Industry de los Estados Unidos.⁷

En 1946, Bruner y Edwards esquematizaron en el siguiente cuadro la frecuencia de doce tipos más corrientes de *Salmonella*.¹⁰

Tabla A. Frecuencia y distribución de los serótipos de *Salmonella sp.* en los Estados Unidos. Datos de Enero 1957-julio 1961.

Microorganismo	Pavos	Gallinas	Otras aves	Cerdos	Ovejas y Cabras	Bovinos	Caballos	Ratones y Ratas	Otros animales	Total
<i>S.typhimurium</i>	612	282	120	45	11	185	49	40	41	1385
<i>S. pollorum</i>	14	987	4			2			3	1010
<i>S. choleraesuis</i>		12	1	353		4			8	387
<i>S. heidelberg</i>	159	127	2	2		2			2	294
<i>S. anatum</i>	176	59	13	8		26	3		6	291
<i>S. enteritidis</i>	63	25	1			50	99	10	9	247
<i>S. newport</i>	165	6	3	3	3	57	3		15	255
<i>S. San Diego</i>	215	10				4				229
<i>S. gallinarum</i>	22	184								206
<i>S. infantis</i>	78	94		2	1	1	3	3	4	186
<i>S. chester</i>	106	52	3					2	1	164
<i>S. Paul</i>	114	18					2		2	136
<i>S. muenchen</i>	95	16	1	1		1				114
<i>S. Derby</i>	52	17	7	27	2	1			7	113

Tabla tomada de Bacteriología y Virología Veterinaria (fuente: Moran, Alice: Proc. 65th Ann Meet. Livestock Sanit.Assn, 1961)

En 1961, Moran resume la frecuencia y distribución de los serótipos de *Salmonella* estas 15 especies se muestran en la tabla anterior, ya que son las que se aislaron con mas frecuencia. Estos microorganismos se hallan ampliamente difundidos entre diversos hospedadores animales y que en muchos casos se encuentran animales afectados distintos a los hospedadores primarios.¹⁰

Bayer, Brown y Bruner han descrito un caso en pavos experimentales, producido por el empleo de una ración de arranque comercial.⁷ Consiguieron aislar nueve serótipos de *Salmonella* a partir de la comida de los pavos y de restos de carne. Pomeroy y Grady hallaron que 175 de 980 muestras de subproductos animales de 22 estados, que eran utilizados para la alimentación animal, estaban contaminados con 43 serótipos diferentes de *Salmonella*.¹¹

Stern describió un medio a base de extracto de carne, glicerina, sulfito y fuesina, en el que los microorganismos (Stern-positivos) producen un color lila intenso, debido a la formación de un aldehído por la fermentación de carbohidratos.¹¹ Una segunda reacción, conocida con el nombre de prueba de Bitter, se realiza sobre un medio que contiene 0.5% de ramnosa en leche, se requieren quince horas de estufa y luego se añade rojo de metilo para comprobar la formación de ácido.¹¹

El medio ha sido modificado añadiendo varias sales, 0.5% de peptona y un carbohidrato fermentable, como la ramnosa, xilosa y maltosa. Una tercera reacción tiene como fundamento la capacidad de los microorganismos de fermentar el d-tartrato añadiendo al medio nutritivo.¹¹ La clasificación de las *Salmonella* empleando reacciones serológicas, tales como la absorción de aglutininas se ha empleado en las *Salmonella* más que en ningún otro grupo de gérmenes.

Ello se ha debido a la aportación inicial de White y Kauffmann.

Tabla B. Esquema de Kauffman- White, ejemplos de formulas antigénicas de *Salmonellas*.

GRUPO O	ESPECIE	FORMULA ANTIGENICA
B	<i>Salmonella typhimurium</i>	1,4,5,12:1:1,2
B	<i>Salmonella agona</i>	4,12:f,g,s:-
D	<i>Salmonella diblin</i>	1,9,12:g,p:-
E	<i>Salmonella anatum</i>	3,10:e,h:1,6
G	<i>Salmonella worthington</i>	1,13,23,:z:1,w

Antígeno O: cifras en negrita, Antígeno H de 1ª fase: letra minúscula, Antígeno H de 2ª fase: cifra (o letra minúscula) tabla tomada de Zinsser Microbiología.

Este género es amplio e incluye más de 2000 cepas diferentes (continúa creciendo a medida que se identifican nuevos microorganismos aislados). A pesar de esta diversidad hay solo tres especies, la *Salmonella choleraesuis* (que incluye un solo microorganismo), la *Salmonella typhi* (que incluye solo al bacilo de la fiebre tifoidea) y la *Salmonella enteritidis* (que incluye al resto.)¹⁰

1.3 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

- Los microorganismos del genero de *Salmonella* son bacilos no esporulados, Gram negativos, relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia Enterobacteriaceae, generalmente son móviles aunque existen especies que no lo son (*Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*).¹⁰
- Producen ácido y gas a partir de la glucosa, maltosa, manitol y sorbitol, no fermentan la lactosa, sacarosa ni salicina, no forman indol, ni coagulan la leche, no licuan la gelatina. Son parásitos del hombre y de algunos animales y suelen producir reacciones inflamatorias del tracto entérico.¹¹
- Las *Salmonella* tienen un tamaño de 2- 3 micras por 0.4-0.6 micras, la mayoría de las especies son móviles debido a flagelos peritricos, crecen fácilmente en los medios de cultivo ordinarios, son generalmente resistentes a la congelación en agua y a ciertos agentes químicos, por ejemplo el verde brillante, el tetrionato de sodio y el desoxicolato de sodio, tales compuestos inhiben a los bacilos coniformes y son por lo tanto útiles para el aislamiento de Salmonellas a partir de heces.¹⁰
- Las especies de *Salmonella* pueden ser identificadas por reacciones bioquímicas y por pruebas serológicas. Diversas cepas de la misma especie pueden ser clasificadas por lisis con bacteriófagos específicos lo cual ayuda al rastreo epidemiológico en los casos de cuarentena.⁶
- Se pueden diferenciar de las demás Enterobacterias por medio del IMVIC.(Indol, rojo de metilo, vogues-poskauer, citratos)⁶
- Existe un solo tipo capsular (*Salmonella typhi*), el Vi (de virulencia), aunque la mayoría de las *Salmonella* no producen capsula. La constitución antigénica de la fracción polisacárida del LPS define en parte la especie. La clase y el numero de azúcares junto con los enlaces existentes entre los mismos, definen los determinantes antigénicos que contienen los antígenos O de un determinado aislamiento. Los antígenos O junto con los determinantes antigénicos existentes en la superficie de los flagelos (antígenos H), que poseen la mayoría de las *Salmonella*, contribuyen desde el punto de vista serológico, a definir como especie un determinado aislamiento.⁴⁹

1.4 ESTRUCTURAS ANTIGENICAS

Existen tres antígenos principales:

1. El antígeno flagelar H, este antígeno es conformado por flagelos, consta de dos fases, la primera es la fase específica y la segunda es la fase inespecífica. La primera fase específica consta solamente de los componentes antigénicos que son específicos para la especie o cepa del microorganismos que se designan con letras minúsculas (a, b, c, etc.) una especie de importancia medica es la *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis*. La fase inespecífica la representan los antígenos que pueden existir en otras especies o grupos, estos antígenos se designan con números arábigos (1, 2, 3, 4 etc.) entre los que tenemos *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis* de interés medico. Los Ag

flagelares son inactivados por calentamiento a temperaturas superiores a 60° C, así como por pH ácido para determinaciones serológicas se les prepara añadiendo formalina a cultivos móviles jóvenes en caldo nutritivo, caldo selenito y caldo tetrionato, tales antígenos aglutinan rápidamente con sueros que contengan anticuerpos anti-H, formando grandes masas esponjosas. Los Ag H, contienen varios constituyentes inmunitarios; para la misma especie de *Salmonella*, los antígenos flagelares pueden presentarse en cualquiera de las dos fases, específica o inespecífica o de ambas. La fase 1 específica es compartida solo por unas cuantas especies diferentes mientras que la fase 2 inespecífica es compartida por varias especies. Los microorganismos tienden a mudar de una fase a otra y a esto se le llama variación de fase, los anticuerpos contra los antígenos H son predominante Ig G.¹¹

2. El antígeno somático O forma parte de la pared de la célula bacteriana, son resistentes al calentamiento prolongado a 100 °C, al alcohol y a los ácidos diluidos. Los Ag O se preparan a partir de bacilos inmóviles por tratamiento con calor y alcohol, con suero que contenga anticuerpos anti-O, tales antígenos se aglutinan lentamente en masas granulares. Los anticuerpos contra Ag O de *Salmonella* son predominantemente IgM estos antígenos poseen la siguiente estructura general. Las cadenas específicas O, formadas por unidades repetidas (oligosacaridos) se encuentran unidos a un polisacárido nuclear basal, el cual se encuentra a su vez unido al lípido A; este conjunto forma un lipopolisacárido (LPS), las diferencias en las cadenas específicas O y en las flagelares y capsular es la base para la serotipificación de *Salmonella*, con más de 1700 serotipos adecuadamente identificados. Estas variaciones en la cadena O específica también tiene implicaciones biológicas debido a que sus características confieren reconocimiento y especificidad antigénica al sistema inmunológico del huésped. La especificidad del Ag O permite tanto la respuesta humoral como células contra cualquier serotipo invasor de *Salmonella* y el desarrollo de anticuerpos mediados al LPS del serotipo específico de *Salmonella*. Estructuralmente se le ha asociado con la invasividad de la bacteria, la producción de enterotoxinas y con la gran sobrevivencia en animales infectados experimentalmente, en donde se ha visto que cepas incompletas (rugosas) poseen poca habilidad para invadir el epitelio de la mucosa intestinal y originan una respuesta inflamatoria muy débil. La estructura del LPS de *Salmonella choleraesuis* también ha sido asociado con la capacidad de algunas cepas de *Salmonella typhimurium* para colonizar el colon del ratón y puede influir en la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino. Los efectos biológicos mas frecuentemente asociados con el LPS de las *Salmonellas* son los efectos mediados por la endotoxina, atribuidos a la porción del lípido A. Muchos de estos efectos parecen ser debidos a la interacción de endotoxina y macrófagos; esta interacción origina la liberación de mediadores, los cuales detonan los eventos asociados con el shock séptico, por momentos la interleucina I, la cual es producida por macrófagos activados, estimula la actividad de linfocitos T y B y la producción en hígado de muchas proteínas séricas asociadas con el proceso de inflamación aguda y actúa en el hipotálamo para inducir fiebre, otro macrófago produce la activación de diversas vías

metabólicas incluyendo la síntesis de prostaglandinas y la cascada de coagulación. Por lo tanto el LPS tiene un amplio espectro de actividades biológicas que origina la diversidad de signos clínicos encontrados en casos de Salmonelosis entérica.²⁰

3. El antígeno capsular Vi (K) se encuentra en la extrema periferia de la bacteria, a menudo interfiere en la aglutinación de cepas aisladas recientemente por los antiseros que contienen primordialmente aglutinas anti-O. Los antígenos Vi son destruidos por calentamiento durante una hora a 60° C y por los ácidos y fenol. Los cultivos que poseen antígenos Vi tienden a ser más virulentos que los que no los tienen. Algunos antígenos K se parecen a los polisacáridos capsulares de los *Meningococos* y *Haemophilus*.²⁰

1.5 VARIACIÓN

Salmonella sp. pueden perder antígenos H y volverse inmóviles, la pérdida del antígeno O está asociada con el cambio de morfología colonial lisa a rugosa. El antígeno Vi puede perderse parcialmente o totalmente, los antígenos pueden ser adquiridos o perdidos mediante el proceso de transducción.⁵

1.6 DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD.

Las *Salmonellas* son microorganismos complejos que producen cierto número de factores de virulencia estos incluyen:

- **ANTIGENOS DE SUPERFICIE.**- La capacidad que tienen las salmonellas de adherirse a las células intestinales del huésped y sobrevivir intracelularmente puede deberse a los antígenos O de superficie, o en el caso de *Salmonella typhi* a la presencia de antígenos Vi. Estudios en humanos voluntarios demuestran que aquellos microorganismos que contienen antígeno Vi son claramente más virulentos que aquellos que no poseen el antígeno. Las cepas sin el Ag Vi son capaces de producir enfermedades en voluntarios, aunque en un menor %. El antígeno Vi puede servir para proteger al antígeno O de antiseros y prevenir la fagocitosis. Las variantes de colonias rugosas que carecen de cadenas laterales O específicas en el LPS son avirulentas, mientras que las variantes de colonias lisas son virulentas, aun no se ha descubierto el papel que desempeñan las cadenas laterales del polisacárido en la facilitación de la adherencia a las células huésped.^{9, 11}
- **INVASIVIDAD.**- La *Salmonella* virulenta atraviesa el revestimiento epitelial del intestino delgado. Sin embargo, a diferencia de *Shigella*, *Salmonella* no reside simplemente en el revestimiento epitelial, sino que pasa directamente a través de las células epiteliales hacia el tejido subepitelial. Se desconocen los mecanismos bioquímicos de la penetración, pero el proceso se asemeja a la fagocitosis. A medida que la bacteria se acerca al epitelio las microvellosidades de las células comienzan a degenerar y las bacterias ingresan en las mismas. Luego son rodeadas por membranas citoplasmáticas invertidas, similares a las vacuolas fagocíticas. *Salmonella* atraviesa las células

epiteliales hacia la lámina propia, ocasionalmente ocurre penetración epitelial a nivel de la unión intercelular, luego de la penetración, los microorganismos se multiplican y pueden pasar hacia otros sitios del cuerpo. La destrucción epitelial se observa en los estadios tardíos de la enfermedad, pero se desconocen los mecanismos por los cuales ocurre esta destrucción.^{9, 11}

- ENDOTOXINA.- Como todos los bacilos entéricos, la endotoxina puede desempeñar un papel en la patogenia de la infección por *Salmonella* especialmente sobre los estadios bacterémicos de la fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas. Presumiblemente la endotoxina puede ser responsable de la fiebre observada durante estas afecciones. La fiebre podría ser producida por la endotoxina actuando directamente o indirectamente a través de la liberación de pirógenos leucocitarios endógenos. La activación de las propiedades quimiotácticas del sistema del complemento puede causar la localización de leucocitos en las clásicas lesiones entéricas observadas en la fiebre tifoidea. Sin embargo, el papel exacto de la endotoxina no se sabe con exactitud aun.^{9,11}
- ENTEROTOXINAS.- La diarrea profusa que generalmente acompaña a la salmonelosis difiere de la diarrea en animales a los cuales se les administra la toxina en forma experimental. Diversos serotipos de *Salmonella*, producen una enterótoxina que es similar a la producida por *Vibrio cholera* y *Escherichia coli*. Estas enterótoxinas se unen a las células epiteliales de la mucosa intestinal y estimulan el incremento del Monofosfato de Adenosin Cíclico, el cual origina la secreción de iones cloruro, sodio, agua y dependiendo del segmento del intestino afectado, la eliminación del bicarbonato hacia el lumen intestinal, generando el proceso diarreico y en combinación con los efectos de la endotoxina pueden provocar un deterioro extremadamente rápida.^{9,11}

1.7 PREPARACIÓN DE ANTISUEROS

Cuando se inmunizan animales con cepas móviles de bacilos entéricos muertos por formol, los antisueros contienen anticuerpos anti-H y anti-O, los anticuerpos para H presentan generalmente un título mas elevado que los anticuerpos para O (esta diferencia puede deberse en mayor parte a la inmunogenicidad del antígeno proteico H comparado con el antígeno polisacárido O y en parte a la mayor sensibilidad de la prueba de aglutinación H) si la cepa inmunizante posee también un antígeno capsular (Vi), el antisuero contendrá además anti-Vi. Los antisueros se relacionan con antígenos individuales de superficie en las pruebas de aglutinación se preparan mediante adsorción selectiva, así, por ejemplo, el anticuerpo anti-H puede ser eliminado por adsorción mediante una suspensión de flagelos homólogos (eliminados por medios mecánicos) o mediante suspensiones de mutantes que poseen los flagelos de las células inmunogénicas aunque carezcan de antígenos “Vi” u O, los anticuerpos anti-O o anti-Vi pueden ser eliminados de forma selectiva utilizando los extractos bacilares adecuados.⁴⁵

1.8 CLASIFICACION

Salmonellas son el grupo más complejo de *Enterobacteriaceae*, con más de 2200 serótipos descritos en el esquema de Kauffman-White. En este esquema, las *Salmonellas* se agrupan (A, B, C y siguientes) sobre la base del antígeno somático O y se subdivide en serótipos (1, 2 y siguientes) por su antígeno flagelar H (es decir A1, A2, B1, B2). Antes del 1º de julio de 1983 se utilizaban tres especies de salmonella para informar resultados positivos: *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella ewpo* y *Salmonella enteritidis*; esta última con más de 2200 serótipos.

El 1º de julio de 1983 se cambió el método para informar los resultados de los serotipos, de modo que todos los microorganismos identificados como *Salmonella* se informan por género y serotipo, omitiendo la referencia a especies.¹⁰ En la práctica diaria, los aislamientos desconocidos de muestras clínicas que son bioquímicamente sugestivos de especies de *Salmonella* se confirman usando antiseros poli-clonales que contienen anticuerpos contra todos los subgrupos mayores. Los subcultivos de aislamientos confirmados son transmitidos a los laboratorios de salud donde se hacen las designaciones de serótipos basadas en reacciones serológicas a determinantes O y H.⁹

TABLA C. Clasificación de *Salmonella* en serogrupos.

Subgrupo 1	Subgrupo 2	Subgrupo 3 ^a	Subgrupo 3b	Subgrupo 4	Subgrupo 5	Subgrupo 6
<i>S. typhi</i> <i>S. choleraesuis</i> <i>S. paratyphi</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. pollorum</i>	<i>S. salamae</i>	<i>S. arizonae</i>	<i>S. diarizonae</i>	<i>S. houtnae</i>	<i>S. bongori</i>	<i>S. choleraesuis</i> subsp. Indica.

Tabla tomada de Zinser

Se han identificado aproximadamente 1000 variedades en relación con los antígenos específicos H, O, y Vi mediante pruebas exhaustivas de adsorción y reacciones cruzadas, por la reacción de aglutinación H, O y Vi se ha conseguido identificar más de 1000 tipos de *Salmonella*. Solo los grandes centros de tipificación de *Salmonella* (Copenhage, Londres, Atlanta, etc.) disponen de las colecciones necesarias de antiseros específicos para tal trabajo, en la mayor parte de los laboratorios de diagnóstico las cepas son clasificadas únicamente por sus características fermentativas y reacciones de aglutinación practicadas con antiseros específicos de grupo.⁴⁴

Las reacciones cruzadas demuestran que cada antígeno O de *Salmonella* posee dos o tres determinantes específicos, cada uno de los cuales recibe un número y es compartido por otros antígenos O, considerando ciertos determinantes de mayor capacidad reactiva la *Salmonella* han sido clasificadas en grupos O de los cuales los primeros 26 son designados mediante letras (A-Z) y los siguientes mediante los números correspondientes de grupo (50, 51, 52, etc.), cada grupo posee su determinante O principal característico, así por ejemplo el grupo C (antígeno O, 6, 7) el determinante principal es el factor 6. Alrededor de un 90% de las cepas aisladas en la especie humana corresponde a los grupos A y E, mediante el empleo de determinantes de menor importancia se pueden establecer divisiones dentro de cada grupo.^{14,44} Los miembros de cada grupo establecido en relación con los antígenos O pueden

subdividirse en especies, según sus antígenos flagelares proteicos H en la clasificación de Kauffman-White los antígenos flagelares de la fase 1 se indican por letras minúsculas y los antígenos de la fase 2 por números. La elaboración del antígeno polisacárido Vi, situadas convencionalmente después de los números que indican los distintos antígenos O ya que la cubierta superficial formada por Vi impide la aglutinación con anticuerpos anti-O homólogos (aunque permite la absorción de anticuerpos) no puede establecerse la diferenciación en este grupo a partir de dicha reacción. ⁶

TABLA D Clasificación serológica y química de especies de *Salmonella* mas frecuentes.

ESPECIE	GRUPO	ANTIGENO O	ANTIGENO H	
			FASE 1	FASE2
<i>S. paratyphi A</i>	A	(1), 2, 12	a	-
<i>S. schottmuelleri</i>	B	(1), 4, (5), 12	b	1,2
<i>S. typhimurium</i>	B	(1), 4, (5), 12	i	1,2
<i>S. paratyphi C</i>	Ci	6, 7, Vi	c	1,5
<i>S. choleraesuis</i>	Ci	6, 7	c	1,5
<i>S. montevideo</i>	Ci	6, 7	g, m, s	-
<i>S. newport</i>	C2	6, 8	e,h	1,2
<i>S. typhi</i>	D	9, 12, Vi	d	-
<i>S. enteritidis</i>	D	(1), 9, 12	g, m	-
<i>S. gallinarum</i>	D	1,9,12	-	-
<i>S. anatum</i>	E	3,10	e,h	1,6

Tabla tomada de bacteriología y virología veterinaria.

1.9 RESISTENCIA

Salmonella choleraesuis como todos los bacilos Gram negativos no esporulados, mueren fácilmente por el calentamiento a 60 ° C durante 20 minutos, y también por desinfectantes químicos. Sin embargo, todos los microorganismos sobreviven en las heces, están protegidos de la luz solar y de la desecación, resisten la congelación, por lo que soportan los periodos invernales.

Las *Salmonellas* son capaces de tolerar las concentraciones relativamente altas de bilis, un hecho que se utiliza para diseñar medios para el aislamiento de estos microorganismos, los miembros de este género son típicos de los bacilos entéricos en su resistencia a otros agentes físicos y químicos. *Salmonella choleraesuis* se utiliza como un microorganismo estándar de pruebas para las preparaciones fenólicas. ³¹

1.10 RESERVORIO

El reservorio de los microorganismos del genero *Salmonella* es el tracto gastrointestinal, tanto de los animales de sangre caliente como de los animales de sangre fría. La fuente de infección incluye el suelo contaminado, la vegetación el agua, y los alimentos contaminados. ²²

1.11 TRANSMISIÓN

La infección se produce como consecuencia de la ingestión de *Salmonella* viables. La enfermedad puede aparecer inmediatamente después de que ha tenido lugar la infección; en un animal ya infectado, es posible que la enfermedad sea consecuencia de una modificación del medio intestinal. El resultado de la

interacción entre el hospedero y los microorganismos del género *Salmonella* depende del grado de resistencia a la colonización del hospedero, de la dosis infectante y de la especie concreta de *Salmonella sp.*¹¹ Los cerdos adultos pueden llegar a ser portadores asintomáticos de Salmonelosis por periodos indefinidos de tiempo. La bacteria puede persistir en bajo número en el intestino y excretarse con las heces, o las heces pueden contaminarse intermitentemente a partir de la vesícula biliar, que es el reservorio común de la bacteria, las *Salmonellas* también pueden subsistir en los ganglios linfáticos regionales del tracto gastrointestinal, pero no son excretados con las heces.¹¹

1.12 ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

La puerta habitual de infección es oral, y después de la infección del microorganismo se multiplica en el intestino causando una enteritis. Una invasión puede presentarse a continuación y tener por resultado una septicemia, con localización subsiguiente en el cerebro y las meninges, el útero preñado, los aspectos distales de las extremidades y las puntas de las orejas y la cola, lo cual puede tener por consecuencia, respectivamente, meningoencefalitis, aborto, osteítis y gangrena seca de los pies, la cola y las orejas. El microorganismo con frecuencia se localiza también en la vesícula biliar y en los ganglios linfáticos mesentéricos, y los supervivientes eliminan intermitentemente el microorganismo por el intestino y con ello por las heces.⁷

Los microorganismos segregan exotoxinas las cuales atacan a la célula blanco (célula epitelial del intestino) mientras que una de ellas desajusta la síntesis de los nucleótidos cíclicos, la otra interrumpe la síntesis de proteínas. El desajuste provoca un flujo de iones y de líquido hacia la luz intestinal, lo que a su vez ocasiona diarrea, en el segundo caso, la detención de la síntesis proteica provoca la muerte de la célula.^{5,14}

Cuando crecen en medios con escasez de hierro las *Salmonellas* elaboran sideroforos (absorben hierro). La fuente de infección comprende las heces de los animales infectados que pueden contaminar el alimento y el agua, la leche, las carnes frescas y procesadas de los mataderos, productos de plantas y animales utilizados como fertilizantes o materias alimentarias, pastos y tierra trashumante y muchos materiales inertes. Los microorganismos pueden sobrevivir durante meses en áreas húmedas y calientes, por ejemplo los establos de engorda de cerdos y en bebederos cavados en la tierra. Los roedores y los pájaros silvestres son también fuente de infección. La prevaencia de la infección varia entre las especies y los países y es mucho mas alta que la incidencia de la enfermedad clínica, que comúnmente es precipitada por situaciones de stress, tales como la suspensión súbita de alimento , transporte, sequía, aglomeración, parto reciente y la administración de algunos medicamentos.^{5,14}

1.13 PATOGENIA

Las células blanco revisten el último tramo del intestino delgado y el primero del intestino grueso, si la célula blanco esta desocupada con respecto al número de *Salmonella*, es posible que se produzca la enfermedad. Una vez ha tenido lugar la adherencia, se desconoce cual es la causa que determina la enfermedad (si es que se presenta) será diarreica o septicémica. Determinadas especies tienen mayor capacidad que otras para producir la enfermedad septicémica. ^{14,51}

Después de adherirse a la célula blanco, las cepas que producen diarrea se multiplican, segregan una toxina semejante a la toxina LT, e invaden la célula. En el interior de la célula, las *Salmonella* segregan la citotóxica que provoca la muerte de la célula y su desprendimiento de la mucosa intestinal. La gravedad de la enfermedad depende del número de células blanco afectadas. Los síntomas de la enfermedad son molestias abdominales y diarreas acompañadas de señales de muerte celular (sangre, restos de células y células inflamatorias) ^{14,51}

Es posible que las cepas que producen septicemia provoquen la diarrea, la destrucción de células blanco o ambas cosas. Las cepas que producen la enfermedad eluden la respuesta inmune del hospedero y se multiplican en el interior de los macrófagos del hígado y del bazo, también en el interior de los macrófagos que circulan en los vasos sanguíneos. Su eliminación en la corriente sanguínea se encuentra inhibida en parte por las unidades repetitivas del Ag O del LPS de la *Salmonella*, debido al complejo de ataque a la membrana del sistema complemento que impide su unión a la membrana externa. Se ha comprobado que una proteína (de 12 kilodaltones) de la membrana externa, codificada por plásmidos, convierte en serorresistente a una determinada cepa *Salmonella typhimurium*. Estas cepas son hidrófilas, en parte, a la fracción del carbohidrato del LPS que provoca una repulsión de la membrana de la célula fagocitaría la cual es relativamente hidrófoba. Las *Salmonella* que son fagocitadas no son destruidas fácilmente, porque en el animal no inmune el contenido de los lisosomas del macrófago no atacara con facilidad a la *Salmonella* que se encuentren en el interior del fagosoma. ^{14,51} Las *Salmonellas* invasoras son capaces de segregar un sideroforo. La enterobactina que separa el hierro de las proteínas fijadoras, del hierro del hospedador. La multiplicación del microorganismo origina una endotoxemia Esto explica la mayoría de los síntomas y el curso de la enfermedad. ¹⁴

1.14 ENFERMEDAD EN CERDOS

De los animales domésticos el cerdo es uno de los reservorios mas importantes de *Salmonellas* y es susceptible de enfermarse con varios serotipos, siendo el mas frecuente *Salmonella choleraesuis*.

Los serotipos de otros huéspedes que atacan al cerdo generalmente se aíslan de intestino y de ganglios mesentéricos, mientras que *Salmonella choleraesuis* da un cuadro de septicemia, pudiéndose aislar de la sangre y de casi todos los órganos parenquimatosos. La edad en que el cerdo es más susceptible y en la

que se producen brotes epidémicos es entre los dos y cuatro meses, pero la infección puede presentarse también en adultos, generalmente en casos aislados.¹¹

En el cerdo, la salmonelosis se puede presentar como una septicemia aguda y fulminante, o como una enfermedad intestinal debilitante de curso crónico. Su forma clínica depende de la especie de *Salmonella*, de la dosis infectante y de la resistencia de la colonización del animal infectado. La enfermedad se observa con mayor frecuencia en aquellos animales que han estado en estrés constante, estas circunstancias se dan con frecuencia en los cerdos de cebo, un grupo de edad en el que corrientemente se presenta la salmonelosis. Para estas las fuentes más comunes de infecciones son los alimentos contaminados (harina de carne, harina de pescado), contacto con heces de animales portadores, instalaciones mal desinfectadas, agua contaminada etc.²⁰

1.14.1 Signos clínicos

Los animales afectados presentan depresión, inapetencia, fiebre, cianosis de orejas, cola, abdomen, hemorragias en la mucosa gástrica, intestinos, corteza renal y epicardio; ganglios mesentéricos y bazo aumentados de tamaño e hiperémicos. En el hígado se pueden encontrar pequeños focos blancos de necrosis.^{3, 13}

En casos crónicos se presenta diarrea profusa de color amarillento, ligero aumento en la temperatura, poco apetito pérdida de peso, debilidad general, los animales que se recuperan se convierten en portadores asintomáticos. A la necropsia se observa inflamación y erosión de la mucosa intestinal, áreas de ulceración en el intestino delgado y grueso. Las úlceras pueden ser pequeñas o extensas de forma regular o irregular, cubiertas de una membrana diférica delgada.^{3, 11, 13}

1.14.2 Salmonelosis septicemia

En los cerdos es común un cambio de color de la piel desde rojo oscuro al morado, especialmente en las orejas y en la parte ventral del abdomen pueden producir además signos nerviosos.⁹

La depresión es marcada, la fiebre (40.5-41.5 °C) es habitual y la muerte se presenta de 24 a 48 horas.

1.14.3 Enterocolitis por *Salmonella*

La enfermedad puede presentarse de manera aguda o subaguda. El signo inicial es una diarrea acuosa amarillenta sin moco, se difunde rápidamente y en tres a siete días en casi todos los animales del corral. Es característico de la salmonelosis que la diarrea se vuelve a presentar por segunda o tercera ocasión, transformándose en una enfermedad diarreica debilitante de varias semanas de duración. Puede aparecer sangre esporádicamente en las heces rara vez profusas en la disentería porcina. Esto a su vez ocasiona fiebre anorexia y deshidratación. La mortalidad es baja y ocurre generalmente después de varios días de diarrea.^{11, 13}

1.15 DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la enfermedad debe ser diferencial con otras enfermedades como peste porcina clásica, erisipelas, disentería porcina, rotavirus, colibacilosis, coccidiosis. Es importante señalar que posteriormente a los brotes de Síndrome respiratorio reproductivo (SRRP) se presentan grandes brotes de la forma septicemia de la enfermedad que ameritan reconocer el desarrollo epidemiológico de ambas enfermedades. El diagnóstico debe involucrar la epidemiología de la granja, la clínica, los hallazgos macro y microscópicos que pueden sugerir la presencia de salmonelosis, debe ser confirmada con el aislamiento bacteriológico por el laboratorio.^{3, 11} Las muestras a evaluar son pulmón, corazón, bazo, hígado, riñón, ganglios linfáticos mesentéricos, heces, intestino (íleon y ciego). Después del aislamiento e identificación bioquímica de las *Salmonella*, se realiza la serotipificación con antisueros específicos y se determina la susceptibilidad antimicrobiana.^{13,20}

1.16 TRATAMIENTO

El tratamiento con antimicrobianos a los cuales la bacteria es sensible son de mucho valor en los brotes de Salmonelosis. Este tratamiento es efectivo en reducir la mortalidad en el brote y la contaminación del medio ambiente por las bacterias excretadas durante y después de la enfermedad así como en reducir los costos por el uso de antimicrobianos inespecíficos. Sin embargo, la localización intracelular de la bacteria es una barrera a los antimicrobianos, por lo que la defensa del animal juega un papel importante en la destrucción de la bacteria.³ Las medidas terapéuticas consisten en medicar a los afectados mediante el uso de antimicrobianos, considerando la base terapéutica dentro de la dosis y tiempo indicado con la finalidad de evitar la resistencia, por lo que es fundamental apoyarse en el diagnóstico de laboratorio y aplicar el antimicrobiano específico, basándose en el antibiograma de la bacteria aislada.^{3,11}

La resistencia múltiple de *Salmonella* a diferentes antimicrobianos es común y existen evidencias que el uso de antimicrobianos en los alimentos para animales ha contribuido a la selección de cepas de *Salmonella* resistentes cuyos patrones de resistencia varían en cada país, región y en diferentes explotaciones.

En estudios realizados se ha demostrado resistencia en cepas de *Salmonella* a diversos antimicrobianos como sulfonamidas, tetraciclina, estreptomicina, neomicina, kanamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol y gentamicina. A la vez se demostró una sensibilidad a quinolonas y cefalosporinas de tercera generación. Por esta situación es de gran valor realizar el aislamiento y la correspondiente susceptibilidad antimicrobiana.^{3, 11,13}

1.17 PREVENCIÓN Y CONTROL

Las vacunas vivas atenuadas administradas oralmente proporcionan la mejor protección contra Salmonelosis, debido a su habilidad para estimular de manera más efectiva la respuesta inmune mediada

por células en comparación con las preparadas con bacterias muertas (House *et al.*, 2001). Se dispone de una vacuna viva atenuada contra *Salmonella choleraesuis* de demostrada seguridad y eficacia con criterios clínicos, patológicos y microbiológicos. Sin embargo, hubo variaciones en el grado de protección en algunas explotaciones que las relacionan a altos niveles de exposición, a infección 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 *Salmonella choleraesuis*.^{6,13}

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 dentro y fuera de las instalaciones de la granja porcina de limpieza, desinfección, adecuada disposición de heces y aguas, bioseguridad (desratización), cuarentenas, vacunas y junto con estas medidas se deben realizar periódicamente monitoreos bacteriológicos y serológicos de los animales de las granjas e instalaciones^{3,1}

1.18 VACUNAS

La vacuna (del latín *vaccinus-a-um*, 'vacuno'; de *vacca-ae*, 'vaca') es un preparado de Antígenos que una vez dentro del organismo provoca una respuesta inmune producida por anticuerpos. Esta respuesta genera memoria inmunológica produciendo en la mayoría de los casos, inmunidad permanente frente al antígeno y disminuyendo la probabilidad de la enfermedad.

Las vacunas se clasifican en vacunas vivas atenuadas y vacunas muertas o inactivadas.

Existen varios métodos de obtención:

- Vacunas avirulentas preparadas a partir de formas no peligrosas del microorganismo patógeno.
- Vacunas posificadas a partir de organismos muertos o inactivas
- Antígenos purificados.

Tipos de vacunas.

Las vacunas pueden estar compuestas de bacterias o virus, ya sean vivos o debilitados, que han sido cultivados con tal fin. Las vacunas también pueden contener organismos inactivos o productos purificados provenientes de aquellos primeros. Hay tres tipos tradicionales de vacunas:

Inactivas.- microorganismos dañinos que han sido tratados con productos químicos o calor y han perdido su virulencia y la capacidad de generar la enfermedad. Ejemplos de este tipo son: la gripe, cólera, peste bubónica y la hepatitis A. La mayoría de estas vacunas pueden ser incompletas o de duración limitada, por lo que se necesita más de una administración.

Vivas atenuadas: microorganismos que han sido cultivados expresamente bajo condiciones en las cuales pierden sus propiedades nocivas. Suelen provocar una respuesta inmunológica más duradera y son aplicadas usualmente en los adultos. Por ejemplo: la fiebre amarilla, sarampión y paperas.

Toxoides: son componentes tóxicos inactivados procedentes de microorganismos, en lugar del propio microorganismo. En este grupo se pueden encontrar el tétanos y la difteria.

1.19. INMUNIDAD

El sistema inmunitario reconoce los agentes de la vacuna como extraños, destruyéndolos y recordándolos. Cuando una versión realmente nociva de la infección llega al organismo, el sistema inmunitario está ya preparado para responder de la siguiente manera: Neutraliza al agente infeccioso antes de que pueda entrar en las células del organismo y lo reconoce para destruir las células que hayan sido infectadas antes de que el agente se pueda multiplicar en gran número.

La vacuna de salmonella choleraesuis viva avirulenta, se administra por vía oral a lechones con la finalidad de activar la respuesta humoral y celular.

La respuesta inmune innata es la primera que entra en contacto con la bacteria viva avirulenta de *Salmonella choleraesuis*, activando una serie de mecanismos de defensa al tener contacto con el Ag. Se lleva la desgranulación de la célula cebada, la activación del complemento formando los MAC, la fagocitosis, la producción de Inmunoglobulinas, la respuesta inflamatoria, la presentación del antígeno a los ganglios linfáticos, la producción de células como linfocitos T y linfocitos B de memoria así como las NK. Con la finalidad que al exponer a los lechones con el agente infeccioso generen anticuerpos específicos contra la salmonelosis.

2.- JUSTIFICACION

Las enfermedades infecciosas que afectan al aparato digestivo del cerdo han sido clásicamente y son aún una de las principales preocupaciones de la salud animal y humana, puesto que con las enfermedades respiratorias son las responsables de buena parte de las pérdidas económicas de las exportaciones porcinas.

La producción porcina es una producción intensiva en la que se trabaja sobre animales cada vez más selectos desde algunos puntos de vista. Los cerdos actuales tienen una capacidad de ganancia de peso y carne en aumento, ya que en la actualidad tiene un aparato digestivo que es llevado al límite de su capacidad y es, en consecuencia mucho más propenso a sufrir alteraciones digestivas.

Las enfermedades digestivas del cerdo se ven aumentadas porque estas enfermedades casi siempre se hacen presentes en las granjas y porque en muchos casos no se tienen las medidas de control adecuadas.

Debido a que la salmonelosis del cerdo ha causado una de las mayores pérdidas económicas y productivas reportadas en la industria porcina nacional, en la actualidad con la aplicación de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* utilizando la vía oral al colocarla en bebederos, evitando estresar a los animales, en conjunto con la segregación de la población se pretende controlar y erradicar esta enfermedad a través de la inmunidad adquirida, Esta bacteria causa enfermedades en el cerdo y por otra parte, la infección de los cerdos es la principal fuente de contaminación de la carne y de los productos cárnicos, a través de los cuales puede llegar al hombre, es una zoonosis principalmente de origen alimentario, por lo que se trata de ampliar las medidas de seguridad y prevención controlando la enfermedad.

3.-HIPOTESIS

- Si la vacuna *Salmonella choleraesuis* cuenta con una estabilidad aceptable en los medios de aplicación, en un lapso de tiempo de 24 horas, a una temperatura variable, entonces se podrá utilizar como una alternativa en la industria porcina como medida de control y prevención de la enfermedad

4.0 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la estabilidad de la vacuna *Salmonella choleraesuis*, simulando las condiciones de vacunación oral de la granja, por medio de dos métodos diferentes. Con el fin de aceptar o rechazar la aplicación en la industria porcina, generando propuestas para las medidas que se deben de seguir en la aplicación de la misma en la granja porcina.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los títulos de la vacuna a lo largo de la evaluación por medio de dos métodos diferentes con el fin de aceptar o rechazar la aplicación de esta en la industria porcina.
- Utilizar dos diluyentes de uso comercial en la reconstitución de las vacunas (ambos comerciales, el diluyente azul de uso común en la industria porcina y el diluyente lechoso como nueva alternativa en la vacunación) y comparar resultados.
- Informar a los porcicultores las medidas que se deben seguir en la aplicación de la vacuna oral.

5.0 MATERIAL Y METODOS.

5.1 Material

Tubos de ensaye

Pipetas volumétricas

Mecheros de buns

Propipetas

Cajas de petri estériles

Termómetro

Garrafón de vidrio de 20 L

Puntillas estériles

Micropipetas de 1000 mcl, 500 mcl, 100 mcl, 10 mcl

Gasas estériles

Tapones de algodón

Matraz erlenmeyer de 1 L

Autoclave

Gradillas

Cronometro

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Vacuna liofilizada oral de *Salmonella choleraesuis*.

5.3 REACTIVOS

Etanol al 70 %

Solución estéril PBS (Solución amortiguadora de fosfatos).

Diluyente diluvac forte (diluyente lechoso)

Diluyente Blue shadow (diluyente azul)

Medio de cultivo AST, BHI.

Bioquímicas primarias:

Gram (cristal violeta, lugol, alcohol-acetona 1-1, safranina)

Catalasa (peroxido de hidrogeno)

Bioquímicas secundarias:

Medios sólidos (citratos, triple azúcar hierro (TSI).)

Medios semisólidos (MIO, SIM.)

Medios líquidos (urea, nitratos, MR-VP.)

6.0 METODOS

6.1 Obtención de título de vacuna por medio de 2 diferentes diluyentes

6.1.1 Diluyente azul

- Se utilizan vacunas vivas avirulentas de *Salmonella choleraesuis* orales de forma liofilizada, provenientes de el laboratorio interesado con el fin de prevenir la Salmonelosis, por *Salmonella choleraesuis* y control para *Salmonella typhimurium*.
- Se verifican la fecha de caducidad de las vacunas y de los diluyentes (diluyente azul y diluyente lechoso) de uso veterinario para la reconstitución de vacunas liofilizadas.
- Reconstituir el liofilizado de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* (cada vacuna contiene 100 dosis) en 100 ml de diluyente azul y homogenizar. (10^0 UFC)
- Tomar 500 μ l de la vacuna liofilizada y llevarlos a un volumen de 5 ml con solución de fosfatos amortiguada (PBS) estéril.
- Preparar sistemas con diluciones de 10^{-1} - 10^{-10} de la vacuna reconstituida, con una solución de fosfatos amortiguada estéril (PBS).(como se muestra en el esquema 1)
- Sembrar en el medio de cultivo Agar de soya y tripticaseina (AST) las diluciones por gota (3 gotas de 10 μ l en un cuadrante del medio de cultivo) por duplicado. En otro medio AST variar la técnica de sembrado y sembrar por estría (30 μ l/por asa) cada una de las diluciones por duplicado.
- Cada sistema se prepara en un periodo de 30 minutos desde el tiempo 0 y llegando a un tiempo de 2 horas, a cada sistema se le toma la temperatura.
- Las cajas sembradas por estría y por gota se dejan incubando 24 horas a 37 ° C.
- Tomar las lecturas y obtener los títulos de la vacuna en los diferentes sistemas.
- Analizar resultados y compararlos con los resultados del diluyente lechoso.
- El esquema se muestra en la Fig. No 1.

6.1.2 Diluyente lechoso

- Se utilizan vacunas vivas avirulentas de *Salmonella choleraesuis* orales de forma liofilizada, provenientes del laboratorio interesado, con el fin de prevenir la Salmonelosis, por *Salmonella choleraesuis* y control para *Salmonella typhimurium*.
- Se verifican la fecha de caducidad de las vacunas y de los diluyentes, (del diluyente azul y del lechoso) de uso veterinario para la reconstitución de vacunas liofilizadas.
- Reconstituir el liofilizado de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* en 100 ml de diluyente lechoso y homogenizar.(10^0 UFC)
- Diluir 500 μ l de la vacuna liofilizada en 4.5 ml de PBS llevándola a un volumen de 5ml y creando una serie de diluciones de 10^{-1} – 10^{-10} mililitros con solución de fosfatos amortiguada (PBS).

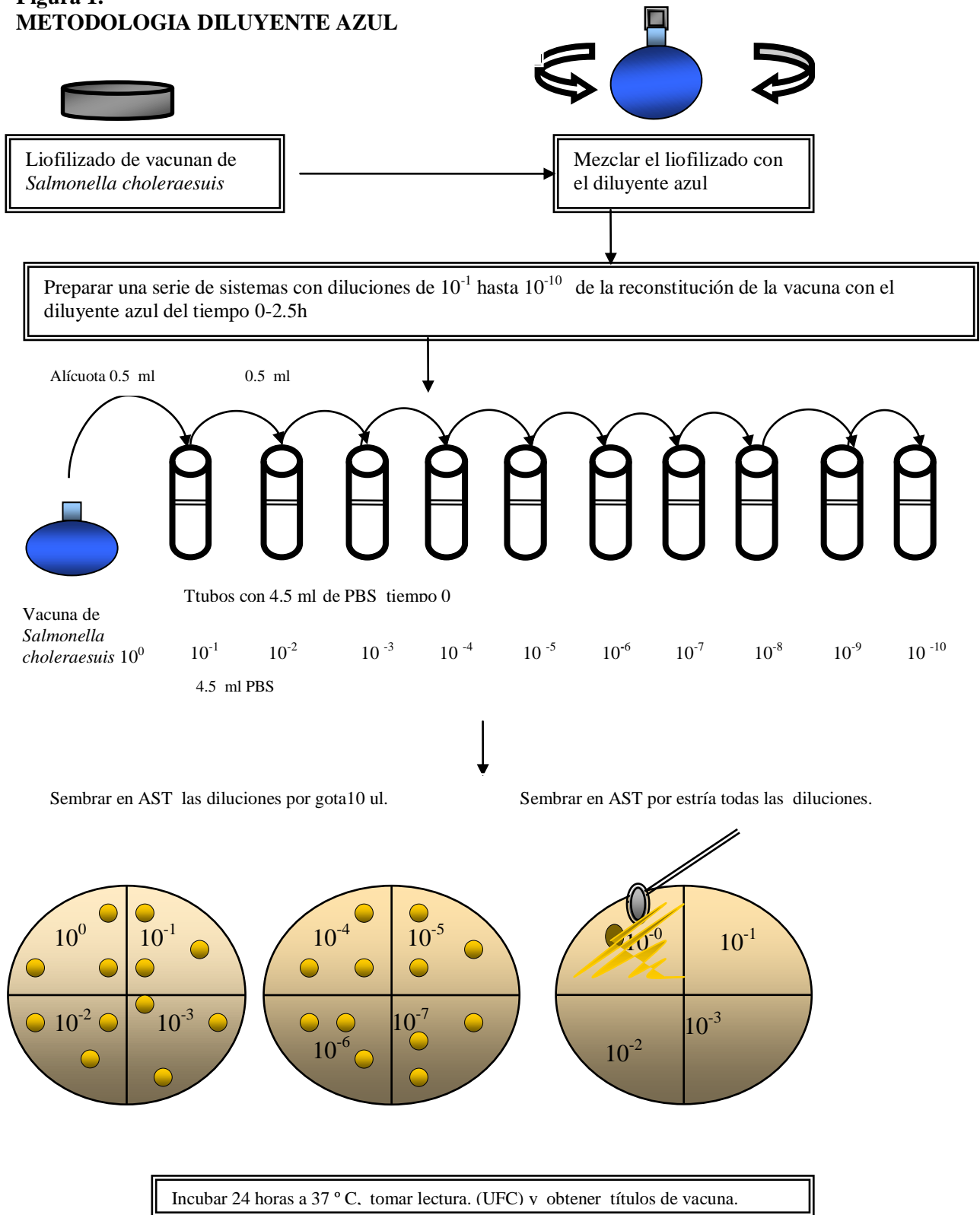
- Preparar sistemas de la vacuna reconstituida con una solución de fosfatos amortiguada estéril (PBS) cada 30 minutos.
- Sembrar en el medio de cultivo Agar de soya y tripticaseina (AST) las diluciones de los sistemas por gota (3 gotas de 10 μ l en un cuadrante del medio de cultivo) por duplicado. En otro medio Agar de soya y tripticaseina (AST) variar la técnica de sembrado y sembrar por estría (30 μ l por asa) cada dilución por duplicado.
- Cada sistema se evalúa en un periodo de 30 minutos llegando a un tiempo de 2 horas, a cada sistema se le toma la temperatura.
- Las cajas sembradas por estría y por gota se dejan incubando 24 horas a 37 ° C.
- Tomar las lecturas y obtiene los títulos de la vacuna en los diferentes sistemas.
- Analizar resultados y compararlos con los resultados del diluyente azul A).
- El esquema se muestra en la fig. No 2

6.1.3 Obtención de título de vacuna aplicada a bebederos utilizando agua destilada, simulando condiciones de vacunación de granja, usando el diluyente azul.

- Se evalúan vacunas vivas avirulentas de *Salmonella choleraesuis* orales de forma liofilizada, provenientes del laboratorio interesado, con el fin de prevenir la Salmonelosis, por *Salmonella choleraesuis* y control para *Salmonella typhimurium*.
- Se verifican la fecha de caducidad de las vacunas y del diluyente azul.
- Reconstituir el liofilizado de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* (cada vacuna cuenta con 100 dosis) en 100 ml de diluyente azul y homogenizar.
- La vacuna homogenizada se lleva a un volumen de 20 L de agua destilada simulando un bebedero de una granja y manteniendo la temperatura a 25 °C que es la temperatura a la que se recomienda mantener la vacuna para su aplicación. (los lechones deben de tomar como mínimo 200 ml de agua para proporcionar la cantidad de microorganismo que necesita ingerir para proporcionar la inmunidad)
- Homogenizar la vacuna solo una vez, en todo el tiempo que se lleve acabo el estudio y mantener el garrafón hacia arriba sin medir las distancias entre la superficie intermedio y fondo del garrafón, con la finalidad de tomar muestras a los mismos tiempos de la superficie, intermedio y fondo del garrafón.
- Tomar alícuotas de 500 μ l de muestra del garrafón de la superficie intermedio y fondo a los mismos tiempos.
- Llevar las alícuotas de 500 μ l de la superficie a tubos de 4.5 ml de PBS se realiza un sistema de diluciones 10^{-1} - 10^{-10} .

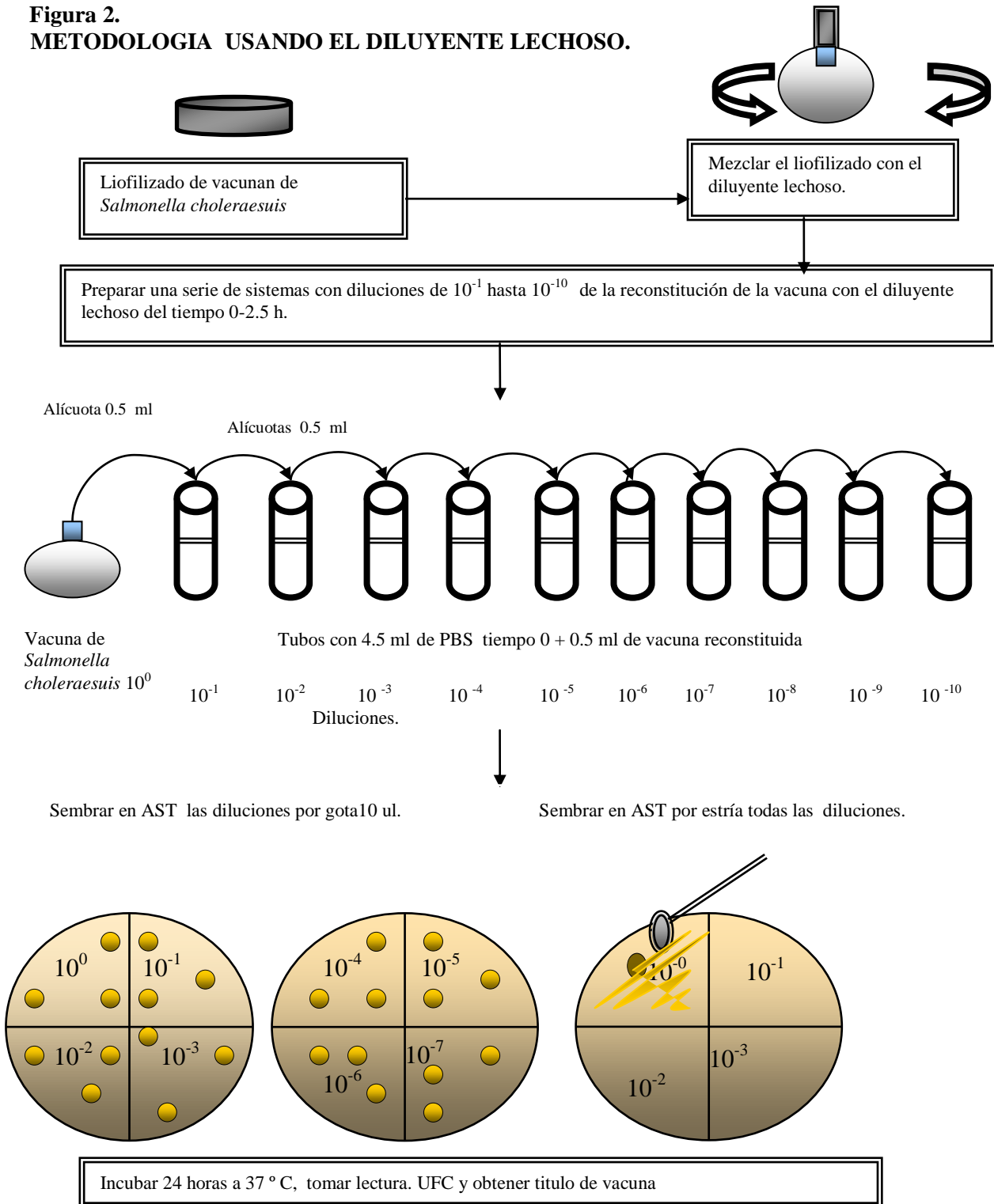
- Dividir los medios de cultivo en 4 cuadrantes y sembrar las diluciones de los sistemas en Agar de soya y tripticaseina (AST) por gota (3 gotas de 10 μ l por cada dilución en un cuadrante del medio de cultivo) y por estría (sembrar por asa 30 μ l por cada dilución en un cuadrante del medio de cultivo).
- Repetir el mismo procedimiento para todos los tiempos (6 horas). Los sistemas se preparan cada 30 minutos y uno a las 24 horas de la superficie intermedio y fondo del garrafón
- Para obtener los títulos tanto del medio del garrafón como del fondo del garrafón se realiza el procedimiento anterior.
- El esquema se muestra en la fig. No 3
- Analizar resultados y compararlos con los resultados de la metodología anterior

Figura 1.
METODOLOGIA DILUYENTE AZUL



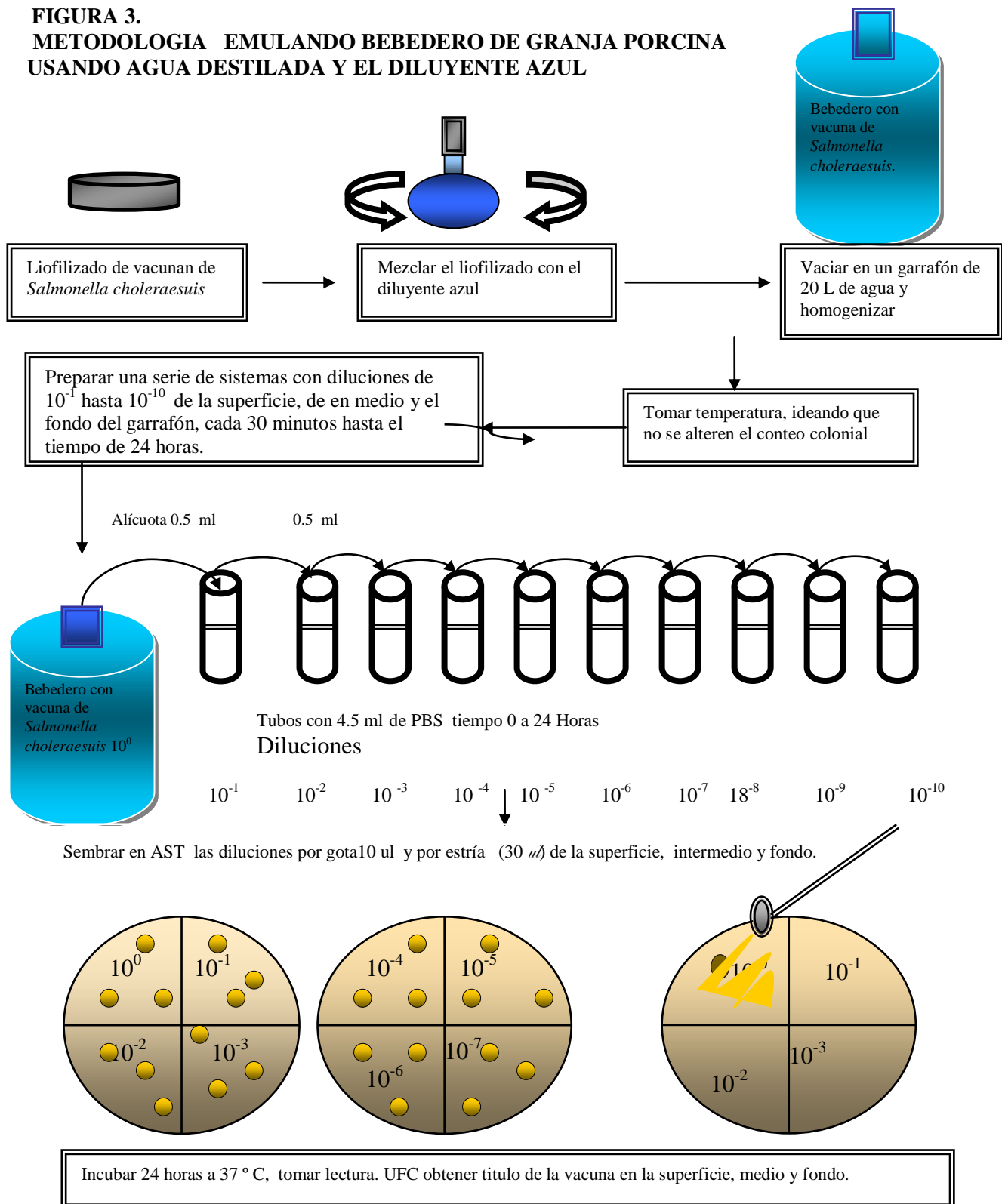
Esta figura No1. Nos indica como se obtuvieron los títulos de la bacteria viva avirulenta de *Salmonella choleraesuis* en el tiempo que duro la evaluación.

Figura 2.
METODOLOGIA USANDO EL DILUYENTE LECHOSO.



Este esquema No 2. Nos indica que el tratamiento que se le da a la vacuna con el diluyente lechoso es el mismo que se le da la diluyente azul, ambos modifican la técnica de sembrado en AST por estría y por gota en ambos diluyentes.

FIGURA 3.
METODOLOGIA EMULANDO BEBEDERO DE GRANJA PORCINA
USANDO AGUA DESTILADA Y EL DILUYENTE AZUL



El esquema No 3. Nos indica como se obtuvieron los títulos de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* al usar el diluyente azul, en el presente estudio, emulando las condiciones de una granja porcina.

7.0 RESULTADOS

7.1 Diluyente lechoso.

Títulos de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente lechoso y sembrando por estria primer muestreo.

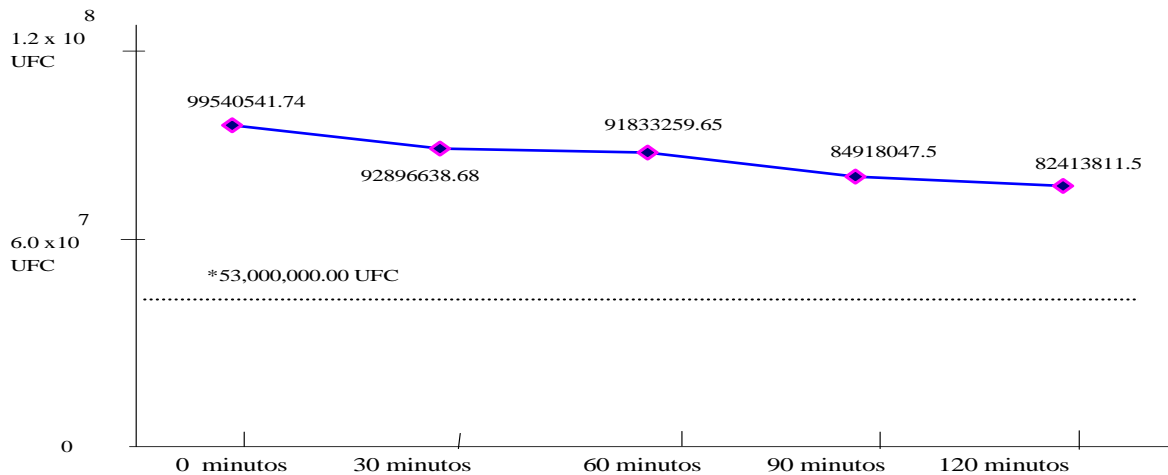


Grafico No. 1. Nos indica el comportamiento de la vacuna al utilizar el diluyente lechoso. El tiempo que duro el experimento, nos indica que la vacuna es estable en este lapso de tiempo. Debido a que los títulos se encuentran por arriba del título mínimo protector.

Porcentaje de la bacteria viva avirulenta, utilizando el diluyente lechoso primer muestreo y sembrando por estria.

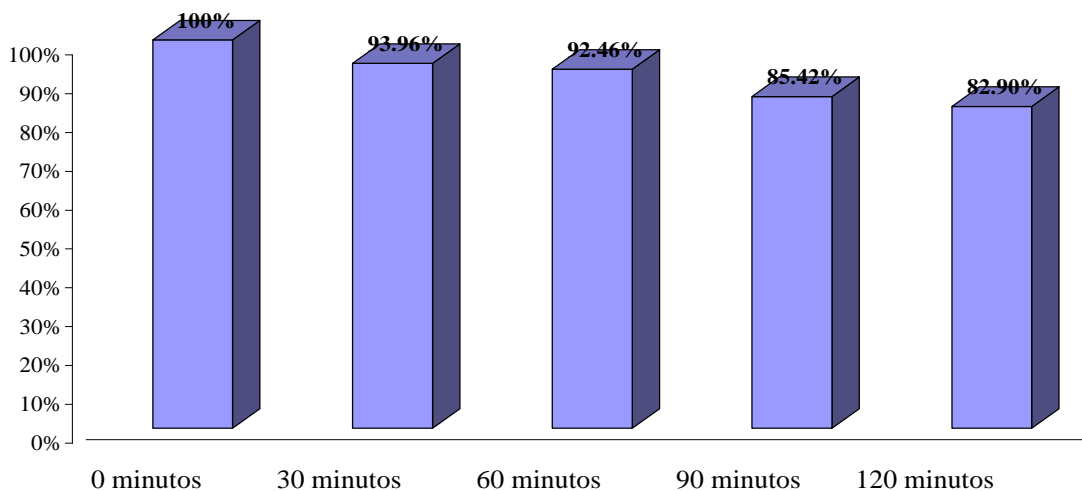


Grafico No 2 proporciona los valores en porcentaje de la viabilidad de la vacuna en el lapso de tiempo en que duro la prueba.

Títulos de la bacteria viva avirulenta usando el diluyente lechoso y sembrando por estria segundo muestreo.

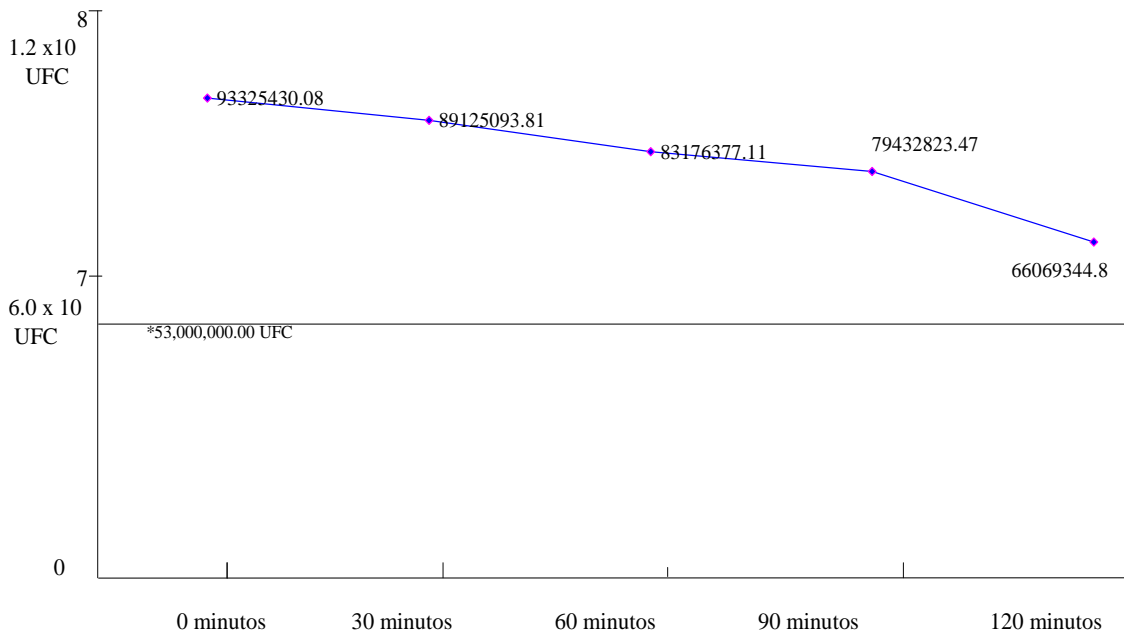


Grafico No-3. Este grafico nos indica el comportamiento de la vacuna al graficar los títulos obtenidos contra el tiempo en que se realizo el estudio mencionado, los títulos se encuentran por arriba del titulo mínimo inmunizante propuesto por el laboratorio interesado.

Porcentaje de la bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente lechoso en el segundo muestreo sembrando por estria.

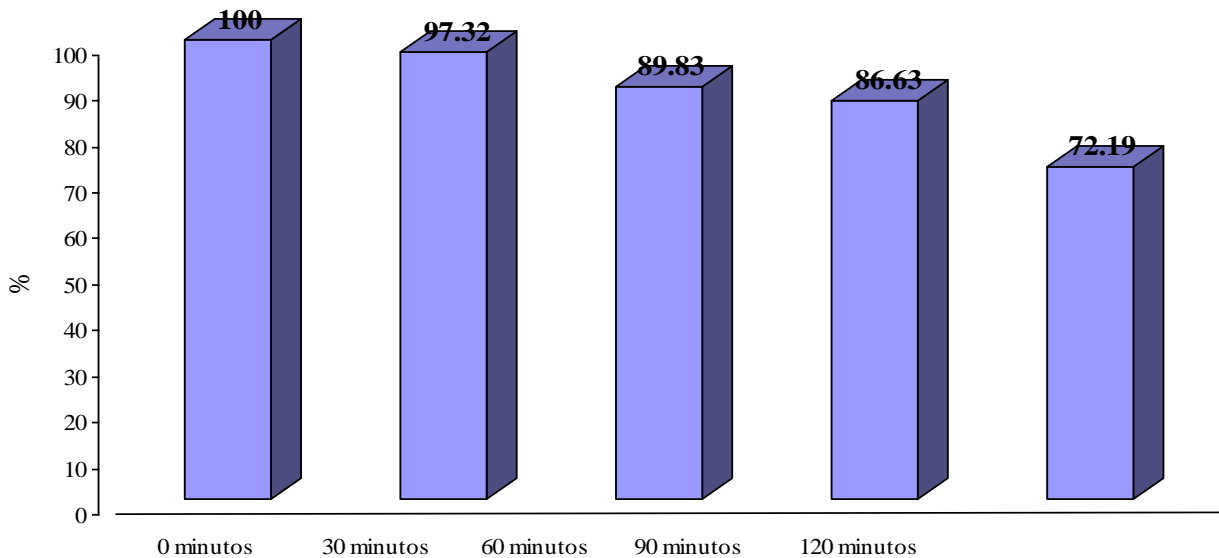


Grafico No 4.- Muestra el porcentaje de bacteria viva avirulenta presente en los diferentes tiempos a los que se realizo el estudio, descendiendo el porcentaje de forma notable al tiempo de 120 minutos.

Títulos de la bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente lechoso sembrando por gota primer muestreo.

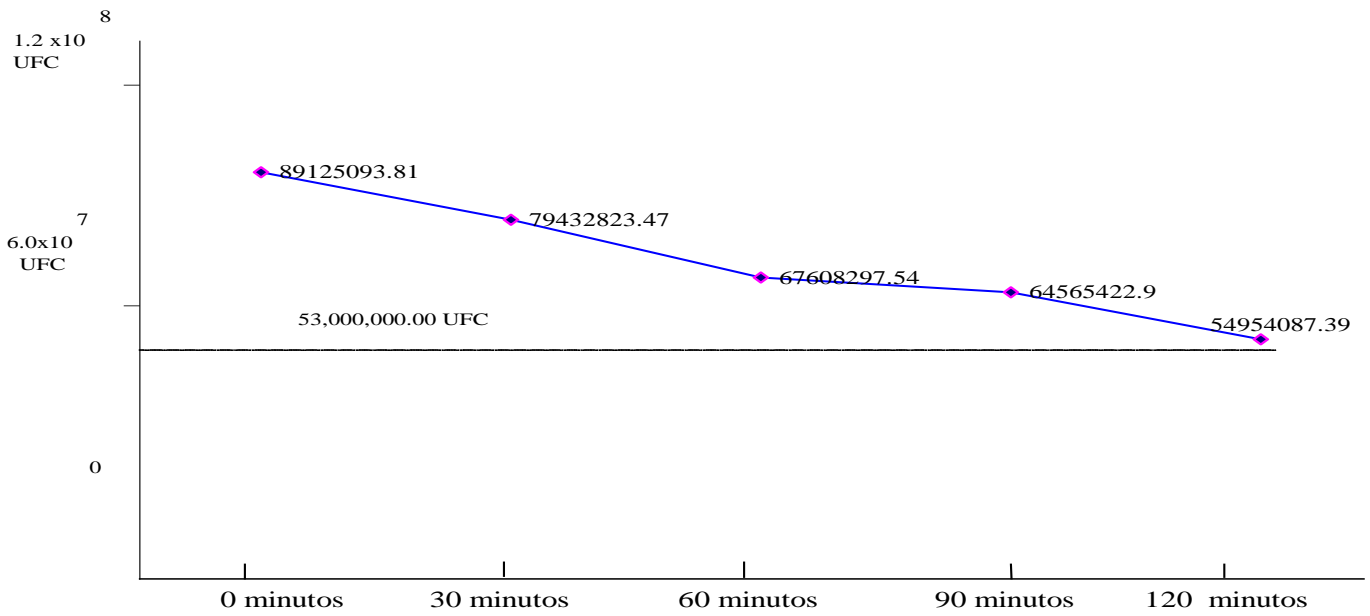


Grafico No 5. Muestra los resultados de los títulos en donde la vacuna demostró ser estable al utilizar el diluyente lechoso como la difusión en placa. La vacuna tiene un comportamiento lineal.

Porcentaje de la bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente lechoso sembrado por gota en primer muestreo.

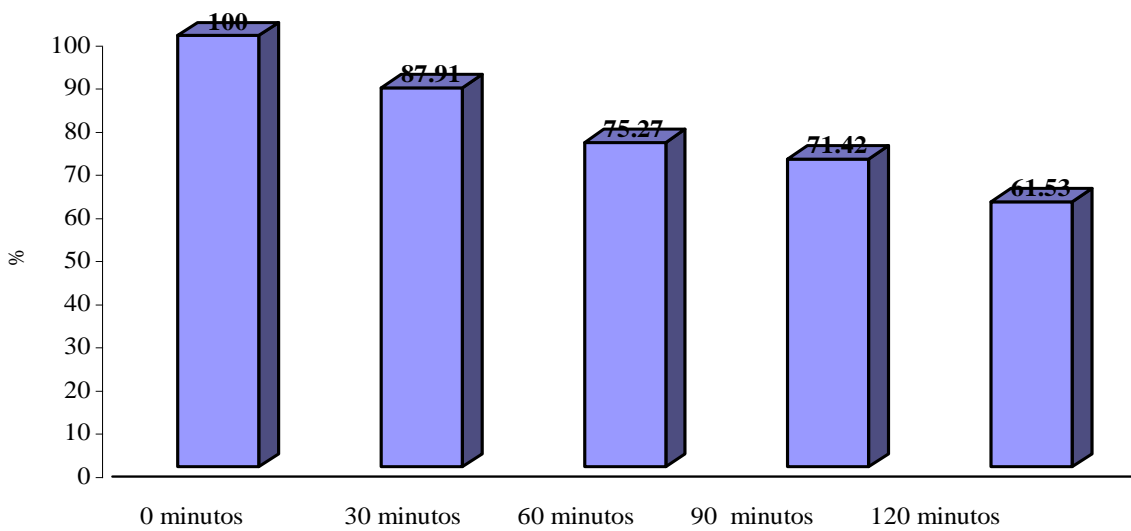


Grafico No 6 Muestra los valores en porcentaje a los cuales la bacteria viva avirulenta se encuentra viable y estable.

Títulos de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente lechoso y sembrado por gota segundo muestreo.

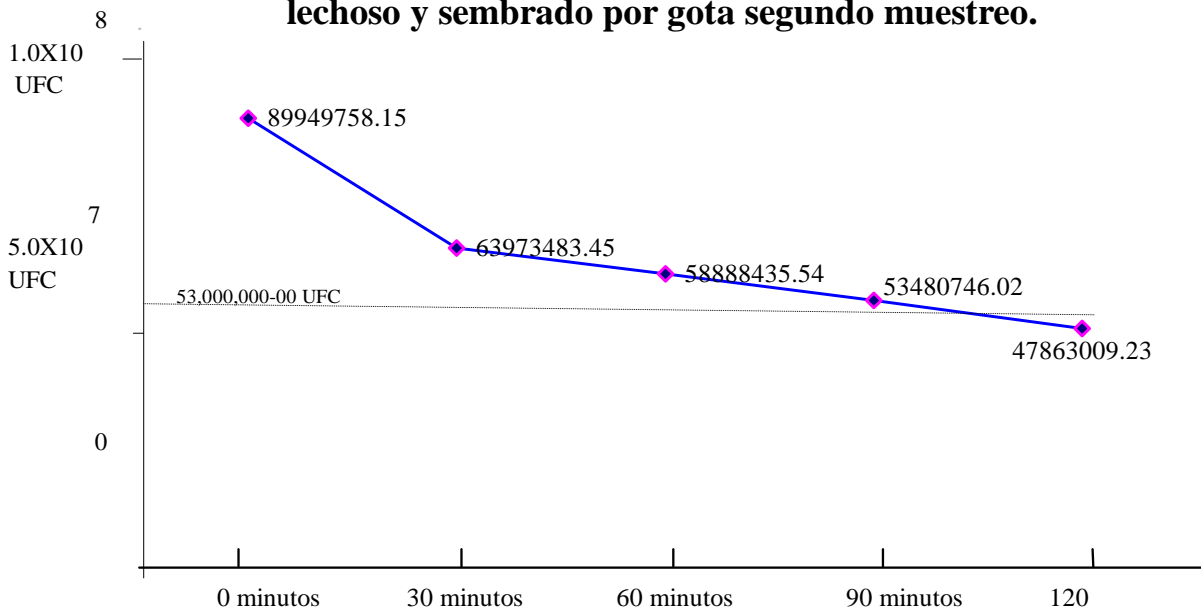


Grafico No 7. Muestra la caída del título de la vacuna por debajo del título mínimo protector al tiempo de 120 minutos .

Porcentaje de la bacteria viva avirulenta con el diluyente lechoso utilizando la tecnica de siembra en gota segundo muestreo.

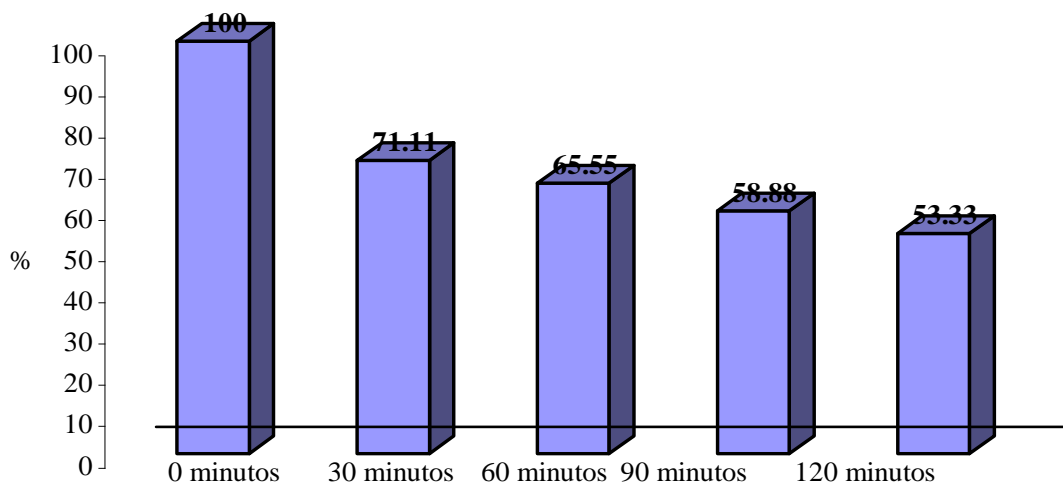


Grafico No 8. Este grafico nos indica una caída del porcentaje de la bacteria viva avirulenta en el último puntote un 42%.

7.2 RESULTADOS USANDO EL DILUYENTE AZUL

Títulos de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrando por estria primer muestreo.

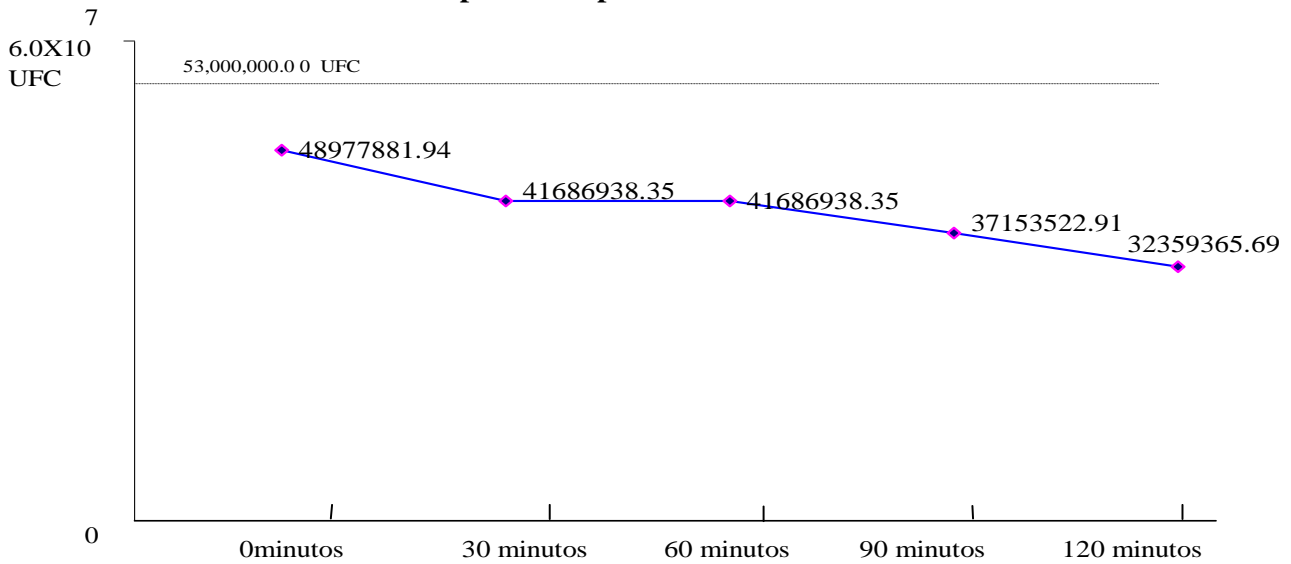


Grafico No 9 La grafica nos indica como los títulos caen por debajo del titulo mínimo protector en el tiempo que duro el experimento, inclusive no se logra alcanzar el titulo deseado.* 53000000 ($10^{7.3}$)

Porcentaje de la bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrando por estria primer muestreo.

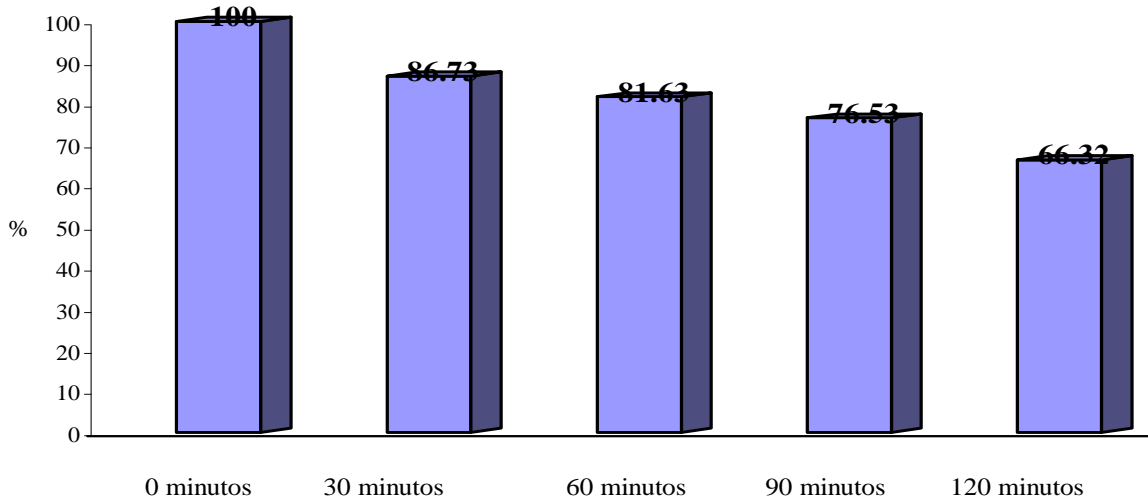


Grafico No 10.-En este polígono de frecuencia podemos ver el porcentaje de la bacteria viva avirulenta en cuanto va pasando el tiempo se observa una disminución notable en la viabilidad de la vacuna..

Títulos de la bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrando por estria segundo muestreo.

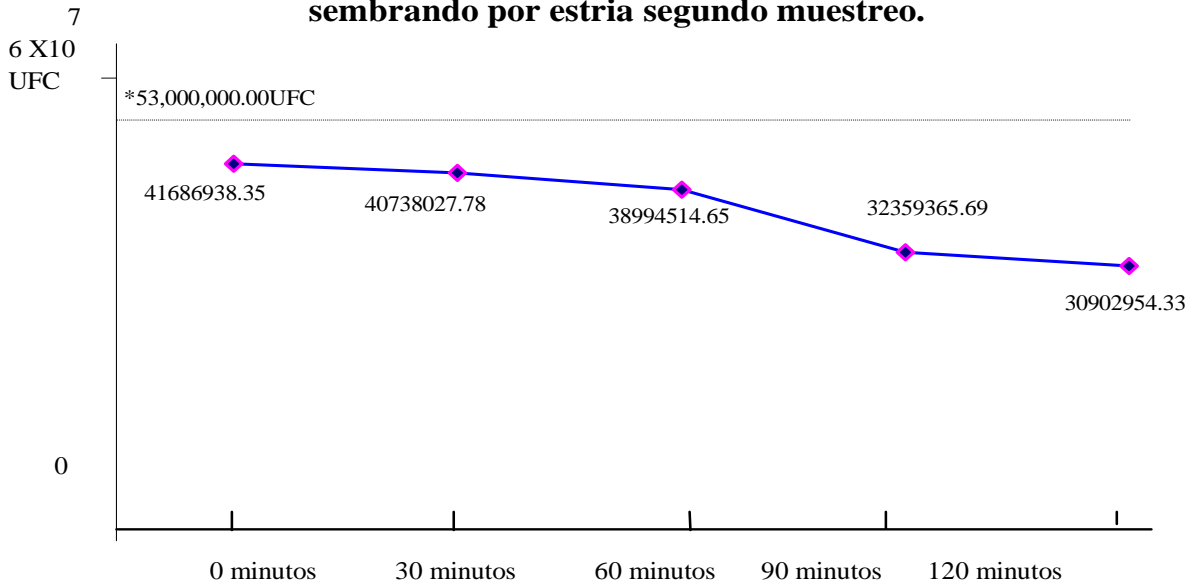


Grafico No 11. Los títulos se encuentran por debajo del titulo mínimo protector., ya que el titulo que se necesita para aplicar la vacuna es de 53,000,000.00 UFC /ml

Porcentaje de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrando por estria segundo muestreo.

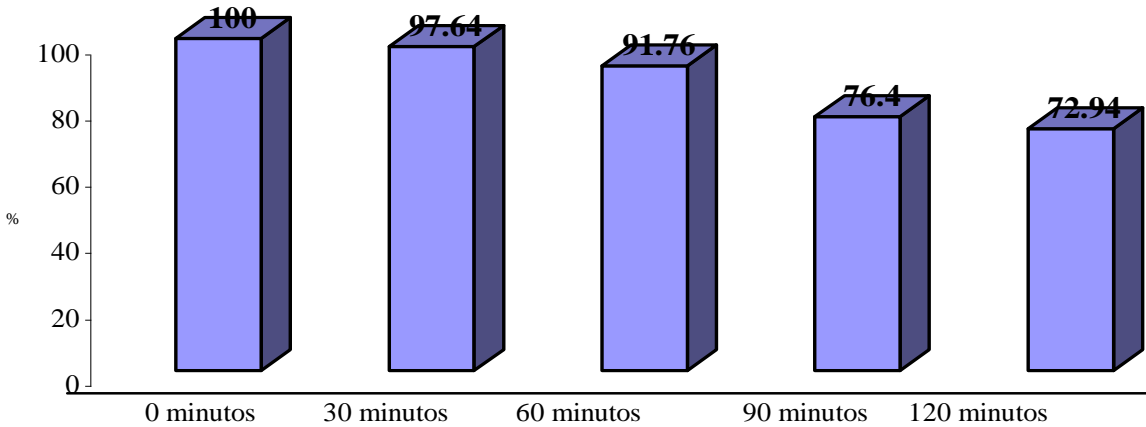


Grafico No 12. Este grafico muestra los porcentajes de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* al ir aumentando el tiempo de la vacunación, por consiguiente la vacuna no llego al titulo deseado para lograr la inmunidad que se espera..

Títulos de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrando por difusion en placa primer muestreo.

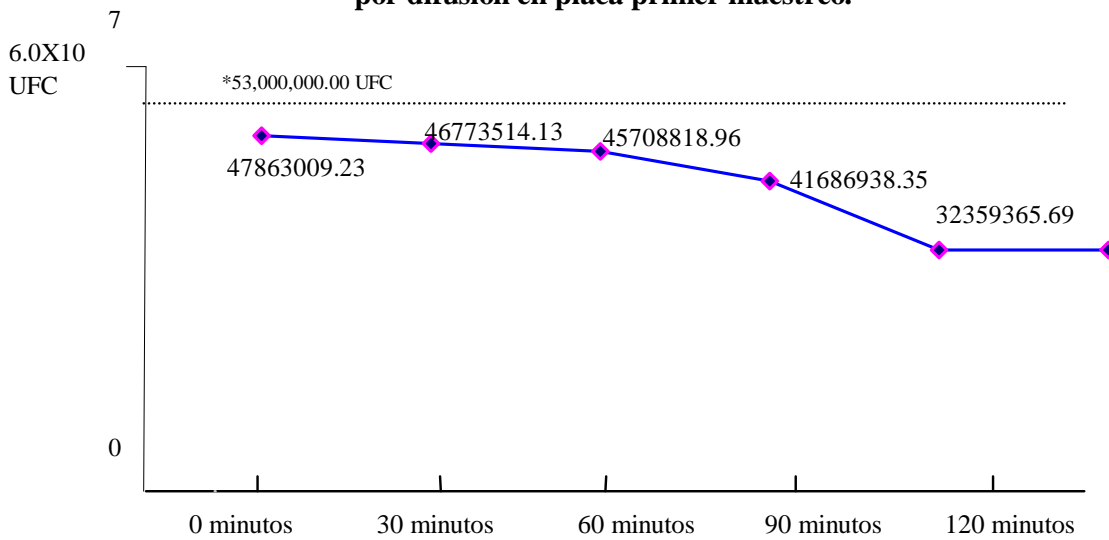


Grafico No 13. Muestra los títulos a los diferentes tiempos que duro el experimento, los títulos caen por debajo del titulo mínimo inmunizante.

Porcentaje de la bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrado por gota primer muestreo.

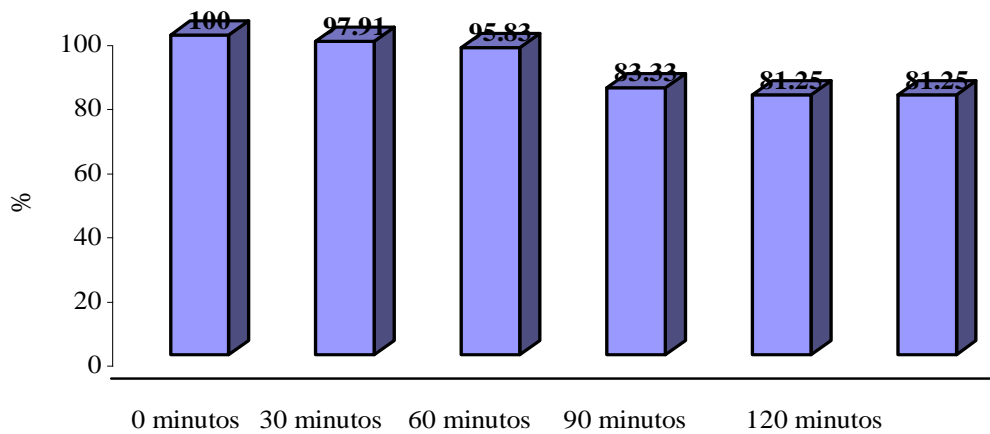


Grafico No 14. Este grafico indica como va decayendo la bacteria en el transcurso que pasa el tiempo. Es mejor la técnica de sembrado en gota al usar el diluyente azul

Títulos de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul, sembrando por gota segundo muestreo.

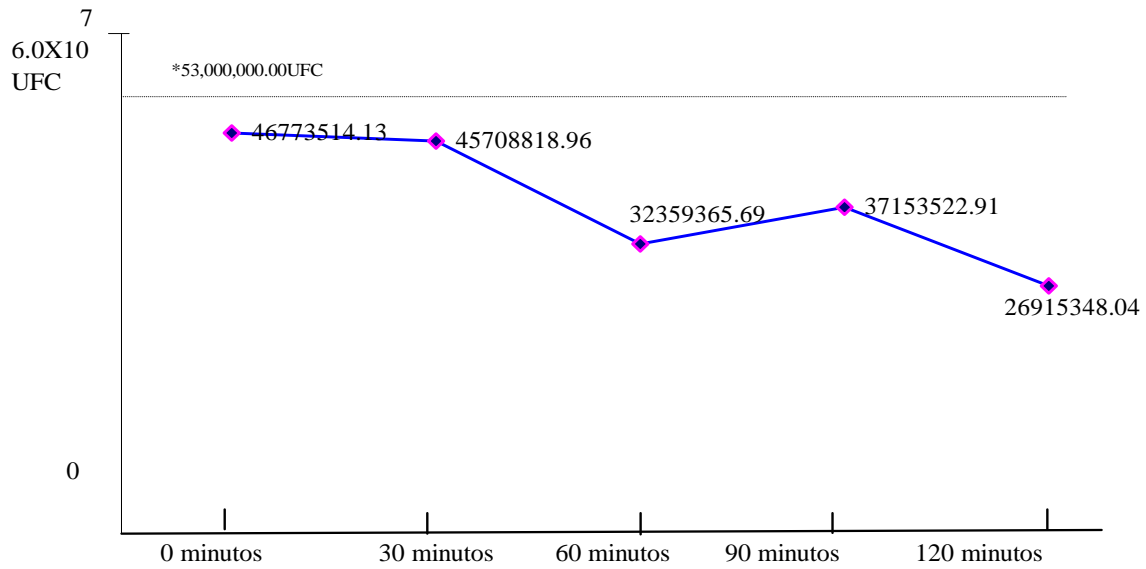


Grafico No 15. Valores abajo del titulo mínimo protector de la vacuna de *salmonella choleraesuis*

Porcentaje de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrando por gota, segundo muestreo.

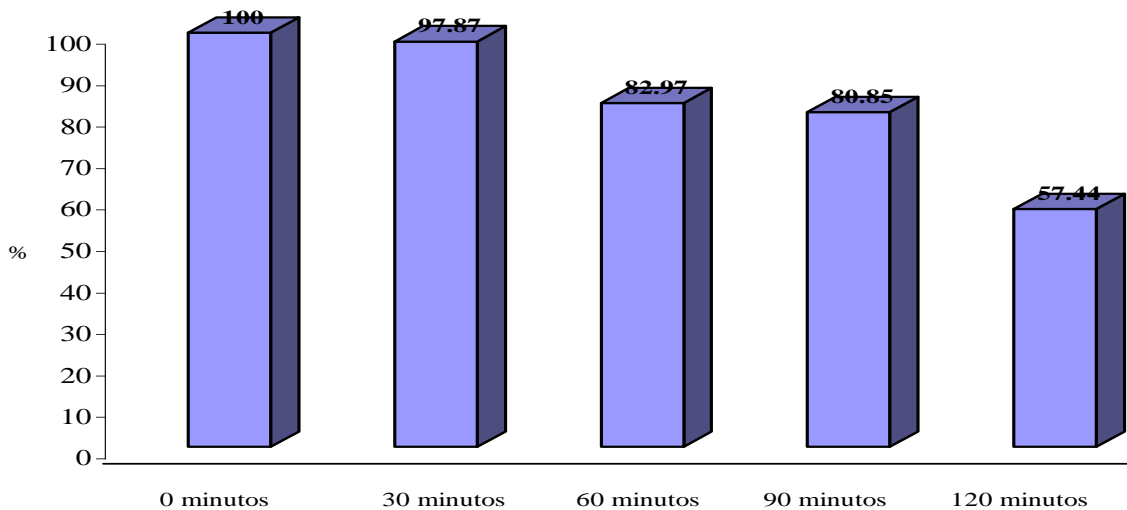


Grafico No 16. Muestra valores del porcentaje que alcanzaron los títulos de la vacuna en los diferentes tiempos que duro el experimento. Y como es que hay un porcentaje menor al que se espera alcanzar en el tiempo que duro la evaluación ya que cae 42% .

7.3 RESULTADOS DE GARRAFON UTILIZANDO EL DILUYENTE AZUL.

Títulos de bacteria viva avirulenta en la superficie del garrafon, utilizando el diluyente azul y sembrando por estria.

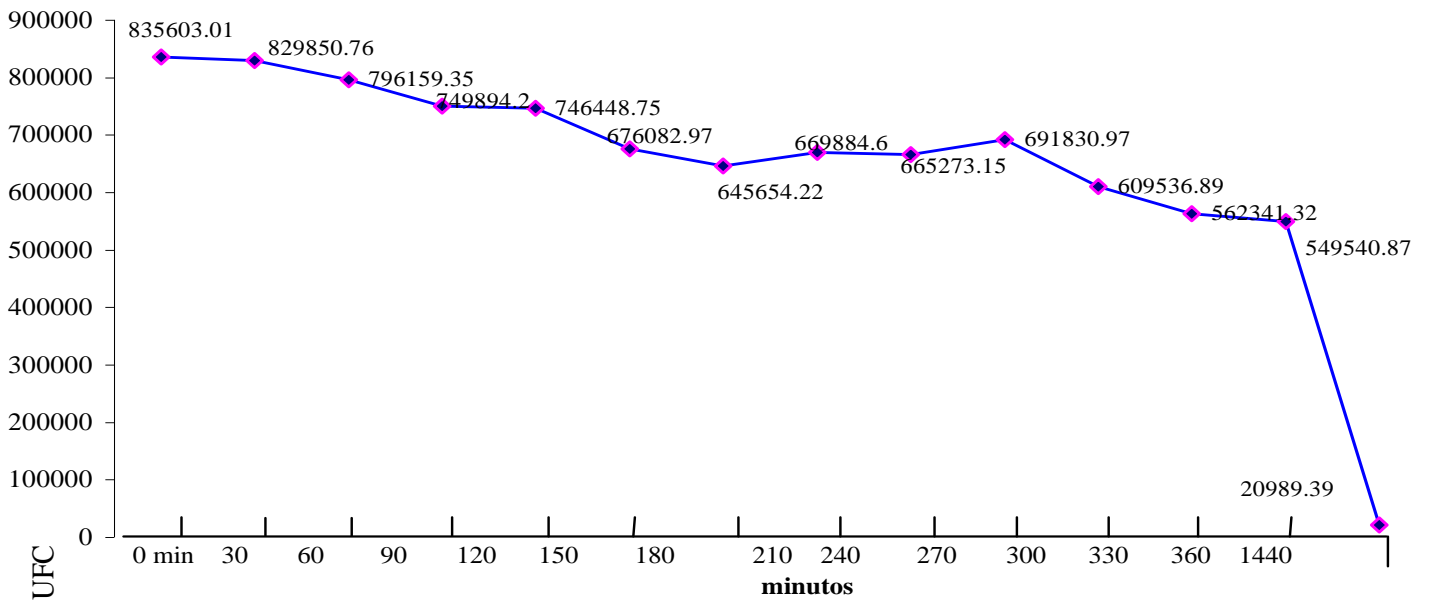


Grafico No 17. El titulo de la vacuna como es de esperarse cae dos logaritmos debido a que se disolvió en 20 L de agua destilada

Porcentaje de bacteria viva avirulenta utilizando el diluyente azul sembrando por estria

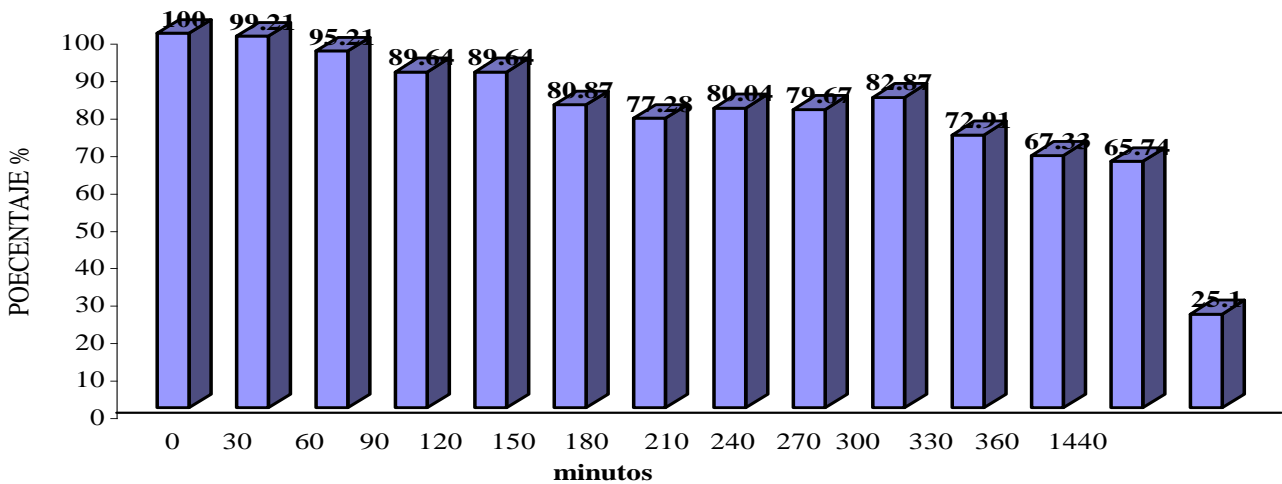


Grafico #18. El porcentaje que presenta la vacuna en el lapso que duro el experimento demuestra que la vacuna mantiene una estabilidad deseada para su propósito de inmunizar a los cerdos de una granja

Títulos de bacteria viva avirulenta en el intermedio del garrafon utilizando el diluyente azul y sembrando por estrria.

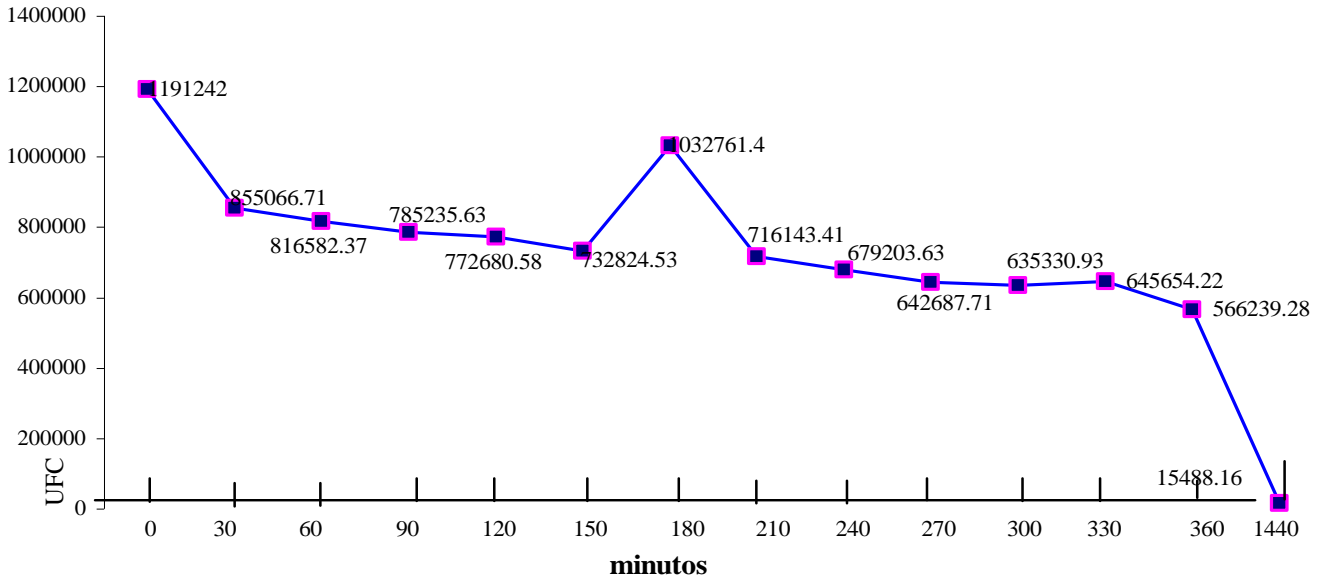


Grafico No 19. El tiempo en que se presenta la vacuna estable, es el esperado para lograr el efecto de inmunización.

Porcentaje de bacteria viva avirulenta en el intermedio del garrafon utilizando diluyente azul sembrando por estrria.

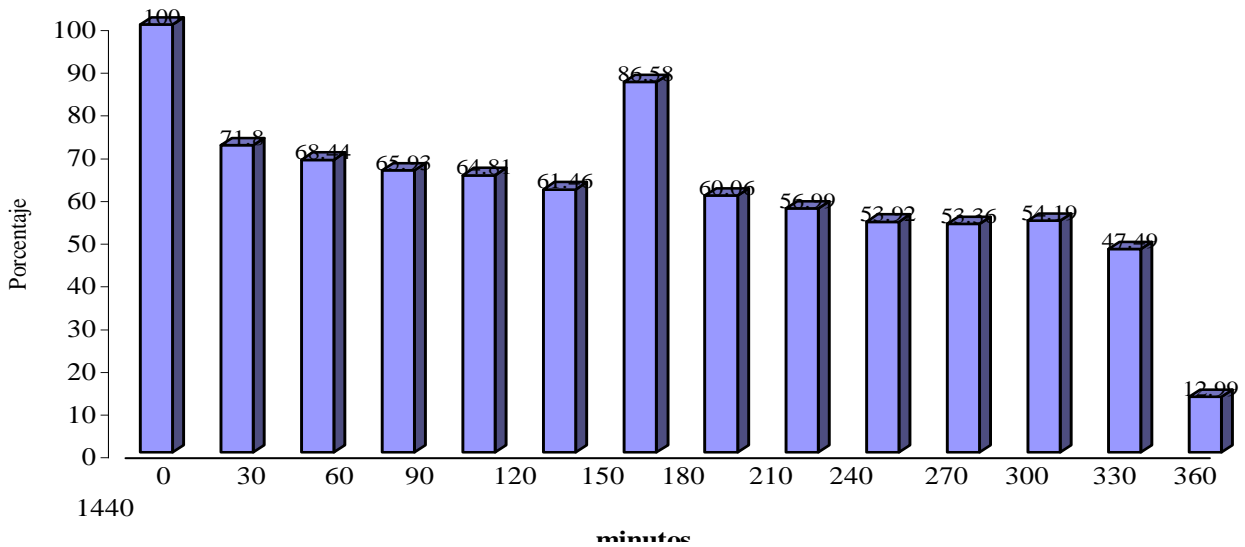


Grafico No 20. El porcentaje de la vacuna nos indica la presencia de microorganismo viable en el bebedero.

Títulos de bacteria viva avirulenta en el fondo del garrafon utilizando el diluyente azul y sembrando por estria.

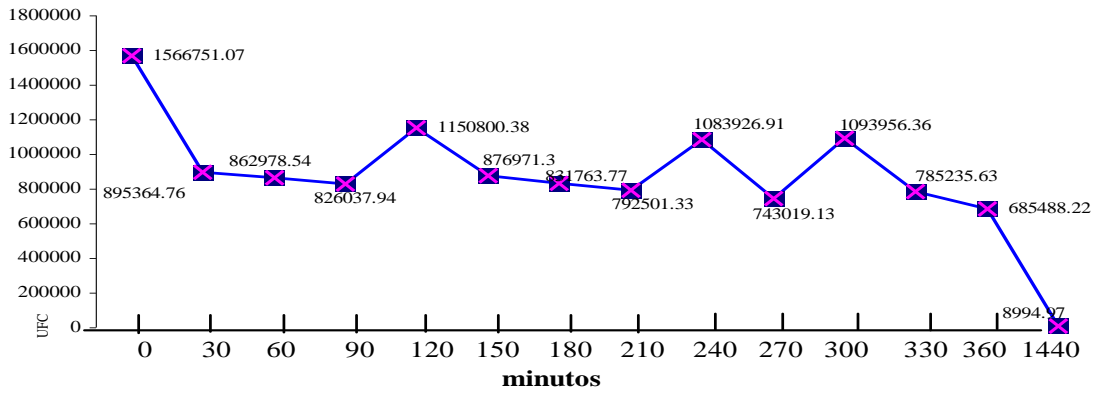


Grafico No 21. Se pueden ver que los valores de los títulos se mantienen constantes caen y suben los títulos constantemente .

Porcentaje bacteria viva avirulenta en el fondo del garrafon utilizando el diluyente azul y sembrando por estria.

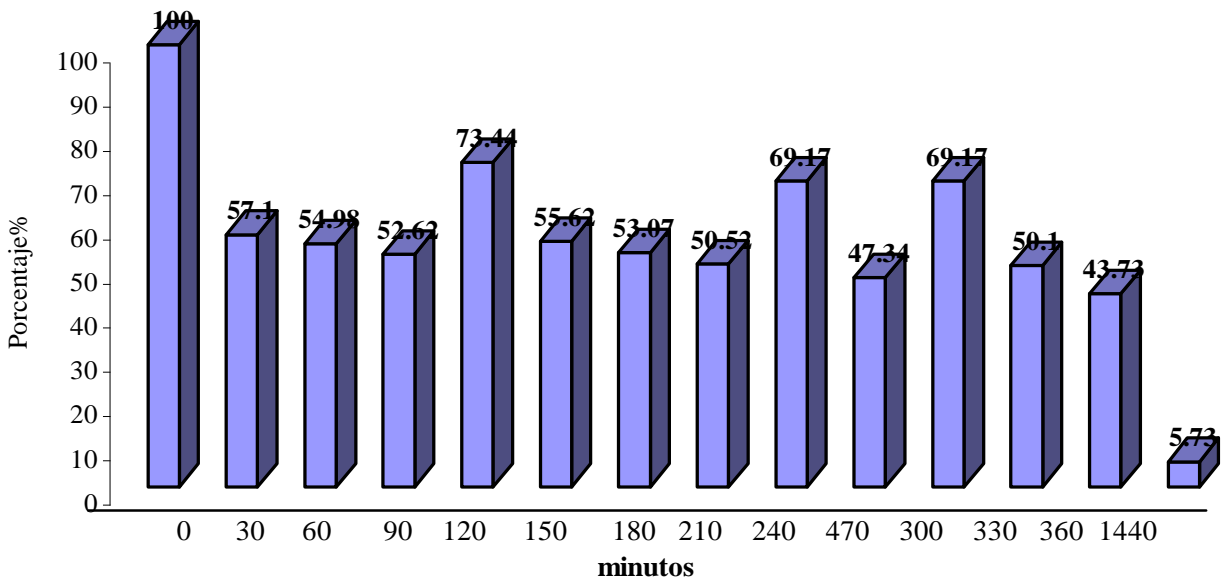


Grafico No 22. La variación de los porcentajes en una base 10 es muy variada ya que los títulos se encuentran arriba y decrecen al paso del tiempo mas no desaparece si no que sube nuevamente .

**Títulos de bacteria viva avirulenta de la superficie del garrafon
utilizando diluyente azul sembrando por gota.**

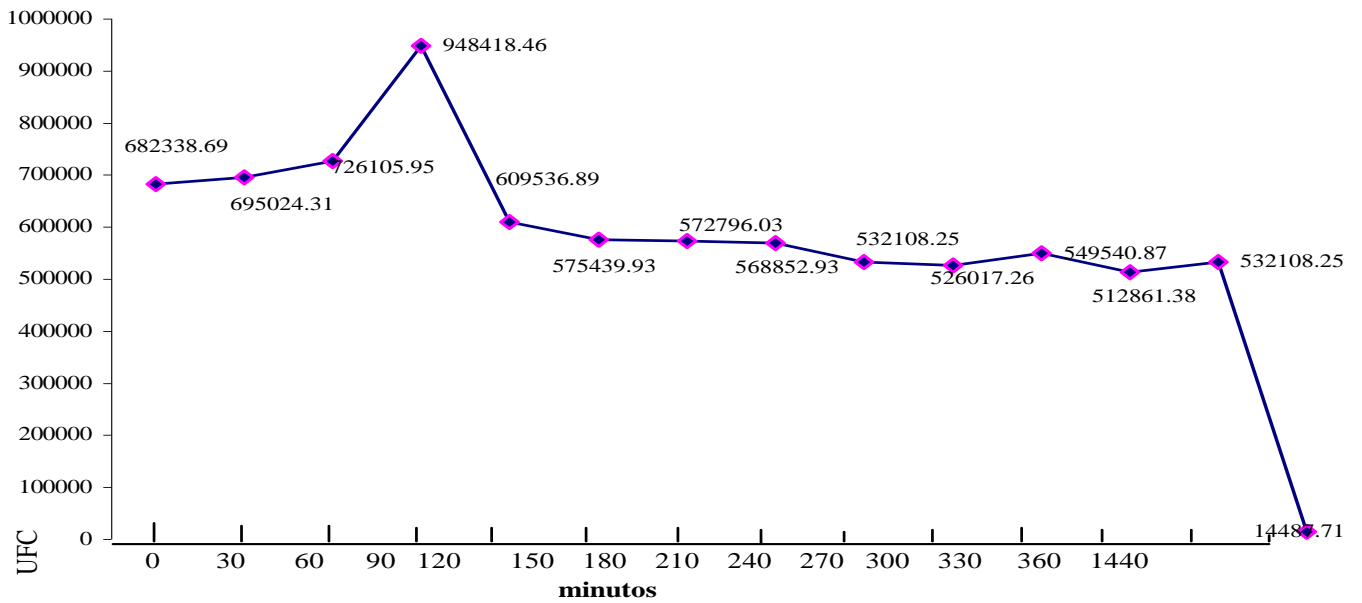


Grafico No 23. Se puede ver en el grafico que un valor se dispara mas sin embargo los demás siguen una línea recta y en el último punto de las 24 horas se puede ver una caída del titulo de la vacuna mas sin embargo no caen por debajo de los logaritmos sino que se mantiene en este mismo

**Porcentaje bacteria viva avirulenta en la superficie del garrafon
usando el diluyente azul y sembrando por gota.**

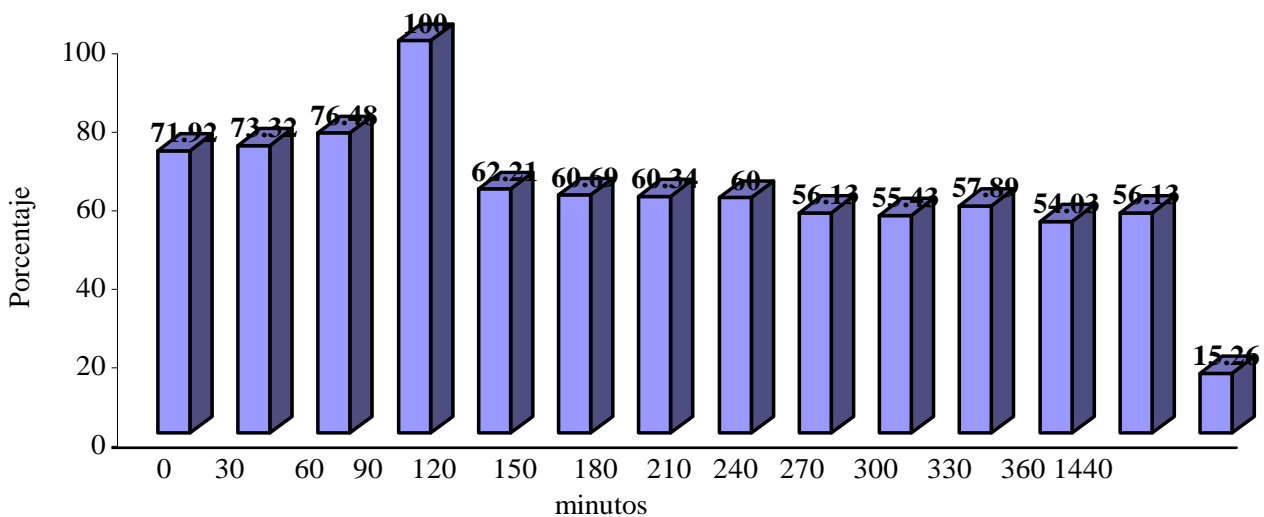


Grafico No 24. Los porcentajes nos indican que la vacuna se puede seguir utilizando en el lapso de tiempo propuesto.

Títulos de bacteria viva avirulenta del intermedio del garrafon utilizando el diluyente azul sembrando por gota.

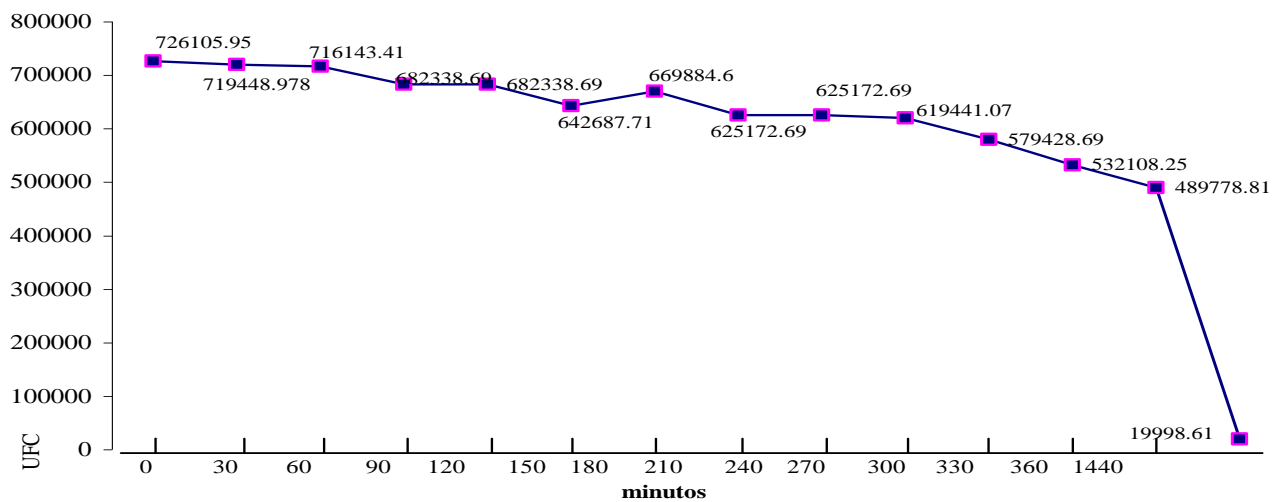


Grafico No 25. Se presenta un comportamiento lineal en este grafico.

Porcentaje de bacteria viva avirulenta presente en el intermedio del garrafon usando el diluyente azul sembrando por gota.

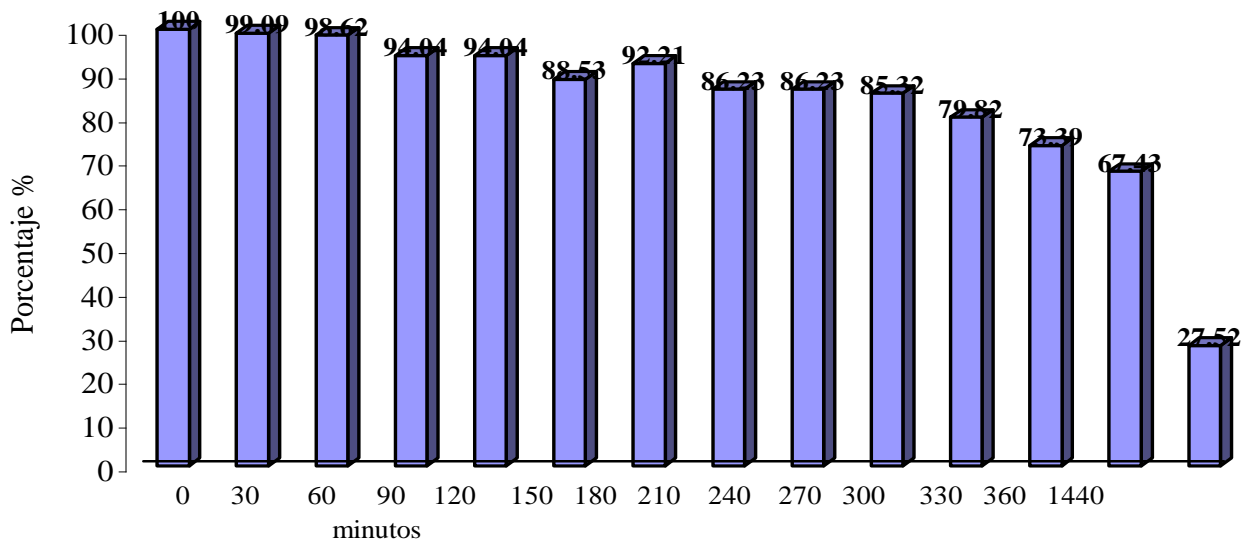


Grafico No 26. Nos proporciona información del porcentaje ve bacteria presente en el garrafón a los diferentes tiempos que se realizo el estudio.

Títulos de bacteria viva avirulenta del fondo del garrafon usando diluyente azul y sembrando por gota.

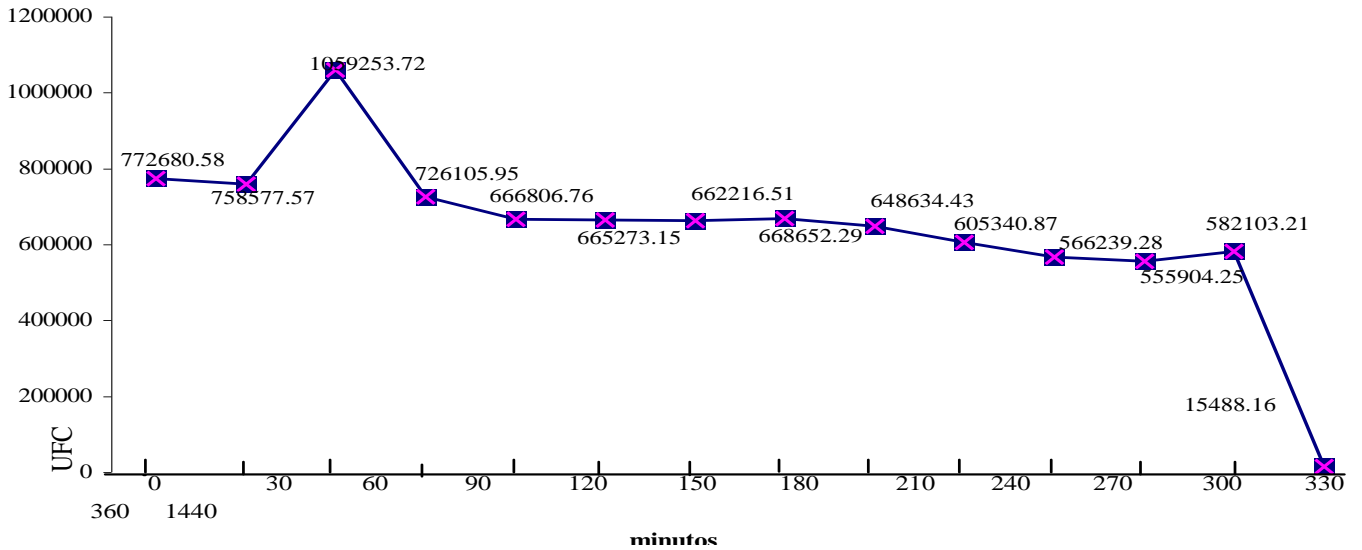


Grafico No 27. Aquí los títulos caen 2 logaritmos por debajo del mínimo protector sin embargo se mantiene estable la vacuna en este tiempo de prueba.

Porcentaje de bacteria viva avirulenta en el fondo del garrafon utilizando el diluyente azul y sembrando por gota.

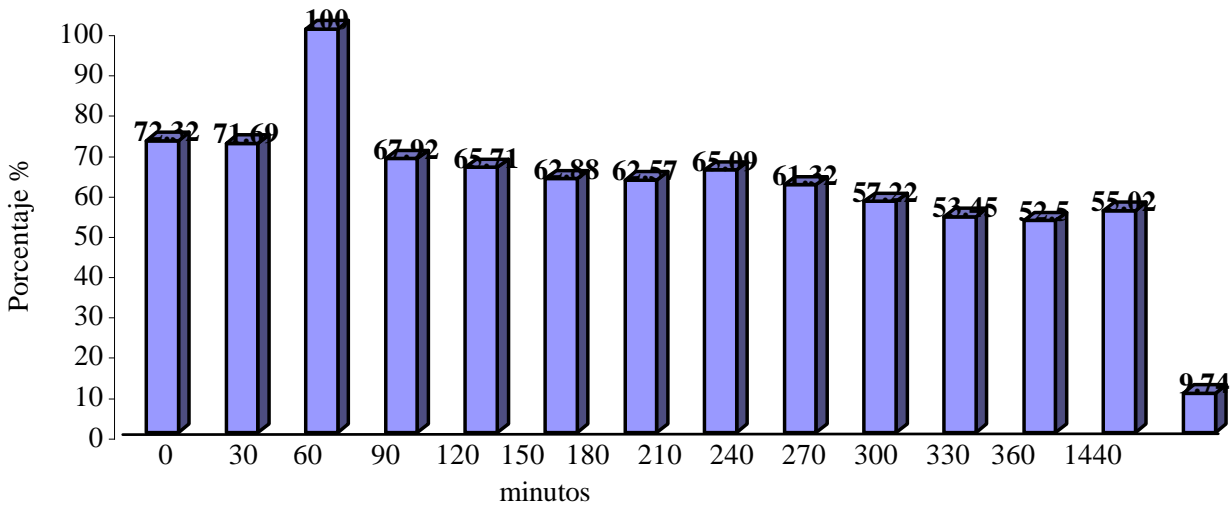


Grafico No 27. Esta grafica muestra como va disminuyendo el porcentaje a en los diferentes tiempos en los que se realizo el estudio, dándonos un indicio de cómo se comporta la vacuna en este lapso de tiempo.

GRAFICOS COMPARANDO LAS TECNICAS DE SEMBRADO DE CADA DILUYENTE.

Títulos de las diferentes trecnicas de sembrado usando el diluyente lechoso

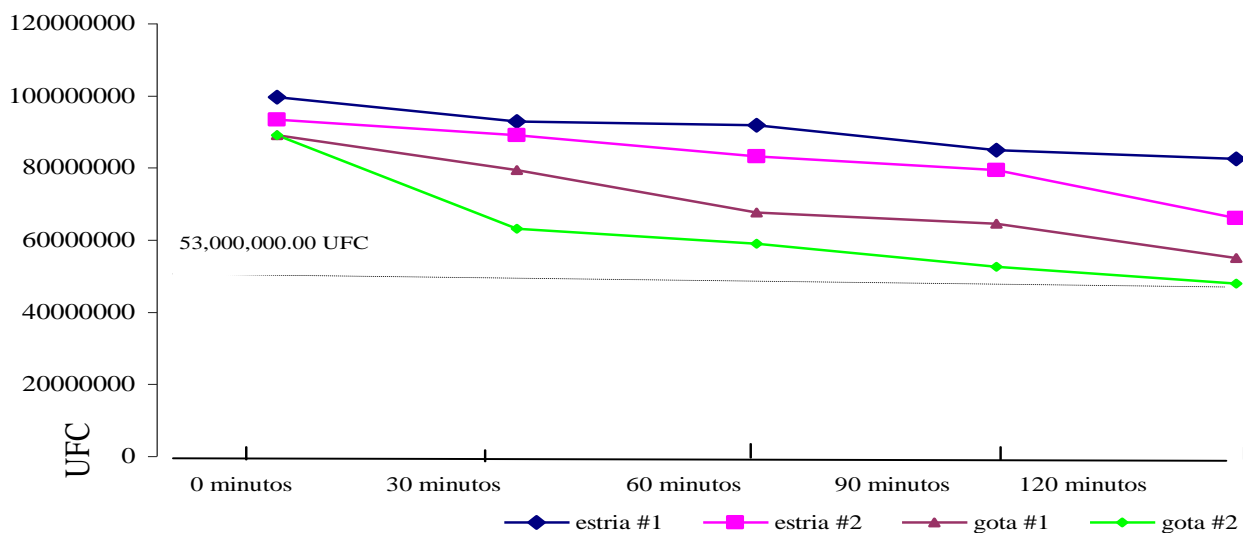


Grafico No 29. Podemos ver la diferencia de la variación en el sembrado con el diluyente lechoso, sin embargo se puede ver la linealidad de las diferentes graficas y además nos indican que el diluyente lechoso muestra mejores resultados al compararlo con el diluyente azul para la reconstitución de la vacuna

Títulos de Diferencia entre los metodos (estria y difucion en placa) usando el diluyente azul.

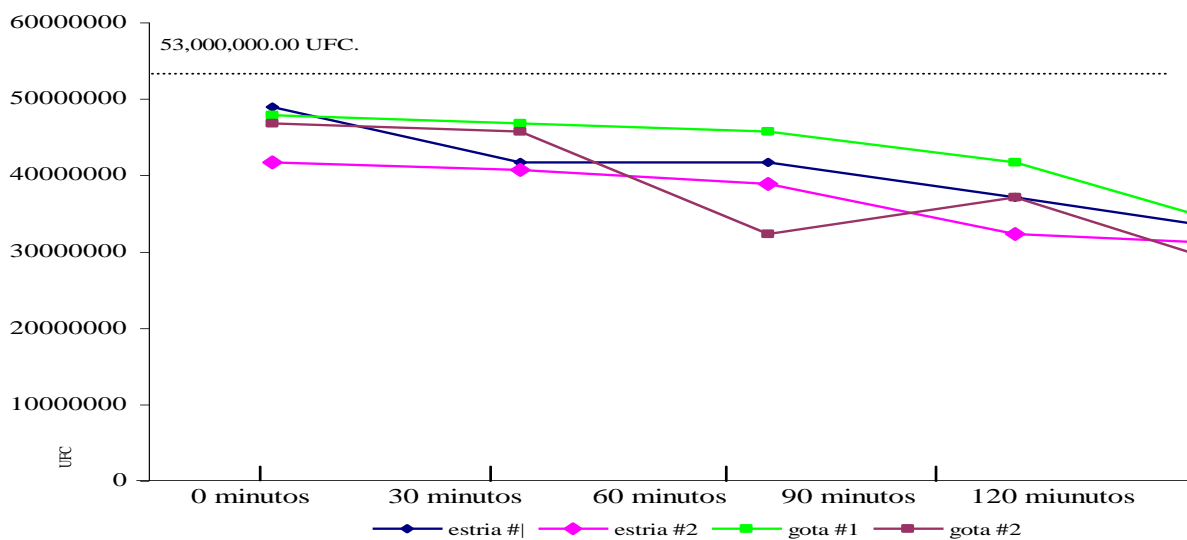


Grafico No 30. El diluyente azul como mencionamos nos proporciona datos por debajo del titulo mínimo protector lo cual indica que es mejor utilizar el diluyente antes mencionado.

GRAFICOS COMPARANDO LAS TECNICAS DE SEMBRADO DEL DILUYENTE AZUL EN LA SUPERFICIE, INTERMEDIO Y FONDO DEL GARRAFON.

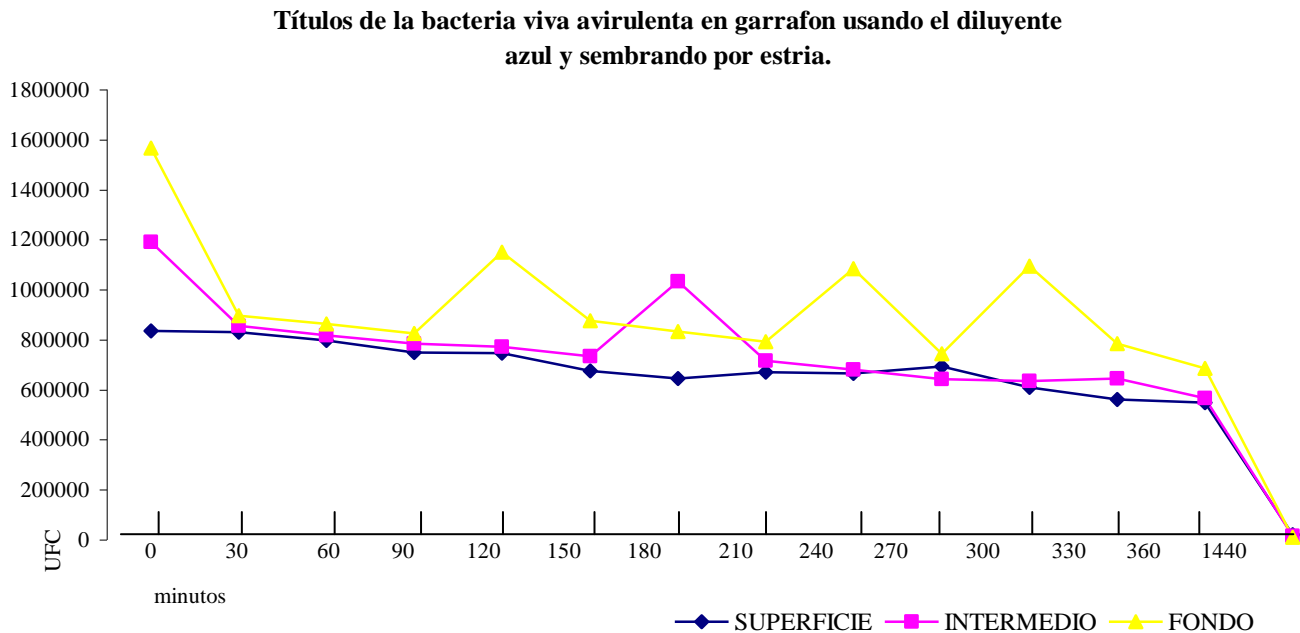


Gráfico No 31. Al simular condiciones de vacunación en un bebedero puedes ver que los resultados indican que la vacuna se mantiene en proporciones similares tanto en la superficie, intermedio y fondo debido al peso de la bacteria

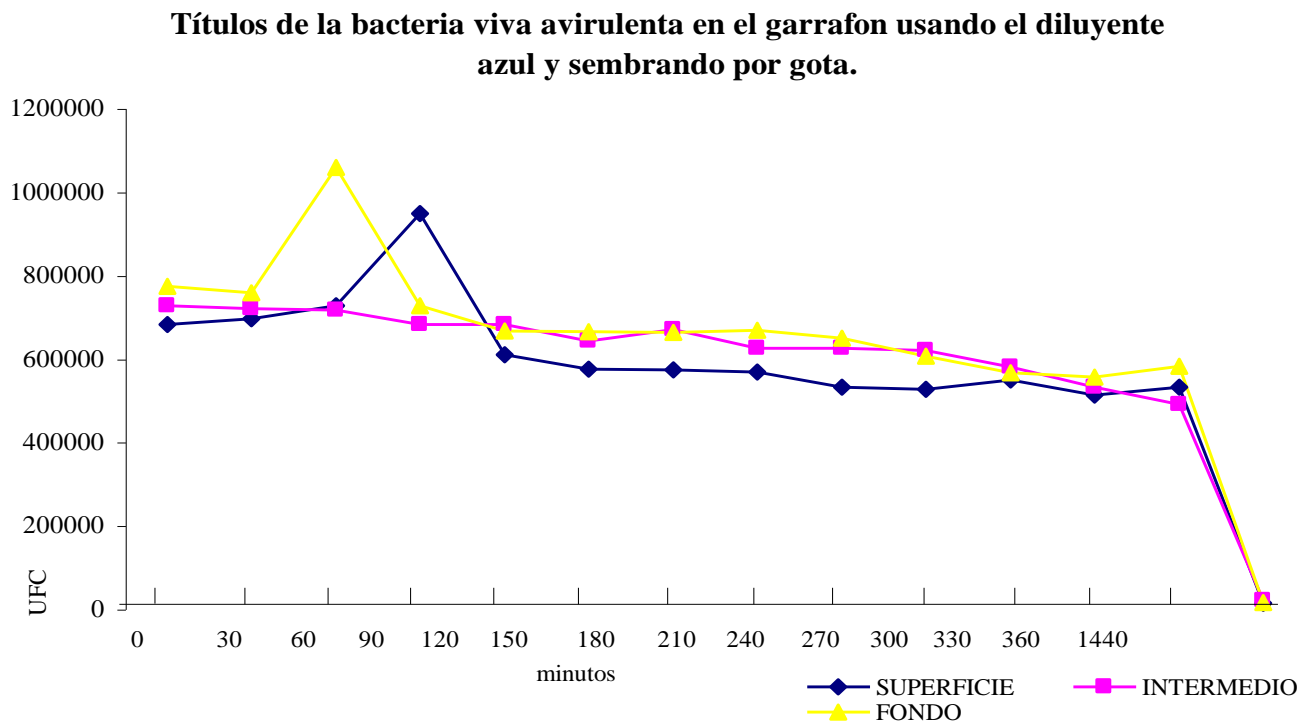


Gráfico No 32. Al simular condiciones de vacunación en un bebedero podemos ver que los resultados indican que la vacuna se mantiene en proporciones similares tanto en la superficie, intermedio y fondo debido al peso de la bacteria y mostró una estabilidad deseada

DISCUSION.

Este estudio tiene como finalidad la Inmunización en una granja porcina, por medio de una técnica de medicina preventiva, cuyo objetivo consiste en procurar resistencia inmune frente a un organismo infeccioso. Con este fin, se proporciona al cerdo en un bebedero una forma del organismo patógeno que no tiene capacidad de producir la enfermedad, pero si de inducir la formación de anticuerpos. Para prevenir y controlar la enfermedad.

Analizando el comportamiento que presenta la vacuna de *Salmonella choleraesuis*, en el laboratorio de virología diagnostica del departamento de postgrado. Se realizo un estudio, comparando las condiciones de laboratorio, con las condiciones simuladas de una granja, controlando las variables de tiempo y temperatura, a las que son llevadas las vacunaciones en las granjas porcinas. Cuyo propósito es llevar una acción temprana en el control de la enfermedad de Salmonelosis.

Para determinar el comportamiento que presenta la vacuna *Salmonella choleraesuis*, utilizamos dos diluyentes (lechoso y azul, ambos diluyentes comerciales, proporcionados por el laboratorio interesado) y alternando la técnica de sembrado (sembrando 30 *ul* por estría y 30 *ul* por difusión en placa /gota), usando garrafones de agua destilada proporcionando alternativas en la vacunación en la granja porcina, se procedió a obtener los diferentes títulos de la vacuna en condiciones diferentes, manteniendo la temperatura a 27.5 °C (+/-) 0.5, este estudio fue realizado por dos analistas.

El presente estudio se dividió en dos partes:

1.-PRIMERA FASE:se compararon dos diluyentes (azul y lechoso). A fin de determinar la vida media de la vacuna de *Salmonella choleraesuis* reconstituida por estos diluyentes, la temperatura se mantuvo a 27.5 °C (+/- 0.5 °C) durante las 2 horas en las cuales se llevo acabo el estudio. (el laboratorio interesado nos proporciono el dato del titulo mínimo inmunizante $10^{7.3}$ UFC).

Las titulaciones se realizaron a la vez con los métodos difusión en placa (gota), como por estría, ambos por duplicado usando los diluyentes azul y lechoso a los diferentes tiempos manteniendo la temperatura constante.

Usando el diluyente lechoso y sembrando por estría, al iniciar la prueba, la vacuna presentaba títulos de $10^{7.99}$ UFC en el primer muestreo y $10^{7.97}$ UFC en el segundo muestreo en la cuenta estándar al tiempo 0 como lo muestran los gráficos 1 y 3(ver tabla 1 y tabla 2 de resultados de anexos). A los 120 minutos los títulos fueron de $10^{7.91}$ UFC y $10^{7.82}$ UFC. Los títulos son aceptados dentro del rango establecido por el laboratorio productor y se observo que la variación entre los diferentes títulos no excede el 10 % de los resultados en mediciones, ya que los resultados se encuentran por arriba de la concentración mínima protectora ($10^{7.3}$ UFC título mínimo inmunizante dato proporcionado por el laboratorio interesado). Debido a que los porcentajes disminuyen de 100% a 82.9% en el primer muestreo así como de 100% a 72.19% en el segundo muestreo se recomienda administrar la vacuna en las 2 horas que duro el experimento.

Cuando se realizó la misma titulación por el método de gota utilizando el diluyente lechoso, los títulos obtenidos al inicio son de $10^{7.95}$ UFC en el primer muestreo y $10^{7.95}$ UFC en el segundo muestreo al tiempo 0 min. Los gráficos 5 y 7 nos indican un comportamiento lineal (ver tabla 4 y tabla 5 de resultados anexos). Los títulos al tiempo de 120 minutos son de $10^{7.74}$ UFC en el primer muestreo y de $10^{7.68}$ UFC en el segundo muestreo hay un título que se encuentra por debajo del título mínimo inmunizante ($10^{7.3}$ UFC). Se debe a que el estudio se realizó por dos analistas.

Al graficar los títulos contra el tiempo se observa un comportamiento lineal por lo cual podemos resumir que la vacuna es estable en un rango de tiempo de 2 horas y se debe de aplicar antes que la viabilidad disminuya y su título no sea el apto para brindar la protección deseada

En los muestreos por difusión en placa (gota) los porcentajes en los que la vacuna se encuentra son de 100% a 61.5% se observa que la variación en los diferentes títulos no excede el 10 % mientras que en la segunda repetición sucede algo semejante a lo antes mencionado, los porcentajes disminuyen de 100% a 53.3% por lo que la bacteria pasa de fase logarítmica a meseta.

En cuanto a los resultados obtenidos con el diluyente azul tanto en el primer muestreo como en el segundo muestreo (ver tablas 5, 6, 7 y 8 de resultados en anexos) se observan valores por debajo del título mínimo protector. Esto puede deberse a que el título de la vacuna desde un principio fue más bajo del recomendado por el laboratorio productor.

Sin embargo cabe destacar que el diluyente azul mantuvo la supervivencia de la bacteria entre un 66% y un 72 % cuando se sembró por estría (tabla 5 y tabla 6 que se presentan en anexos) y 81.25 % y un 57.44 % de viabilidad a los 120 minutos (tabla 6 y tabla 7 de anexos). Lo cual nos indica que la vacuna es estable en este diluyente.

Normalmente un lote al ser aprobado por la fábrica del laboratorio productor necesita tener un título superior al mínimo protector de por lo menos un 50% de tal manera que este diluyente también conserve la viabilidad durante los 120 minutos del estudio.

Notamos una similitud entre los resultados del diluyente lechoso con el diluyente azul en las cuentas viables por gota que presenta una mayor variación que las cuentas viables realizadas por estría, por lo tanto suponemos que fue más fácil leer las unidades formadoras de colonias ya que se encontraban más separadas que las unidades formadoras de colonias obtenidas por el método sembrando por estría.

Ambos diluyentes proporcionan confiabilidad al biológico, al mantener viable la vacuna en un tiempo de 120 minutos, tiempo suficiente para inocular 100 dosis a 100 lechones en una granja.

Por tal motivo la vacuna de salmonella choleraesuis es estable en los dos diluyentes, ya que los resultados obtenidos son muy similares.

Las variaciones del sembrado no difirieron en los resultados ya que se puede ver que los títulos son muy similares, cabe mencionar que al realizar un sembrado por estría proporcionamos más espacio para que el microorganismo se desarrolle, sin embargo el sembrado por gota nos proporciona 10.15

microorganismos menos que por estría, ambos métodos son confiables al obtener los títulos de la vacuna debido a que cuentan con la misma concentración de microorganismo.

2.- SEGUNDA FASE :En el caso del garrafón, se tomo un solo frasco de vacuna reconstituida por el diluyente azul que es el que se utiliza con regularidad y luego se vació en un garrafón de agua destilada homogenizandola una sola vez, tratando de emular lo que ocurre en las granjas, cuando se diluye la vacuna al ponerla en bebederos.

Las granjas no cuentan con agua destilada, pero se empleo esta agua ya que es libre de cloro, por lo cual evitamos una variable más en el sistema.

El estudio se prolongo por 6 horas, cada 30 minutos se realizaron muestreos, con un total de 10 muestreos tanto de la superficie, intermedio y fondo del garrafón, este se mantuvo con la boca hacia arriba con la finalidad de tomar las muestras a la vez de la superficie, intermedio y fondo al mismo tiempo, ya que se desea saber si hay la misma cantidad de microorganismo en todo el volumen de agua. El garrafón mide 46 cm de largo, por lo que se descartan 6 cm que integran la boca del garrafón, la superficie midió 13 cm hacia abajo ya que al invertir la forma del garrafón seria la primera que tendría contacto con los lechones. El intermedio midió 14 cm y el fondo 13 cm. Por lo que al tomar las muestras no se consideraron las distancias por cada muestreo, solo se aseguro de tomar las muestras de las distancias proporcionadas para la superficie, el intermedio y el fondo del garrafón.

Los resultados obtenidos nos indican que los títulos cae dos logaritmos por debajo del título mínimo protector, debido a que la vacuna se diluyo en 20 litros de agua destilada, cada vacuna de *Salmonella choleraesuis* contiene 100 dosis y se administra 1 ml por vía oral a cada lechón realizándolo de la manera convencional, por lo que se realizaron modificaciones en la dosis que se necesita administrar si se quiere emplear esta alternativa. El volumen que se necesita administrar a cada lechón son 200 ml para lograr la inmunidad. Por tal motivo es recomendable aplicar la vacuna en los primeros tiempos debido a que la vacuna se encuentra a mayor concentración en la superficie, intermedio y fondo del garrafón en esos tiempos. Se analizo utilizando una cantidad despreciable de muestra al realizar las diluciones.

Al preparar el sistema se diluyo la vacuna y se homogenizo solo una vez tomando en cuenta que no se podría homogenizar nuevamente en los bebederos.

Los resultados (ver tablas 9, 10, 11, 12, 13, 14) de garrafón de anexos) muestran que el titulo obtenido en este estudio se encuentra abajo del titulo mínimo protector, esto es por la entropía que se mantiene en el sistema, la dosis que se debe administrar es de 200 ml / cerdo, a fin de que todos tengan una cantidad proporcionalmente equitativa si se quiere que el cerdo tenga la inmunidad inducida por el biológico.

Ya que los resultados de la superficie (graficos17 y 23), el intermedio (gráficos 19 y 25) y fondo (grafico 21 y 27) se mantienen muy semejantes, podemos decir que la cantidad de bacterias distribuidas en el garrafón son aproximadamente las mismas y que los primeros cerdos que se acerquen a beber el agua van a tener la misma proyección de los que se acerquen a beber agua al final, por lo que cabe destacar el

tamaño de partícula de la salmonella no le permite irse al fondo de el garrafón y se mantiene constante, en las primeras horas, a las 6 horas que dura el estudio se puede ver que todavía se mantiene título por lo que a las 24 horas del estudio se encuentra un crecimiento de microorganismo en menor cantidad, pero no es suficiente para dosificar a los lechones de la granjas porcícolas ya que en el fondo se esperaría que la vacuna sedimentara, mas no fue ese el caso, ya que la vacuna se mantuvo distribuida en el garrafón proporcionalmente.

Sin embargo cabe destacar que se recomienda no esperar tanto tiempo para administrar la vacuna porque se pierde la viabilidad de las bacterias ya que se van haciendo viejas porque en ese momento se encuentran activas.

Para la administración de la vacuna es recomendable mantener a los cerdos en ayuno de agua de 8- 12 horas, mantener los bebederos desinfectados, mantener los bebederos con agua destilada, homogenizar la vacuna en el diluyente proporcionado por el laboratorio interesado, homogenizar la vacuna una sola vez en dichos bebederos con el fin de evitar el estrés a los animales, identificar si el alimento proporcionado a los cerdos contiene una dosis de antibióticos, seguir medidas de sanidad. Siguiendo estas recomendaciones se espera que al colocar los bebederos con las vacuna el cerdo tome una cantidad de agua que proporcione la protección recomendable para causar la inmunidad deseada en los lechones.

ANEXOS

Tablas de resultados de la vacuna con títulos y porcentaje de vacuna viva avirulenta.

TABLA #1 Resultados del diluyente lechoso sembrando por estría primer muestreo

TIEMPO	# TOTAL DE COL.	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	199	99.5	99540541.74	10 ^{7.99}	100
30 minutos	186	93	92896638.68	10 ^{7.96}	93.96
60 minutos	184	92	91833259.65	10 ^{7.96}	92.46
90 minutos	170	85	84918047.50	10 ^{7.92}	85.42
120 minutos	165	82.5	82413811.50	10 ^{7.91}	82.9

En la tabla se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la vacuna en el primer muestreo utilizando el diluyente lechoso, como el sembrado por estría en el AST a los diferentes tiempos establecidos, proporcionando los títulos de la vacuna

TABLA #2 Resultados del diluyente lechoso sembrando por estría segundo muestreo.

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	187	93.5	93325430.08	10 ^{7.97}	100
30 minutos	182	91	89125093.81	10 ^{7.95}	97.32
60 minutos	168	84	83176377.11	10 ^{7.92}	89.83
90 minutos	162	81	79432823.47	10 ^{7.90}	86.63
120 minutos	135	67.5	66069344.80	10 ^{7.82}	72.19

En la tabla se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la vacuna en el segundo muestreo utilizando el diluyente lechoso, variando el sembrado por estría, en el AST, a los diferentes tiempos establecidos, proporcionando los títulos de la vacuna. Estos resultados son semejantes a los del primer muestreo.

Tabla #3 Resultados del diluyente lechoso sembrando por gota primer muestreo

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	182	91	89125093.81	10 ^{7.95}	100
30 minutos	160	80	79432823.47	10 ^{7.90}	87.91
60 minutos	137	68.5	67608297.54	10 ^{7.83}	75.27
90 minutos	130	65	64565422.90	10 ^{7.81}	71.42
120 minutos	112	56	54954087.39	10 ^{7.74}	61.53

En esta tabla se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la vacuna en el primer muestreo utilizando el diluyente lechoso, como el sembrado por difusión en gota en el AST a los diferentes tiempos establecidos, proporcionando los títulos de la vacuna.

TABLA #4 Resultados del diluyente lechoso sembrando por gota segundo muestreo

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	180	90	8912509381	10 ^{7.95}	100
30 minutos	128	64	63095734.45	10 ^{7.80}	71.11
60 minutos	118	59	58888435.54	10 ^{7.77}	65.55
90 minutos	106	53	52480746.02	10 ^{7.72}	58.88
120 minutos	96	48	*47863009.23	10^{7.68}	53.33

En esta tabla se encuentran tabulados los resultados obtenidos de la evaluación de la vacuna en el segundo muestreo utilizando el diluyente lechoso, como la sembrada difusión en agar AST, a los diferentes tiempos establecidos, proporcionando los títulos de la vacuna. Estos resultados indican una caída por debajo del título mínimo protector en el tiempo de 120 minutos.

TABLA #5 Resultados del diluyente azul sembrando por estría primer muestreo

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	98	49	*48977881.94	10^{7.69}	100
30 minutos	85	42.5	*41686938.35	10^{7.62}	86.73
60 minutos	80	40	*41686938.35	10^{7.60}	81.63
90 minutos	75	37.5	*37153522.91	10^{7.57}	76.53
120 minutos	65	32.5	*32359365.69	10^{7.51}	66.32

La tabla nos proporciona información de los títulos obtenidos en los diferentes tiempos sembrando con estría en AST. Los valores con * indican que se encuentran por debajo del título mínimo protector. Además de indicarnos en que porcentaje se encuentra la bacteria viva avirulenta en los diferentes tiempos que duro el experimento.

Tabla #6 Resultados del diluyente azul sembrando por estría segundo muestreo

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	85	42.5	*41686938.35	10^{7.62}	100
30 minutos	83	41.5	*40738027.78	10^{7.61}	97.64
60 minutos	78	39	*38904514.50	10^{7.59}	91.76
90 minutos	65	32.5	*32359365.69	10^{7.51}	76.40
120 minutos	52	31	*30902954.33	10^{7.49}	72.94

Los valores con * indican que el título de la vacuna se encuentra por debajo del título mínimo protector.

TABLA #7 Resultados del diluyente azul sembrando por gota primer muestreo

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	96	48	*47863009.23	10^{7.68}	100
30 minutos	94	47	*46773514.13	10^{7.67}	97.91
60 minutos	92	46	*45708818.96	10^{7.66}	95.83
90 minutos	80	40	*41686938.35	10^{7.60}	83.33
120 minutos	78	39	*32359365.69	10^{7.59}	81.25

La tabla muestra resultados de los * títulos por debajo del título mínimo inmunizante.

TABLA # 8 Resultados del diluyente azul sembrando por gota segundo muestreo

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	94	47	*46773514.13	10^{7.67}	100
30 minutos	92	46	*45708818.96	10^{7.66}	97.87
60 minutos	78	39	*32359365.69	10^{7.59}	82.97
90 minutos	76	38	*37153522.91	10^{7.57}	80.85
120 minutos	54	27	*26915348.04	10^{7.43}	57.44

Datos obtenidos en el primer muestreo con el diluyente azul. *valores por debajo del título mínimo inmunizante.

Tablas. Resultados de bacteria viva avirulenta usando agua destilada en un garrafón

tabla # 9 Resultados primer muestreo diluyente azul/estría garrafón superficie

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	251	83.66	835603.01	10 ^{5.92}	100
30 minutos	249	83	829850.76	10 ^{5.91}	99.21
60 minutos	239	79.66	796159.35	10 ^{5.90}	95.21
90 minutos	225	75	749894.20	10 ^{5.87}	89.64
120 minutos	224	74.66	746448.75	10 ^{5.87}	89.64
150 minutos	203	67.66	676082.97	10 ^{5.83}	80.87
180 minutos	194	64.66	645654.22	10 ^{5.81}	77.28
210 minutos	201	67	669884.60	10 ^{5.82}	80.04
240 minutos	200	66.66	665273.15	10 ^{5.82}	79.67
270 minutos	208	69.33	691830.97	10 ^{5.84}	82.87
300 minutos	183	61	609536.89	10 ^{5.78}	72.91
330 minutos	169	56.33	562341.32	10 ^{5.75}	67.33
360 minutos	165	55	549540.87	10 ^{5.74}	65.74
1440 minutos	42	21	20989.39	10 ^{4.32}	25.10

Los títulos obtenidos de la vacuna de salmonella choleraesuis tienen un comportamiento lineal a medida que transcurre el tiempo.

TABLA # 10 Resultados primer muestreo Diluyente azul/estría garrafón intermedio

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	358	119.3	1191242.00	10 ^{6.07}	100
30 minutos	257	85.66	855066.71	10 ^{5.93}	71.8
60 minutos	245	81.66	816582.37	10 ^{5.91}	68.44
90 minutos	236	78.66	785235.63	10 ^{5.89}	65.93
120 minutos	232	77.33	772680.58	10 ^{5.88}	64.81
150 minutos	220	73.33	732824.53	10 ^{5.86}	61.46
180 minutos	310	103.3	1032761.40	10 ^{6.07}	86.58
210 minutos	215	71.66	716143.41	10 ^{5.85}	60.06
240 minutos	204	68	679203.63	10 ^{5.83}	56.99
270 minutos	193	64.33	642687.71	10 ^{5.80}	53.92
300 minutos	191	63.66	635330.93	10 ^{5.50}	53.36
330 minutos	194	64.66	645654.22	10 ^{5.81}	54.19
360 minutos	170	56.66	566239.28	10 ^{5.75}	47.49
1440 minutos	31	15.5	15488.16	10 ^{4.19}	12.99

Títulos de la vacuna obtenidos en la simulación de la inmunización de la salmonelosis.

Tabla #11 Resultados primer muestreo Diluyente azul/ estría garrafón fondo

TIEMPO	#TOTALDE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	471	157	1566751.07	10 ^{6.19}	100
30 minutos	269	89.66	895364.76	10 ^{5.95}	57.10
60 minutos	259	86.33	862978.54	10 ^{5.93}	54.98
90 minutos	248	82.66	826037.94	10 ^{5.91}	52.62
120 minutos	346	115.33	1150800.38	10 ^{6.06}	73.44
150 minutos	262	87.33	876971.3	10 ^{5.94}	55.62
180 minutos	250	83.33	831763.77	10 ^{5.92}	53.07
210 minutos	238	79.33	792501.33	10 ^{5.89}	50.52
240 minutos	326	108.6	1083926.91	10 ^{6.03}	69.17
270 minutos	223	74.33	743019.13	10 ^{5.87}	47.34
300 minutos	329	109.6	1093956.36	10 ^{6.03}	69.17
330 minutos	236	78.66	785235.63	10 ^{5.89}	50.10
360 minutos	206	68.66	685488.22	10 ^{5.83}	43.73
1440 minutos	18	9	8994.97	10 ^{3.95}	5.73

Valores tabulados de los diferentes títulos de la vacuna en 24 horas

Tabla # 12 Resultados Diluyente azul sembrando por gota garrafón superficie

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	205	68.33	682338.69	10 ^{5.83}	71,92
30 minutos	209	69.66	695024.31	10 ^{5.84}	73.32
60 minutos	218	72.66	726105.95	10 ^{5.86}	76.48
90 minutos	285	95	948418.46	10 ^{5.97}	100
120 minutos	183	61	609536.89	10 ^{5.78}	62.21
150 minutos	173	57.66	575439.93	10 ^{5.76}	60.69
180 minutos	172	57.33	572796.03	10 ^{5.75}	60.34
210 minutos	171	57	568852.93	10 ^{5.75}	60
240 minutos	160	53.33	532108.25	10 ^{5.72}	56.13
270 minutos	158	52.66	526017.26	10 ^{5.72}	55.43
300 minutos	165	55	549540.87	10 ^{5.74}	57.89
330 minutos	154	51.33	512861.38	10 ^{5.71}	54.03
360 minutos	160	53.33	532108.25	10 ^{5.72}	56.13
1440 minutos	29	14.5	14487.71	10 ^{4.16}	15.26

Valores del título del segundo muestreo de la valoración de la vacuna.

Tabla # 13 Resultados Diluyente azul/gota garrafón intermedio

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	218	72.66	726105.95	10 ^{5.86}	100
30 minutos	216	72	719448.978	10 ^{5.87}	99.09
60 minutos	215	71.66	716143.41	10 ^{5.855}	98.62
90 minutos	205	68.33	682338.69	10 ^{5.834}	94.04
120 minutos	205	68.33	682338.69	10 ^{5.834}	94.04
150 minutos	193	64.33	642687.71	10 ^{5.808}	88.53
180 minutos	201	67	669884.60	10 ^{5.826}	92.21
210 minutos	188	62.66	625172.69	10 ^{5.796}	86.23
240 minutos	188	62.66	625172.69	10 ^{5.796}	86.23
270 minutos	186	62	619441.07	10 ^{5.792}	85.32
300 minutos	174	58	579428.69	10 ^{5.763}	79.82
330 minutos	160	53.33	532108.25	10 ^{5.726}	73.39
360 minutos	147	49	489778.81	10 ^{5.690}	67.43
1440 minutos	40	20	19998.61	10 ^{4.30}	27.52

Esta tabla nos indica el rango de los títulos en donde es viable la vacuna por el crecimiento de microorganismo.

Tabla # 14 Resultados Diluyente azul/gota garrafón fondo

TIEMPO	# TOTAL DE COL	# PLACAS	TITULO UFC/ml	TITULO Log	PORCENTAJE %
0 minutos	230	75.62	772680.58	10 ^{5.88}	72.32
30 minutos	228	76	758577.57	10 ^{5.880}	71.69
60 minutos	318	106	1059253.72	10 ^{6.025}	100
90 minutos	218	72.66	726105.95	10 ^{5.861}	67.92
120 minutos	209	69.66	66806.76	10 ^{5.842}	65.71
150 minutos	200	66.66	665273.15	10 ^{5.823}	62.88
180 minutos	199	66.33	662216.50	10 ^{5.821}	62.57
210 minutos	207	69	668652.29	10 ^{5.838}	65.09
240 minutos	195	65	648634.43	10 ^{5.812}	61.32
270 minutos	182	60.66	605340.87	10 ^{5.782}	57.22
300 minutos	170	56.66	566239.28	10 ^{5.753}	53.45
330 minutos	167	55.66	555904.25	10 ^{5.745}	52.50
360 minutos	175	58.33	582103.21	10 ^{5.765}	55.02
1440 minutos	31	10.33	15488.16	10 ^{4.014}	9.74

Los valores obtenidos, a lo largo del tiempo que se realizó la prueba, nos indican que la vacuna es viable y muestra una considerable disminución de colonias en cuanto el tiempo de exposición es más tardado en proporcionar la vacuna.

7.4 Fotografías de la bacteria viva avirulenta de *Salmonella choleraesuis*.

1-a) Gram – de la vacuna de *salmonella choleraesuis*

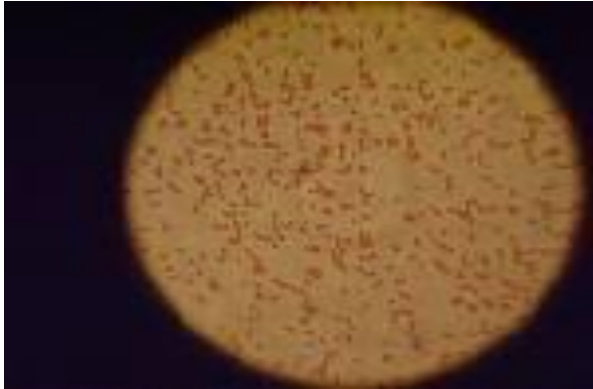


Foto No 1. Gram – de la bacteria *Salmonella Choleraesuis* en el microscopio óptico.

1-b) Bacteria de *Salmonella choleraesuis*

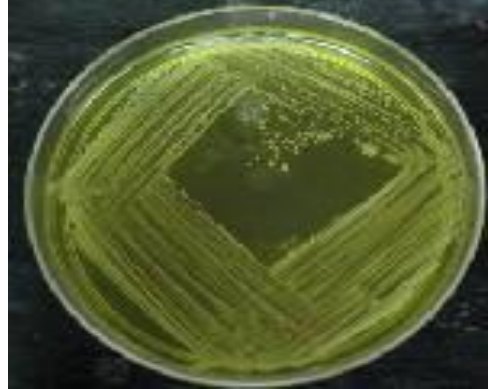


Foto No2. Sembrada en Agar soya tripticaseina crecimiento característico de la bacteria colonias redondas cremosas beige.

1-c) Cuenta viable método difusión en placa



Foto No 3. Muestra el crecimiento de la bacteria viva Avirulenta de la bacteria *Salmonella choleraesuis*

1-d) Cuenta viable método difusión en placa y estría



Foto No 4. Comparación de las 2 técnicas de sembrado *Salmonella choleraesuis* de las diferentes diluciones

BIBLIOGRAFÍAS.

- 1.- Andonegui, L.H; La Industria Farmacéutica como Productora de Biológicos, Avirama, año 7, vol.VII, No. 73, pp10-14. 1988.
- 2.- Batalla, C.D; Problemas Post-vacúnales en bovinos, Avirama, año 7, vol. VII No. 73 . pp. 37-38. 1988.
- 3.- Ciencia Veterinaria. Epizootiología de la Salmonelosis en Bovinos, porcinos y aves. Universidad Nacional Autónoma de México pp. 162-170.1981
- 4.- Cortez, H.S, Avirama, Factores que influyen en la calidad de un biológico. año7, vol VII, No. 73, pp. 31-32. 1988.
- 5.- Cwan. S.T., Steel, K,J.; Manual para la identificación de bacterias de importancia medica. 1990
- 6.- Davis, D.Tratado de Microbiología ,et al,: 4^a ed. Salvat, Barcelona.1993.
- 7.- Lansing .M. Preston Microbiología. Ed. McGraw-Hill Interamericana 4^a ed. 1999 Madrid España.
- 8.- Antonio Morilla G Manual de Inmunología. Ed. Diana 1^a ed septiembre 1989. México DF.
- 9.-Manual de bacteriología.
- 10.- Zinsser .Wolfgang. K. Joklik. Microbiología. Ed. Medico Panamericana. 18^a ed 1989 Buenos Aires Argentina.
- 11.- I.A Merchant. Bacteriología y Virología Veterinaria. 3^aed. 2^a reimpresión ed. Acribia Zaragoza España, 1990.
- 12 .- Antonio Morilla G.y Carlos R. Bautista.G. Manual de Inmunología. ed. Diana, 1^aedición, 1986 México D.F
- 13.- Manual Merck de Veterinaria.
- 14.- Harrison. Principios de Medicina Interna. 13^a ed, vol. 1 editorial Mc Graw Hill.1999.
- 15.- Goodman. Gilman. Bases farmacológicas de la terapéutica. 9^a ed. Edt. Interamericana. 1998.
- 16.-Eli Benjamín, et, al (2002) Inmunology A Short Course 4^a edicion, Wileyiiss, Estados Unidos.
- 17.-Janaway, Jr,. AL (2003), Inmunologia, El Sistema Inmunitario en Condiciones de Salud y Enfermedad 2^a Edicion, Ed. Manson Barcelona España.
- 18.-Merchan T. I.A. Packer R,a(1970) Bacteriología y Virologia Veterinaria 3^a Edicion, Ed. Acribia Zaragoza España.
- 19.- Rojas M, William (2000) Inmunologia 12^aEdicion , Ed. Corporación para la investigación Biologicas, Bogota, Colombia.
- 20 Edwin H. Lennette. Manual of Clinical Microbiology Fourth Edition American Society for Microbiology. Washington D.C 1985.
- 21.- Balows, Hausler, Herrmann Isenberg Shadomy Manual of Clinical Microbiology, Fifh, edition American Society FOR Microbiology. Washington, Dc 2005.

- 22.- Murphy, Gibbs, Horizinek Veterinary Virology, Third Edition Srt, San Diego Copyright. 199 by Academic Piess.
- 23.- G,W Osbalditan Tecnicas de laboratorio en Bacteriologia Clinica Veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza España.
- 24.-Freedman, David y otros. Estadística. Barcelona: Antoni Boch Editor2ª ed., 1993. . Un libro claro, escrito con maestría y con muchas ideas tanto en estadística como en probabilidad.¹
- 25.-Ríos, Sixto. Iniciación a la estadística. Madrid: Editorial Paraninfo8ª ed., 1992. . Libro introductorio sobre la estadística y sus métodos.²
- 26.-Freund, John E. y Simon, Gary A. Estadística elemental. México: Prentice Hall8ª ed., 1994. . Un libro claro y con múltiples ejercicios.³
- 27.-Edwards E.A.; Hiderbrand L.r.: Method for Identifyng Salmonella and S higella Directly from the primary Isolation Plate by Coagglutination of Protein A-Containing Staphilococci Sensitized with Specific Antibody. J Clin Microbiol. 3 (3) :339-343. 1996.
- 28.- Rocknill C.R. ; Rumans W.I. Detection of Salmonella Typhi D, Vi, and d Antigens in Body Fluids, Using Specific Antibody-Coated Staphylococci. J Clin Microbiol 5(1) 81-85. 1997.
- 29 Arevalo M., L etal . 1996. Guia de utilizacion de antisepticos. Sociedad española de medicina preventiva salud publica e higiene (SEPSPH).(U RL : www.Mpsp.org/mpsp/Documentos/Desinfe/Antisep.htm)
- 30 Diaz, M. G. y FERRAN, c.j. 2004 Fundamentos y tecnicas de analisis microbiologico. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Lab. De Diagnostico clinico España. Pp.
- 31.- Jawetz,E. Manual de microbiologia medica. Ed. El manual moderno. México 1997.
- 32.-Mac Fadin, F. Pruebas Bioquimicas para la identificación de bacterias de importancia clinica. Ed. Medica Panamericana. México, 1990.
- 33.- Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (URL: www.cdc.gov/old/ohs/biosfty.htm.)
- 34.-Ai-Li Shiau, Cheng-Chen, Y.Ch.S. Enhancement of humoral and cellular immune responses by an oral Salminella choleraesuis vaccine expressing porcine prothymosin. Avialable online at www.sciencedirect.com Vaccine 23(2005) 5363-5571.
- 35.- Mohamed N, Mohamed A. S. N. Vectors for enhanced gene expression and protein purification in Salmonella. Journal homepage: www.Elsevier.com/locate/gene. Gene 421(2008) 95-99.
-

- 36.-Gustavo Dominguez. Alberto. Alberto. S. Almira. J. Salmonella enterica serovar Choleraesuis derivatives harbouring deletion in rpoS and pho P regulatory genes are attenuated in pigs, end survive end multiply in porcine intestinal macrophages and fibroblasts, respectively. Available online at www.sciencedirect.com. Veterinary Microbiology 130(2008) 298-311.
- 37.-Virginia L. Doug M . Michael. Keith H. Cross-protective immunity in calves by a DNA adenine methylase deficient Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine. Available online at www.sciencedirect.com. Vaccine 24 (2006) 1339-1345.
- 38T.E.Burkey. K.J. Skjolaas. S.S.Dritz. Expression of Toll-like receptors. Interleukin 8, macrophage migration inhibitory factor, and Osteopontin in tissues from pigs challenged with Salmonella enterica serovar Typhimurium or serovar Choleraesuis. Available online at www.sciencedirect.com. Veterinary Immunology and Immunopathology 115(2007) 309-319.
- 39.- Kendra A. Hyland, David r. Brown, Michael P. Salmonella enterica serovar Choleraesuis infection of the porcine jejunal Peyer's patch rapidly induces IL- 1 and IL-8 Expression. Available online at www.sciencedirect.com. Veterinary Immunology and Immunpathology 109 (2006)1-11.
- 40.- Robertj. Tsang Long Lin. Ching Ching Wu. Insertional mutation of marA vitiates inducible multiple antimicrobial resistance in Salmonella enterica subp. Enterica serovar Choleraesuis. Available online at www.sciencedirect.com. Veterinary microbiology 109 (2005) 267-274.
- 41 .- <http://www.monografias.com/trabajos14/patogenos/patogenos.shtml>.
- 42.- URL: http://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella_choleraesuis
- 43.-[http:// www.vision veterinaria.com/articulos/art101 patogenia.htm](http://www.visionveterinaria.com/articulos/art101_patogenia.htm).
- 44.-<http://www.sanidad animal. Info/inmuno/SEPTIMO03.htm>.
- 45.-<http://www. Virologia.unimi.it/influenza/intestazione.htm>.
- 46.- <http://buscador.ya.com/indice /ciencias/Ciencias de la vida /Virologia>.
- 47.-<http://www.lapelle.it/virologia/virologia.html>.
- 48.-<http://www.bilogia.unito./esami/virologia.htm>.
- 49.-<http://biología.edu.ar/virologia>.