



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO**

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

**DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE ELISA COMPETITIVA PARA
LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Salmonella enterica*
SEROVARIEDAD TYPHIMURIUM EN AVES RAPACES**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ALBERTO ENRIQUE MONGE ZÚÑIGA

TUTOR

DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

COMITÉ TUTORAL

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

DR. GARY GARCIA ESPINOSA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS:

Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

IT224311-3

Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

IN216005

Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)

PE 200707

El trabajo fue realizado con el equipo e instalación de:

Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en
Salud Animal de la FESC, Campo 4

"We need another and a wiser, perhaps a more mystical, concept of animals.

***Remote from universal nature and living by complicated artifice,
man in civilization surveys the creature through the glass of his knowledge
and sees thereby a feather magnified and the whole image in distortion.***

***We patronize them for their incompleteness,
for their tragic fate of having taken form so far below ourselves.***

***And therein we err, and greatly err.
For the animal shall not be measured by man.***

***In a world older and more complete than ours
they move finished and complete,
gifted with extensions of the senses we have lost or never attained,
living by voices we shall never hear.***

They are not brethren.

They are not underlings.

***They are other nations, caught with ourselves in the net of life and time,
fellow prisoners of the splendor and travail of the earth."***

Henry Beston

*Dedicado a todas las aves involucradas en este trabajo, especialmente: N°1, N°2, N° 3, N° 4, N°5,
N°6, Camila, María Paula y Ferdinand.*

AGRADECIMIENTOS

Mis Papas y mis hermanas por toda su paciencia, comprensión, amor, apoyo, les estaré eternamente agradecido por todo lo que han hecho por mí.

Karito, por siempre estar ahí para mí, escuchándome, apoyándome, ayudándome en todo momento a superarme. Mil besos preciosa! Te amo!

México: infinitas gracias a un país que me ha dado TODO.

UNAM: *alma mater*. Por siempre puma, sangre azul y piel dorada.
...Como no te voy a querer?...

A mis mejores amigos: Cañón de S. Semaan, Jason, El Chicharo Puig, Jaramito, Sebas, Randall. A Jebús y Holly Flying Panocha. Dedicado Chicharo!

Cesar Cuenca muchas gracias por todo amigo, nunca pierdas esa sencillez y buena onda que te caracteriza, espero que aun estando lejos sigamos siendo buenos amigos.

Betty, Patty, Tamara, Hadad, Laura, Liz, Lis, Lis jajaja, son un montón pero bueno creo que saben a quienes me refiero, Gaby, Emmanuel, Juan José, Juan José, Tere, Roger, Toluco, Victor, Victor en fin... todos los que estuvieron por ahí compartiendo en el laboratorio.

Juan Antonio Montaraz y Gary García gracias por sus opiniones del trabajo y por su disposición a ayudarme.

Alma Núñez y personal de la Secretaría de Posgrado por siempre haberme ayudado con los trámites.

CIVS Los Reyes La Paz SEMARNAT y Zoológico San Juan de Aragón (DGZDF)

MVZ Heber Ramón Santiago López
MVZ Daniel Contreras Patiño
MMVZ Gerardo López Islas

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	13
HIPÓTESIS	17
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	55

Resumen

Salmonella se ha aislado en aves rapaces de vida libre y cautiverio, tanto de individuos sanos como enfermos. Reportes previos identifican a *S. Typhimurium* como la serovariedad con mayor prevalencia en estas aves, aunque también pueden infectarse con otras serovariedades provenientes de diferentes fuentes. En el caso de las aves rapaces no se han desarrollado pruebas de ELISA específicas que sirvan como modelo para otras especies y que formen parte del diagnóstico rutinario para *S. Typhimurium*. El obstáculo principal al estudiar y diagnosticar enfermedades infecciosas en aves silvestres es la falta de anticuerpos secundarios IgY específicos de forma comercial. Para superar esta limitación, el desarrollo de una ELISA “competitiva” es el método más adecuado ya que se puede utilizar en cualquier especie para el diagnóstico serológico de *Salmonella Typhimurium*. Se tomaron hisopos cloacales y muestras sanguíneas de 76 individuos de 12 especies diferentes, la frecuencia de aislamiento fue de 15.8% (12/76) sólo un aislamiento fue de *S. Typhimurium* mientras que la serovariedad más encontrada fue *S. Agona* con cuatro aislamientos. Para el desarrollo de la ELISA competitiva se utilizó suero de gallinas inmunizadas con LPS de *S. Typhimurium* como suero de competencia. El valor de corte que se tomó para designar a los animales como positivos o negativos a anticuerpos contra *Salmonella Typhimurium* fue de 12.6% de inhibición. La prueba dio como positivos a 21 individuos de los 76 en total correspondiendo a 27.6%. Se pudo comprobar que los parámetros de rendimiento de la prueba en comparación con la prueba de oro fueron notablemente más bajos, específicamente en sensibilidad diagnóstica (25%) y valor predictivo positivo (14.8%). Para mejorar el rendimiento de la prueba hay que considerar cambiar el antígeno de prueba ya que el LPS de *S. Typhimurium* no tiene reacción cruzada con otros LPS de composición distinta, para lograr la detección de *Salmonella* sp. debe considerarse hacer una mezcla de LPS que logre identificar mayor cantidad de serovariedades.

Abstract

Salmonella has been isolated from free-living and captive raptors, both healthy and clinical individuals. Previous reports identified *S. Typhimurium* as the most prevalent serotype in raptors, but they can also get infected with other serotypes from different sources. In the case of raptors specific ELISA tests have not been developed for the routine diagnosis of *S. Typhimurium*. The main obstacle in studying and diagnosing infectious diseases in wild birds is the lack of commercially available secondary antibodies. To overcome this limitation, the development of a competitive ELISA is the most suitable method because it can be applied in any species for the serologic diagnosis of *S. Typhimurium*. Cloacal swabs and blood samples were taken from 76 individuals from 12 different species; the prevalence of bacterial shedding was 15.8% (12/76) only one isolate was identified as *S. Typhimurium* while the most common serotype was *S. Agona*. For the development of the competitive ELISA laying hens were immunized with LPS and their sera were used as competition serum. To distinguish between positive and negative animals the cutoff point was established at 12.6% inhibition. The test gave positive status to 21 birds corresponding to 27.6% seroprevalence. The performance parameters of the test were compared to the gold standard test and they were found significantly low, specifically in diagnostic sensitivity (25%) and positive predictive value (14.8%). In order to improve the ELISA performance it must be considered changing the test antigen because the LPS is highly specific and does not have extensive cross reactivity with other LPS with different antigenic composition. To achieve the detection of *Salmonella* sp. it should be considered making a mixture with various LPS with different composition in order to identify many serotypes in one test.

Introducción

El género *Salmonella* incluye bacterias Gram negativas, anaeróbicas facultativas con forma de bacilos que se clasifican dentro de la familia Enterobacteriaceae. *Salmonella* puede ser encontrada como comensal y patógeno en una amplia variedad de animales de homeotermos y poiquilotermos y es capaz de sobrevivir libre en el ambiente por periodos prolongados. La nomenclatura taxonómica actual considera que 2579 serovariedades son variantes de dos especies, *Salmonella enterica* (2557) y *S. bongori* (22) (Grimont y Weill, 2007). *S. enterica* a su vez tiene seis subespecies con base en sus características bioquímicas, antigénicas y filogenéticas denominadas: I. *enterica*, II. *salamae*, III. *arizonae*, IV. *diarizonae*, V. *houtenae* e VI. *indica* (Libby *et al.* 2004). Según la clasificación de Kauffmann-White-Le Minor (KWL) la mayoría de los aislamientos del género *Salmonella* a partir de muestras clínicas pertenecen a la subespecie *enterica*. Anteriormente las serovariedades se consideraban especies distintas, esto hace que la nomenclatura sea compleja para cada serovariedad, por ejemplo, *S. enterica* subesp. *enterica* serovariedad Typhimurium. Para simplificar la nomenclatura las serovariedades de *Salmonella* son referidas por su serovariedad, por ejemplo *Salmonella* ser. Typhimurium. (Friend y Franson 1999, Grimont y Weill, 2007)

Las infecciones por *Salmonella* pueden resultar en diversos síndromes clínicos o estados de enfermedad. De hecho, una infección de un mismo aislamiento puede producir manifestaciones clínicas distintas en diferentes hospederos. El resultado de la interacción entre una *Salmonella* en particular y un hospedero potencial depende de varios factores que incluyen la serovariedad, especie de hospedero, dosis infectante, competencia inmunológica, y la microbiota. El espectro de la enfermedad puede oscilar entre un estado de portador asintomático a una enfermedad sistémica febril potencialmente fatal. Las infecciones por *Salmonella* generalmente se describen como causantes de salmonelosis tifoide (sistémica febril) o no tifoide (SNT, gastroenteritis). (Dougan *et al.* 2011)

Salmonella puede infectar una amplia variedad de especies, que producen diferentes síndromes clínicos. Sin embargo, los aislamientos pertenecientes a ciertas serovariedades son restrictivos con respecto a los hospederos que pueden infectar. Por ejemplo, *S. Typhi* infecta al humano y causa fiebre tifoidea y no infecta ratones o prácticamente ninguna otra

especie. La pulorosis y la tifoidea aviar producidas por *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* respectivamente, son formas tifoides que producen enfermedades en aves de corral y han recibido una atención considerable debido a su impacto económico. Por otro lado, varias serovariedades no tifoides albergan agentes capaces de infectar diferentes animales, a dichos agentes se les ha denominado promiscuos. Ciertamente, pueden causar enfermedad en animales y diseminarse al humano como una infección zoonótica. Las aves silvestres se pueden infectar con *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, pero se infectan más comúnmente con las variantes de *Salmonella* no tifoides, de las cuales *S. Typhimurium* es la más representativa. Las formas no tifoides constituyen la gran mayoría de las bacterias del género *Salmonella*, y se han convertido en una causa importante de enfermedad y muerte en aves silvestres. (Daoust y Prescott 2007, Friend y Franson 1999).

Patogenicidad de Salmonella

Una característica fundamental del género *Salmonella* es que tienen la habilidad de invadir y sobrevivir en células de mamífero estando adaptadas a la vida intracelular. Esto incluye la capacidad de colonizar enterocitos, macrófagos y otras células inmunitarias. Esta propiedad ha sido asociada genéticamente a la virulencia ya que los mutantes que no sobreviven en estas células tienen una habilidad reducida o nula para causar infección. Los genes asociados a virulencia se han ligado a regiones adquiridas de ADN, pero algunos también han sido mapeados en la región central del genoma que se comparte con otras bacterias. A las regiones o loci genético que albergan múltiples genes de virulencia o patogenicidad se denominaron “Islas de Patogenicidad”. La Isla de Patogenicidad I (SPI-1) y SPI-2 codifican sistemas de secreción Tipo III, los cuales son piezas claves para la invasividad y persistencia. Es importante recalcar que los sistemas de secreción Tipo III, incluyendo SPI-I y SPI-2, pueden codificar complejos que pueden “inyectar” proteínas bacterianas a las células del hospedero. Dichas proteínas bacterianas, comúnmente denominadas proteínas efectoras, pueden apropiarse de funciones de las células del hospedador, incluidas aquellas asociadas con el sistema inmune. Por lo tanto, las bacterias del género *Salmonella* se han hecho expertas en remodelar las células del hospedero así como en promover actividad inmunomoduladora. La virulencia depende de la interacción

entre múltiples genes y redes, la cual puede diferir significativamente entre serovariedades o incluso entre dos aislamientos de la misma serovariedad. (Dougan *et al.* 2011)

Biología de la infección por Salmonella

Para comprender las bases moleculares de la infección por *Salmonella*, incluyendo la habilidad para colonizar y sobrevivir en el hospedero, es importante entender las fases microbiológicas de la infección. En infección natural, *Salmonella* es adquirida del ambiente por ingestión de agua contaminada, presas contaminadas en el caso particular de aves rapaces o por contacto con un portador. Curiosamente, el reservorio en el ambiente generalmente no se conoce. Seguido de la ingestión en números suficientes, una proporción del inóculo sobrevive el pH bajo del estómago para entrar al intestino delgado donde se puede establecer una infección. *Salmonella* tiene una respuesta adaptativa de tolerancia al pH ácido, el cual puede ayudar a la supervivencia en este ambiente. Después de pasar por el estómago puede continuar la colonización luminal del intestino delgado y grueso y puede eliminarse en heces por un largo periodo. *Salmonella* es reconocida por ser predominantemente invasiva y codifican múltiples sistemas (incluyendo SPI-I) para interactuar y penetrar el epitelio de la mucosa. Por consiguiente, para lograr efectivamente el acceso al epitelio debe de evitar los efectos neutralizantes del sistema inmune, incluyendo los péptidos antimicrobianos, inmunoglobulina A, así como, barreras químicas como las sales biliares. Una adhesión eficiente es un prerrequisito para la invasión, y la adherencia a la membrana de la superficie apical de los enterocitos está mediada por adhesinas como las fimbrias. Existen evidencias que sugieren que *Salmonella* muestra preferencia por las células M, las cuales examinan el contenido antigénico del intestino. *Salmonella* puede ser capaz de dirigirse a las células M y manipular su función, por ejemplo induciendo apoptosis. Después de moverse a través de las células M *Salmonella* puede acceder a células linfoides en tejidos como las Placas de Peyer. Dentro del tejido linfoide asociado a intestino (GALT), *Salmonella* puede ser ingerida por diferentes células incluidas células dendríticas. En estas etapas tempranas de invasión, existe evidencia que en ratón *Salmonella* puede dirigirse a subconjuntos particulares de células dendríticas o incluso a localizaciones dentro del linfonodo, por ejemplo zonas ricas en linfocitos T. Sin

embargo, las interacciones específicas probablemente pueden variar entre serovariedades y aislamientos. Otro mecanismo puede involucrar la habilidad de *Salmonella* de romper uniones estrechas de las células, y con esto perturbar la capacidad de la capa epitelial de moderar el balance iónico y de localización de células inmunitarias. En realidad, es probable que la responsable sea una combinación de ambas rutas. (Dougan *et al.*, 2011)

Se conoce relativamente poco sobre los mecanismos que previenen que la mayoría de serovariedades de *Salmonella* se hagan sistémicas a niveles clínicos significativos.. En la forma tifoide, la infección sistémica entonces requiere una combinación de una capacidad eficiente de atravesar la capa epitelial del intestino, combinada con la habilidad de permanecer sin ser detectada por el sistema inmune. Las *Salmonella* tifoides son fagocitadas por los macrófagos y se diseminan por el sistema reticuloendotelial. En contraste, las *Salmonella* no tifoides normalmente inducen una respuesta inflamatoria más localizada en individuos inmunocompetentes, provocando una gran afluencia de leucocitos polimorfonucleares, incluyendo neutrófilos, hacia el lumen intestinal y diarrea. Sin duda alguna, las infecciones reales son un complejo de interacciones entre el patógeno y el hospedero pero la anterior descripción provee una síntesis de cómo se dan las etapas iniciales de la infección por *Salmonella* y donde se pueden dar interacciones con el sistema inmunológico. (Dougan *et al.*, 2011)

Salmonella en aves silvestres

El papel de las aves silvestres en la epidemiología de la Salmonelosis ha sido estudiado como un posible riesgo de que éstas constituyan una fuente de diseminación de *Salmonella* (Gopee *et al.* 2000, Kapperud 1983, Reche *et al.* 2003a). Los individuos infectados pueden eliminar ésta bacteria durante períodos prolongados de tiempo que van desde semanas a meses. La persistencia de la bacteria en ambientes contaminados es el resultado de un pequeño porcentaje de las aves que permanecen como portadores crónicos que excretan intermitentemente *Salmonella* en el ambiente. (Friend y Franson, 1999)

La Salmonelosis aviar por infecciones paratifoides se da a nivel mundial y cada vez aumenta su prevalencia entre las aves silvestres en una amplia variedad de hábitats. La distribución geográfica de la salmonelosis en aves de vida libre se relaciona íntimamente

con las fuentes de contaminación ambiental que entran en la cadena trófica de las aves (Friend y Frandson 1999)

Debido a que las bacterias del género *Salmonella* son primordialmente bacterias entéricas, su distribución sigue de cerca a la de los humanos y animales de una amplia variedad de especies incluyendo reptiles, aves y mamíferos. El rango potencial de hospederos aviares de *Salmonella* parece ser ilimitado. Algunos serotipos no tienen predilección por hospedero, y las aves silvestres que están cercanamente asociadas con personas o animales domésticos son las que con mayor probabilidad muestren una prevalencia alta de acarreo intestinal debido a los niveles altos de contaminación del ambiente con esta bacteria. Las infecciones por *Salmonella* en aves silvestres son adquiridas en su mayoría del ambiente y, con algunas excepciones, estas aves tienen poca participación en la transmisión de la infección a animales domésticos y humanos. Se han realizado estudios que muestran que la presencia de *Salmonella* en intestino por aves silvestres es menor al 1% (Daoust y Prescott, 2007). La presencia de *Salmonella* en el intestino generalmente no se asocia a una enfermedad clínica y, en la ausencia de reinfección, puede durar a lo mucho algunas semanas. Sin embargo, los polluelos y aves jóvenes muestran mayor susceptibilidad a la infección la cual pueden adquirir de sus padres por vía vertical u horizontal. Las diferencias en ecología alimenticia entre las especies aviares en relación al tipo de ambiente contaminado va a influir en la prevalencia de *Salmonella* en estas especies. Las gaviotas en particular, es común que acarren *Salmonella*. (Ferns y Mudge, 2000; López *et al.*, 2011)

Pruebas de Diagnóstico para Salmonella

Para el diagnóstico de bacterias del género *Salmonella* se sigue considerando como “prueba de oro” al aislamiento e identificación mediante técnicas microbiológicas. La bacteria puede ser aislada fácilmente utilizando medios de enriquecimiento y medios selectivos o diferenciales a partir de muestras de heces, hisopos cloacales, material de cama contaminado y órganos internos. Se considera que la mejor muestra para evidenciar la presencia de *Salmonella* es el intestino más que el contenido intestinal (Clausen y Gudmunijsson, 1981).

Los métodos serológicos como la aglutinación en placa y la ELISA pueden ser utilizados para detectar infecciones con serovariedades de *Salmonella*. Las infecciones con estos organismos normalmente llevan a la producción de anticuerpos circulantes, principalmente de la clase IgM al inicio de una infección y posteriormente de IgG. Una de las desventajas de los métodos bacteriológicos es que la excreción de *Salmonella* se da de forma intermitente mientras que las concentraciones séricas de IgG se mantienen de forma más prolongada. Una desventaja de los métodos serológicos es que en las etapas tempranas de la infección, las concentraciones séricas de IgG aún están bajas, mientras que la excreción de la bacteria está en su punto máximo. (Barrow, 1992) La técnica serológica más utilizada es la aglutinación en placa con suero o sangre completa para el diagnóstico de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, una de las principales desventajas de esta prueba es la frecuencia de falsos positivos (Barrow, 1992) y es la prueba que se contempla en la Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar (SAGARPA, 1993).

ELISA

La ELISA indirecta involucra el uso de un antígeno de detección adherido a pozos en una microplaca, después de aplicar un reactivo de bloqueo para reducir las uniones inespecíficas, se colocan las muestras para análisis en los pozos. Los anticuerpos unidos en la muestra son detectados por un conjugado enzimático. La ELISA puede desarrollarse en varios formatos, de forma que pueda detectar tanto antígenos como anticuerpos, entre ellas se encuentran la ELISA directa, indirecta, sándwich o de captura y competitiva (Figura 1). El uso de la adsorción pasiva de partículas se puede llevar a cabo en placas de titulación de 96 pozos la cuales se encuentran disponibles de forma comercial, así como, el equipo adecuado para una manipulación sencilla y disponibilidad de los reactivos. Esto permite el uso de volúmenes pequeños y le da a la ELISA el potencial de manejar grandes cantidades de muestras rápidamente. El resultado de una ELISA es una reacción de color que puede ser observada a simple vista y leída rápidamente usando un espectrofotómetro con diseño multicanal. Esto permite que se puedan almacenar los datos y analizarlos estadísticamente.

Para el desarrollo de ELISAs se han utilizado una gran variedad de antígenos de *Salmonella* incluyendo LPS, flagelo, fimbria SEF14 y preparaciones crudas de antígeno.

(Barrow 1994, Beumer *et al.* 1991, Jouy *et al.* 2005) Debido a la persistencia de la respuesta humoral las ELISAs basadas en detectar IgG tienen el mayor potencial de indicar el estado infeccioso de un individuo.

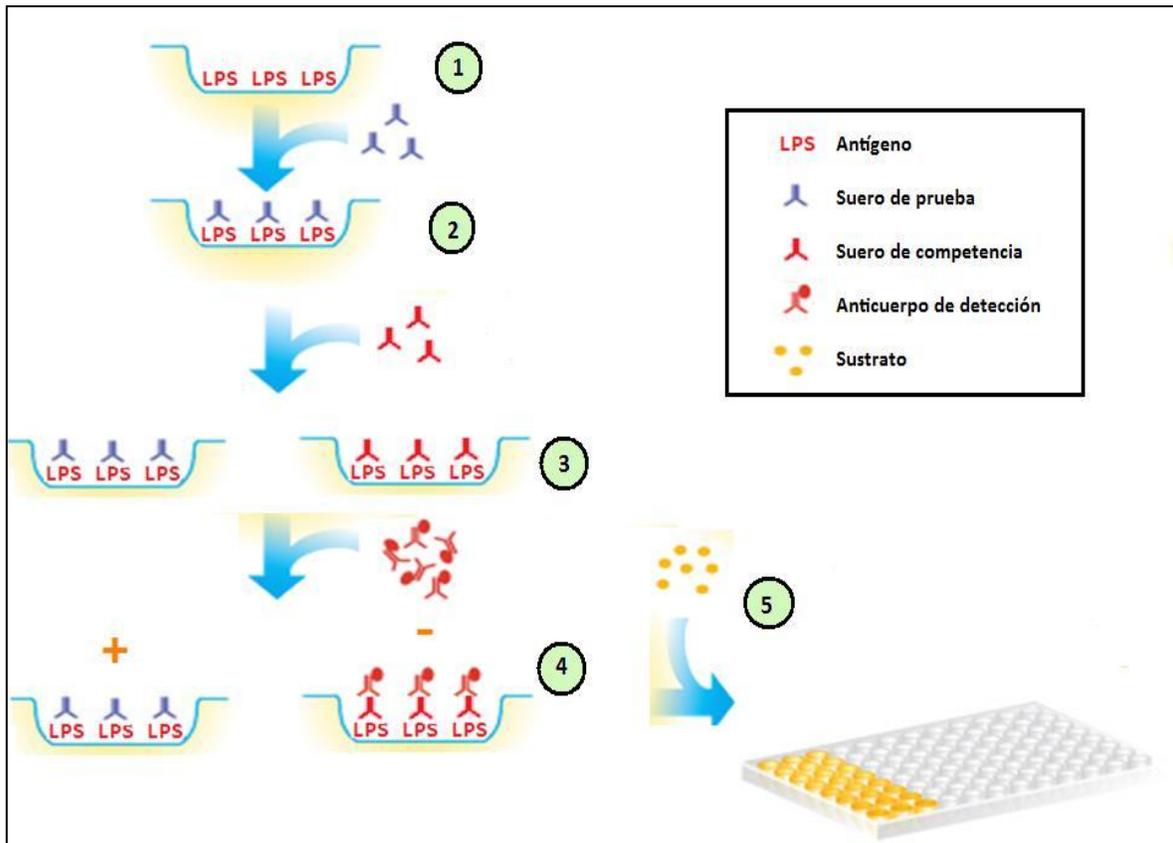


Figura 1. Esquema de una ELISA Competitiva. (1) El primer paso para la ELISA es la sensibilización de los micropozos con el antígeno (LPS) después de un periodo de incubación se realiza un lavado y posteriormente un bloqueo de los sitios libres, (2) Se agrega al pozo una cantidad del suero de prueba, se deja incubar y se lava, (3) se agrega el suero de competencia., se incuba y se lava; (4) se agrega el anticuerpo secundario o de detección que reacciona contra los anticuerpos del suero de competencia pero no contra el suero de prueba, en el caso de que los anticuerpos en el suero de prueba se unan al antígeno ocupa los espacios en la placa inhibiendo el desarrollo de color (5). En esta prueba en particular la intensidad de color desarrollada es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos en el suero de prueba.

Sensibilidad y Especificidad

Los factores que influyen sobre la capacidad del resultado del ensayo para revelar con exactitud el estado del hospedero con respecto al analizable o la infección en cuestión son: la sensibilidad del diagnóstico (SnD), la especificidad de diagnóstico (EspD) y la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada. La SnD y EspD se calculan a partir de los resultados experimentales que depare la aplicación de un ensayo a muestras de animales de referencia. La medida en que esos animales de referencia sean representativos de todas las variables ligadas al hospedero o al entorno de la población que el ensayo pretende estudiar tiene una influencia decisiva sobre la exactitud con la que luego podrá interpretarse un resultado. (Jacobson, 1998; Pita y Pértegas, 2003)

La sensibilidad del diagnóstico se define como la proporción de animales infectados que dan un resultado positivo al ensayo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del ensayo para detectar la enfermedad, también se le conoce como “fracción de verdaderos positivos”.

La especificidad de diagnóstico, es la proporción de animales no infectados que dan resultado negativo; de los animales de referencia no infectados que dan un resultado positivo, se dirá que arrojan falsos resultados positivos, también se le conoce como “fracción de verdaderos negativos”. El número y el origen de las muestras utilizadas para deducir ambos parámetros revisten una importancia capital para el correcto desarrollo de un ensayo. Conseguir que un resultado positivo o negativo permita inferir con exactitud la condición de un animal respecto a la infección en estudio constituye un objetivo básico del proceso de validación de un ensayo. Esa capacidad no depende únicamente de que el ensayo posea una exactitud y una precisión elevadas y de una cuidadosa estimación de su SnD y su EspD, sino que depende también en buena medida de la prevalencia de la infección en la población. La falta de una estimación actualizada de la prevalencia de la enfermedad en esa población compromete seriamente la interpretación de un resultado tanto positivo como negativo. (Jacobson, 1998; Pita y Pértegas, 2003)

Salud Pública

En la actualidad, la salmonelosis se considera una de las zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados, debido a la contaminación de alimentos de origen

animal. La propagación de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium va en aumento a partir de la segunda mitad del siglo XX, cuando ocurrieron dos cambios mundiales en la epidemiología de la salmonelosis: el surgimiento de infecciones en humanos por *Salmonella* Enteritidis, y la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de *Salmonella* Typhimurium (Gutierrez-Castillo *et al.* 2008). La importancia de la salmonelosis ha aumentado debido a su distribución mundial, la gran cantidad de serovariedades asociadas a enfermedad, el amplio rango de hospederos, la patogénesis compleja y epizootiología complicada involucrando seres humanos, animales y ambiente. (Gopee *et al.* 2000)

Las infecciones por *Salmonella* pueden ser transmitidas en varias formas, y la importancia de los diferentes modos de transmisión varía con la serovariedad involucrada, patrones alimenticios y conducta, y prácticas de manejo. El mayor factor de riesgo para las aves rapaces en cautiverio es cuando la alimentación consiste en presas vivas o recién muertas como palomas domésticas, codornices o pollos de un día. (Wernery *et al.* 1998, Sykes *et al.* 1981, Höfle *et al.* 1998). Las bacterias aisladas en aves de cautiverio varía de acuerdo con la alimentación ofrecida, Bangert *et al.* 1988, encuentra diferencias en aislamientos hechos en aves alimentadas con pollo y aves alimentadas con otros animales. En este estudio la mayor parte de las aves trabajadas eran alimentadas con pollo crudo, así que es posible que esta sea una fuente importante de *Salmonella* en estas aves. Jamshidi *et al.* (2009), encontró una frecuencia de 8.3% para *Salmonella* sp. y un 1.3% para *S.* Typhimurium en canales de pollo por medio de PCR, asumiendo que exista una frecuencia similar en las canales con las que se alimenta a estas aves, lo cual representa un riesgo alto para esta población. Dada la frecuencia de animales positivos a *Salmonella* sp. y el alto grado de contacto requerido para rehabilitar o tratar estas aves, se hace posible la transmisión de *Salmonella* de estos animales a seres humanos que se encuentran en contacto estrecho.

La Salmonelosis califica como una enfermedad emergente, porque su prevalencia en las poblaciones de aves silvestres parece haber aumentado considerablemente en los últimos 40 años como consecuencia de la alimentación artificial por el ser humano. (Tizard, 2004) Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en

la práctica del manejo de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos. Estos cambios han tenido como consecuencia nuevos problemas en la higiene de los alimentos al originar una fácil diseminación de *Salmonella* así como de otros gérmenes patógenos en los alimentos. (Tauxe, 1997)

Antecedentes

Salmonella en aves rapaces

Salmonella se ha aislado en aves rapaces es de vida libre y cautiverio, tanto de individuos sanos como enfermos. La importancia de *Salmonella* en aves rapaces es controversial. La severidad de la enfermedad puede variar por varios factores como: serovariedad implicada, edad, estado inmune del hospedero, contaminación ambiental, higiene en las presas en el caso de aves en cautiverio, entre otros. En aves rapaces y carroñeras ocurre el ciclo más simple de la salmonelosis aviar donde se adquiere la bacteria por ingestión de presas contaminadas con la bacteria (Tizard, 2004), por lo que las serovariedades aisladas en aves rapaces y carroñeras pueden indicar la ingestión de *Salmonella* a partir de una presa infectada, siendo la fuente principal de exposición a este patógeno.

Existen muy pocos reportes sobre brotes epizoóticos de *Salmonella* en aves rapaces entre ellos, Sykes 1981, reporta un caso en un *Falco peregrinus* en un centro de reproducción el cual mostró pérdida de peso, diarrea verde brillante, debilidad, alas caídas, anorexia, se encontraba postrado sobre el esternón, con las plumas erizadas y disnea. En la necropsia la porción caudal del intestino delgado y colon presentaron heces verdosas brillantes, el hígado se mostró aumentado de tamaño y con múltiples focos necróticos blanquecinos de 0.5 a 1mm de diámetro, los pulmones estaban moderadamente congestionados y se observaron varias masas necróticas por debajo de la superficie dorsal de la pleura. Los hallazgos histopatológicos incluyeron: hígado con necrosis licuefactiva multifocal, infiltración moderada de heterófilos, grupos de bastones Gram negativos en citoplasma de células Kupfer, congestión pulmonar, bronconeumonía multifocal. Las condiciones de estrés a las que fue sometido en halcón parecieron desencadenar un cuadro de infección latente.

Höfle 1998 también reporta Salmonelosis en *Aquila pennata* y *Aquila heliata* en vida libre, donde la mayoría de las aves con condiciones patológicas fueron menores a dos meses. En la necropsia se observó emaciación, tricomoniasis esofágica con obstrucción parcial del esófago, hepatomegalia, esplenomegalia y pericarditis fibrinosa. También se

observó hemorragia de la mucosa del proventrículo y enteritis fibrinosa a hemorrágica y pericarditis hemorrágica. Los hallazgos histopatológicos encontrados fueron: depleción linfocitaria en bazo, en hígado infiltración de células plasmáticas de moderada a difusa, el riñón se encontró congestionado, hemorrágico y con necrosis de túbulos contorneados distales.

Daoust 1978 reporta un caso de *S. Typhimurium* en un cuervo con osteomielitis y artritis, donde las lesiones microscópicas se limitaron al sistema esquelético y bazo, este último mostrando depleción de folículos linfoides e infiltración difusa de células plasmáticas en la pulpa roja. En la cápsula articular de la articulación del codo se observó infiltración de heterófilos, células mononucleares y fibroblastos, la reacción inflamatoria alcanzó el tejido subcutáneo. Los cartílagos articulares ulnares y humerales mostraron ligera degeneración hialina. Kocabiyik et al. 2006, reportan un caso de salmonelosis en *Bubo bubo* donde fue aislada *S. Enteritidis*. Kinne et al. 2008, también reportan un brote de salmonelosis en falconiformes con hallazgos similares.

En aves rapaces se ha aislado *Salmonella* en varias familias de aves vida libre y cautiverio pero las descripciones de casos clínicos son escasos. Las diferentes especies y edades pueden diferir incluso siendo infectados por la misma serovariedad, los individuos jóvenes de manera general muestran signos clínicos más severos que los adultos. La infección puede resultar en enfermedad hiperaguda con muerte súbita o puede resultar en un curso de infección más prologado que puede convertirse en septicémico o estar caracterizado por la presencia y persistencia de la bacteria en la sangre, o desarrollar una infección local en el individuo

Las lesiones postmortem observadas en otras aves silvestres pueden incluir degeneración o necrosis de músculo esquelético, gastroenteritis (ocasionalmente con úlceras y granulomas) esplenomegalia y hepatomegalia (con o sin focos blanquecinos diseminados), congestión biliar y nefropatía. Las infecciones crónicas usualmente causan pericarditis o epicarditis fibrinosa, formación de granulomas en hígado, bazo y riñón, y degeneración o inflamación de los ovarios o testículos. El contenido fibrinoso en colon también es un hallazgo común. Los cambios histopatológicos son inespecíficos con inflamación purulenta en órganos parenquimatosos. En aves con signos nerviosos se puede observar una leptomeningitis purulenta y formación de exudado en el espacio

subaracnoideo. La ocurrencia y los tipos de lesiones macroscópicas son muy variables dependiendo del curso de la infección, la virulencia de la cepa, y la resistencia del hospedero.

En 31 reportes de aislamientos de *Salmonella* en aves rapaces de 1967 a 2008, 15 reportan *S. Typhimurium*, 7 *S. Enteritidis*, 3 *S. Havana*, 3 *S. Arizona*, y otras serovariedades incluyendo Hadar, Newport, Amager, Montevideo, Muenchen, Thompson, entre otros. Los reportes de *Salmonella* en aves rapaces se muestran en la Tabla 1. Ningún estudio utilizó la prueba de aglutinación en placa y sólo un reporte utilizó una prueba comercial diseñado para aves de corral basado en una ELISA para diagnóstico de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Stenzel *et al.* 2008). Considerando que *Salmonella* en aves rapaces puede representar un problema potencial de salud para los individuos y para la salud pública, se requiere de pruebas que permitan la vigilancia completa de esta enfermedad.

ELISA en aves rapaces

En el caso de las aves rapaces no se han desarrollado pruebas de ELISA específicas que sirvan como modelo para otras especies y que formen parte del diagnóstico rutinario para *Salmonella Typhimurium*.

El obstáculo principal al estudiar y diagnosticar enfermedades infecciosas en aves silvestres es la falta de anticuerpos secundarios IgY específicos de forma comercial. Según Martínez *et al.* 2003, existen dos formas de solucionar este problema: 1) Desarrollar anticuerpos específicos contra las inmunoglobulinas de las especies de interés ó, 2) utilizar un anticuerpo de detección desarrollado contra gallina. La primera solución es económicamente costosa, además de tomar un largo periodo en desarrollar. La segunda solución parece ser la más práctica bajo el supuesto de que el anticuerpo desarrollado contra gallina reaccione adecuadamente contra el suero de otras especies aviares. Sin embargo, no todos los anticuerpos comerciales anti-IgY de gallina tienen reacción cruzada con otras especies aviares. Para superar estas limitaciones, el desarrollo de una ELISA “competitiva” parece ser el método más adecuado para el diagnóstico serológico de *Salmonella Typhimurium* (Figura 1).

Tabla 1. Reportes de *Salmonella* spp. en aves rapaces a nivel mundial.

País	Referencia
Japón	Asagi M et al., 1967
Estados Unidos	Locke y Newman, 1970
Canadá	Daoust PY, 1978
Estados Unidos	Sykes GP, 1981
Estados Unidos	Winsor DK et al., 1981
Estados Unidos	Kirkpatrick CE y Colvin BA, 1986
Estados Unidos	Kirkpatrick CE y Texler-Myren VP, 1986
Estados Unidos	Bangert et al., 1988
Emiratos Arabes Unidos	Zachariah R, 1996
España	García FJ et al., 1997
Canadá	Mikaelian I, 1997
Italia	Battisti A et al., 1998
Trinidad	Adesiyun AA et al., 1998
España y Portugal	Höfle U et al., 1998
Emiratos Árabes Unidos	Wernery et al., 1998
Trinidad	Gopee NV et al., 2000
Estados Unidos	Hudson RC et al., 2000
España	García de los Ríos JE et al., 2002
Noruega	Refsum T et al., 2002
Estados Unidos	Smith WA et al., 2002
Estados Unidos	Lambersky N et al., 2003
España	Reche MP et al., 2003
Arabia Saudita	Naldo JL y Samour JH, 2004
España	Millán J et al., 2004
Suecia	Palmgren et al., 2004
Emiratos Árabes Unidos	Samour JH, 2005
Turquía	Kocabiyik L et al., 2006
Estados Unidos	Jijón S et al., 2007
Japón	Kobayashi H et al., 2007
Estados Unidos	Saito KE et al., 2007
Polonia	Stenzel T et al., 2007
Emiratos Árabes Unidos	Kinne J et al., 2008

Hipótesis

Es posible el desarrollo de una técnica de ELISA Competitiva para el diagnóstico serológico de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium en aves rapaces, que sea de alta sensibilidad y especificidad.

Justificación

Las pruebas serológicas pueden ser de gran utilidad como métodos de control de las enfermedades, principalmente cuando no existe el uso de vacunación para su prevención, especialmente en este caso que se trata de una enfermedad zoonótica. La principal limitante en el diagnóstico serológico en aves silvestres es la falta de anticuerpos de detección específicos, el sistema de la ELISA competitiva resuelve esta limitación haciendo que la prueba se ajuste para su uso en múltiples especies.

Objetivo General

Desarrollar y evaluar una prueba de ELISA competitiva para el diagnóstico serológico de la salmonelosis en aves rapaces.

Objetivos particulares

1. Evaluar la reactividad de un conjugado comercial (Jackson ImmunoResearch ®) anti-IgY de gallina contra sueros obtenidos de aves rapaces para su utilización en la prueba de ELISA.
2. Obtener anticuerpos policlonales contra *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium a partir de gallinas ponedoras, en caso de que la afinidad del conjugado sea baja.
3. Estandarizar una prueba de ELISA competitiva para el diagnóstico serológico de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium en aves rapaces.
4. Determinar la presencia de anticuerpos contra *S. Typhimurium* en aves rapaces mantenidas en cautiverio.
5. Determinar la frecuencia de *Salmonella* sp. en aves rapaces en cautiverio mediante pruebas bacteriológicas y moleculares para utilizarlos como animales de referencia para la prueba.

Material y Métodos

Con el fin de obtener una batería de sueros se realizó un muestreo de aves rapaces en cautiverio del Centro de Conservación e Investigación de Vida Silvestre (CIVS) SEMARNAT en Los Reyes la Paz, Estado de México y el Zoológico San Juan de Aragón. Se obtuvo una muestra de sangre y un hisopo cloacal, la sangre se dejó coagular por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se refrigeró a 4°C para que se retrajera el coagulo y separar el suero por centrifugación a 700g por 10 minutos, se separó en alícuotas según la cantidad obtenida y se almacenó en congelación (-20° C) hasta su utilización, el hisopo se colocó en un tubo con medio de pre-enriquecimiento preparado con agua peptonada buferada pH 7.0, el cual se colocó en incubación a 37°C durante 24 h.

Con la ayuda de los médicos encargados de las aves, se realizó un examen clínico de ellas al momento de tomar las muestras de sangre.

1. Evaluar la afinidad de un conjugado comercial (Jackson ImmunoResearch) anti-IgY de gallina con sueros obtenidos de aves rapaces para su utilización en la prueba de ELISA

La evaluación de la reacción cruzada se realizó por tres métodos: Dot ELISA, Western Blot y ELISA.

Dot ELISA

Se colocaron 5 µl de suero de gallina, pavo, aguililla de Harris, halcón cola roja y aguililla negra sobre membranas de nitrocelulosa, se dejaron secar a temperatura ambiente. Después se bloquearon los sitios libres durante una hora con una solución de leche descremada en polvo al 5%, se lavaron con PBS-T 0.05% tres veces. Posteriormente se sumergieron en diferentes diluciones del conjugado durante una hora. Se lavaron 3 veces con PBS-T 0.05% y en seguida se agregaron 150 µl de la solución reveladora (alfa-cloro naftol 15mg, TBS 25ml, metanol 5 ml, peróxido de hidrógeno 50µl), se incubó 10 minutos

a temperatura ambiente. Se descartó la solución reveladora, se lavaron las membranas de nitrocelulosa con PBS y se dejaron secar a temperatura ambiente (Bárceñas, 1993).

Electroforesis

Se llevó a cabo la electroforesis de sueros mediante un sistema en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se utilizó un gel separador (12.5% gel, 0.375 M Tris, pH 8.8) y uno concentrador (4% gel, 0.125 M Tris, pH 6.8) con una solución amortiguadora de corrida (Tris 15g/L, glicina 72g/L, SDS 5g/L). Se utilizaron muestras de suero de gallina (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*) y aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*). Se colocaron 20 µl de suero en una dilución 1:40 en cada pozo, se colocó en uno el marcador de peso molecular y se dejó correr a 150 V con 120 mA hasta que las muestras penetraron en el gel de separación y posteriormente a 150V con 85 mA hasta que las muestras llegaron casi al final del gel. El corrimiento electroforético se realizó en condiciones reductoras, utilizando el buffer de carga para proteína (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol, 10% SDS, 1% azul de bromofenol) y buffer reductor (2-β-mercaptoetanol).

Western blot

Se realizó la transferencia de los geles del SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa usando un método de transferencia pasiva, colocando los geles entre dos membranas a donde fue transferida la proteína, aplicando 10 kg de peso durante 48 h. Posteriormente se retiraron las membranas y se procedió a bloquear los sitios libres con leche descremada al 5% durante 1 hora. Se colocó el conjugado anti-IgY de gallina (Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:200 y se colocó con la solución reveladora por 10 minutos.

ELISA

Se sensibilizaron las placas con diluciones de suero de diferentes especies de aves rapaces incluyendo sueros de gallina como control (+), pavo y pato a 37°C por 1h. Se lavaron los pozos tres veces con PBS-T y se reincubaron con el conjugado Jackson

ImmunoResearch anti-IgY de gallina en una dilución de 1:2500. Se lavaron los pozos nuevamente tres veces previa a la adición de 50 µl/pozo de la solución sustrato (ácido cítrico al 1%, NaPO₄ 0.1M, 0.4mg/ml de ortofenilendiamina (OPD), peróxido de hidrógeno al 0.03%) y se les dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Inmediatamente se agregó a cada pozo 50 µl de una solución de H₂SO₄ al 3M. Las placas se leyeron en un lector de ELISA a 492nm para observar las diferencias en el desarrollo de color.

2. Obtención de anticuerpos policlonales anti-*Salmonella* para su uso en una ELISA competitiva.

La obtención de anticuerpos específicos contra *Salmonella* Typhimurium se realizó en gallinas (*Gallus gallus*) a partir de suero y de la yema de huevo.

Extracción de LPS

Se realizó la extracción de LPS siguiendo la técnica descrita por Apicella (2008), utilizando una cepa de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028 donada por el laboratorio Diagnósticos Clínicos Veterinarios S.A. de C.V. México (DCL). La bacteria se cultivó por 24h a 37°C en 10 tubos con 5ml de caldo soya tripticaseína posteriormente se trasladó a un volumen de un litro del mismo caldo por 24h a 37°C, se centrifugó todo el caldo a 2500g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó el exceso de caldo con solución salina al 0.9%, se deshidrató con acetona y se molió en mortero hasta obtener un polvo fino. Se suspendieron 500mg del material en 15ml de solución de solubilización (Tris-HCl 10mM, SDS 2%, MgCl₂ 2mM, 2-mercaptoetanol 4%), se colocó en baño María a 65°C y se mezcló en Vortex hasta su completa solubilización. Se agregaron 100µg de proteinasa K (20mg/kg, Invitrogen) y se dejó incubando 1h a 65°C, posteriormente se colocó en baño maría a 37°C durante toda la noche. Se agregaron a la solución 2ml de acetato de sodio 3M y 30ml de etanol absoluto frío dejando precipitar el material a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 1500g por 15 min, se desechó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 9ml de agua destilada y se agregó 1ml de acetato de sodio 3M y se mezcló en Vortex, se agregaron nuevamente 20ml de etanol absoluto frío y se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. El precipitado se centrifugó otra vez a

1500g por 15 min y se resuspendió en 9ml de Tris-Cl (pH 7.4), se colocó en baño María a 65°C, se agregó un volumen igual de fenol al 90% precalentado a 65°C y se dejó asentar por 15 min. Posteriormente la muestra se colocó en hielo y se enfrió rápidamente hasta 4°C. Se centrifugó a 2500g durante 15 min, se removió la fase acuosa y se volvió a extraer la capa fenólica con un volumen igual de agua destilada. La solución se sometió a diálisis con agua destilada realizando cambios constantes aproximadamente cada 4 horas durante 2 días. Se corroboró la presencia de lipopolisacárido por medio de una prueba de aglutinación. La concentración final en la solución fue de 33.3mg de bacterias deshidratadas/ml. La solución se almacenó en refrigeración para su posterior uso.

Esquema de inmunización

Se utilizaron 8 gallinas las cuales se dividieron en 3 grupos: Grupo 1: 3 gallinas inoculadas con 1ml (33.3mg) del extracto de LPS de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), Grupo 2: 3 gallinas inoculadas con 1ml extracto de LPS de *Escherichia coli* O26:H y el Grupo 3 o grupo control con dos gallinas inoculadas con caseína y lactosa (ProteiZoo®). La solución de LPS se emulsificó con adyuvante completo de Freund para la primera inoculación, y con adyuvante incompleto de Freund para las tres siguientes inoculaciones, ambos adyuvantes en una proporción de 1:5 ó 0.25ml de adyuvante y 1ml de extracto de LPS. Se inyectaron por vía intramuscular gallinas de la raza Rhode Island de aproximadamente 23 semanas de edad en cuatro sitios diferentes (0.25mL por sitio) de los músculos pectorales. Las inmunizaciones de refuerzo se realizaron en los días 10, 20 y 30 después de la inmunización inicial. Por cada gallina se hicieron grupos de 3 huevos antes y después de cada inoculación para realizar la purificación de las inmunoglobulinas. También se tomó una muestra de suero de cada gallina antes de cada inoculación para analizar la respuesta de anticuerpos séricos y compararlos con los de la yema de huevo. Los huevos fueron almacenados a 4°C hasta su utilización. (Sunwoo *et al.* 2006)

Aislamiento de la fracción hidrosoluble con IgY de la yema de huevo

La fracción hidrosoluble que contiene a la IgY se preparó a partir de yema de huevo usando el método de dilución en agua desarrollados por Akita y Nakai (1992). La yema del huevo se separó físicamente de la clara y se limpió con toallas de papel para eliminar la adhesión de clara de huevo. La membrana se perforó y a la yema se le permitió fluir en una probeta sin la membrana. La yema de huevo se mezcló primero con suavidad, con 8 volúmenes de agua destilada fría (pH 4.0) para evitar posibles interferencias de los glóbulos de la grasa de la yema del huevo, debido a la presencia de altas concentraciones de ácido. Se agregó agua destilada acidificada fría (pH 2.0), para hacer la dilución final de 1:10. Después de mezclar bien, se ajustó a un pH de 5.0 a 5.2 y se incubaron a 4°C durante 12 h. La fracción hidrosoluble se obtuvo por centrifugación a 700g a 4°C durante 20 min y se almacenó a -20°C hasta su análisis. (Sunwoo *et al.* 2006)

Purificación de la IgY

La IgY fue purificada por precipitación con sulfato de amonio (40%), (Ko y Anh, 2007). Las fracciones precipitadas (1 ml) se analizaron para la actividad de IgY por ELISA y para la concentración de proteína. (Sunwoo *et al.* 2006)

3. Estandarizar una prueba de ELISA para el diagnóstico serológico de *Salmonella* sp. en aves rapaces.

Se utilizó el LPS extraído de una cepa de referencia de *Salmonella* Typhimurium (33.3mg/ml bacterias deshidratadas). Como controles se utilizaron suero (+) de gallinas previamente inmunizadas contra el LPS de *Salmonella* Typhimurium y suero (-) de gallinas inoculadas con *E.coli* y del grupo control. Se utilizaron placas con 96 pozos (8 x 12) de fondo plano (Costar®). Se utilizó Buffer Fosfatos con Tween al 0.05% (PBS-T 0.05%), pH 7.4, para todas las diluciones de reactivos. La inmovilización de los antígenos se realizó colocando un volumen de 50µL de la solución de LPS y se dejó en refrigeración a 4°C durante la noche. Se lavaron los antígenos no unidos al pozo con PBS-T tres veces. Se

bloquearon los sitios libres con albúmina bovina al 3% (BSA 3%). Se utilizó una solución de ácido cítrico al 1% e hidróxido de sodio al 0.1M, 0.4mg/ml de OPD, 15 µl de H₂O₂ al 30% como sustrato. (Coligan, 2005) Se tomó el suero de las tres gallinas inoculadas con el LPS de *Salmonella* Typhimurium y se realizó una mezcla, la cual, se utilizó como suero positivo (+), mientras que los sueros de gallinas del grupo control se utilizaron en mezcla como suero negativo (-).

4. Presencia de anticuerpos en aves rapaces mantenidas en cautiverio

El análisis de los datos se realizó de acuerdo a Crowther, 1995, como “*spot testing*”. Se tomaron los valores promedio del ruido de fondo y se restó a todos los pozos, posteriormente se tomó la media del 100% de la reacción (control positivo) y se expresaron los valores de absorbancia como un porcentaje del rango 0 a la media del control 100%. Se tomó la media de los sueros problema y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de competencia en cada pozo} = 100 - [(Abs \text{ Suero Problema} / Abs \text{ Suero Control}) \times 100]$$

Los valores de cada suero se compararon con el antisuero estándar de competencia (Suero polivalente de conejo anti-*Salmonella* Biorad®). Para la evaluación de “*spot testing*” los sueros negativos fueron evaluados como controles. Varios sueros fueron incluidos en una prueba, se evaluó su valor promedio de competencia y su variación. Los sueros que dieron valores más altos de competencia en las mismas condiciones, 2 desviaciones estándar de la media del suero negativo fueron establecidos como positivos.

5. Determinar la frecuencia de *Salmonella* sp. en aves rapaces en cautiverio mediante aislamiento bacteriano y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Aislamiento bacteriano

El hisopo cloacal, se colocó en 1ml de agua peptonada buferada (pH 7.0) como medio de transporte y pre-enriquecimiento, se incubó 24h a 37°C, posteriormente se tomaron 100µl para inocular en 10mL de medio de enriquecimiento Rappaport Vassiliadis en una relación de 1:100 y se dejó incubando a 41.5°C por 36h, para posteriormente

sembrar en los medios selectivos Verde Brillante y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). Se seleccionaron las colonias con morfología característica y se realizaron las pruebas bioquímicas de rutina (LIA, MIO, TSI, Citrato, Urea, Catalasa, Oxidasa, Tinción de Gram) para identificar a las bacterias del género *Salmonella*.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La extracción de DNA se realizó mediante el procedimiento descrito por Oliveira *et al.* 2002. Se centrifugaron a 5000g durante 4 minutos y el pellet bacteriano se resuspendió en 500 µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, SDS 10%) con 1,25 µl de proteinasa K (20 mg / ml), la solución se incubó a 55°C durante 2 horas. Se añadió un volumen de 500 µl de fenol-cloroformo (1:1), pH 8.0, se mezcló en Vortex por 15 segundos antes de centrifugar a 1500g durante 4 min. El ADN se precipitó añadiendo 125 µl de acetato de amonio 7.5M y 375 µl de isopropanol frío incubando a -20°C durante 30 min. Se centrifugó a 1500g durante 10 min, tras lo cual el sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol frío al 80%, el precipitado de ADN se resuspendió en 50 µl de Tris-EDTA (TE) y se almacenó a -20°C.

Se utilizaron dos pares de iniciadores (Tabla 2), específicos para el gen *invA* de *Salmonella sp.* 139-141 (Rahn *et al.*, 1992) y para el gen *fliC* de *Salmonella* Typhimurium Fli15-Typ04 (Soumet *et al.*, 1999). La amplificación se hizo en un volumen total de 25 µL conteniendo buffer para PCR, 200mM de cada dNTP, 2mM de MgCl₂, 0.1 µM de cada iniciador, 2µl de DNA y 1 U de Taq polimerasa. El programa que se utilizó para el gen *invA* fue a 94°C 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C 1 segundo; 55°C 1 segundo, 72 °C 21 segundos y por último 72 °C 7 minutos y para el gen *fliC* fueron 94°C 5 minutos, 52°C 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C 45 segundos; 50°C 45 segundos, 72 °C 45 segundos y por último 72 °C 10 minutos. Se realizó un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (Sigma®). Los geles se observaron en un Analizador de imágenes (Syngene) y se tomaron fotografías de los resultados. (Oliveira *et al.*, 2002). En todas las reacciones de PCR se utilizó *S. Typhimurium* como control positivo y *Escherichia coli* como control negativo.

Tabla 2. *Iniciadores* utilizados para la amplificación de *Salmonella* sp. y *S. Typhimurium*.

<i>Iniciador</i>	Gen	Longitud	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplificado (bp)
139 (1)	<i>invA</i>	26	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	284
141 (1)	<i>invA</i>	22	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
Fli15 (2)	<i>fliC</i>	22	CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT	620
Typ04 (2)	<i>fliC</i>	16	ACTGGTAAAGATGGCT	

(1) *Salmonella* sp. (Oliveira *et al.* 2002)

(2) *Salmonella* Typhimurium (Oliveira *et al.* 2002)

Serotipificación

Las cepas aisladas sospechosas de ser *Salmonella* sp. fueron enviadas al Laboratorio DCL para su evaluación mediante serología utilizando sueros polivalentes (A-I) y sueros monovalentes (B,C,D) para identificación de antígenos somáticos. Así mismo, las cepas fueron evaluadas por el Sistema API.

Sensibilidad antimicrobiana

Cada aislamiento se sembró en caldo soya tripticaseína y se dejó incubar a 37° C por 24 h. Posteriormente cada una fue sembrada sobre agar soya tripticaseína, se colocaron 8 sensidiscos comerciales de antibióticos en una caja y en la otra 9, teniendo en total 17 sensidiscos para cada cepa, los antibióticos empleados fueron; ampicilina 10µg (AMP), amikacina 30µg (AK), cefalotina sódica 30µg (CF), ceftriaxona sódica 30µg (CRO), cloramfenicol 30µg (CL), cloxacilina benzatínica 20µg (CB), cloxacilina sódica 20µg (CX), dihidroestreptomicina 10µg (DS), enrofloxacin 5µg (ENR), adipato de espiramicina 10µg (EA), estreptomicina 10µg (SM), gentamicina 10µg (GE), lincomicina 2µg (LM),

neomicina 30µg (NEO), penicilina benzatínica 20U (PB), tetraciclina 30µg (TT) y trimetoprim/sulfametoxazol 25µg (STX). Se dejaron incubar por 24 h a 37° C y posteriormente se midieron los halos de inhibición de cada antibiótico, fueron interpretados según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI antes conocido como NCCLS) (CLSI, 2007).

6. Correlación de los resultados bacteriológicos con los resultados de la prueba de ELISA para determinar parámetros de rendimiento de ésta.

Para el cálculo de la sensibilidad (SnD) y la especificidad (EspD) se hizo uso de una tabla de cuatro celdas (2 x 2) que relaciona los datos concluyentes de carácter positivo y negativo que arrojó la ELISA con el conocimiento que se tiene de la ausencia o presencia de la infección (aislamiento bacteriano) en cada animal. Se utilizó como modelo la Tabla 3, modificada a partir de Jacobson, 1998. Se realizaron dos cálculos del rendimiento de la prueba, una para los resultados con *Salmonella* sp. y otro para *Salmonella* Typhimurium y serovariedades con posible reacción cruzada.

Tabla 3. Cálculo de sensibilidad diagnóstica y la especificidad diagnóstica con ayuda de una tabla 2 x 2 que relaciona la condición de cada animal respecto a la infección con los resultados del ensayo para los animales de referencia infectados y los no infectados.

		Animales de referencia de condición conocida respecto a la infección	
		Infectados	No Infectados
Resultados del ensayo	Positivos	Verdaderos positivos A	Falsos positivos B
	Negativos	Falsos negativos C	Verdaderos negativos D
		Sensibilidad diagnóstica $\frac{A}{A + C}$	Especificidad diagnóstica $\frac{D}{D + B}$
		Valor predictivo positivo $\frac{A}{A + B}$	Valor predictivo negativo $\frac{D}{D + C}$

Resultados

Muestreo

Se realizó el muestreo entre el 22 de Julio y 11 de Septiembre de 2010. Se tomaron muestras de 76 individuos en total, 6 individuos en el Zoológico San Juan de Aragón y 69 en el CIVS SEMARNAT Los Reyes La Paz, comprendiendo 12 especies distintas, 10 incluidas en el orden Falconiformes (aves rapaces diurnas) y 2 especies en el orden Strigiformes (aves rapaces nocturnas) (Tabla 4). La mayoría de los individuos se ubican en 4 especies: aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*), halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*), huho real (*Bubo virginianus*), y Caracara (*Caracara plancus*), en orden descendente, las especies anteriores representaron el 82.6% (62/75) de la población de las aves muestreadas.

Todas las aves muestreadas se encontraron clínicamente sanas.

Tabla 4. Especies aviares trabajadas durante el periodo de muestreo.

Familia	Especie	Nombre común	Número de Individuos
Accipitridae	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Aguililla de Harris	32
Accipitridae	<i>Buteo jamaicensis</i>	Halcón Cola Roja	14
Strigidae	<i>Bubo virginianus</i>	Buho Real	9
Falconidae	<i>Caracara plancus</i>	Caracara	8
Tytonidae	<i>Tyto alba</i>	Lechuza de campanario	3
Accipitridae	<i>Buteo lagopus</i>	Aguililla Ártica	3
Accipitridae	<i>Buteo swainsoni</i>	Halcon de Swainson	2
Accipitridae	<i>Buteo magnirostris</i>	Aguila Caminera	1
Accipitridae	<i>Buteo nitidus</i>	Halcón Gris	1
Accipitridae	<i>Buteo regalis</i>	Aguililla Real	1
Accipitridae	<i>Buteogallus athracinus</i>	Aguililla Negra	1
Falconidae	<i>Falco peregrinus</i>	Halcón Peregrino	1
Total	12		76

Reacción del conjugado Anti-IgY de gallina

En la Figura 2 se pueden observar los resultados de la técnica de Dot ELISA para evaluar la reactividad del conjugado comercial anti-IgY de gallina (Jackson Antibodies®) contra sueros completos de diferentes especies aviarias. A una dilución del conjugado de 1:200 se observó una reacción intensa con el suero de gallina y pavo, para las especies de aves rapaces se notó una reacción débil. A una dilución de 1:400 el suero de gallina y el pavo dieron una reacción intensa, pero para el caso de la aguililla de Harris y el halcón cola roja la reacción se debilitó significativamente.

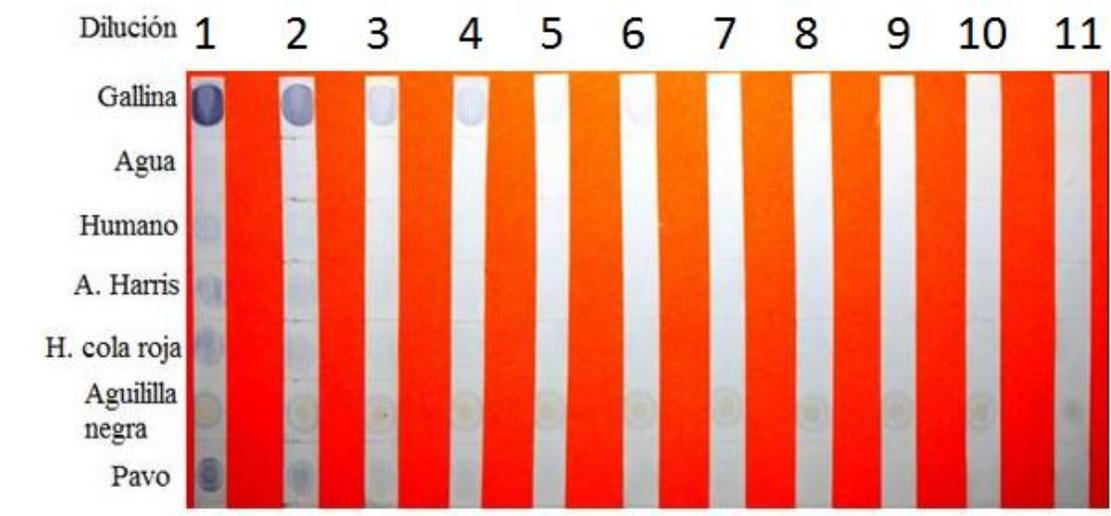


Figura 2. Reacción de Inmunoperoxidasa con Anti-IgY de gallina en Dot ELISA. Muestras de suero de aves: gallina (*Gallus gallus*), agua, humano (control (-)), aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*), halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*), aguililla negra (*Buteogallus anthracinus*) y pavo (*Meleagris gallopavo*). Diluciones del conjugado: (1) 1:200, (2) 1:400, (3) 1:800, (4) 1:1600, (5) 1:2000, (6) 1:4000, (7) 1:5000, (8) 1:8000, (9) 1:10000, (10) 1: 20000, (11) 1: 40000.

Se realizaron varios análisis en SDS-PAGE (Figura 3) y Western Blot (Figura 4) modificando la dilución del suero (sin dilución, 1:20, 1:40, 1:200, 1:400), en condiciones reductoras. Podemos observar en el carril 5 la reacción del conjugado con el suero de pavo, se observan dos bandas que corresponden a las cadenas pesadas (75-80 kDa) y ligeras (22-30 kDa) de las gammaglobulinas, en el carril 1 se observó una reacción mucho más

marcada con el suero de gallina, incluso llegan a reaccionar otras proteínas séricas. En los carriles 3 y 4 no se observa ninguna banda, indicando que el conjugado Jackson ImmunoResearch anti-IgY de gallina tiene una reactividad baja contra los sueros de aguililla de Harris y halcón cola roja.

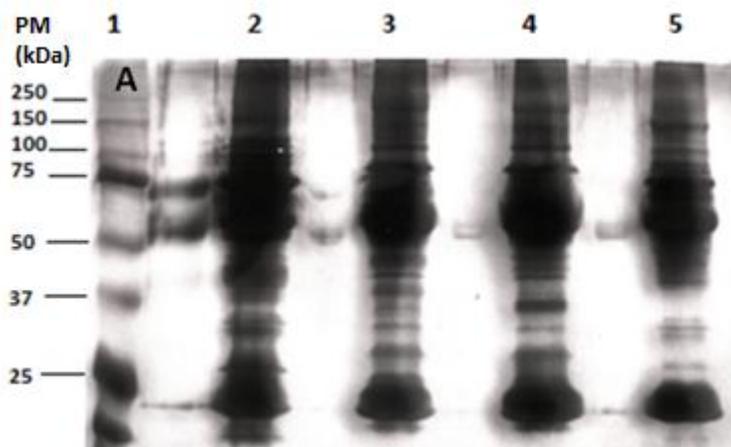


Figura 3. Electroforesis de los sueros de diversas especies de aves mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. SDS-PAGE tinción con nitrato de plata. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Gallina, Carril 3: aguililla de Harris, Carril 4: halcón cola roja, Carril 5: Pavo. Todos los sueros fueron diluidos 1:40.

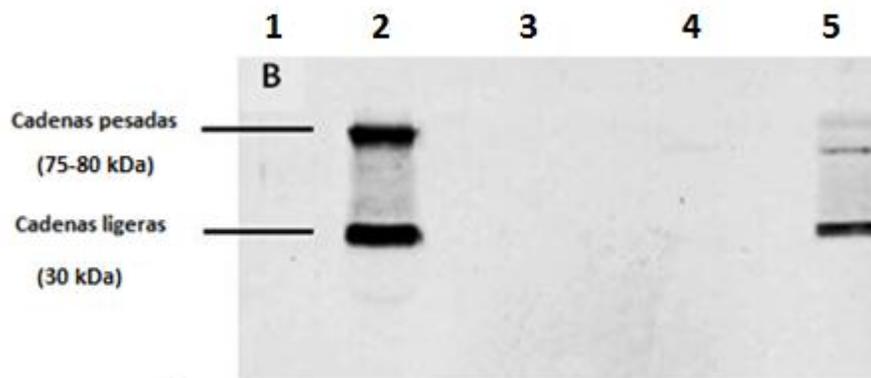


Figura 4. Inmunotransferencia del corrimiento electroforético de los sueros revelados con anti-IgY peroxidado Western Blot correspondiente a Figura 3 utilizando anti-IgY de gallina. La ubicación de las dos bandas corresponde a las cadenas pesadas y cadenas ligeras de la IgY. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Gallina, Carril 3: Aguililla de Harris, Carril 4: Halcón Cola Roja, Carril 5: Pavo. Todos los sueros fueron diluidos 1:40.

Para la ELISA indirecta los resultados muestran una marcada disminución de la reacción contra las especies de aves rapaces y el pato, sin embargo tuvo reacción intensa para la gallina y el pavo (Figura 5).

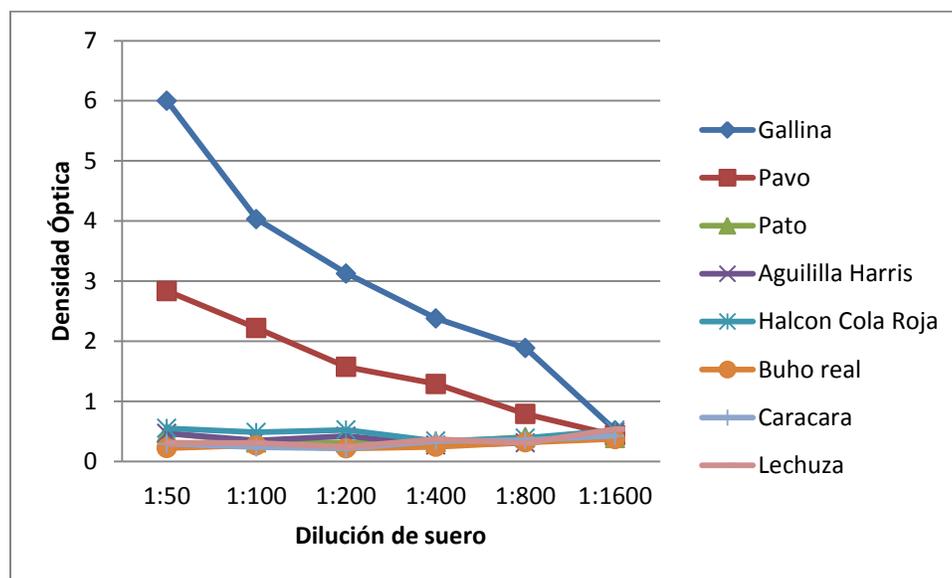


Figura 5. Reactividad del conjugado anti-IgY con sueros de diferentes especies en ELISA. Resultados mostrando la baja reactividad del conjugado con especies diferentes a la que fue diseñado, el pavo muestra una reacción moderada. La dilución del conjugado utilizada fue de 1:2500.

Esquema de inmunización

La respuesta a las inoculaciones con extracto de LPS de *S. Typhimurium* provocó un aumento de anticuerpos específicos en suero (Figura 6), el nivel de la respuesta observada fue en aumento después de cada inmunización. En las gallinas inmunizadas con extracto de LPS de *E. coli* se observó que antes del inicio del esquema de inmunización mostraban niveles altos de anticuerpos contra el extracto de LPS de *S. Typhimurium* así como una de las gallinas del grupo *Salmonella* y una de las gallinas del grupo control, las cuales se decidió retirarlas del experimento. En la última fecha del calendario de inmunización dos gallinas se encontraron muertas horas después, una del grupo *Salmonella* y una del grupo *E. coli*. Se midió la respuesta con ELISA en cada fecha y los sueros con

respuesta elevada con respecto al control se mezclaron para su uso como suero positivo en la ELISA Competitiva.

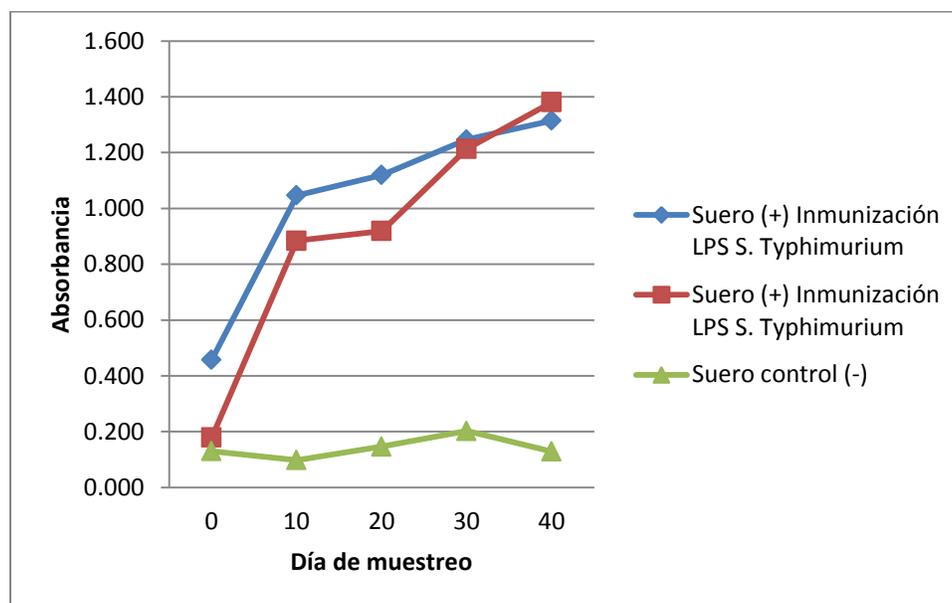


Figura 6. ELISA indirecta mostrando el efecto de las inoculaciones con extracto de LPS de *Salmonella* Typhimurium. Muestra la alta inmunogenicidad del LPS utilizado como antígeno. Los sueros de las gallinas inoculadas con LPS de *S. Typhimurium* fueron mezclados y utilizados como suero control (+) en la prueba de ELISA competitiva. El suero de la gallina perteneciente al grupo control no mostró una reacción contra el extracto de LPS de *Salmonella* Typhimurium con el que se sensibilizaron las placas. Muestra la alta inmunogenicidad del LPS utilizado como antígeno.

IgY

Se realizó la extracción de inmunoglobulinas a partir de la yema de los huevos de las gallinas inoculadas con extracto de LPS y se comparó con los niveles observados en suero por medio del ELISA (Figura 7). Los resultados indican una reacción mucho menor a la observada en suero, incluso utilizando una dilución mucho menor. Podemos observar que la iniciadora dilución del suero (1:100) da el doble de lectura que la iniciadora dilución de la IgY de yema (1:5). Por esta razón se decidió continuar utilizando el suero como control para la prueba de ELISA y no el extracto de inmunoglobulinas de yema.

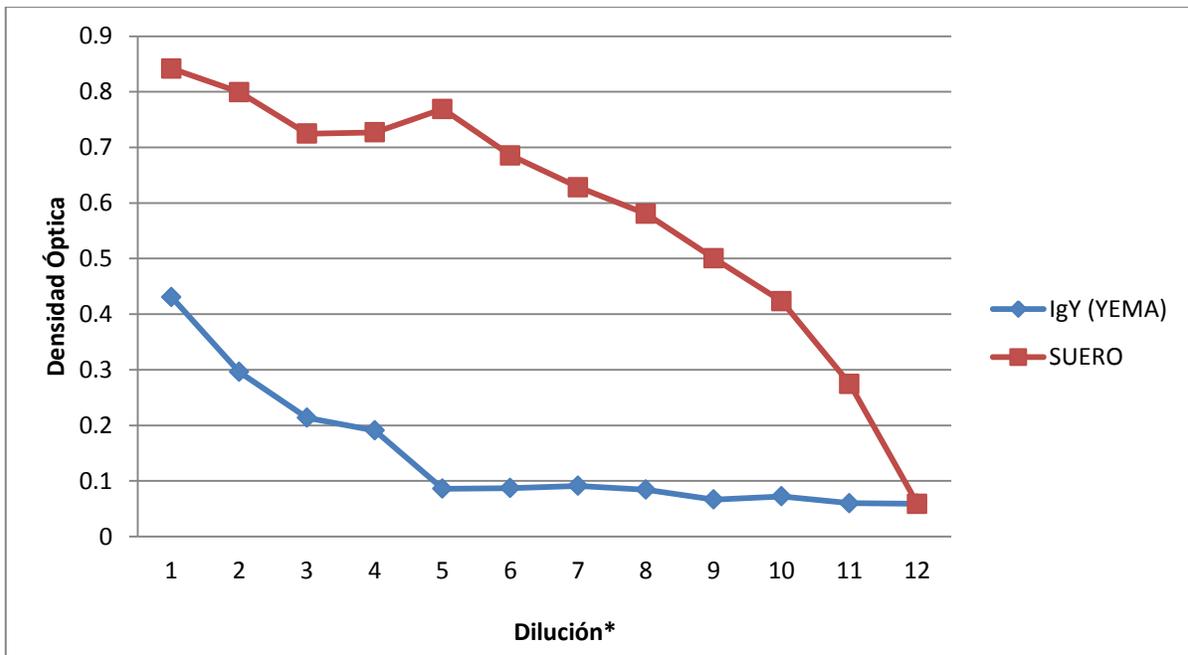


Figura 7. Comparación de la reacción en ELISA del suero control y el extracto de IgY de yema.

* La dilución inicial para el extrato de IgY fue de 1:5, mientras que la del suero fue de 1:100. Posteriormente se realizaron diluciones dobles seriadas. En la siguiente tabla se muestran emparejadas las diluciones hechas en la figura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IgY (yema)	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Suero	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400	1:204800

Estandarización de la ELISA

De acuerdo con los resultados observados en la estandarización de la ELISA indirecta por medio de titulación en “tablero de ajedrez” (Figura 8) el extracto de LPS debe ser diluido 1:10, el suero control positivo en una dilución 1:100 y el conjugado anti-IgY de

gallina 1:7500 para observar valores positivos por encima de 1.0 y debajo de 2.0, y para valores negativos por debajo de 0.2.

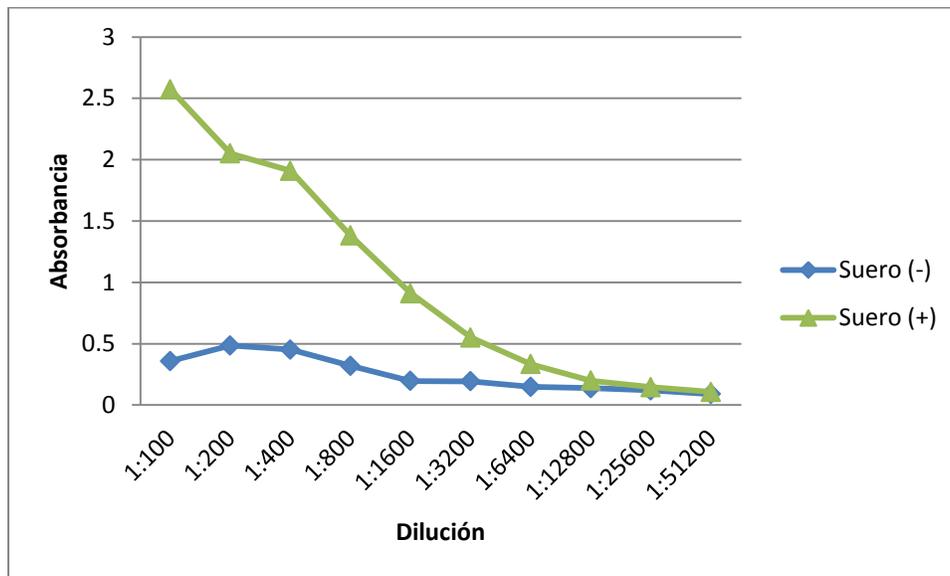


Figura 8. Efecto de la dilución de los sueros de gallina sobre la reacción de la ELISA indirecta. Se sensibilizaron las placas con extracto de LPS de *Salmonella Typhimurium*.

Suero (+): mezcla de sueros de gallinas con alta reacción a la inmunización con el mismo antígeno. Suero (-): mezcla de sueros de gallinas inoculadas con caseína y lactosa con baja reacción al antígeno

ELISA Competitiva

El valor de corte que se tomó para designar a los animales como positivos o negativos a anticuerpos contra *Salmonella Typhimurium* fue de 12.6% de inhibición de acuerdo al método de Crowther, 2005 previamente descrito (Tabla 5 y Figura 9). El suero control (BioRad) fue utilizado en una dilución 1:2 y se utilizó en todas las placas como control de la reacción, dando un promedio de 82.4% de inhibición. La prueba dio como positivos a 21 individuos de los 76 muestreados correspondiendo a 27.6% (Tabla 6 y Figura 9).

Tabla 5. Resultado de ELISA competitiva mostrando los valores de inhibición obtenidos en los sueros de las aves rapaces.

	Número de animales	Promedio (%)	Desviación Estándar (%)
Controles	29	5.56	3.36
Positivos	21	17.83	4.77
Negativos	55	6.00	4.98

Tabla 6. Resultado ELISA competitiva en la población de aves rapaces muestreadas

Especie	Cantidad	Frecuencia (%)
Aguililla de Harris	10/32	31.25
Buho Real	2/9	22.2
Caracara	2/8	25
Lechuza de campanario	2/3	66.6
Aguililla Ártica	2/3	66.6
Halcón Cola roja	1/14	7.2
Aguililla real	1/1	100
Caminera	1/1	100
Total	21/76*	27.6

*Los animales se establecieron como positivos a anticuerpos contra *Salmonella* Typhimurium cuando el porcentaje de inhibición dado en la ELISA superó el 12.6%. (Material y Métodos: 6)

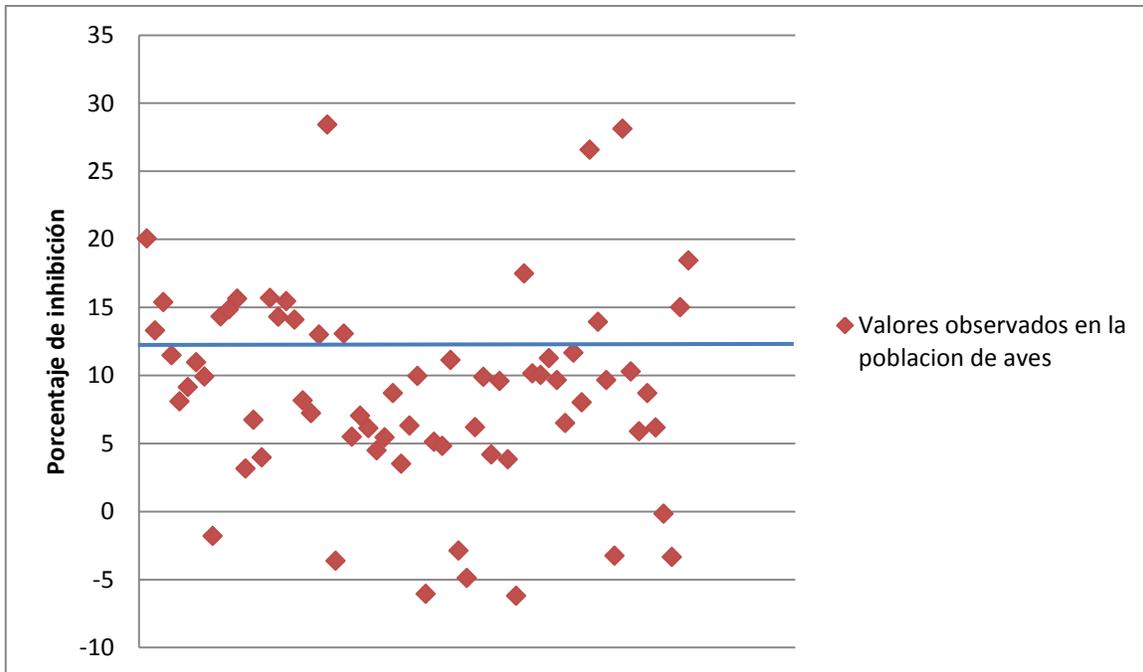


Figura 9. Gráfica de dispersión de los resultados de la ELISA Competitiva. La línea azul muestra el valor de corte establecido. Las muestras positivas tuvieron una inhibición mayor al 12.6% (valor de corte)

Aislamiento

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los aislamientos positivos a *Salmonella* sp. provenientes de aves rapaces mantenidas en cautiverio en el Estado de México. Se logró aislar *Salmonella* sp. de 12 de 76 aves, representando una frecuencia de 15.8% en la población. Sin embargo, los aislamientos se restringen a las 3 especies con mayor número de individuos: *Parabuteo unicinctus*, *Buteo jamaicensis* y *Bubo virginianus*, con una frecuencia de 15.6, 28.6 y 33.3% respectivamente. Todos los demás animales trabajados resultaron negativos al aislamiento.

Tabla 7. Frecuencia de aislamientos de *Salmonella* sp. a partir de hisopos cloacales en las aves trabajadas.

Especie	Número de Individuos	Frecuencia (%)
Aguililla de Harris <i>Parabuteo unicinctus</i>	32	5/32 (15.6)
Halcón Cola Roja <i>Buteo jamaicensis</i>	14	4/14 (28.6)
Buho Real <i>Bubo virginianus</i>	9	3/9 (33.3)
Caracara <i>Caracara plancus</i>	8	0/8 (0)
<i>Tyto alba</i>	3	0/3 (0)
<i>Buteo lagopus</i>	3	0/3 (0)
<i>Buteo swainsoni</i>	2	0/2 (0)
<i>Buteo magnirostris</i>	1	0/1 (0)
<i>Buteo nitidus</i>	1	0/1 (0)
<i>Buteo regalis</i>	1	0/1 (0)
<i>Buteogallus athracinus</i>	1	0/1 (0)
<i>Falco peregrinus</i>	1	0/1 (0)
Total	76	12/76 (15.8%)

Confirmación por PCR

Se realizó la técnica de PCR para confirmar que las cepas identificadas bioquímicamente como *Salmonella* sp., en la Figura 10 se muestran los resultados del PCR para la identificación del gen *invA*, el amplificado tuvo un tamaño de 284bp, lo cual coincide con lo citado por Oliveira *et al.*, 2002. En la Figura 11 se observan los resultados del PCR para el gen *fliC*, el amplificado tuvo un tamaño de 620bp que también concuerda con lo observado por Oliveira *et al.*, 2002; las cepas positivas a este gen corresponden a la serovariedad Typhimurium. Las condiciones utilizadas para la amplificación del gen *invA* fueron las mismas previamente reportadas por Oliveira *et al.*, 2002, los amplificados observados coincidieron con el tamaño esperado de 284bp (Figura 10). Para la

amplificación del gen *fliC* de *Salmonella* Typhimurium se utilizó el ciclo reportado por Cuenca-Verde, 2008, observando un amplificado de 620bp (Figura 11) (Oliveira et al, 2002).

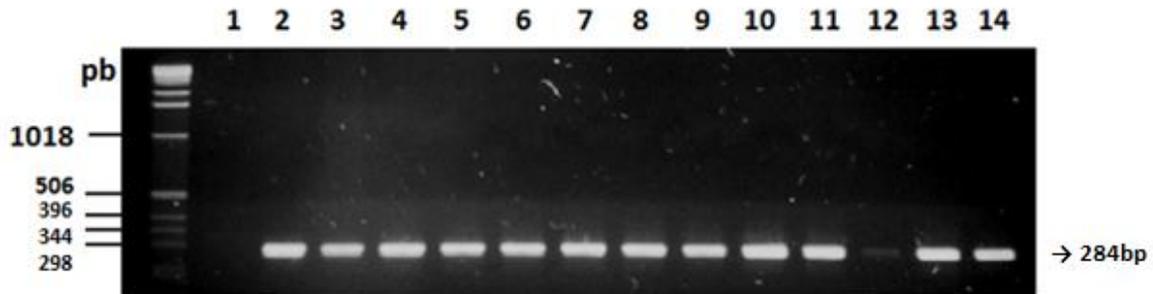


Figura 10. Amplificados del gen *invA*. Gel de agarosa al 1.5% mostrando los amplificados obtenidos por PCR empleando los iniciadores 139-141 para el gen *invA*. Marcador de tamaño (1kb DNA ladder Sigma®), Carril 1: control negativo; Carriles 2-11,13 y 14 aislamientos confirmados como *Salmonella* sp; Carril 12: muestra negativa (*Proteus vulgaris*).

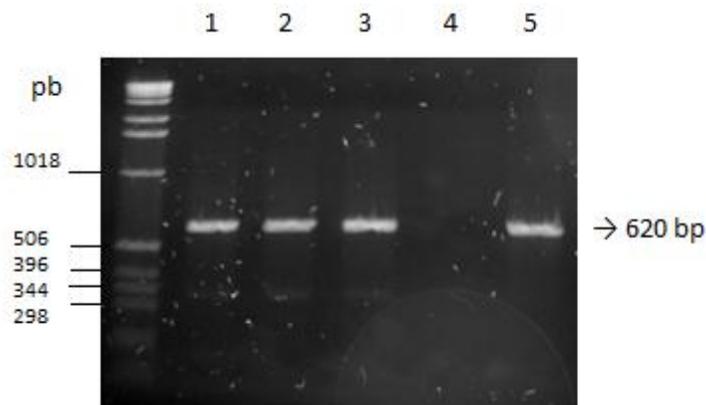


Figura 11. Amplificación del gen *fliC*. Gel de agarosa al 1.5% mostrando los amplificados obtenidos por PCR empleando los iniciadores Typ04-Fli15 para el gen *fliC*. Marcador de tamaño (1kb DNA ladder Sigma), Carril 1-3: Cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium; Carril 4: *Salmonella* Agona; Carril 5: aislamiento EMZ-11 confirmado como *Salmonella* typhimurium.

Tabla 8. Interpretación de resultados de la identificación de *Salmonella* por distintos métodos

Cepa	Especie de procedencia	Técnicas Bioquímicas Estándar	API	Aglutinación Polivalente (A-I)	Aglutinación Monovalente (B, C, D)	PCR		Interpretación Final *
						gen <i>invA</i>	gen <i>fliC</i>	
EMZ-02	A. Harris	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> B monofásica	-	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.
EMZ-03	A. Harris	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> C1 monofásica	-	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.
EMZ-04	A. Harris	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Albany	+	-	+	-	<i>Salmonella</i> Albany
EMZ-05	A. Harris	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Albany	+	-	+	-	<i>Salmonella</i> Albany
EMZ-10	A. Harris	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Brandenburg	+	B	+	-	<i>Salmonella</i> Brandenburg
EMZ-06	H. Cola Roja	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Agona	+	B	+	-	<i>Salmonella</i> Agona
EMZ-07	H. Cola Roja	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Agona	+	B	+	-	<i>Salmonella</i> Agona
EMZ-08	H. Cola Roja	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Agona	+	B	+	-	<i>Salmonella</i> Agona
EMZ-09	H. Cola Roja	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Agona	+	B	+	-	<i>Salmonella</i> Agona
EMZ-11	Buho Real	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i>	+	-	+	+	<i>Salmonella</i> Typhimurium
EMZ-12	Buho Real	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> Poona	+	-	+	-	<i>Salmonella</i> Poona
EMZ-13	Buho Real	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	+	-	<i>Salmonella</i> sp.

* (Tabla 8) Se tomaron en cuenta los resultados bioquímicos, serológicos y moleculares para la identificación final de las cepas de *Salmonella*. Para la interpretación final de la identificación de *Salmonella* se le dio prioridad a los resultados de PCR ya que la prueba supera a las demás en especificidad.

Sensibilidad antimicrobiana

Se puede observar en la Tabla 9 y Figura 12 que el 100% de las cepas mostraron resistencia a la ampicilina (AMP), cloranfenicol (CL), penicilina benzatínica (PB), cefalotina sódica (CF), lincomicina (LM), cloxacilina benzatínica (CB), cloxacilina sódica (CX). Otros antibióticos en los cuales se encontró resistencia fueron: EA (77%), SM (61.5%), CF (38.5%), TT (38.5%), STX (38.5%) y NEO (15%), mostrando niveles intermedios de resistencia se encontró a la amikacina (AK, 54%), enrofloxacin (ENR, 54%), adipato de espiramicina (EA, 23%), cefalotina sódica (CF, 61.5%), estreptomycin (SM, 38.5%), ceftriaxona sódica (CRO, 23%), gentamicina (GE, 92%), neomicina (NEO, 85%), dihidroestreptomycin (DS, 77%) y tetraciclina (TT, 61.5%). Ninguno de los antibióticos probados fue 100% eficaz, la CRO fue el antimicrobiano al cual se mostró mayor nivel de susceptibilidad (77%), seguido por el STX (61.5%), AK y ENR (46% ambos) y la DS (23%). Cabe destacar que la cepa 7 fue resistente a todos los antibióticos empleados.

Determinación de parámetros de rendimiento

Los resultados de parámetros de rendimiento de la prueba de ELISA se muestran en la Tabla 10. Donde se calculó la sensibilidad diagnóstica (SeD), especificidad diagnóstica (EspD), valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Se puede observar que los valores de SeD y valor predictivo positivo están muy bajos tanto en el diagnóstico de *Salmonella* sp. como *S. Typhimurium* y asociadas, ya que existe poca concordancia entre los resultados del aislamiento bacteriano y la prueba de ELISA competitiva.

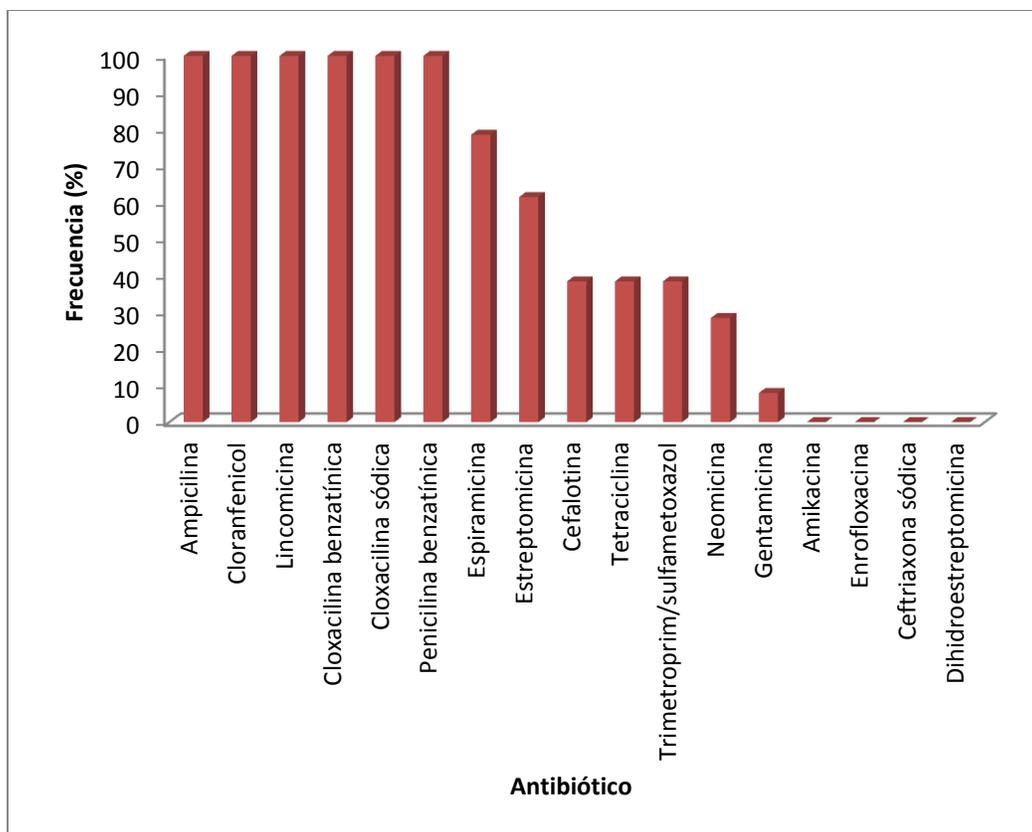


Figura 12. Frecuencia de resistencia a antimicrobianos en las cepas aisladas. La figura muestra que muchos de los antibióticos evaluados no mostraron efectividad alguna contra las cepas de *Salmonella* aisladas de las aves rapaces.

Tabla 9. Patrón de sensibilidad a antibióticos en las cepas identificadas como *Salmonella*

Cepa	Antibiótico																
	AK	ENR	AMP	EA	CF	SM	CRO	GE	CL	LM	NEO	CB	CX	PB	DS	TT	STX
EMZ-02	S	S	R	R	I	R	S	I	R	R	I	R	R	R	I	I	S
EMZ-03	S	S	R	I	I	R	S	I	R	R	I	R	R	R	I	I	S
EMZ-04	S	S	R	R	I	I	S	I	R	R	I	R	R	R	I	I	S
EMZ-05	I	I	R	R	I	R	S	I	R	R	I	R	R	R	I	I	S
EMZ-10	I	I	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
EMZ-06	I	I	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
EMZ-07	S	I	R	R	R	R	I	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R
EMZ-08	S	I	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
EMZ-09	I	S	R	R	I	I	S	I	R	R	R	R	R	R	I	I	S
EMZ-12	I	S	R	I	R	I	S	I	R	R	I	R	R	R	I	I	S
EMZ-11	I	S	R	R	I	I	S	I	R	R	I	R	R	R	I	I	S
EMZ-13	S	I	R	R	R	I	S	I	R	R	I	R	R	R	I	R	R

Susceptible: 0 – 5mm, Intermedia: 5-19mm, Resistente: \geq 20mm.

Amikacina 30 μ g (AK), Enrofloxacina 5 μ g (ENR), Ampicilina 10 μ g (AMP), Adipato de Espiramicina 10 μ g (EA), Cefalotina Sódica 30 μ g (CF), Estreptomina 10 μ g (SM), Ceftriaxona Sódica 30 μ g (CRO), Gentamicina 10 μ g (GE), Cloramfenicol 30 μ g (CL), Lincomicina 2 μ g (LM), Neomicina 30 μ g (NEO), Cloxacilina Benzatínica 20 μ g (CB), Cloxacilina Sódica 20 μ g (CX), Penicilina Benzatínica 20U (PB), Dihidroestreptomina 10 μ g (DS), Tetraciclina 30 μ g (TT) y Trimetoprim/Sulfametoxazol 25 μ g (STX).

Tabla 10. Parámetros de rendimiento de la ELISA competitiva desarrollada.

	<i>ELISA competitiva</i>		
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. Typhimurium</i> y serovariedades con posible reacción cruzada	<i>Salmonella Typhimurium</i>
Sensibilidad Diagnóstica	25%	28.5%	0%
Especificidad Diagnóstica	71.9%	71.9%	72%
Valor predictivo positivo	14.8%	10%	0%
Valor predictivo negativo	83.25%	90.2%	98.2%

Tabla 11. Antígenos presentes en las serovariedades aisladas

Serovariedad	Grupo O (Serogrupo)	Fórmula Antigénica (Somático)*	Posible reacción cruzada**
Agona	O:4 (B)	1,4,5,12	+
Albany	O:8 (C ₂ -C ₃)	8,20	-
Brandenburg	O:4 (B)	4,5,12	+
Poona	O:13 (G)	1,13,22	-
Salmonella C1	O:7 (C1)	6,7	-
Salmonella B	O:4 (B)	4, 12	+
Typhimurium	O:4 (B)	<u>1, 4, 5, 12</u>	+

*Grimont y Weill (2007) WHO Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars

** Tomando como base el antígeno utilizado en la prueba de ELISA

Discusión

En el presente trabajo, la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* sp. fue de 15.8%, ninguno de los individuos mostró signos relacionados con salmonelosis. Millán *et al.*, 2004 encontró resultados similares en Falconiformes en vida libre: 14.3% (5/35) y una frecuencia más baja en Strigiformes 5.3% (1/19). Esto contrasta con lo reportado por otros autores como Palmgren *et al.*, 2004 donde se encontró un 2.9% (2/69) de frecuencia en polluelos de halcones peregrinos; Gopee *et al.*, 2000 encontraron un 6% (3/53) en aves rapaces en cautiverio, Jijón *et al.*, 2007 un 5.4% (2/37) en dos centros de rescate de fauna silvestre en Ohio, USA; Kirkpatrick y Texler-Myren (1986) encontraron una frecuencia de 1.9% (2/105) ambos individuos de la especie *Buteo jamaicensis* en vida libre; Kirkpatrick y Colvin (1986) en un estudio en *Tyto alba* encontraron un 8.5% (8/94) de positividad a *Salmonella* sp. en polluelos muestreados en los nidos. En el presente trabajo se muestrearon 3 individuos de esta especie pero ninguno dio positivo al aislamiento bacteriano; Reche *et al.* (2003a) encontraron 7.36% (21/285) en aves rapaces en cautiverio y 4.19% (13/310) de aves silvestres positivos al aislamiento; Lamberski *et al.*, 2003 encuentran un porcentaje de frecuencia mayor (16.6%) aunque con una muestra más pequeña (5/30) todos los animales positivos fueron de vida libre y ninguno de cautiverio resultó positivo, también es importante resaltar que los animales en el estudio fueron de dos especies *Buteo jamaicensis* y *Accipiter cooperi*. En el presente trabajo se tomaron muestras de individuos de 13 especies distintas, sin embargo sólo 3 de ellas resultaron positivas al aislamiento de *Salmonella* sp., lo cual coincidió con las tres especies con mayor número de individuos (Tabla 4),

Los Secretaría de Salud reporta a *S. Typhimurium* como el serotipo con mayor frecuencia de aislamiento en muestras de origen humano (20.4%), seguido por *S. Enteritidis* (18.3%), a *S. Agona* como el cuarto lugar, y como segundo lugar en muestras de origen no-humano (alimentos, agua y muestras ambientales) (Gutierrez-Cogco *et al.* 2000). Los resultados encontrados por estos autores son parecidos a otros provenientes de otras partes del mundo ya que la mayoría coinciden en reportar a las serovariedades *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* como los más frecuentes (Garcia *et al.*, 1997). Esto concuerda con los reportes

de aislamientos hechos en aves rapaces (Tabla 1) que también reportan estas dos serovariedades con mayor frecuencia.

En el presente estudio la serovariedad encontrada con mayor frecuencia fue *S. Agona* (4/12, 33.3%) y en segundo lugar *S. Albany* (2/12, 16.6%), solamente se logró un aislamiento de *S. Typhimurium* (1/12, 8.3%), frecuencia considerablemente más baja que la reportada por Gutierrez-Cogco *et al.* 2000 y todos los estudios de *Salmonella* en aves rapaces encontrados en la literatura (Tabla 1). Dentro de estos 31 reportes, 15 mencionan a *S. Typhimurium*, 7 a *S. Enteritidis*, seguidos por *S. Havana* y *S. Arizona* con 3 cada una. Se mencionan un total de 27 serovariedades entre las cuales encontramos a *S. Branderup* la cual se aisló en el presente trabajo de una aguililla de Harris, pero ninguno de los estudios menciona aislamientos de *S. Agona*, *S. Albany* y *S. Poona*, 3 serovariedades que se reportan por primera vez en aves rapaces. Como ya se dijo anteriormente *S. Agona* se encuentra como segundo lugar en aislamientos de muestras de origen no-humano así que es hasta cierto punto normal encontrar esta serovariedad al estar comúnmente en el ambiente, *S. Albany* y *S. Poona* son serovariedades raras que numéricamente no fueron importantes en el reporte de Gutierrez-Cogco *et al.* (2000). En un estudio hecho en España (Reche *et al.*, 2003) se encontró que la serovariedad Havana fue predominante en aves rapaces en cautiverio, se realizó biotipificación y tipificación genética y se determinó que los aislamientos provenían de una fuente común, probablemente el pollo con que se alimenta a las aves. Cabe destacar que los 4 aislamientos de *S. Agona* del presente trabajo provienen de la misma especie (halcón cola roja), esto podría sugerir que se originaron de una fuente común pero se necesitan más estudios como los realizados por Reche *et al.*, 2003 para confirmar dicha afirmación.

La resistencia a antimicrobianos se da de forma natural por presiones evolutivas, que han proveído la variabilidad genética y fenotípica para esta resistencia. Sin embargo, la proliferación eficiente de organismos resistentes sólo se provoca si existe una presión selectiva. Levy, 1997 propuso este principio en la ecuación de resistencia a antibióticos, la cual estipula que los problemas de resistencia son el resultado de presión selectiva (cantidad y tiempo de uso de antimicrobianos en un área determinada) y la presencia de los rasgos de resistencia contra esta droga. En la cría de animales de abasto los agentes antimicrobianos son usados con tres propósitos: terapéuticos, profilácticos y como

promotores de crecimiento. En todas estas instancias se aplica una presión de selección en las poblaciones de bacterias para resistencia a antibióticos.

En el presente trabajo se encontraron cepas resistentes a antibióticos de uso común, con 100% de resistencia a ampicilina, cloranfenicol, penicilina benzatínica, cefalotina sódica, lincomicina, cloxacilina benzatínica y cloxacilina sódica. Smith *et al.*, 2002 también encontraron que todas las cepas estudiadas mostraron resistencia a algún antimicrobiano, sin embargo, se encontró susceptibilidad a cloranfenicol, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual contrasta con lo hallado en este trabajo, en el cual, se encontraron resistencias de 100, 38.5 y 38,5% respectivamente. En el estudio antes mencionado también reportan varias cepas resistentes a ampicilina, lo cual concuerda con el 100% de resistencia encontrado en este trabajo. Kocabiyic *et al.* (2006) encontró una cepa de *Salmonella* Enteritidis PT 21b susceptible a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, y trimetoprim/sulfametoxazole, en cambio las cepas aisladas en este trabajo mostraron un 100% de resistencia a ampicilina y cloranfenicol y en menor grado para gentamicina con 92% de resistencia intermedia, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol con 38.5% de resistencia a ambas. Kirkpatrick y Colvin (1986) no encontraron ninguna resistencia a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* aisladas de la especie *Tyto alba*. Esta especie se encuentra relacionada con ambientes urbanos y suburbanos, por lo cual se esperaría encontrar algún tipo de resistencia, sin embargo no fue el caso. Kirkpatrick y Texler-Myren (1986), encontraron dos cepas de *Salmonella* resistentes a penicilina y susceptibles a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, neomicina y trimetoprim/sulfametoxazol, antibióticos en los cuales se observaron diferentes grados de resistencia (Tabla 9). Gopee *et al.* (2000) realizaron un estudio con fauna silvestre en cautiverio donde los 66 aislamientos mostraron resistencia a alguno de los antimicrobianos probados: alta a cefalotina (92%), intermedia a estreptomycin (35%) y tetraciclina (29%), y baja en gentamicina (2%), cloranfenicol (0%) y trimetoprim/sulfametoxazol (0%); mientras que en este trabajo la cefalotina tuvo solo 38.5% de resistencia, estreptomycin 61.5%, tetraciclina 38.5%, gentamicina 8%, cloranfenicol 100% y trimetoprim/sulfametoxazol 38.5%. Los resultados del presente trabajo respecto a la sensibilidad a antimicrobianos muestran que las cepas encontradas expresan un mayor nivel de resistencia en comparación con la mayoría de estudios hechos en aves rapaces. La prevalencia de infecciones

asintomáticas en aves rapaces en centros de rescate y rehabilitación es alta y la alta prevalencia de resistencia a antibióticos puede ser un problema grave en el momento de la terapia contra la salmonelosis.

En cuanto al desarrollo del ELISA, el conjugado comercial Jackson ImmunoResearch anti-IgY de gallina no pudo ser validado para su uso en una ELISA indirecta ya que no tuvo reactividad con los sueros de aves rapaces (Figuras 3 y 4). Este hallazgo concuerda con reportes de otros autores (Martínez *et al.* 2003, Cray y Villar, 2008) de que no todos los anticuerpos anti-IgY de gallina tienen buena reactividad cruzada. Estas diferencias en reactividad pueden estar relacionadas al inóculo de inmunización y esquema de purificación utilizado por cada laboratorio. También es posible que existan diferencias antigénicas suficientes para que el conjugado anti-IgY de gallina no reconozca a la IgY de aves rapaces, lo cual contrasta con los estudios hechos por Hädige *et al.* (1980) y Hädige y Ambrosius (1986) donde afirma que existe una cercana relación antigénica entre las inmunoglobulinas 7S en aves, reptiles y anfibios.

Los resultados obtenidos en el Western Blot indican con claridad que el conjugado comercial Jackson Antibodies anti-IgY de gallina no reconoce a la IgY de la aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*) y el halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*), ambas pertenecientes al orden Falconiformes, a la familia Accipitridae.

Con base en estos resultados, se llegó a la conclusión de que una ELISA competitiva es la opción más adecuada para el diagnóstico serológico de *Salmonella* Typhimurium ya que el conjugado anti-IgY de gallina no tuvo reactividad contra los sueros de aves rapaces probados y al elegir esta variante de la ELISA se puede probar cualquier especie que no reaccione con el anticuerpo secundario (Figura 1).

Se eligió al LPS como inmunógeno y antígeno en la ELISA indirecta y competitiva debido a su alta inmunogenicidad, su fácil extracción en grandes cantidades como material homogéneo y su fácil absorción en polímeros hidrófobos debido a su fracción de lípido A (Apicella, 2008). En el presente trabajo se observó que el esquema de inmunización utilizado tuvo éxito en aumentar los títulos de anticuerpos específicos contra el LPS de *Salmonella* Typhimurium en suero, aunque se observaron efectos adversos marcados por la inoculación del inmunógeno como: letargia, disnea, anorexia, plumas erizadas y depresión, lo cual concuerda con lo observado en pollos de engorda por Xie *et al.*, 2000 quienes

también detectaron fiebre y baja de peso en los animales inoculados con LPS de *Salmonella* Typhimurium. De las preparaciones de adyuvantes que han sido probadas y los mejores resultados se han observado con la utilización de emulsiones de antígenos mezclados con adyuvante completo de Freund en la primera inyección y con adyuvante incompleto para las siguientes (Hodek y Stiborová, 2003). En la Figura 6 se observa que el suero empleado como antisuero de unión al LPS resultó con un alto título ya que aún a la dilución 1:6400 continuó dando una reacción positiva en la prueba de ELISA, con una diferencia de absorbancia mayor a 0.1000. (Crowther, 2005)

A pesar de las múltiples bondades reportadas en la literatura acerca del uso de la IgY (Alarcón *et al.* 2000), en el presente trabajo no se pudo realizar la purificación exitosa a partir de la yema de las gallinas inoculadas. Al comparar el nivel de anticuerpos presentes en el suero y el extracto de IgY (Figura 7) se observó que los anticuerpos específicos en yema eran mucho menores que los presentes en suero. Esta situación pudo haberse presentado porque el periodo de tiempo entre la recolección de los huevos y el procesamiento fue muy prolongado (mayor a 2 meses), esto pudo provocar la pérdida de actividad específica de los anticuerpos o la desnaturalización de los mismos.

De acuerdo a la literatura consultada, este es el primer ensayo diseñado para el diagnóstico de *Salmonella* en aves rapaces, ya que la gran mayoría de los reportes (Tabla 1) utilizan el aislamiento bacteriano como método de diagnóstico. Los resultados obtenidos por la ELISA competitiva en el presente trabajo indican una alta prevalencia de anticuerpos contra el LPS de *Salmonella* Typhimurium en las aves trabajadas (Tabla 5 y 6). Sin embargo, existen varios factores que hay que considerar concernientes a la interpretación de estos resultados.

Se pudo comprobar que los parámetros de rendimiento de la prueba de ELISA en comparación con la prueba de oro fueron notablemente más bajos, específicamente en sensibilidad diagnóstica y valor predictivo positivo (Tabla 10). En contraste, los valores calculados de especificidad diagnóstica y valor predictivo negativo fueron significativamente más altos. Estos dos valores indican la probabilidad de que un individuo sano con un resultado negativo en la prueba se encuentre verdaderamente sano. Es decir, la prueba de ELISA competitiva desarrollada es mejor descartando individuos negativos que identificando los positivos, una prueba con estas características puede ser útil como prueba

de tamiz, los ensayos de alta especificidad suelen usarse a modo de ensayos de confirmación. En el presente estudio, los resultados del aislamiento bacteriano indican que las aves rapaces se infectan con una amplia diversidad de serovariedades de *Salmonella enterica*, lo cual hace que el diseño de la ELISA competitiva para una sola serovariedad como *S. Typhimurium* muy limitada. También se considera que la prevalencia de *Salmonella Typhimurium* en estos animales es demasiado baja para obtener valores de rendimiento significativos con este tamaño de muestra, para lograr lo anterior se debe de tomar un número de muestra adecuado tomando en cuenta la prevalencia en la población (Jacobson, 1998).

Según los resultados del aislamiento bacteriano solo 1 de 76 individuos resultó positivo a *S. Typhimurium* representando una frecuencia de 1.3%, mientras que la ELISA competitiva estableció que 21 de 76 individuos representando un 27.6% presentaron un status serológico positivo de acuerdo al valor de corte establecido en la prueba. Se puede notar que la prevalencia encontrada por la ELISA competitiva es considerablemente más alta que el aislamiento bacteriano, situación que puede explicarse de varias formas. Estudios previos con *S. Typhimurium* han indicado que las IgY circulantes no son indicadoras del estado bacteriológico en gallinas (Barrow 1992). Los títulos de IgY contra *S. Typhimurium* pueden persistir por varias semanas después de una infección, incluso detectándose hasta 45 semanas postinfección (Barrow, 1992a). La desventaja de los niveles persistentes de IgY es que los individuos que no están infectados pueden ser considerados así por su status serológico. Barrow (1992a) observó en un experimento que la respuesta serológica contra *S. Typhimurium* es directamente proporcional a la dosis inoculada oralmente esto puede traducirse en que los diferentes niveles de exposición a la bacteria debido a las condiciones en campo aunado a diferencias en el tiempo de exposición y momento de muestreo, pueden ser factores que influyan en la variación de las concentraciones séricas de IgY (Barrow, 1992). Cabe resaltar que el único individuo en el que se aisló *S. Typhimurium* no fue positivo según la ELISA competitiva, situación que se puede explicar por un nivel de exposición bajo con la bacteria. Según Smith *et al.* (1995) en algunos animales colonizados por *Salmonella* no hay seroconversión si la bacteria no se multiplica suficiente o invade los tejidos. Esta respuesta gradual también indica la necesidad de evaluar la ELISA como una prueba de parvada, ya que ante la ausencia de

excreción de la bacteria, individuos con concentraciones intermedias de IgY presentes pueden ser difíciles de interpretar. Los altos niveles de IgY encontrados no son un problema grave ya que puede existir gran contaminación del entorno aún en la ausencia de excreción de la bacteria, indicando una potencial fuente de reinfección.

Otro aspecto a considerar es el grado de reacción cruzada entre *S. Typhimurium* y otras serovariedades de *Salmonella enterica*, ya que varios autores (Smith *et al.* 1995, Barrow 1992) han reportado grados variables de reacción cruzada entre el LPS de los grupos B y D debido al antígeno O:12, esto podría hacer que la ELISA detecte no solo a *Salmonella Typhimurium* sino otras serovariedades que compartan el antígeno somático 12 (Tabla 11) como *S. Agona*, la cual fue aislada en cuatro halcones cola roja aunque solo uno de ellos resulto positivo en la ELISA. Esta situación podría hacer que la ELISA haya dado como positivos a individuos que hayan estado expuestos con serovariedades distintas a *S. Typhimurium* que compartan el antígeno 12 y por lo tanto estar sobreestimando la seroprevalencia de esta bacteria. Aunque muchas serovariedades de *Salmonella enterica* pueden compartir otros antígenos somáticos estos no provocan reacción cruzada posiblemente debido a su baja inmunogenicidad como el O:1 (Smith *et al.* 1995). Un estudio previo (Smith *et al.* 1995) parece indicar que algunos antígenos O tienen poca inmunogenicidad, aunque las razones para esto aún no se comprenden en su totalidad.

Estudios previos (Barrow 1992, Barrow 1994, Hassan *et al.* 1991) han encontrado que la ELISA es altamente específica, no encontraron reacciones cruzadas en el suero seguido de la inoculación oral y parenteral de una amplia variedad de enterobacterias con relación antigénica (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp.* y *Citrobacter freundii*).

En el presente estudio no fue posible determinar si los animales llegaron infectados al centro de rehabilitación o al zoológico o si fueron infectados después de su admisión. Los animales silvestres también pueden adquirir *Salmonella* de otras fuentes ambientales como explotaciones de ganado, fabricantes de alimentos y plantas de tratamiento de desechos. La prevalencia de *Salmonella* en fauna silvestre para un área geográfica en particular probablemente es reflejo de la frecuencia con la que se encuentran estas fuentes de contaminación en el rango de distribución de los animales (Daoust y Prescott, 2007).

En el caso del aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*) esto podría facilitar la transmisión de *Salmonella* sp. ya que esta especie tienden a tener estructuras sociales en familias de varios individuos, aún en cautiverio, esto podría hacer que el contacto entre aves infectadas y sanas sea mayor y de esta forma darse la transmisión, en el caso de la especie *Bubo virginianus* todos los individuos se encontraban en un mismo recinto, esto podría facilitar la transmisión. Los hábitos conductuales y alimenticios de estos animales ciertamente puede influenciar la probabilidad de ser infectados con *Salmonella* sp (Euden, 1990). El encontrar *Salmonella* en aves rapaces puede indicar la infección en otras poblaciones animales como pequeños mamíferos y aves paseriformes (Kirkpatrick y Texler-Myren, 1986).

La prevalencia reportada para *Salmonella* en aves rapaces es relativamente alta, por eso se debe tener cuidado extra con la higiene de los individuos que manejan estas aves o los materiales contaminadas con sus heces en centros de rescate, zoológicos y centros de reproducción, entre otros. Esta consideración no debe ser limitada en casos donde la enfermedad es aparente y debe aplicarse en todas las operaciones de rutina como limpieza de comederos, jaulas y manejo de aves durante actividades de campo como anillamiento y marcaje. (Abulreesh *et al.* 2007, Friend y Frandson 1999)

Conclusiones

- 1.- El conjugado comercial Jackson ImmunoResearch no mostró reacción contra los anticuerpos IgY de las aves rapaces ensayadas.

- 2.- Los anticuerpos anti-LPS de *Salmonella* Typhimurium obtenidos en la yema de huevo de gallinas inmunizadas no tuvieron una alta concentración, pero fueron de un alto título en el suero.

- 3.- La prueba de ELISA competitiva desarrollada requirió sensibilizar las placas con extracto de LPS de *Salmonella* Typhimurium a una concentración de 3.33 mg/ml de bacterias deshidratadas, un suero anti-LPS de *Salmonella* Typhimurium a una dilución de 1:100, utilizar el suero problema de las aves rapaces diluido 1:2 y emplear el anticuerpo secundario Jackson ImmunoResearch a una dilución de 1:7500.

- 4.- La prueba desarrollada se estandarizó para un valor de corte de 12.6 % de inhibición, obteniéndose una sensibilidad diagnóstica de 0% y un valor predictivo positivo de 0% ya que el número de individuos infectados fue demasiado bajo como para obtener estos valores.

- 5.- La frecuencia de aislamiento fue de 15.8% (12/76) sólo un aislamiento fue de *S.* Typhimurium mientras que la serovariedad más encontrada fue *S.* Agona con cuatro aislamientos.

- 6.- Mediante la prueba de ELISA se obtuvieron 21 aves positivas, correspondiendo a 27.6% en las aves trabajadas

- 7.- Se debe de considerar que las aves rapaces pueden ser un reservorio importante y pueden representan un riesgo potencial para los seres humanos y otros animales. Se requiere de más datos e investigación sobre estos aislamientos para obtener información detallada sobre la epidemiología de la *Salmonella* en aves rapaces de México. Al actuar

como portadores asintomáticos los riesgos potenciales de salud pública para la salmonelosis probablemente se hayan subestimado. Se deben de realizar esfuerzos para aumentar la conciencia del público y manejadores sobre el riesgo zoonótico asociado al contacto con aves rapaces.

8.- Todos los aislamientos de *Salmonella* Typhimurium mostraron niveles de resistencia contra al menos cinco antibióticos, lo cual, las convierte en cepas multiresistentes. Esto representa un riesgo sanitario ya que podría dificultar la terapéutica en caso de enfermedad.

9.- El desarrollo de una ELISA competitiva es un método muy adecuado en aves rapaces, principalmente porque puede aplicarse en múltiples especies sin comprometer su sensibilidad.

10.- Las aves rapaces se pueden infectar con una variedad amplia de serovariedades de *Salmonella enterica* lo cual hace que una prueba de ELISA para una sola serovariedad sea muy limitada para detectar la prevalencia de animales que han estado expuestos a otras serovariedades con distinta fórmula antigénica a *S. Typhimurium*.

Referencias

- Abulreesh HH, Goulder R, Scott GW (2007) Wild birds and human pathogens in the context of ringing and migration. *Ringling and Migration* 23, pp 193-200
- Adesiyun AA, Seepersadsingh N, Inder L, Caesar K (1998) Some bacterial enteropathogens in wildlife and racing pigeons from Trinidad. *Journal of Wildlife Diseases* 34 (1) pp. 73-80.
- Akita EM y Nakai S (1992). Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. *Journal of Food Science*. 57:629–634.
- Alarcón CE, Hurtado H, Castellanos JE (2000) Anticuerpos Aviares: Alternativa en Producción y Diagnóstico. *Biomédica*, diciembre, 20, N°004 pp. 338-343.
- Apicella MA (2008) Isolation and Characterization of Lypopolisacharides, en: *Bacterial Pathogenesis Methods and Protocols*. Humana Press, pp. 3-15.
- Asagi M, Oka C, Sato G (1967) Isolation of *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* from crows in the city of Otaru. *Japanese Journal of Veterinary Science* 38:521-522.
- Bangert RL, Ward ACS, Stauber EH (1988) A survey of the aerobic bacteria in the feces of captive raptors. *Avian Diseases* 1988; 32: 53-62.
- Barcnas MG (1993) Comparación de la Respuesta Inmune Humoral de Cerdos Inmunizados con *Bordetella bronchiseptica* y la Desarrollada en Casos Clínicos de Rinitis Atrofica Porcina. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Auntonoma de México. México.
- Barrow PA (1994) Serological diagnosis of *Salmonella* serotype enteritidis infections in poultry by ELISA and other tests. *International Journal of Food Microbiology*, 21 pp. 55-68

- Barrow PA (1992) ELISAs and the serological diagnosis of salmonella infections in poultry: a review. *Epidemiology and Infection*, 109, 361-396
- Barrow (1992a) Further observations on the serological response to experimental *Salmonella Typhimurium* in chickens measured by ELISA. *Epidemiology and Infection*, 108, 231-241.
- Battisti A, Di Guardo G, Agrimi U, Bozzano AI (1998) Embryonic and neonatal mortality from Salmonellosis in captive-bred raptors. *Journal of Wildlife Diseases* 34:64-72
- Beumer RR, Brinkman E, Rombouts FM (1991) Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella spp.*: a comparison with other methods. *International Journal of Food Microbiology*, 12, pp. 363-374
- Clausen B, Gudmunijsson F (1981) Causes of mortality among free-ranging gyrfalcons in Iceland. *Journal of Wildlife Diseases* Vol. 17. No. 1.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007) Performance Standards in Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth International Supplement. Pennsylvania, USA.
- Coligan EJ, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (2005) Short Protocols in Immunology. Wiley, USA.
- Cray C, Villar D (2008) Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. *Veterinary Clinical Pathology*; 37/3, 328-331.
- Crowther JR (1995) *Methods in Molecular Biology: ELISA Theory and Practice*. Totowa, New Jersey. Humana Press;

- Cuenca Verde NM (2008) Frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* productora de shiga-like toxin en ovinos con diarrea en un sistema de producción intensiva. Tesis de Maestría. UNAM.
- Daoust PY (1978) Osteomyelitis and arthritis caused by *Salmonella typhimurium* in a crow. *Journal of Wildlife Diseases* Vol. 14.
- Daoust PY, Prescott JF (2007) Salmonellosis. En: *Infectious Diseases of Wild Birds*. Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT. Blackwell Publishing.
- Dougan G, John V, Palmer S, Mastroeni P (2011) Immunity to salmonellosis. *Immunological Reviews*; Vol. 240: 196-210.
- Euden PR (1990). – *Salmonella* isolates from wild animals in Cornwall. *British Veterinary Journal*, 146 (3), pp., 228-232.
- Friend M, Franson JC. (1999) *Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds*. U.S. Fish and Wildlife Service. Washington D.C.
- Ferns PN, Mudge GP (2000) Abundance, diet and *Salmonella* contamination of gulls feeding at sewage outfalls. *Water Research*, Vol. 34, 10, 2653-2660.
- García FJ , Cogolludo C, Suárez P, Anadón E (1997) Análisis de los serotipos de *Salmonella* aislados por los Laboratorios de Sanidad Animal de España. *Boletín Epidemiológico Semanal* vol. 5, N° 8.
- Gopee NV, Adesiyun AA, Caesar K (2000) Retrospective study of Salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *Journal of Wildlife Diseases* 36(2), pp. 284-293
- Grimont PAD, Weill FX (2007) *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th Edition.

- Gutiérrez-Castillo AC, Paasch-Martínez LH, Calderón-Apodaca NL (2008) Salmonellosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria México*, 39 (1)
- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC (2000) Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de Mexico*, Vol. 42, N° 6, 490-495.
- Hädge D, Fiebig H, Ambrosyus H (1980) Relationship of 7S immunoglobulins of mammal, birds and lower vertebrates to the turkey IgY. *Developmental and Comparative Immunology*, 10, pp. 377-385.
- Hädge D, Ambrosyus H (1986) Degree of antigenic relationship between 7S immunoglobulins of various vertebrates to chicken IgY. *Developmental and Comparative Immunology*, 4, pp. 501-514
- Hassan JO, Mockett APA, Catty D, Barrow PA (1991) Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune response. *Avian Diseases* 35, 809-819.
- Hodek P, Stiborová M (2003) Chicken Antibodies – Superior Alternative for Conventional Immunoglobulins. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. B69 N°4 pp 461-468.
- Höfle U, Blanco JM, Pizarro M (1998) Salmonellosis and *Salmonella* infections in free-living and captive birds of prey. *EAZWV Second scientific meeting*, May 21-24 Chester, UK.
- Hudson CR, Quist C, Lee MD, Keyes K, Dodson SV, Morales C, Sanchez S, White DG, Maurer JJ (2000) Genetic Relatedness of *Salmonella* Isolates from Nondomestic

- Birds in Southeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1860–1865
- Jacobson RH (1998) Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17 (2), 507-526
- Jamshidi A, Bassami MR, Afshari-Nic S (2009) Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella Typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. *International Journal of Veterinary Research*, 3,1, 43-48.
- Jijón S, Wetzel A, LeJeune J (2007) *Salmonella enterica* from wildlife at two Ohio rehabilitation centers. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38(3), pp. 409-413
- Jouy E. , Proux K, Humbert F, Rose V, Lalande F, Houdayer C, Picault JP, Salvat G (2005) Evaluation of a French ELISA for the detection of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in flocks of laying and breeding hens. *Preventive Veterinary Medicine*, Vol. 71, Issue 1-2, 91-103.
- Kapperud G, Rosef O (1983) Avian Wildlife Reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. En Noruega. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 45(2), pp. 375-380.
- Kinne J, Joseph M, Sharma A, Wernery (2008) Severe Outbreak of Salmonellosis in Hunting Falcons in the United Arab Emirates. *Falco*, Issue No.32 Autumn pp. 24-27
- Kirkpatrick CE, Trexler-Myren (1986) VP: A survey of free-living falconiform birds for *Salmonella*. *JAVMA* 189:997-998,
- Kirkpatrick CE, Colvin BA (1986) *Salmonella* spp in nestling common barn-owls (*Tyto alba*) from Southwestern New Jersey. *J Wildlife Dis* 22:340-343
- Ko KY, Ahn DU (2007). Preparation of Immunoglobulin Y from Egg Yolk using Ammonium Sulfate Precipitation and Ion Exchange Chromatography.

- Kobayashi H, Kanazaki M, Shimizu Y, Nakajima H, Khatun M, Hata E, Kubo M (2007) *Salmonella* isolates from cloacal swabs and footpads of wild birds in the immediate environment of Tokyo Bay. *Journal of Veterinary Medical Science* 69(3): 309-311
- Kocabiyik L, Cangul IT, Alasonyalilar A, Dedicova D, Karpiskova R (2006) Isolation of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 21b from a Eurasian Eagle-Owl (*Bubo bubo*). *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), 696–698.
- Lamberski N, Hull AC, Fish AM, Beckmen K, Morishita TY (2003) A Survey of the Choanal and Cloacal Aerobic Bacterial Flora in Free-Living and Captive Red-Tailed Hawks (*Buteo jamaicensis*) and Cooper's Hawks (*Accipiter cooperii*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 17(3): 131-135.
- Levy SB (1997) Antibiotic resistance: an ecological imbalance. En: *Antibiotic Resistance: Origin, Evolution, Selection and Spread*. Ciba Foundation Symposium 207, Wiley, Chichester, pp. 1-14.
- Libby SJ, Halsey TA, Altier C, Potter J, Gyles (2004) *Salmonella*. En: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO (editores). Third Edition. Blackwell Publishing.
- Locke LN, Newman JA (1970) Paratyphoid in a Barn Owl. *Chesapeake Science* 11(1), pp. 67-68.
- López-Martín J, Junod T, Riquelme F, Contreras C, González-Acuña D. (2011) Detección de especies de *Salmonella* y *Mycobacterium* en gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus* Lichtenstein) y gaviotas de Franklin (*Larus pipixcan* Wagler) en la ciudad de Talcahuano, Chile. *Revista Médica de Chile*, Vol. 139, No 11.

- Martínez J, Tomás G, Merino S, Arriero E. y Moreno J (2003) Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology*, 17, 700-706.
- Mikaelian I, Daignault D, Duval MC, Martineau D (1997) Salmonella infection in wild birds from Quebec. *Canadian Veterinary Journal* Volume 38
- Millán J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA, Barral M (2004) Salmonella isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Revue scientifique et technique. Organización Mundial de Sanidad Animal* 23 (3), 905-911
- Naldo JL, Samour JH (2004) Causes of Morbidity and Mortality in Falcons in Saudi Arabia. *Journal of Avian Medicine* 18(4):229-241
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2006) Manual de la OIE sobre animales terrestres Capítulo 1. 1. 3. Principios de Validación para las Pruebas de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas, pp. 21-33
- Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW (2002) Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87, pp. 25-35.
- Palmgren H, Broman T, Waldenström J, Lindberg P, Aspán A, Olsen B (2004) Salmonella Amager, Campylobacter jejuni, and Urease-positive Thermophilic Campylobacter Found in Free-flying Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*) in Sweden. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3), pp. 583–587

- Pita FS, Pértegas DS (2003) Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y Especificidad. *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120-124.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss III R, Gyles CL (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 271-279.
- Reche MP, Echeita MA, de los Rios JE, *et al.* (2003): Comparison of phenotypic and genotypic markers for characterization of an outbreak of *Salmonella* serotype Havana in captive raptors. *Journal of Applied Microbiology* 94:65-72.
- Reche MP, Jimenez PA, Alvarez F, *et al.* (2003a) Incidence of *Salmonella* in captive and wild free-living raptorial birds in central Spain. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 50, pp. 42-44.
- Refsum T, Handeland K, Baggesen DL, Holstad G, Kapperud G (2002) *Salmonella* in Avian Wildlife in Norway from 1969 to 2000. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 5595–5599
- SAGARPA, Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993 Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.
- Saito EK, Sileo L, Green DE, Meteyer CU, McLaughlin GS, Converse KA, Docherty DE (2007) Raptor Mortality due to West Nile Virus in the United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(2), pp. 206–213
- Samour JH, Naldo JL (2005) Causes of morbidity and mortality in captive falcons in Saudi Arabia. 8th European AAV Conference. Association of Avian Veterinarians. France, April 24-30

- Smith WA, Mazet JK, Hirsh DC (2002) *Salmonella* in California wildlife species: Prevalence in rehabilitation centers and characterization of isolates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33(3): 228–235
- Smith BP, Dilling GW, House JK, Konrad H, Moore N (1995) Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella* serology using lipopolysaccharide antigen. *Journal of Veterinary Diagnostics Investigation*, 7, 481-487.
- Stenzel T, Tykalowsky B, Mazur-Lech B, Koncicki A (2008) Infections in Wildlife Birds – Results of serological screening. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 52, 63-66
- Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Colin P (1999) Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 1-6.
- Sunwoo HH, Wang WW, Sim JS (2006) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunology Letters*, 106, 191–193.
- Sykes GP, Murphy C, Hadaswick V (1981) *Salmonella* infection in a captive peregrine falcon. *Journal of the American Veterinary Association* 179:1269-71.
- Tauxe RV (1997) Emerging foodborne diseases and envolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*; (3)4: 425-434.
- Tizard I (2004) Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 13(2), pp. 50-66
- Wernery U, Wernery R, Zachariah R, Kinne J (1998) Salmonellosis in relation to Chlamydiosis and pox and *Salmonella* infections in captive falcons in the United Arab Emirates. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 45:577-583, 1998

- Winsor DK, Bloebaum AP, Mathewson JJ (1981) Gramnegative, aerobic, enteric pathogens among intestinal microflora of wild turkey vultures (*Cathartes aura*) in west central Texas. *Appl Environ Microbiol* 42:1123-1124
- Xie H, Rath NC, Huff WE, Balog JM (2000) Effects of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide on Broiler Chickens. *Poultry Science*, 79: 33-40.
- Zachariah R (1996) *Salmonella* sp. infection in captive falcons. *Falco*; 6: 5.