

13  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**VALIDACION EN CAMPO DE UN INMUNO-ENSAYO  
ENZIMATICO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA  
TIFOIDEA AVIAR.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**BLANCA ESTELA BAUTISTA CRUZ**

Asesores: MVZ. MC. Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.  
MVZ. MC. PhD. Francisco Suárez Güemes.  
MVZ. MC. PhD. Guillermo Téllez Isafas.  
MVZ. EPA. José Antonio Quintana López



MEXICO, D. F.

1996.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**VALIDACIÓN EN CAMPO DE UN INMUNO-ENSAYO ENZIMÁTICO PARA  
EL DIAGNÓSTICO DE LA TIFOIDEA AVIAR.**

Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales  
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la  
Universidad Nacional Autónoma de México

Para obtener el título de  
Médico Veterinario Zootecnista

por:

**Blanca Estela Bautista Cruz.**

**ASESORES**

**MVZ. MC. Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.**

**MVZ. MC. PhD. Francisco Suárez Gilmes.**

**MVZ. MC PhD. Guillermo Téllez Isaias.**

**MVZ. EPA. José Antonio Quintana López.**

México D.F.

1996

## DEDICATORIA

A DIOS:

Por ser mi luz, esperanza y verdad. Gracias por brindarme la oportunidad de ser cada día mejor; por que en los momentos más difíciles de mi vida siempre has estado junto a mí. Gracias por la fuerza, paciencia y perseverancia, que me permitieron concluir esta etapa importante en mi vida, y por toda la ayuda que me brindas a través de la gente que me rodea.

A MIS PADRES: ANTONIA CRUZ Y CRESCENCIO BAUTISTA.

A quienes les debo la vida y de quienes siempre recibí el mejor ejemplo de rectitud, honestidad y perseverancia. Gracias por el amor que siempre me brindaron, por la confianza y la esperanza que depositaron en mí desde pequeña. Nunca olvidare los esfuerzos que hicieron para hacer de nosotros hombres y mujeres de provecho.

Nunca terminaré de dar gracias a Dios por tenerlos junto a mí. Ustedes son mi más grande inspiración.

¡ LOS AMO MUCHO !

**A MIS HERMANOS: ALEJANDRO, LOURDES Y JORGE.**

Por todo el apoyo, paciencia y comprensión que me han brindado, por aceptarme tal y como soy, por tratar siempre de mantener la unidad en la familia. Gracias por los momentos que hemos compartido. Los quiero mucho.

**A MIS SOBRINOS: ANDREA MONSERRAT Y JORGE IVAN.**

Por que con sus risas y travesuras han llenado nuestras vidas de amor, alegría, ternura y esperanza, porque son el regalo más grande que Dios pudo dar a esta familia. Siempre ocuparán un sitio muy especial en mi corazón. Los quiero mucho.

**A MI TIA AVELINA:**

Por que con su ejemplo de empeño y perseverancia sembró en mí el deseo de superación. Gracias por el apoyo y ayuda que siempre ha brindado a nuestra familia.

**A ERIKA:**

Por todo el apoyo que has brindado a nuestra familia, por aceptarnos tal y como somos. ¡Gracias!

## AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

AL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL AVES.

Por la formación profesional que he recibido de todos sus miembros.

A MIS ASESORES:

Antonio Verdugo Rodríguez,

Francisco Suárez Gúemes,

José A. Quintana López

Guillermo Tellez Isalas.

Por la confianza que tuvieron en mí, gracias por los consejos, valiosos comentarios y por el tiempo que me dedicaron, pero sobre todo por la oportunidad de desarrollar este trabajo que representa una de mis más grandes satisfacciones.

¡MIL GRACIAS!

A MI JURADO:

Por enriquecer este trabajo con sus valiosos comentarios.

A JESÚS VÁZQUEZ N. :

No solo por los comentarios, consejos y tiempo que me brindo, también por el interés que siempre demostró para sacar adelante este trabajo. ¡GRACIAS!

**A ODETTE URQUIZA:**

Un agradecimiento muy especial a una gran mujer y amiga, por los consejos que siempre me brindó, gracias por el apoyo y las palabras de aliento que supo darme en los momentos difíciles. ¡MUCHAS GRACIAS!

**A MIS AMIGOS:** Gaby Pérez, Cecilia Rosario, Pilar Castañeda, Ma Luisa Hernández, Daniel Camacho, Armando Alcalá, Manuel Quiroz y Rosario Ramos.

Gracias por la ayuda desinteresada que siempre han sabido brindar, por su preocupación y por sus palabras de aliento. ¡NUNCA LO OLVIDARE!

Este trabajo se realizó en forma conjunta entre el Departamento de Producción Animal: Aves y el laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología ambos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia / UNAM.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), proyecto PAPIIT-IN505195.

## CONTENIDO

	página
Resumen.....	1
Introducción .....	2
Etiología.....	4
Signos .....	5
Lesiones .....	5
Diagnóstico .....	5
Mecanismos de patogenicidad.....	6
Estructura antigénica.....	7
Membrana externa.....	8
ELISA.....	12
Objetivos .....	16
Materiales y Métodos .....	17
Resultados .....	25
Discusión.....	27
Conclusiones .....	31
Literatura Citada.....	32
Cuadros y Figuras .....	39



## RESUMEN

BAUTISTA CRUZ BLANCA ESTELA. Validación en campo de un Inmuno ensayo-enzimático para el diagnóstico de la Tifoidea aviar. Asesor principal MVZ. M. en C. Dr. Antonio Verdugo Rodríguez. Coasesores MVZ.MC PhD. Francisco Suárez Gilemes., MVZ. PhD. Guillermo Téllez Isafas., MVZ. EPA. José Antonio Quintana López.

Se realizaron estudios con un inmunoensayo enzimático estandarizado previamente para el diagnóstico de tifoidea aviar (TA-ELISA), en la cual se utiliza como antígeno de captura una preparación de proteínas de la membrana externa (pPME) de *Salmonella gallinarum* cepa U2 resistente al ácido nalidixico y a la novobiocina (NA/NO). Se evaluaron un total de 815 sueros clasificados en 6 grupos: grupo 1 (testigo positivo), sueros de pollos *spf* inoculados oralmente con una dosis de  $1 \times 10^9$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. gallinarum*; grupo 2 (testigo negativo), sueros de pollos libres de patógenos específicos (*spf*) inoculados con 1 ml de una solución salina fosfatada (PBS), por vía oral; grupo 3, sueros de gallinas de una granja de reproductoras con un problema de *S. gallinarum*; grupo 4, sueros de gallinas de una granja de reproductoras con problemas de *Salmonella* spp móviles; grupo 5, sueros de gallinas de postura con antecedente de vacunación con *Salmonella gallinarum* cepa 9R y grupo 6, sueros de aves libres de *Salmonella* sp, asociadas a otras enterobacterias. Para el grupo 1, se inocularon a 55 pollos *spf* con una dosis  $1 \times 10^9$  UFC/ml de *S. gallinarum* cepa U2, por vía oral. El grupo 2, fue conformado con 50 pollos *spf* con una solución de PBS por vía oral. Para determinar el punto de corte se compararon los resultados obtenidos en la TA-ELISA, con un grupo de 8 sueros de pollos *spf* infectados experimentalmente y positivos al aislamiento y aglutinación en placa con el antígeno k-polivalente<sup>a</sup> y 8 sueros de pollos *spf* del grupo control no infectado. Para la obtención y purificación del antígeno se utilizó la cepa de *S. gallinarum* U2. Los resultados logrados por la TA-ELISA, mostraron en el grupo 3, un 80.45 % de seropositividad a *S. gallinarum* no encontrándose diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el grupo

<sup>a</sup> Salshury Laboratories, Charles City, Iowa 50616, E.U.A.

testigo positivo ( $P > 0.05$ ). En el grupo 4 un 54.5 % ( $P < 0.025$ ), en el grupo 5 un 33.2 % ( $P < 0.001$ ), en el grupo 6 un 2.22 % ( $P < 0.001$ ), en el grupo 1 la TA-ELISA, detectó al 100 % de los sueros de aves infectadas experimentalmente evaluados y en el grupo 2 se observó al 0%. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Ji-cuadrada. Para determinar el comportamiento de la prueba, se estudiaron las densidades ópticas de cada grupo y se analizaron mediante la prueba de Dunca (p<0.05). Se pudo apreciar que en el grupo 3, la prueba tuvo un comportamiento muy similar al grupo testigo positivo, al analizar al grupo 4, se observó un comportamiento similar al grupo testigo y al grupo 5; el grupo 6 no mostró similitud con ninguno de los grupos evaluados. Con el análisis de resultados se concluye que si bien la TA-ELISA no fue capaz de discriminar los anticuerpos contra *S. gallinarum*, y *S. enteritidis*, si demostró tener un comportamiento diferente en cada uno de los grupos tratados, y es lo suficientemente específica para discriminar anticuerpos contra otras enterobacterias.

## VALIDACION EN CAMPO DE UN INMUNOENSAYO ENZIMATICO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA TIFOIDEA AVIAR

### INTRODUCCIÓN

La industria pecuaria con mayor auge dentro de la economía mexicana es la avicultura, ya que proporciona la proteína de origen animal al precio más bajo<sup>1</sup>. Hasta el primer semestre de 1995 el consumo *percapita* de carne de pollo fue de 15.7 kg y de huevo de 15.9 kg. La parvada nacional es de 290,532,380 aves (ponedoras, reproductoras, progenitoras, pollo de cogorda y pavos)<sup>1</sup>. La avicultura está sujeta a diversos factores, siendo los aspectos sanitarios uno de los más importantes. Algunas de las enfermedades bacterianas que provocan grandes pérdidas, son las producidas por el género *Salmonella*. Este género comprende a más de 2,200 serotipos, en la industria avícola los serotipos importantes se clasifican en salmonelas móviles, formado por *Salmonella enteritidis* y *S. typhi*, y el de las salmonelas no móviles como es el caso de *S. pullorum* y *S. gallinarum* que producen la pulorosis y la tifoidea aviar respectivamente<sup>2</sup>.

Las salmonelas móviles son las que producen los problemas de paratifoideas en las aves, pero también pueden afectar al hombre produciendo salmonelosis por la ingestión de alimentos contaminados<sup>2</sup>. Las salmonelas no móviles no afectan al hombre, pero en cambio producen grandes pérdidas en la industria avícola. Ramírez (1987), realizó un estudio para estimar las pérdidas ocasionadas por tifoidea aviar en reproductoras pesadas y determinó un déficit equivalente: a \$ 6,400 millones causados por la disminución en la incubabilidad del huevo, una disminución en la producción de carne de más de 120,000 toneladas, un aumento en el costo de producción por

---

<sup>1</sup> Datos proporcionados por Datos Nacional de Avicultores (1995).

mortalidad, antibióticos, pérdida de peso y mala conversión; en suma un impacto económico final de aproximadamente \$ 85,000 millones anuales<sup>56</sup>.

Debido a las elevadas pérdidas económicas producidas por esta enfermedad, el 26 de febrero de 1980, se estableció oficialmente en México la campaña de control y erradicación contra la enfermedad de la pulorosis y tifloidea aviar (TA)<sup>4</sup>.

La tifloidea aviar (TA), es una enfermedad septicémica ocasionada por *Salmonella gallinarum*, afecta principalmente al pollo y a la gallina de postura, dentro de estas las estirpes pesadas son las más susceptibles<sup>10,43,54</sup>. También afecta a la codorniz, el pavo y el pato<sup>6,43,54</sup>. Las vías de transmisión son: vertical; esta vía se considera la principal para la diseminación y perpetuación de la enfermedad<sup>44,50</sup>, ya que la bacteria tiene un tropismo por el ovario y se estima que de un 5 a un 33% de los huevos procedentes de gallinas infectadas contienen *S. gallinarum*, y la horizontal, ya que la infección se propaga de aves enfermas a sanas, actualmente se considera como la principal causa de diseminación entre granjas de aves reproductoras<sup>44</sup>. Se ha demostrado que un ave que se encuentra en fase aguda de la enfermedad, es capaz de excretar la bacteria a través de heces, secreciones nasales y oculares<sup>29,43,51</sup>. Es importante señalar el papel que juegan los pájaros, moscas y ratones como vectores mecánicos, inclusive otras especies de aves como el pavo y especies silvestres como reservorios de la bacteria<sup>6,32,43,54,73</sup>.

El periodo de incubación es de 4 a 5 días. El curso en aves infectadas transovariamente es de 2-3 semanas, en aves jóvenes es de unos cuantos días. La presentación de la enfermedad puede ser de forma subaguda a crónica y de la misma manera variará la severidad de las lesiones. La mortalidad dependerá de la edad de las aves y su susceptibilidad. Si la infección se adquirió transovariamente, la mortalidad se observa desde la primera semana de edad<sup>43,54</sup>.

## ETIOLOGÍA

*S. gallinarum* es un bacilo corto Gram-negativo, inmóvil, que carece de cápsula, esporas y flagelos, es un parásito intracelular, anaerobio facultativo<sup>15,17,54,60,73</sup>. Es resistente a los efectos de la congelación y descongelación diaria por un período de 43 días, se inactiva por la acción del fenol a una concentración 1:1000, el permanganato de potasio al 1% la inactiva en tres minutos y la formalina al 2% en 1 minuto. Posee la fórmula antigénica "O", 1,9,12<sup>24,74</sup>. Cuando la bacteria es sembrada en medios artificiales pierde rápidamente su patogenicidad, no así, si se almacena en congelación o liofilización.

## SIGNOS

Las aves recién nacidas infectadas transovariamente, se observan apáticas y anoréxicas, inclusive se ven aves muertas en la charola de nacimientos. En pollitos sobrevivientes se aprecia un excremento rico en uratos. En la forma aguda se advierte una anemia hemolítica ligera, debido a la pérdida de hasta el 70% de los glóbulos rojos provocada por el efecto de la endotoxina<sup>43,54</sup>.

En aves en postura se aprecian crestas y barbillas pálidas, en algunas ocasiones cianóticas; diarrea verdosa o amarillenta; debilidad, baja en la producción de huevo y en algunas aves gravemente afectadas cesa la producción<sup>54</sup>.

## LESIONES

La magnitud de las lesiones dependerá del curso de la enfermedad; en la forma sobreaguda no se observa ninguna lesión. En casos agudos se observan hepatomegalia y a los riñones aumentados de tamaño, congestionados y con necrosis multifocal. En aves

adultas se aprecia hepatomegalia con múltiples focos de necrosis y de color verde, el ovario se encuentra hemorrágico<sup>43,54</sup>.

## DIAGNÓSTICO

Un aspecto crítico para el control de la TA es la eficiencia en el diagnóstico, los métodos empleados actualmente son: aglutinación con sangre completa, aglutinación en placa, microaglutinación y el aislamiento bacteriano<sup>11,58</sup>.

La aglutinación con sangre completa y la aglutinación con suero, en placa, en las cuales se utiliza antígeno k-polivalente de *Salmonella pullorum*, son pruebas rápidas y fáciles de realizar, pero tienen baja especificidad<sup>9,38</sup>, debido a que estas pruebas detectan en mayor cantidad a los anticuerpos IgM, los cuales se producen en gran cantidad en la respuesta inmune primaria por lo que existe la posibilidad de obtener reacciones falsas positivas<sup>9,50,58</sup>.

La microaglutinación es una prueba que se emplea para confirmar la presencia de reacciones positivas<sup>23,58</sup>, pero se ha observado que se presentan reacciones cruzadas con otras bacterias Gram-negativas<sup>9</sup>.

El aislamiento bacteriológico es el método empleado para confirmar el diagnóstico, pero debido a que se necesitan por lo menos 72 horas una vez que la muestra es llevada al laboratorio para su realización, no puede considerarse como práctico, porque en la mayoría de las ocasiones el tiempo es vital para emprender las medidas de control pertinentes.

Se han obtenido buenos resultados al emplear la técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para el diagnóstico de *S. gallinarum*<sup>8,11,42,65</sup>, *S. enteritidis*<sup>7,37,47,61</sup>, *S. typhi*<sup>68,69,70</sup> y *S. typhimurium*<sup>42,48</sup>, en algunos con especificidad de hasta 100% y sensibilidad del 96%<sup>69</sup>. Los antígenos empleados en esta han sido lipopolisacáridos<sup>42,47</sup>, flagelos<sup>61</sup> y proteínas de membrana externa<sup>65,66,67,68,69,70</sup>.

## MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DEL GENERO *Salmonella*.

Todas las especies de *Salmonella* poseen una endotoxina, el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa. Las cadenas laterales O-específicas de LPS constituyen los antígenos O lisos de estas bacterias. Por otra parte, se ha demostrado la actividad de una enterotoxina de *S. gallinarum* análoga a la toxina lábil (*Labil toxin LT*) de *E.coli* y toxina colérica (*Cholera toxin CT*) de *Vibrio cholerae*<sup>64</sup>. Para la virulencia y sobrevivencia *in vivo* de *Salmonella* es necesario la capacidad de capturar hierro. Se ha visto que ratones nutricionalmente deficientes en hierro son más resistentes a la infección, que los animales sin esta deficiencia<sup>24</sup>.

*S. typhimurium* y *S. choleraesuis* en cultivos celulares son capaces de producir un cambio sobre la superficie de la membrana celular de la célula huésped debido a un cambio en la actina de la membrana celular, posteriormente la bacteria penetra dentro de una vesícula endocítica y en ella se multiplica. Una vez fagocitada la bacteria la membrana celular recobra su aspecto normal. Al parecer dicho mecanismo es relacionado con un grupo de genes denominados *inv (inv A-P)*<sup>69</sup>.

La baja permeabilidad a componentes hidrofóbicos de la membrana externa de *E. coli* y *S. typhimurium* deben conferir una ventaja selectiva que los hace resistentes a las sales biliares y a pequeñas cadenas de ácidos grasos que son abundantes en el intestino delgado<sup>52</sup>.

Por otro lado Buchmier *et al* (1989), realizaron estudios con cepas mutantes de *S. typhimurium* que poseían inserciones Tn10 en genes necesarios para la supervivencia dentro de macrófagos, para evaluar la capacidad de supervivencia y observaron que los macrófagos peritoneales son más eficientes para matar a la bacteria en comparación con los derivados del bazo o de la médula ósea<sup>13</sup>. La *S. typhimurium* inhibe la fusión del

fagosoma-lisosoma<sup>14,21</sup>. Di Donato *et al* (1986) demostraron que las porinas inhiben la fagocitosis por la activación de la adenil ciclasa<sup>22</sup>.

## ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Las bacterias Gram negativas poseen como parte de su envoltura celular al antígeno somático "O", el cual está compuesto por cadenas de polisacárido. Algunos antígenos "O" están relacionados con la producción de colonias lisas. Por el contrario, la ausencia de este antígeno, da como resultado la producción de cepas rugosas las cuales son fácilmente fagocitadas. Las cepas lisas están relacionadas con la virulencia por la resistencia que presentan a la fagocitosis<sup>23</sup>.

Entre las salmonelas se encuentran antígenos "O" diferentes que se denominan con números arábigos. Una bacteria puede contener más de un antígeno "O" y tienden a aparecer en combinaciones periódicos<sup>24</sup>.

En *S. typhi* y *S. enteritidis* se encuentra un antígeno de superficie compuesto por polisacáridos que es termolábil y se conoce como Vi y es superficial en relación al antígeno "O"; la capacidad de aglutinación puede ser reestablecida en el antisuero del grupo O cuando el antígeno es destruido por calor<sup>24</sup>.

Algunas cepas patógenas de *E. coli* y *S. typhi* poseen una cápsula delgada compuesta de polisacáridos acidofílicos, la cual retarda el proceso de fagocitosis. Probablemente debido a la presencia de la cápsula, se impide la activación de la vía alterna del complemento<sup>24</sup>.

Los antígenos flagelares, pueden presentarse en dos fases normalmente irreversibles: Fase 1 y Fase 2 los cuales son lábiles al calor y al tratamiento con ácido o etanol. Los antígenos en fase 1 se denominan arbitrariamente con letras minúsculas y los antígenos en Fase 2 se designan con números arábigos. Las cepas que poseen ambos tipos, son bifásicas y los que tienen uno son monofásicas<sup>12,24</sup>.



## MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa (ME) de las bacterias Gram-negativas, es una estructura constituida por una bicapa de moléculas anfipáticas. Debido a la baja permeabilidad, una de sus funciones es la de proteger a la bacteria de la acción de las sales biliares, pequeñas cadenas de ácidos grasos y en contra de las enzimas digestivas en el intestino delgado. Está constituida en un 20% a 25% de fosfolípidos, 30% de lipopolisacáridos y 45% a 50% de proteínas. En su parte exterior está formada por lipopolisacáridos y proteínas y hacia su cara interna por los fosfolípidos<sup>21,52</sup>.

La membrana externa es mucho más permeable que otras membranas, es ligeramente permeable a solutos hidrofóbicos, posiblemente se deba al componente lipopolisacárido. También es una barrera para solutos hidrofílicos con pesos moleculares de 1000 daltons o más<sup>24</sup>.

Se ha estimado que en la parte externa de la membrana externa, los LPS ocupan el 41% y las proteínas el 59% en tanto que la interna el 53% por fosfolípidos y el 47% por proteínas. En *S. typhimurium* se ha encontrado que contiene cerca de  $1.5 \times 10^6$  moléculas de fosfolípidos y  $5.8 \times 10^5$  moléculas de monómeros de LPS por  $\mu\text{m}^2$  de membrana externa<sup>45</sup>.

**FOSFOLÍPIDOS.** Los fosfolípidos de la parte externa de la ME son muy similares a los de la parte interna básicamente están formados por fosfatidil etanolamina, algunos por fosfatidil glicerol y una cantidad muy pequeña de cardiolipinas<sup>12,21</sup>.

El lipopolisacárido es una molécula anfipática, hidrofílica en su parte polisacárida e hidrofóbica en su porción lipídica la cual recibe el nombre de Lípido A. En la porción externa contiene al antígeno somático "O"<sup>19,52</sup>.

La composición protéica de la membrana externa es relativamente más simple que la de la membrana citoplasmática, y en general es pobre en cuanto a la presencia de

proteínas con actividad enzimática. La fosfolipasa A es la primera proteína de la membrana externa con actividad enzimática que se informó dentro de los miembros de las enterobacterias<sup>52</sup>.

**PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA.** Muchas de las propiedades de la membrana externa se atribuyen a las proteínas principales y se localizan en la ME, se encuentran en una proporción de aproximadamente  $10^5$  moléculas/bacteria aunque incluyen algunas especies proteicas diferentes<sup>46</sup>. Las proteínas principales se pueden dividir en tres grupos: 1) proteínas que forman poros o porinas, 2) proteínas no porinas o estructurales y 3) lipoproteínas.

Algunas proteínas de la membrana externa facilitan el paso de solutos. Dichas moléculas hidrofílicas son suficientemente pequeñas para atravesar la membrana externa por difusión a través de las porinas. Las porinas posiblemente excluyan a los compuestos hidrofóbicos<sup>12,19,21</sup>.

Todas las proteínas están codificadas por los genes, la regulación genética de las proteínas de la membrana externa están en parte supeditadas a factores externos como por ejemplo: una mutación en el locus *tolF* da como resultado la ausencia de la proteína Ia.<sup>45</sup>

Dentro de las proteínas no porinas se encuentra una proteína principal denominada Omp A y la lipoproteína de Braun, ambas participan en la estabilización de la ME, además Omp A es necesaria para que se lleve a cabo el fenómeno de conjugación mediado por el factor "F" en el caso de *E. coli*<sup>45,46</sup>.

También se han descrito otras proteínas como una fosfolipasa A, una proteasa, proteína Tsx, proteína Btu B y las proteínas Ton A, Fec, Fep A y Cir<sup>52</sup>.

Se ha reportado que en *E. coli*, las proteínas feulB, tonB y cit están involucradas en el transporte de hierro quelado y la proteína tsx facilita la difusión de nucleósidos a

través de la membrana externa<sup>46,52</sup>. Las lipoproteínas son las más pequeñas de la membrana externa, pero frecuentemente son las más numerosas y se encuentran unidas covalentemente con el peptidoglicano<sup>21</sup>

Las porinas se clasifican en tres tipos: a) el primer tipo forma canales acuosos que permiten el paso por difusión pasiva de solutos a través de la ME, la selectividad esta muy relacionada con el tamaño de los solutos en relación a el diámetro del poro, b) un segundo tipo esta relacionado con el transporte de oligosacáridos y nucleósidos, y c) un tercer tipo funciona en la captación de moléculas de solutos de gran tamaño, y este tipo puede interactuar directamente con el soluto<sup>21,30</sup>.

Las porinas se conforman en trómeros, sobre la superficie externa de la membrana, y algunas de ellas poseen tres canales, los cuales se fusionan en la parte media para formar un solo canal que desemboca hacia la parte interna, permitiendo así el paso de solutos de bajo peso molecular, como: aminoácidos, nucleósidos y algunos iones metálicos<sup>19,36,45,52</sup>. Las porinas tienen la capacidad de mantener su estado de trómeros aún en presencia de detergentes como el duodecil sulfato de sodio (SDS) a temperaturas menores de 60°C. Estas proteínas poseen una región hidrofóbica y una hidrofílica<sup>19,45</sup>.

*S. typhimurium* expresa 3 tipos de porinas principales, OmpD, OmpF, y OmpC, cuyos respectivos genes están regulados por una serie de factores extracelulares, por ejemplo los genes que codifican para la producción de OmpC y OmpF de *E. coli*, se encuentran regulados por osmolaridad y temperatura, y la expresión de las porinas OmpC y OmpF de *S. typhimurium* se regula de manera muy similar a OmpF y OmpC de *E. coli*<sup>41</sup>. En contraste OmpC de *S. typhi* no se regula por osmolaridad<sup>55</sup>.

Las porinas poseen una alta capacidad para conferir protección, Udliaynkumar y Muthukkaruppan (1987), demostraron que el pPME de *S. typhimurium* fue capaz de inducir una inmunidad protectora contra la salmonelosis en ratones<sup>63</sup>. Kussi *et al* (1981),

administraron preparados de proteínas de la membrana externa ( pPME) a ratones, y observaron que al administrarse preparados de estas proteínas produjeron hasta un 100% de protección cuando se desafiaron con cepas homólogas y un 50% contra otra especie<sup>39</sup>. Por otro lado Isibasi *et al* (1988), inocularon 30µg de proteínas de la membrana externa de *S. typhi* en ratones a los cuales posteriormente se les desafió con 1,000 DL<sub>50</sub> de 2 cepas de *S. typhi* y se determinó un 30% de protección<sup>35</sup>.

Se han realizado estudios para evaluar las propiedades de las porinas. Galdiero *et al* realizaron estudios en pacientes con fiebre tifoidea para determinar la capacidad antigénica de las porinas de *S. typhi*<sup>16</sup>.

Bouzoubaa *et al* (1987) determinaron la protección en pollos que fueron vacunados con un pPME y una bacterina, ambas de *S. gallinarum*. Las aves fueron desafiadas oralmente con 10 DL<sub>50</sub> de *S. gallinarum* obteniendo resultados del 100% de protección contra el desafío oral en aquellos pollos que fueron inmunizados con el pPME. Los extractos de *S. gallinarum*, fueron superiores a la vacuna 9R. La infección sistémica se redujo a 5% en las aves vacunadas dos veces con la proteína con un adyuvante oleoso<sup>11</sup>.

También se ha demostrado que las porinas de *S. typhimurium* producen procesos inflamatorios por la activación del complemento y por la liberación de histamina. La inyección de 100 µg de porinas a cobayos indujeron la activación del complemento 6 horas post inoculación y sus efectos persistieron por más de 12 horas<sup>26</sup>.

Galdiero *et al* (1990), demostraron que al administrarse de 1 a 10 µg/ml de porinas en células peritoneales de ratón, se observó liberación de histamina. El edema inducido por 30 µg de porinas fue similar al causado por 1mg de Carragenina<sup>27</sup>.

Se ha demostrado que porinas inducen la liberación del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), y de las interleucinas: IL-1 $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , e IL-4. Galdiero *et al*

demonstraron que 1µg/ml de porinas inducen la liberación de TNF-α, IL-1α, IL-6, IL-4 mientras que 5µg/ml inducen la liberación de IFN-γ. También desencadenan al complemento por medio de la activación del TNF-α<sup>25,27</sup>.

## ELISA

Las pruebas serológicas se pueden clasificar en a) Pruebas de Unión Primaria estas se realizan al combinar antígenos y anticuerpos, en este tipo de prueba se cuantifican los complejos inmunes formados para lo cual pueden utilizarse radioisótopos, colorantes fluorescentes o marcadores enzimáticos, dentro de este grupo se encuentran las pruebas de: radioinmunoanálisis, inmunofluorescencia y las inmunoenzimáticas. En comparación con las pruebas de unión secundaria, estas son capaces de detectar cantidades muy pequeñas de antígeno, traduciéndose en alta sensibilidad y especificidad. b) Pruebas de Unión Secundaria, son aquellas que miden los resultados de la interacción antígeno-anticuerpos (Ag-Ac) realizada *in vitro*. Dentro de este grupo se encuentran la mayoría de las pruebas (Inhibición de la hemoaglutinación, Pruebas de fijación del complemento, Aglutinación bacteriana) y c) Pruebas de Unión Terciaria que miden el efecto protector de los anticuerpos en un animal como ejemplo tenemos a la prueba de anafilaxia cutánea pasiva<sup>62</sup>.

Dentro de las pruebas inmunoenzimáticas las más importantes son las inmunoabsorbentes ligadas a enzimas. Los métodos de ELISA se clasifican en: Método Indirecto, Indirecto modificado, competitivo, doble sandwich, y doble sandwich modificado<sup>72</sup>.

El uso de la técnica de ELISA en la medicina humana es amplio, Araj *et al* (1987) utilizaron una ELISA para el diagnóstico de *Salmonella* spp. a partir de muestras de orina y suero de pacientes con bacteremia sospechosos de salmonelosis, en donde observaron resultados satisfactorios<sup>5</sup>. En la Medicina Veterinaria se ha constituido

como una herramienta importante para el diagnóstico de las enfermedades bacterianas, virales y parasitarias de los animales<sup>57</sup>. Se han realizado diversos estudios en donde se ha observado la efectividad de esta prueba.

La prueba de ELISA no sólo es útil para la detección de anticuerpos sino también para detectar al antígeno. Hassan *et al* (1991), emplearon una ELISA indirecta utilizando como fase sólida antisueros policlonales para *S. typhimurium* y *S. enteritidis* para detectar la presencia de *S. typhimurium* y *S. enteritidis* en donde se observó una buena correlación entre la ELISA y el cultivo bacteriológico<sup>51</sup>.

En el caso de las enfermedades bacterianas, se han utilizado como antígenos diferentes estructuras de las bacterias, tal es el caso de los LPS, antígenos flagelares y más recientemente los pPME. Barrow *et al* (1992), utilizaron un polisacárido de *S. gallinarum* como antígeno en una ELISA indirecta, esta prueba pudo diferenciar la infección causada por este tipo de *S. gallinarum* con la de otros grupos. La incorporación de un antígeno en la prueba ELISA, permitió la diferenciación entre las infecciones causadas por *S. pullorum* y *S. enteritidis*<sup>8</sup>. Por otro lado, Van Zijderveld *et al* (1992), mediante una ELISA utilizando los LPS como antígeno de captura, no fueron capaces de discriminar entre la respuesta inmune humoral anticuerpos contra *S. panama* y *S. enteritidis*. Sin embargo, coinciden con otros autores en la posibilidad de utilizar la ELISA como una técnica apropiada para monitorear grandes poblaciones, gracias a su rapidez y sensibilidad<sup>75</sup>.

Recientemente se han estudiado a los pPME como posibles antígenos de detección en la técnica de ELISA. Verdugo-Rodríguez *et al*, utilizaron pPME de *S. typhi* para diagnosticar pacientes con fiebre tifoidea y en donde obtuvieron una especificidad del 100% y una sensibilidad del 94%<sup>69</sup>. Posteriormente, Vázquez (1995) desarrolló un inmuno ensayo indirecto utilizando preparaciones de PME de diferentes cepas de *S. gallinarum*, observó una especificidad del 97% y una sensibilidad del 98.5%<sup>65</sup>. Los resultados obtenidos por Verdugo-Rodríguez *et al*<sup>68,69,70</sup> y Vázquez *et al*<sup>65,66,67</sup> sugieren

suponer que esta prueba puede ser utilizada como un método alternativo para el diagnóstico de la TA en granjas, por lo que es necesario evaluar su especificidad y sensibilidad en condiciones de campo.

## HIPÓTESIS

La técnica de ELISA utilizando como antígeno de captura una preparación de PME de *S. gallinarum* cepa U2, es una prueba de diagnóstico eficaz, ya que posee una alta sensibilidad y especificidad para la tifoidea aviar, cuyo resultado se obtiene en 4 horas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Realizar estudios de validación en campo de un inmunoensayo enzimático (TA-ELISA), previamente estandarizado bajo condiciones controladas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Producción de sueros contra *S. gallinarum* cepa U2 NA/NO (grupo testigo positivo).
2. Obtención de sueros de pollos *spf*, para ser utilizados como grupo testigo negativo.
3. Elaboración del pPME de *S. gallinarum* U2 NA/NO que será utilizado como antígeno para la TA-ELISA.
4. Obtención de sueros de gallinas provenientes de granjas comerciales.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANTÍGENO

Para inocular a las aves se emplearon 2 cepas: una de *Salmonella gallinarum* U2 resistente al ácido nalidixico y a la novobiocina (NA/NO) donada por el MVZ Mario Padrón, a la cual se le dieron 5 pases en ave viva para recuperar su patogenicidad, y otra de *S. enteritidis* fagotipo 13 NA/NO obtenida del National Veterinary Services Laboratory, Ames, I.A.5001.

### AVES

Se emplearon 125 pollos de 4 semanas de edad Libres de Patógenos Específicos (specific pathogen free: *spf*) raza ligera obtenidos en ALPES S.A. de C.V.

### ALIMENTO

Se emplearon raciones de iniciación y crecimiento no comerciales, libres de *S. gallinarum* y antibióticos, especiales para pollos *spf*<sup>a</sup>.

---

<sup>a</sup> Investigación Aplicada S.A., Tehuacan, Puebla.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo comprendió tres etapas: 1. Obtención de sueros de grupos de pollos *spf* inoculados y bajo condiciones controladas (Cuadro 1), 2. Recolección de sueros de campo (Cuadro 2) y 3. Valoración de los sueros mediante el TA-ELISA (Cuadro 3).

### FASE 1. OBTENCIÓN DE SUEROS TESTIGOS.

1. Las aves *spf* de 4 semanas de edad se mantuvieron en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la F.M.V.Z. UNAM, en corrales de madera con cama de viruta.

Desde su recepción y hasta la finalización del experimento se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. A la quinta semana las aves se dividieron en 3 grupos: a) grupo 1: aves inoculadas con *S. gallinarum* NA/NO, b) grupo 2: aves inoculadas con *S. enteritidis* NA/NO; y c) grupo 3: aves no inoculadas (testigo negativo).

Antes de ser inoculadas, se les tomó una muestra de sangre de la vena radial con el objeto de obtener un parámetro basal. Al día siguiente las aves se inocularon por vía oral con una dosis de  $1 \times 10^9$  UFC/ml de *S. gallinarum*. A las 48 y 72 h post inoculación (PI) se tomaron hisopos cloacales y sangre. A los días 7, 14, 21, 28 y 35 PI se realizaron los muestreos sanguíneos de los 3 grupos. A los 35 PI los pollos fueron sacrificados por desnucamiento, se tomaron muestras de hígado, bazo y tonsilas cecales.

Las muestras sanguíneas se tomaron sin anticoagulante, posteriormente los sueros se centrifugaron a 2,000 revoluciones por minuto (2 Krpm) durante 10 min. Una

---

<sup>1</sup> IEC CENTRA-7R International Equipment Company, U.S.A.

vez obtenidos los sueros se depositaron en microtubos (ependorf)<sup>a</sup> y se almacenaron en congelación a -20°C.

Cuadro 1. Diseño experimental Fase 1.

GRUPO	# DE POLLOS	TRATAMIENTO	VIA ORAL DOSIS UFC/100µl	DIAS OE MUESTREO POSTINFECCION
1	55	<i>S.gallinarum</i> U2/NANO	1x10 <sup>9</sup>	0, 7, 14, 21, 28, 35
2	20	<i>S. enteritidis</i>	1x10 <sup>9</sup>	0, 7, 14, 21, 28, 35
3	50	TESTIGO / PBS		0, 7, 14, 21, 28, 35

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La cepa se sembró en caldo de medio "A" (caldo nutritivo<sup>b</sup> 0.7% + extracto de levadura<sup>c</sup> 0.1% + glicerol<sup>d</sup> 0.2% + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.31%<sup>a</sup> + KH<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0.13%) y se incubó a 37°C por 24 h. Los cultivos se depositaron en tubos cónicos de 40 ml y se centrifugaron a 2 Krpm por 10 min, se decantó el sobrenadante, posteriormente se realizaron 2 lavados a la bacteria con una solución salina fosfatada (PBS), centrifugándose a 2 Krpm<sup>e</sup> por 10 minutos. Al término de este procedimiento el inóculo se ajustó con un espectrofotómetro<sup>f</sup> a una concentración celular de 1x10<sup>9</sup> UFC/ml.

Para verificar la estandarización del inóculo se realizaron diluciones décuples seriadas, se sembraron en agar nutritivo (caldo nutritivo 0.7% + extracto de

<sup>a</sup> Ralnin Instruments CO. INC Woburn, MA

<sup>b</sup> Merk Naucalpan de Juárez Edo. de México.

<sup>c</sup> DIFCO, Laboratories, Detroit, Michigan USA

<sup>d</sup> J.T. Baker S.A. de C.V., Edo. de Méx. México.

<sup>e</sup> IEC CENTRA-7E 216 International Equipment USA.

<sup>f</sup> Milton Roy Spectronic 20D

levadura 0.1% + glicerol 0.2% +  $K_2HPO_4$  0.31% +  $KH_2PO_4$  0.13% + 1.5% agar nutritivo<sup>1</sup>) y a las 24 h se realizo la lectura de las colonias por placa.

## ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

Se siguieron los lineamientos de Andrews y Poelma (1978) para el aislamiento de *Salmonella*<sup>1</sup>. Los hisopos cloacales y los órganos de las aves inoculadas se sembraron en tubos con 10 ml caldo tetracionato, la sangre se sembró en un medio difásico. Las muestras se incubaron a 37°C por 24hs, posteriormente se pasaron a cajas de agar Mac'Conkey y verde brillante incubándose a 37°C; a las 24 hs, se les realizaron pruebas bioquímicas a las colonias morfológicamente sospechosas de *Salmonella* spp. De la misma manera se hicieron pruebas complementarias con azúcares a todas aquellas que fueron positivas a las bioquímicas; por último y para confirmar cada uno de los aislamientos, se efectuó a cada una de las cepas, una aglutinación con un antisuero comercial (factores 1,9,12)

## FASE 2. OBTENCIÓN DE SUEROS DE CAMPO

Se tomaron sueros de las aves remitidas al Departamento de Producción Animal : Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM., para su diagnóstico (libres de *Salmonella* spp.), así como de grajias comerciales integrando 4 grupos diferentes :

**Cuadro 2.** Diseño experimental Fase 2.

GRUPO	TRATAMIENTO	# DE SUEROS	UBICACIÓN GRANJA
1	<i>Salmonella gallinarum</i>	266	TLAXCALA
2	<i>Salmonella enteritidis</i>	244	EDO. MEX.
3	<i>Salmonella gallinarum</i> 9R	244	CEIPA/UNAM
4	ENTEROBACTERIAS	45	DPA:AVES

<sup>1</sup> DIFCO, Laboratories, Detroit, Michigan USA.

### FASE 3. VALIDACIÓN DE LA TA-ELISA CINETICA DE CRECIMIENTO

Para la extracción de las proteínas se necesitó conocer la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento, por lo que se determinó la curva de crecimiento de la bacteria. La bacteria se sembró en 50 ml de medio general "A" y se incubó a 37°C con agitación (200 rpm)<sup>a</sup> durante 18 horas. Posteriormente se tomaron 2 ml del preinóculo y se inocularon a 50 ml de medio "A" y se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm). Cada hora se realizaron lecturas de la bacteria por medio de espectofotometría<sup>b</sup> a 540 nm.

### PREPARACIÓN DE pPME

La *Salmonella gallinarum* cepa U2 NA/NO fue sembrada en medio "A" y se incubó hasta llegar a la fase estacionaria temprana (28 h) (figura 1), el cultivo se centrifugó<sup>c</sup> a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Las pastillas se resuspendieron en una solución 10 mM de fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), usándose por sonicación<sup>d</sup> con 7 pulsos de 60 seg cada uno a 12 kHz. Las células lisadas se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 35,000 rpm por 35 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió con una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  al 10 mM con 2% de triton X-100 y se incubó en baño maría a 37°C por 30 minutos, posteriormente se centrifugó<sup>e</sup> 2 veces a 35,000 rpm por 35 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante cuidadosamente. Para su almacenamiento, se hicieron alícuotas y se almacenaron en congelación a -20°C hasta su uso.

<sup>a</sup> New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J. USA., Modelo U-24.

<sup>b</sup> Milton Roy Spectronic 20D.

<sup>c</sup> Beckman J2-21 Centrifuge Rotor JA-17.

<sup>d</sup> Soniprep 150, SANYO, U.S.A.

<sup>e</sup> Beckman L8-80 Ultracentrifuge Rotor SW50.1-50 ti00.

Todos los sueros fueron procesados utilizando la técnica de ELISA para determinar los niveles de anticuerpos. Se empleó la técnica estandarizada por Vázquez *et al*<sup>65</sup>.

#### TECNICA DE ELISA

El antígeno extraído se inmovilizó en Microplacas<sup>a</sup> depositando 100µl/pozo a una concentración de 2µg/ml de proteína por placa durante 24 h. Previo a la utilización de la placa, se lavó 3 veces con una solución de PBS tween-20<sup>b</sup> al 0.05%. Las placas se bloquearon con 150µl/pozo de una solución de Albúmina bovina sérica (BSA)<sup>b</sup> al 1% y se dejó actuar por 60 minutos a 37°C, se lavaron con PBS tween-20 al 0.05%, 3 veces. En cada pozo se depositó 100µl de los sueros a estudiar a una dilución de 1:9375, se incubaron a 37°C por 90 minutos y se lavaron 3 veces con solución PBS tween-20 al 0.05 %.

Posteriormente a cada pozo se le agregó 100µl IgG de cabra anti-Ig de pollo acoplada con biotina<sup>c</sup> a una dilución de 1:1000, incubándose durante 60 minutos a 37°C, se lavaron 3 veces con una solución PBS-tween 20 al 0.05 %, para después depositar en cada pozo 100µl del conjugado ( *streptavidina acoplada con peroxidasa* )<sup>c</sup> diluido 1:3000, se incubó por 60 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 5 veces con PBS-tween 20 al 0.05 %, dejando un intervalo de 5 minutos entre cada lavado. Finalmente por último se agregó a cada pozo, 100µl de una solución del sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y ABTS ( *3-ethyl-benzyl-thiazoline sulfonic acid* )<sup>b</sup> y se dejó reaccionar por 35 minutos. Las placas se leyeron en un lector de ELISA<sup>d</sup> a los 35 minutos, con una longitud de onda de 405 nm.

<sup>a</sup> NUNC-IMMUNO MODULE POLYSORB F8, Denmark.

<sup>b</sup> Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, MO, USA.

<sup>c</sup> Vector Laboratories, Inc, U.S.A.

<sup>d</sup> Microplate Reader modelo 3550, Bio-Rad, Laboratories, Richmond USA.

**Cuadro 3.** Diseño experimental fase 3, grupos evaluados por la TA-ELISA.

GRUPO	TRATAMIENTO	# DE SUEROS
1	Pollos <i>spf</i> inoculados con <i>S. gallinarum</i> .	8
2	Pollos <i>spf</i>	8
3	Gallinas infección de <i>S. gallinarum</i> .	266
4	Gallinas infección de <i>Salmonella</i> sp. móvil	244
5	Gallinas vacunados con <i>S. gallinarum</i> 9R.	244
6	Gallinas asociadas a otras enterobacterias no patógenas	45

### CARACTERIZACIÓN DEL pPME

Se realizó en geles de poliacrilamida SDS desnaturalizantes al 13% (PAGE-SDS al 13%). La muestra se preparó con 94 µl del pPME, 5µl de SDS al 20%, 1µl de β-mercaptoetanol y azul de bromofenol (0.001%)<sup>a</sup>. La muestra se desnaturalizó por ebullición durante 5 minutos<sup>70</sup>.

### CUANTIFICACIÓN DEL pPME

Una vez obtenido el preparado se cuantificó mediante el sistema micro BCA (ácido bicinconínico)<sup>b</sup> siguiendo los lineamientos recomendados por el laboratorio<sup>53</sup>.

### PUNTO DE CORTE

Para determinar el punto de corte, se utilizó el método descrito por Nielsen *et al*<sup>19</sup>. Se utilizaron 8 sueros de pollos *spf* inoculados experimentalmente con *S. gallinarum* de 28 días PI (grupo testigo positivo) y los sueros de 8 pollos *spf* (grupo

<sup>a</sup> Sigma Immuno Chemical, St. Louis, MO. USA.

<sup>b</sup> Pierce Chemical, Co., Rockford, IL, USA.

testigo negativo), los cuales fueron leídos a una longitud de onda de 405 nm obteniendo una densidad óptica (D.O.) de 0,496.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El número de sueros detectados por la TA-ELISA como positivos en cada grupo, fueron analizados mediante una prueba de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) para determinar las diferencias significativas entre los grupos.

Las D.O. obtenidas de cada uno de los sueros evaluados por la TA-ELISA, fueron analizados mediante un Análisis de Varianza, y se obtuvieron las diferencias significativas entre grupos mediante la prueba de Duncan, utilizando el programa de análisis estadístico SAS<sup>®</sup> <sup>49</sup>.

---

<sup>49</sup> SAS INST. CARY, N.C.



## RESULTADOS

### ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

Apartir de hemocultivos se obtuvo un 81.81% de aislamiento de las aves inoculadas con *S. gallinarum* a las 48 y 72 h PI. Sólo se obtuvo un 1.81% de aislamientos a partir de hisopos cloacales y órganos (ver figura 2).

El total de aislamientos de *S. enteritidis* a partir del hemocultivo fue del 20% (4 aves). En donde el 75% fue a las 48 h y 25% a las 72 h. El mayor número de aislamientos se obtuvo a partir de hisopos cloacales donde, se logró recuperar la bacteria de un 80% a las 48 h y 90% a las 72 h. En tanto el aislamiento de la bacteria a partir de órganos no fue posible (ver figura 2).

### PREPARADO DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA

Una vez obtenido el preparado se cuantificó mediante el sistema micro BCA (ácido bicinonfalco)<sup>a</sup> siguiendo los lineamientos recomendados por el laboratorio (Pierce 1993), obteniéndose una concentración de pPME 24.4 mg/ml. Las bandas reveladas a partir del PAGE-SDS 13% con tinción de Coomassie<sup>b</sup> fueron de aproximadamente 47.86 kDA y 29.5 kDA.

### VALIDACIÓN DE LA TA-ELISA

Se evaluaron un total de 799 sueros. Para determinar el punto de corte se compararon los resultados obtenidos por la TA-ELISA, con un grupo de 8 sueros de pollos *spf* infectados experimentalmente positivos al aislamiento y la aglutinación en

---

<sup>a</sup> Pierce Chemical, Co., Rockford, IL, USA.

<sup>b</sup> Sigma Immuno Chemicals St. Louis, M.O. USA.

placa con el antígeno k-polivalente<sup>a</sup> y 8 sueros de pollos *spf* del grupo testigo negativo. Los resultados se expresaron como porcentajes de absorbancia obtenidos a partir de un suero positivo<sup>49</sup>. Se determinó un punto de corte de 80% (D.O. 0.496) ( ver cuadro 4 y figura 3).

En el cuadro 5 (Resultados de la TA-ELISA de *Salmonella gallinarum* analizados por la prueba de Ji cuadrada, al ser comparados con el grupo testigo positivo), se puede ver que la TA-ELISA detectó positivos al 80.45% (214 sueros) de los sueros del grupo 3 con una significancia del  $p > 0.05$ . En el grupo 4 la prueba detectó al 54.51% ( 133 sueros) de los sueros como positivos con una significancia del  $P < 0.025$ . En tanto en el grupo 5, el 33.2% (81 sueros) fue positivo a la TA-ELISA con una significancia de  $P < 0.001$ . Por último en el grupo 6, se observó una seropositividad del 2.22% (1 suero) con una significancia del  $P < 0.001$ .

En el cuadro 6, se observa que el comportamiento de la TA-ELISA en el grupo 3 es similar al grupo testigo positivo pero diferente a los grupos 4, 5, y 6. En el caso del grupo 4 el comportamiento frente a la prueba, es similar grupo testigo positivo y al grupo 5, pero diferente al grupo 3 y al 6; en tanto que el grupo 5 sólo tiene similitud en comportamiento con el grupo 4 pero es diferente a los demás grupos; por último el grupo 6 no tiene similitud en comportamiento con ninguno de los grupos.

---

<sup>a</sup> Salsbury Laboratories, Charles City, Iowa 50616, E.U.A.

## DISCUSIÓN

La ELISA se ha convertido en una herramienta de elección en los laboratorios aviares, ya que a través de esta prueba se pueden manejar grandes volúmenes de sueros, es una prueba confiable rápida y sensible, sus resultados se han comparado con otras pruebas y han sido satisfactorios<sup>34,57,65,66,67,68,69,70</sup>.

En el estudio realizado por Vázquez *et al* (1995)<sup>65</sup>, la TA-ELISA detectó positivos al 100% de los sueros evaluados, sin embargo en este estudio la TA-ELISA detectó al 80.45% de los sueros correspondientes al grupo 3, esto concuerda con Nicholas y Cullen (1991)<sup>47</sup>, quienes mencionan que la reacción entre sueros homólogos es mayor que la observada entre sueros heterólogos. Por otra parte, en el primer caso las aves fueron inoculadas bajo condiciones controladas, con una dosis conocida de *S. gallinarum* por lo que la respuesta fue uniforme, en cambio en este caso los sueros fueron de gallinas con un brote de campo, y por tanto la respuesta no fue uniforme, debido a que la calidad e intensidad de la respuesta inmune ante una cepa de campo y una de laboratorio son muy diferentes<sup>54</sup>, por lo que las densidades ópticas ( DO ), observadas en el grupo 3 fueron más elevadas en relación al grupo 1.

La TA-ELISA fue eficaz para detectar los anticuerpos contra *S. gallinarum* y también contra *S. enteritidis*, esto concuerda con lo mencionado por algunos investigadores como Dankert y Hofstra (1980)<sup>33</sup>, Cooper *et al* (1989)<sup>18</sup> y Dadrast *et al* (1990)<sup>20</sup>, acerca de la antigenicidad cruzada de los componentes de la ME, no sólo entre los diferentes serotipos de salmonelas, en algunas ocasiones se observa esta reacción cruzada en las diferentes enterobacterias, razón por la que la TA-ELISA no discriminó los anticuerpos de las *Salmonellas* spp. móviles, sin embargo es necesario realizar más estudios que permitan esta diferenciación, ya sea al incluir un antígeno flagelar o encontrando estructuras específicas de *S. gallinarum*.

Así mismo Kuusi *et al* (1981)<sup>39</sup>, quienes inmunizaron ratones con un antisuero de conejo anti-porinas y otro con un antisuero de conejo anti-porinas-LPS y posteriormente los desafiaron con una cepa de *S. typhimurium* y por ELISA determinaron los títulos de anticuerpos, observaron una mejor respuesta en los ratones inmunizados con el preparado de Porinas-LPS, pero al detectar la cantidad de anticuerpos específicos contra los LPS, se observaron que estos eran iguales a los que se encontraron en los sueros contra el purificado, de igual manera en el grupo control negativo, lo que les permitió deducir que el papel de los LPS es como una especie de adyuvante de las porinas y no como antígenos.

Timoney y Sikora (1987)<sup>61</sup>, mediante ELISA utilizaron flagelina acoplada a la fase sólida para detectar sueros de pollos con *S. enteritidis*, sin embargo esta prueba también detectó en un bajo nivel sueros de pollos inoeculados con *S. pullorum*, lo que reafirma lo encontrado en el presente estudio.

De los sueros pertenecientes al grupo 3 al evaluar mediante la prueba de Duncan, se pudo apreciar que el comportamiento del grupo con respecto a la ELISA, es similar al del grupo 1, como ya se mencionó, el grupo control contenía sueros de pollos inmunizados con la misma cepa que se empleó para el TA-ELISA. Esto concuerda con lo observado por Barrow *et al* (1992)<sup>8</sup>.

En el grupo 4 formado por sueros de gallinas comerciales con problemas de Paratifoideas, se apreció una seropositividad del 54.51 %, al comparar su comportamiento con respecto a los otros grupos, se puede concluir que su comportamiento es parecido al grupo 1 y al 5. Nicholas *et al* (1991)<sup>47</sup>, observaron una significativa reacción cruzada entre el antígeno de *S. typhimurium* y los sueros de *S. enteritidis*.

En el grupo 5 la TA-ELISA sólo fue capaz de detectar como positivos al 33.2 % de los sueros, esto es contrario a lo reportado por Vázquez *et al*, donde el 77.78% de sueros de pollos inoculados experimentalmente con  $1 \times 10^8$  UFC de *S. gallinarum* 9R son positivos. Sin embargo no hay que olvidar el catabolismo de los anticuerpos<sup>8</sup>. Datos no incluidos en este estudio muestran el comportamiento inmunológico de las aves inoculadas experimentalmente, en donde se observó una ligera caída en los niveles hacia el día 35 PI, desafortunadamente, el modelo experimental no permitió evaluar en forma más detallada. Sin embargo, Barrow (1992)<sup>8</sup>, observó que los niveles de anticuerpos en pollos inoculados oralmente con *S. gallinarum*, alcanzaron su pico a las 8 semanas y comenzaron a bajar hasta la semana 16 para luego mantener niveles bajos pero constantes.

Se observó que el comportamiento de la TA-ELISA sobre el grupo de sueros con problemas de *Salmonellas* móviles (grupo 4), fue parecido al grupo testigo positivo y al grupo 5, Hosfira (1980)<sup>13</sup> y Nakaido (1979)<sup>16</sup>, mencionan que la antigenicidad cruzada de las PMI es un fenómeno generalmente observado entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

En datos no incluidos en este estudio acerca del perfil inmunológico de los sueros de pollitos inoculados experimentalmente, se observó una disminución en los niveles hacia el día 35 PI; los sueros de las gallinas con antecedentes de vacuna 9R tenían por lo menos 1 año de haber sido vacunadas. Sería importante para futuros trabajos evaluar el comportamiento de la TA-ELISA en sueros de gallinas vacunadas recientemente y con múltiples vacunaciones, ya que esta práctica es muy frecuente en gallinas reproductoras.

En el grupo 6 sólo se detectó como positivos al 2.22 %, su comportamiento fue distinto a los demás grupos, esto puede deberse parcialmente a que los agentes aislados en estas aves no resultaron ser patógenos invasivos para las aves, sería conveniente evaluar los sueros de gallinas con problemas de Enterobacterias, importantes en el aspecto clínico, como es el caso de *E.coli*. Barrow *et al* (1992)<sup>8</sup>, observaron que sueros

de pollos inoculados oralmente o parenteralmente con una cepa patógena de *E.coli*, reaccionaron con el antisuero polivalente de *Salmonella*; esto no sólo se observa en la prueba de ELISA, sino además en otro tipo de pruebas serológicas y es un punto muy importante para ser considerado en posteriores investigaciones<sup>9</sup>.

Los resultados anteriores sugieren que el TA-ELISA utilizando como fase sólida un pPME, de *S. gallinarum* es capaz de detectar a los sueros positivos de aves con problemas de salmonelosis, pero no posee una especificidad lo suficientemente alta para poder discriminar los anticuerpos contra *Salmonella* sp móvil.

El bajo índice de recuperación de la bacteria a partir de órganos, concuerda con lo observado por Garren y Hill (1959)<sup>28</sup>, quienes advirtieron un menor desarrollo de anticuerpos en la estirpe Leghorn en comparación con la estirpe Rhode Island, de igual manera Bumstead y Barrow (1993)<sup>45</sup>, observaron la resistencia genética de la estirpe Leghorn hacia *S. gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. pullorum* y *S. typhimurium*.

Como se observó en los resultados conseguidos por el aislamiento bacteriológico, el mayor porcentaje de aislamientos de *S. gallinarum* fue a partir de hemocultivo a las 72 h. PI, por el contrario sólo se aisló el 1.81 % a partir de órganos e hisopos cloacales. Con respecto al aislamiento de la bacteria a partir de los hisopos, concuerda con los trabajos realizados por Padrón (1987)<sup>51</sup>, quien determinó la excreción de la bacteria partir del quinto día PI.

En cuanto a los aislamientos de *S. enteritidis*, el mayor porcentaje se observó a partir de los hisopos cloacales (90%) a las 72 h PI. En hemocultivos se observó el 20%, no se pudo recuperar la bacteria a partir de órganos.

## CONCLUSIONES

La TA-ELISA resultó ser una prueba serológica efectiva para el diagnóstico de *S. gallinarum*, detecto los anticuerpos producidos contra *Salmonella enteritidis*, y en menor grado los anticuerpos dirigidos contra la cepa vacunal 9R. La TA-ELISA discrimino los anticuerpos contra otras Enterobacterias no patógenas. Si bien la TA-ELISA no fue capaz de discriminar los anticuerpos contra *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella gallinarum* cepa 9R, si demostró tener un comportamiento diferente en cada una de los grupos antes mencionados.

## LITERATURA CITADA

1. Andrews, W.H., Poelma, P.L., Wilson, C.R. and Romero, A.: Isolation and identification of *Salmonella*. In: Bacterial Analytical and Manual, 5<sup>th</sup> de. *Association of Official Analytical Chemist*, Washington, D.C. 1-29 (1978).
2. Anónimo: All about *Salmonella*. *Mixed World Poultr.m.*, 4:25-27 (1992).
3. Anónimo.: *Unión Nacional de Avicultores*. Boletín., 10:1-4 México. (1993)
4. Anónimo.: Comisión permanente para el control y erradicación de la pulorosis y tifoidea aviar . Programa y manual de normas y procedimientos de la campaña nacional contra la pulorosis y tifoidea aviar. *Asociación Americana de la soya*. México D.F. 1986.
5. Araj, G. F. and Chugh, T. D.: Detection of *Salmonella* spp. in clinical specimens by capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 25:2150-2153 (1987).
6. Arora, A.K., Gupta, S.C. and Kaushik, R.K.: Isolation of *Salmonella gallinarum* from turkeys. *Ind. Vet. Med., J.* 65:171 (1988).
7. Barrow, P., et al. Detection of *Salmonella* infection by ELISA. *Vet.Rec.*, 2: 586 (1989).
8. Barrow, P.A., Berchieri, A. and Al-Haddad, Jr. A.: Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum* - *S. pullorum*. Detected by enzyme-linked immunosorbent assay, *Avi. Dis.*, 36:227-236 (1992).
9. Bourhy, H., Guittet, M., L'Hospitalier, R., Bennejean, G., Morin, M., Le Coq H., et Morin Y.: Diagnostic serologique de l'infection a *Salmonella gallinarum-pullorum*. *Rec. Med. Vet.*, 164:213-220 (1988).
10. Bouzoubaa, K., Lemalnger, K. and Bell, J.C.: Village chickens as a reservoir of *Salmonella gallinarum* in Morocco. *Prev. Vet. Med.*, 12:95-100 (1992).
11. Bouzoubaa, K., Nagaraja, K.V., Newman, J.A. and Pomeroy, B.S.: Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avi. Dis.*, 31:699-704 (1987).



12. Boyd, R. R.: General Microbiology. *Times Mirror / Mosby College Publish* Second edition Virginia (1988).
13. Buchmeier N. A., Heffron, F.: Intracellular survival of Wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophages-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect. and Immun.*, 13:1-7 (1989).
14. Buchmeier, N. A. and Heffron, F.: Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. and Immun.*, 59:2232-2238 (1991).
15. Bunstead, N. and Barrow, P.: Resistance to *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. enteritidis* in inbred lines of chickens. *Avi. Dis.*, 37:189-193 (1993).
16. Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H., and Mora, G.C.: Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. and Immun.* 52:209-212 (1986).
17. Carter, G.R., D.V.M. MS., D.V. SC. *Enterobacteriaceae* In: Bacteriología y Micología Veterinarias. fourth edition Ed. *Manual Moderno* Philadelphia (1985).
18. Cooper, G.L., Nicholas, R.A. and Bracewell C.D. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*. *Vet. Rec.*, 125, 567-572 (1989).
19. Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Janssonius, J.N. and Rosenbush, J.P.: Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nat.*, 358: 727-733 (1992).
20. Dadrast, H. L., Hesbeth, R. and Taylor, D.J. Egg yolk antibody of *Salmonella* infected poultry. *Vet. Rec.*, 126, 219 (1990).
21. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. And Ginsberg, H. S.: Cell envelope; spores In: Microbiology *Harper and Row, Publishes* Third edition Philadelphia 1980.
22. Di Donato, A., Draetta, G. F. and Illiano, G.: Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation *Res.*, 11:87-97 (1986).
23. Frazier, N. M.: Application of microtiter test on *Salmonella gallinarum* vaccinated flocks field report. V Convención anual de Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Acapulco Gro, 1980. 226-229. México

24. Freeman, B.A.: Bacilos entericos: *Salmonella*, *Arizona* y *Citrobacter* In: *Microbiología de Burrows*. 22 ed. Ed. *Interamericana McGraw-Hill*, México, D.F. 1989.
25. Galdiero, F., Cipollaro de Lero, G., Benedetto N., Galdiero, M. and Tufano M. A.: Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect and Immun.*, 61: 155-161 (1993).
26. Galdiero, F., Tufano, M. A., Sommese, L., Folgore, A. and Tedesco, F.: Activation of complement system by porins extracted from *Salmonella typhimurium*. *Infect. and Imm.*, 46: 559-563 (1984).
27. Galdiero, F., Tufano, M. A., Galdiero M., Masiello, S., and Di Rosa, M.: Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. and Imm.*, 58: 3183-3186, 10 (1990)
28. Garren, H. W. and Hill, C. H.: Agglutinating antibody titers of young with the Leghorns and Rhode island reds following inoculation with live and inactivated *Salmonella gallinarum* cultures. *Poul. Sci.*, 26: 918-922 (1959).
29. Hall, W.J., Legenhausen, D. H., MacDonald, A.D.: Studies in fowl typhid. Y. Nature and Disemination. *Poult. Sci.*, 28: 344 -362 (1949)
30. Hancock, R. E. W.: Role of porins in outer membrane. *J. Bacteriol.* 169:929-933 (1987).
31. Hassan, J. O., Mockett, A. P. A., McLeod, S. and Barrow P. A.: Indirect antigen-trap ELISAs using polyclonal antisera for detection of group B and D *Salmonellas* in chickens. *Avian Pathol.*, 20: 271-281 (1991).
32. Henzler, D.J. and Optiz, H.M.: The role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infection on chicken layer farms. *Avi. Dis.*, 36: 625-631 (1992).
33. Hofstra, H., and Dankert, J.: Major outer membrane proteins: common antigens in enterobacteriaceae species. *J. Gen. Microbiol.*, 119: 123-131 (1980).
34. Hopkins, B.A., Skeeles, J.K., Houghten, G.E. and Story J.D.: Development of an Enzyme-linked immunosorbent assay for *Bordetella avium*. *Avian Dis.*, 32: 353-361.
35. Islbasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J.: Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,VI. *Infect. and Immun.*, 56: 2953-2959 (1988).

36. Jeanteur, D., Lakey, J. H., and Pattus, F.: The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.*, 5:2153-2164 (1991).
37. Kim, C. J., Nagaraja, K. V., Pomeroy, B. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 52:1069-1074 (1991).
38. Kumar, A. and Kaushik, R.K.: Comparative evaluation of some diagnostic test used for diagnosis fowl typhoid. *Ind. Vet. Med. J.*, 12:138-141 (1988).
39. Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H. and Mäkelä, P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. and Immun.*, 34:328-332 (1981).
40. Luginbuck, R.C. and Sholotzhaver, S.D.: SAS/STAT Guide for Personal Computers. 6th. De. SAS Institute. Cary N.C., (1987).
41. Matsuyama, S.I., Inokuchi, K. and Mizushima S.: Promoter exchange between *OmpF* and *OmpC* genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, 158:1041-1047 (1984).
42. Minga, U.M.: A disc ELISA for the detection of *Salmonella* group D antibodies in poultry. *Res. in Vet. Sci.*, 52:384-386 (1992).
43. Mosqueda, A. y Lucio, B.: Enfermedades comunes de las aves domésticas. *Fnc. De Med. Vet. Zoot. UNAM*, México, 1985.
44. Mosqueda, T.A. : Médiuns sanitarias para prevenir la tifoidea aviar. *Avirama*, 5: 8-14 (1987).
45. Nakaido, H., and M. Vnara.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, 49:1-32 (1985).
46. Nakaido H., Nakae T., 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 20:163-250 (1979).
47. Nicholas, R. A. J. and Cullen, G. A.: Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. *Vet. Rec.*, 128: 74-76 (1991).
48. Nicholas, R.A.J.: Serological response of chickens naturally infected with *Salmonella typhimurium* detected by ELISA. *Brit. Vet. J.*, 148:241-248 (1992).

49. Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P., Kelly, W.: Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Agricul. Can., Anim. Dis. Res. Inst.*, pp 1-31 (1993).
50. Padron, N.M.: Control de la tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. *Avi. Prof.*, 5:7-10 (1987).
51. Padron N.M.: Infección por *Salmonella gallinarum* en aves semipesadas: expresión de la bacteria por heces y su control por medio de la desinfección de cama. *Avirama*, 5: 22-28 (1987).
52. Pérez, M.J.: Estructuras bacterianas composición química y función. En: Bacteriología general principios biológicos. Editado por Pérez, M.J., Suárez, G.F., Flores, C.R. 71-84. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1990.
53. Pierce Chemical Company: Hand book for Micro BCA Protein Assay Reagent Kit USA. (1993).
54. Pomeroy, B.S. and Nagaraja, K.V.: Fowl typhoid In: Diseases of poultry. Edited by Hofstad, M.S. Barnes, H.J. Calnek, B.W. Reid, W.M., pag. 87-98 *Iowa State University Press, Ames* (1984).
55. Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez A. and Calva E. Expression of *Salmonella typhi* and *E. coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *E. coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* 5:1205-1210 (1991).
56. Ramírez H.: Repercusiones económicas de la tifoidea aviar en reproductoras pesadas. *Avirama* 5: 39-43 (1987).
57. Rives, D. V.: The basics of serology: aid to health of poultry. *Poul. Digest.* Nov:12-17 (1991).
58. Rosales, G.A.: Prueba de microaglutinación (MA) para la detección de infecciones producidas por *Salmonella pullorum* y *S. gallinarum*. *Avi. Prof.*, 1:25-26 (1987).
59. Salyers, A.A. and Whitl, D.D.: Salmonella infections. In: Bacterial Pathogenesis a molecular approach. 10 ed., 30: 45-50 (1994).
60. Stephen, B. Hitchner, Charles, H. Domermuth, H. Graham, Purchase, James, E. Williams. Salmonellosis and Arizonosis In: Isolation and Identification of avian pathogens. *AAA P.* N.Y. (1980).
61. Timoney, J. F., Sikora N., Shivasprasad, H. L. and Optiz, M.: Detection of *Salmonella* spp. in clinical species by capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 127:168-169 (1987).

62. Tizard, I.: *Inmunología Veterinaria*, 3a. ed. Interamericana McGraw-Hill, México.
63. Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. and Immun.*, 55:816-821 (1987).
64. Urquiza B. O. 1995 Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotoxina de *Salmonella gallinarum*. *Tesis de Maestría. Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM.* México.
65. Vázquez, N.J. 1995 Preparaciones de Proteínas de la Membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la Tifoidea aviar. *Tesis de Maestría. Fac. De Med. Vet. Zoot. UNAM.* México.
66. Vázquez, N.J., Huerta, L., Suárez, F., Quintana, J.A., Puente, J.L., Calva, E. y Verdugo, R.A.: Utilización de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* en ELISA para el diagnóstico de tifoidea aviar. IV Jornada Médico avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1993.
67. Vázquez, N.J., Suárez, F., Quintana, J.A., Puente, J.L., Calva, E. y Verdugo, R.A.: Proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum*: variabilidad electroforética y potencial en diagnóstico. XVIII Convención Anual ANECA. Cancún Quintana Roo, México. Páginas 1993.
68. Verdugo, R. A. 1993: Respuesta Inmune Humoral Específica contra Preparaciones de Proteínas de la Membrana Externa de *Salmonella typhi*. *Tesis de Doctorado. Colegio de Ciencias y Humanidades Instituto de Biotecnología.* Cuernavaca Morelos.
69. Verdugo-Rodriguez, A., Lay-Harn Gam, Devi, S., Koh, C.L., Puthucheary, S.D., Calva, E. and Pang.: Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparations in typhoid fever patients. *Asi. Pac. J. Aller. and Immu.*, 11:45-52 (1993).
70. Verdugo-Rodriguez, A., Lopez, V. Y., Puente, J.L., Rutz-Palacios, G.M. and Calva, E.: Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12:248-254 (1993).
71. Verjans, G. M., Ringrose J. F., Alphen, van L., Feltkamp T. E. W. and Kusters J. G.: Entrance and survival of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* within human B- and T-cell lines. *Infect. and Immun.*, 62:2229-2235 (1994).

72. Voller, A., Bidwell, D. and Barlett, A.: The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). nitrifield of laboratories of comparative medicine, Reagent's Park, London 1979.
73. Wilson, J. E. and Macdonald J. W.: Salmonela infection in wild birds. *Br.vet.J.*, 123:212-219 (1967).
74. William, H.E.: Identification of Enterobacteriaceae. *Ed. Elsevier Science Publishish Co. Inc. N.Y.* 4th. Edition, 1986.
75. Zijderveld, van, F. G., Zijderveld, van, A. M. B. and Anakotta, J.: Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. *J. Clin. Microblal.*, 30:2560-2566 (1992).

**Cuadro 4.** Determinación del punto de corte, de acuerdo a las densidades ópticas de los sueros evaluados mediante la TA-ELISA de *Salmonella gallinarum* a una densidad óptica de 405 nm.

Punto de corte D.O.	<i>Salmonella gallinarum</i>		<i>Salmonella spp</i>		<i>S. gallinarum</i> 9R		Enterobacterias		Testigo positivo
	Elisa (+)	positividad %	Elisa (+)	positividad %	Elisa (+)	positivida d%	Elisa (+)	positividad %	%
0.496	214	80.45	133	54.51	81	33.2	1	2.22	80
0.465	215	80.82	145	59.42	87	35.65	1	2.22	75
0.434	218	81.95	153	62.7	102	41.8	1	2.22	70
0.403	221	83	165	67.062	114	46.72	1	2.22	65
0.372	228	85.71	177	72.54	120	49.18	3	6.66	60
0.341	228	85.71	188	77.05	126	51.64	4	8.88	55
0.310	231	86.64	197	80.74	136	55.74	5	11.11	50
<b>Total sueros</b>	266		244		244		45		8

ESTE TEXTO NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Cuadro 5.** Resultados obtenidos en cada uno de los grupos de sueros evaluados mediante la TA-ELISA de *Salmonella gallinarum* analizados por la prueba de Ji cuadrada, al ser comparados con el grupo testigo positivo.

GRUPO	TRATAMIENTO	POSITIVIDAD*	%	P
3	<i>Salmonella gallinarum</i>	266 / 214	80.45	> 0.05
4	<i>Salmonella</i> spp. móvil	244 / 133	54.51	< 0.025
5	<i>Salmonella gallinarum</i> 9R	244 / 81	33.2	< 0.001
6	Enterobacterias	45 / 44	2.22	< 0.001

\* Valores expresados como total de sueros evaluados / sueros positivos.

Nota: Los grupos 1 y 2 corresponden a los testigos positivo y negativo respectivamente.



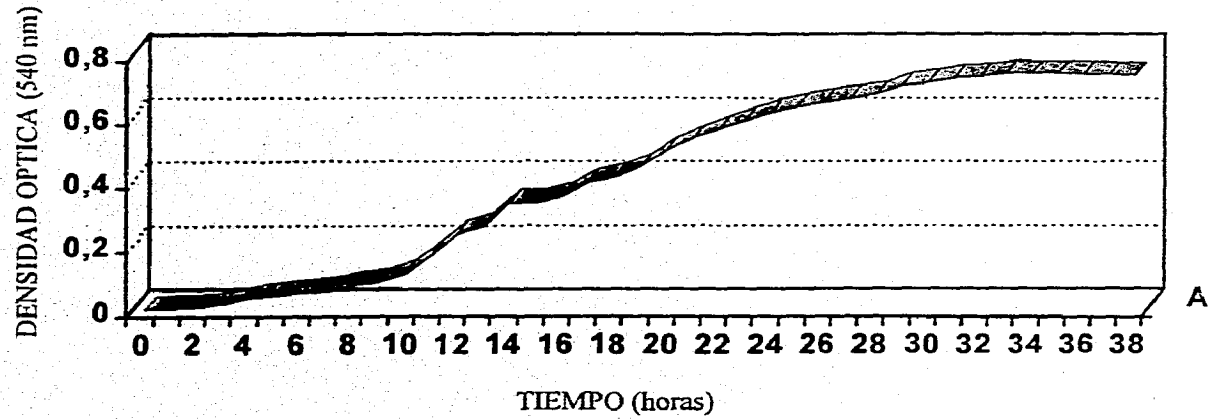
**Cuadro 6.** Resultados de la TA-ELISA de *Salmonella gallinarum*, obtenidos mediante la prueba de rango múltiple de Duncan, del paquete estadístico SAS.

GRUPO	TRATAMIENTO	DENSIDAD OPTICA *	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	RANGO
3	<i>Salmonella gallinarum.</i>	0.74 ± 0.26 <sup>A</sup>	0.078	1.113	1.035
4	<i>Salmonella mōvil</i>	0.52 ± 0.22 <sup>BC</sup>	0.068	1.26	1.192
5	<i>Salmonella gallinarum</i> R9	0.40 ± 0.26 <sup>C</sup>	0.004	0.979	0.975
6	Enterobacterias	0.16 ± 0.18 <sup>D</sup>	0.0125	0.620	0.6075
1	Testigo positivo	0.64 ± 0.11 <sup>AB</sup>	0.423	0.801	0.378

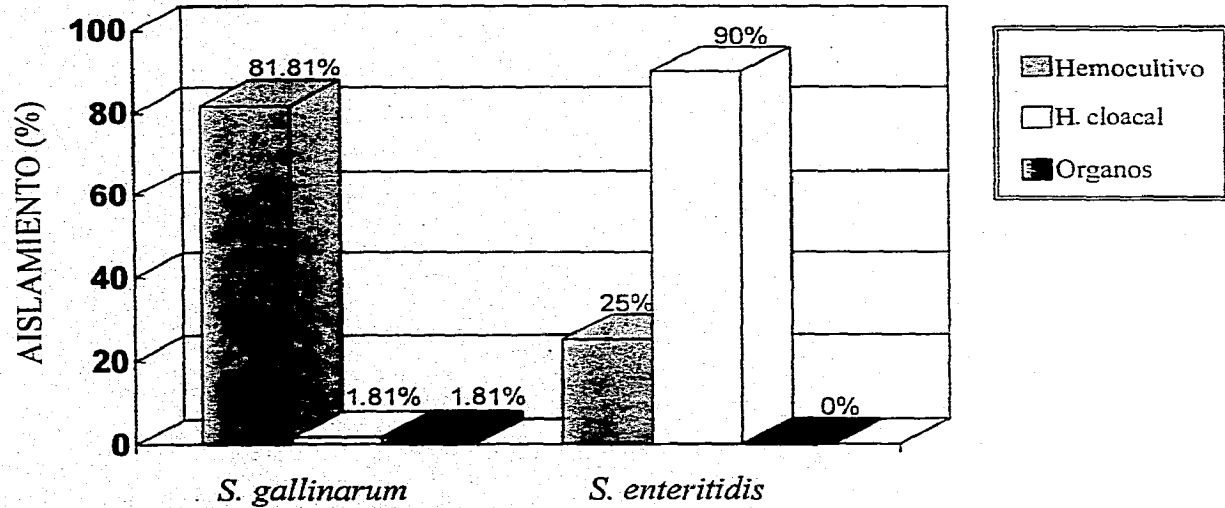
\* Valores expresados como medias ± Desviación estandar. Valores con diferentes literal son estadísticamente significativas (P < 0.05).

Nota: el grupo 2 corresponde al testigo negativo.

**Figura 1.** Curva cinética de crecimiento de *Salmonella gallinarum* U2 NA/NO.

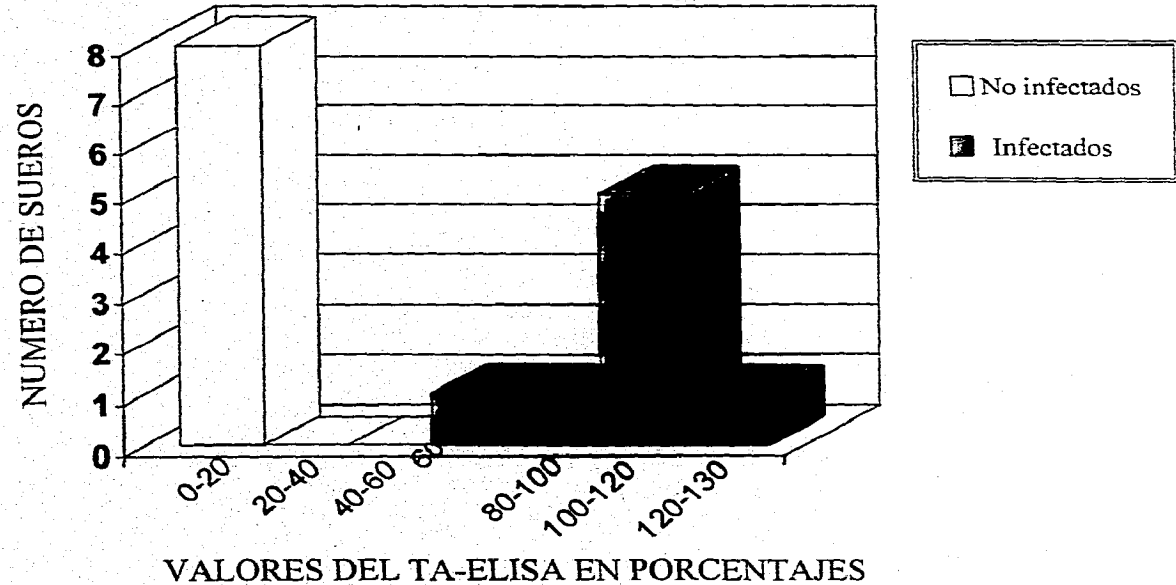


**Figura 2.** Aislamiento de *S. gallinarum* y *S. enteritidis* apartir de hemocultivo, hisopo cloacal y órganos\* a los 35 días post-inoculación

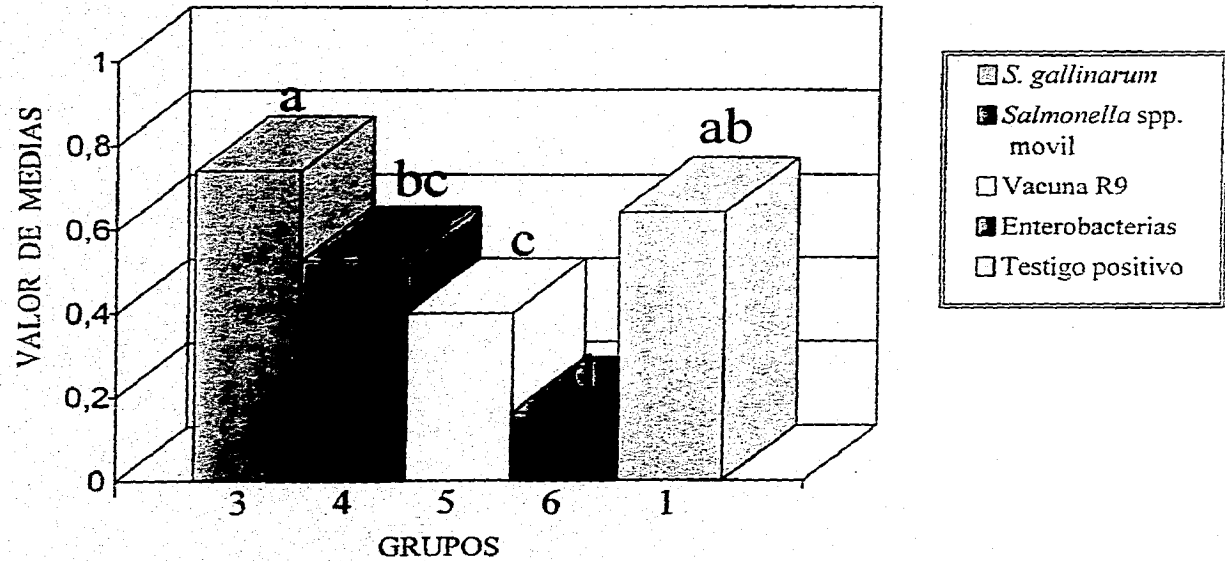


\* bazo, hígado y tonsilas cecales

**Figura 3.** Determinación del Punto de Corte de la TA-ELISA de *Salmonella gallinarum*, mediante el porcentaje de los valores de absorbancia con una longitud de onda de 405 nm.



**Figura 4.** Resultados del comportamiento de la TA-ELISA en los diferentes grupos comparandolos con el grupo testigo positivo.



Grupos con diferente literal son estadísticamente significativos ( $P < 0.001$ )