

22
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRODUCCION DE ANTISUEROS POLICLONALES
CONTRA LOS ANTIGENOS H:g, t, s Y q PARA LA
SERTOTIPIFICACION DE *Salmonella enteritidis* EN LA
SALMONELOSIS AVIAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ANGELICA DORANTES MORALES

ASESORES: MVZ. MC. ODETE URQUIZA BRAVO
QBP. DRA. ELBA REYES MALDONADO
MVZ. Ph. D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS



MEXICO, D. F.

MAYO, 1997

**TESIS CON
FOLIA DE ORIGEN**



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.

**PRODUCCION DE ANTISUEROS POLICLONALES CONTRA LOS ANTIGENOS H:g,
t, s Y q PARA LA SEROTIPIFICACION DE *Salmonella enteritidis* EN LA
SALMONELOSIS 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:

Angélica Dorantes Morales

ASESORES

MVZ. MC. Odette Urquiza Bravo

QBP. Dra. Elba Reyes Maldonado

MVZ. Ph. D. Guillermo Téllez Isafas

México, D.F.

Mayo, 1997

LOS HOMBRES EN SI, NO SON NADA: SON

SUS OBRAS LAS QUE CUENTAN.

GUILLEMO PRIETO

VIVE TU TIEMPO

DÁTE TIEMPO PARA TRABAJAR,
ES EL PRECIO DEL TRIUNFO.
DÁTE TIEMPO PARA PENSAR
ES LA FUENTE DEL PODER.
DÁTE TIEMPO PARA JUGAR,
ES EL SECRETO DE LA ETERNA JUVENTUD.
DÁTE TIEMPO PARA LEER,
ES EL FUNDAMENTO DE LA SABIDURIA.
DÁTE TIEMPO PARA SER AMIGO,
ES EL CAMINO DE LA FELICIDAD.
DÁTE TIEMPO PARA SOÑAR,
ES ATAR TU CARRETA A UNA ESTRELLA.
DÁTE TIEMPO PARA AMAR Y SER AMADO,
ES EL PRIVILEGIO DE LOS DIOS.
DÁTE TIEMPO PARA MIRAR ALREDEDOR,
EL DÍA ES MUY CORTO PARA SER EGÓISTA.
DÁTE TIEMPO PARA REIR,
ES LA MÚSICA DEL ALMA.

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme dado la vida, y sobre todo la esperanza cuando más lo necesite.

A MIS PADRES:

Ma. de Jesús Morales Vázquez

Rodolfo Dorantes Moreno

Porque siempre han buscado lo mejor para sus hijos a pesar de los tropiezos que la vida les ha dado. Muchas Gracias por toda la confianza y apoyo que me han tenido.

A MIS HERMANOS:

Rocío, Gabriel, y Sergio futuro MVZ. porque entre nosotros han existido diferencias, pero nos une algo más grande el amor de ser una gran familia.

A Juan Antonio González Garatachía

Porque siempre he tenido su apoyo, paciencia y gran cariño.

A mis mejores amigas

Claudia Martínez Ferrérez y Marianela De la Peña Zamora. Porque siempre he recibido su apoyo y una maravillosa amistad de su parte sin esperar nada a cambio.

A todos mis amigos y compañeros:

Carolina, Gabriela, Laura, Teresa, Claudia, Gerardo, Lilia, Julio, Rosy, Judith, Eva, Feli, Luisa, Nestor, Juan Carlos, Jesús, Cecilia, Blanca...

En especial a Nazario Bañuelos, Edgar Peña, José González, Sr. Juan Merino, porque me regalaron parte de su tiempo para realizar esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

AL DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL : AVES.

AL CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACION Y EXTENSION EN
PRODUCCION AVICOLA (C.E.I. E.P.A.)

AL DR. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

Por apoyar en todo momento la realización de este trabajo.

A LA DRA. ODETTE URQUIZA BRAVO

Porque siempre me ha dado su apoyo y confianza para lograr grandes éxitos.

A LA DRA. ELBA REYES MALDONADO

Muchas gracias por el tiempo dedicado a esta tesis en especial a la fase experimental, en donde su conocimiento fue la base fundamental para concluir este trabajo.

A LOS INTEGRANTES DEL JURADO:

Dr. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES.
DRA. MA. DE LA LUZ CHARLES N.
DRA. MA. ELENA RUBIO GARCIA.
DR. MIGUEL A. CENICEROS RUIZ.
DRA. ODETTE URQUIZA BRAVO.

Gracias por enriquecer esta tesis con sus valiosos conocimientos.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIONES.....	18
LITERATURA CITADA.....	19
CUADROS.....	22

RESUMEN

DORANTES MORALES ANGELICA. PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES CONTRA LOS ANTIGENOS H:g, t, s Y q PARA LA SEROTIPIFICACION DE *Salmonella enteritidis* EN LA SALMONELOSIS AVIAR (Bajo la dirección de: MVZ. MC. Odette Urquiza Bravo, QBP. Dra. Elba Reyes Maldonado y MVZ. Ph.D. Guillermo Téllez Isaías).

El número de aislamientos de *Salmonella enteritidis* se ha incrementado considerablemente en los últimos diez años. Debido a la frecuencia de brotes epidémicos por consumo de alimentos como huevo o carne provenientes de aves infectadas con *S. enteritidis*, ha surgido la necesidad de buscar la forma de facilitar la identificación de *S. enteritidis* por medio de la serotipificación con antisueros producidos en México, por lo que el objetivo del presente trabajo fue producir en el Departamento de Producción Animal: Aves, cuatro antisueros policlonales mono-específicos H:g, H:t, H:s y H:q por medio de las técnicas convencionales, para el diagnóstico de salmonelosis aviar, obteniéndose previamente los antígenos H:f,g; H:g,m; H:g,m,s; H:m,t; H:g,q; y H:g,p destinados para inmunización de conejos y obteniéndose antisueros polivalentes: H:g,m; H:g,m,s; H:m,t; H:g,q; H:f,g y H:g,p. Los títulos obtenidos de los antisueros antes mencionados con su antígeno homólogo fueron: H: f,g (1:25,600); H: g,m (1:51,200); H: g,m,s (1:12,800); H: m,t (1:12,800); H: g,q (1:25,600) y H: g,p (1:51,200); mientras que con sus antígenos heterólogos los títulos obtenidos se comportaron similares a lo descrito por otros investigadores. Además se prepararon antígenos H: g,p,u; H: g,m; H: g,m,s; H: g,q; H: m,t y H: g,p para la evaluación de los antisueros obtenidos.

INTRODUCCIÓN

La Salmonelosis aviar, en particular las paratifoideas, tienen gran importancia económica en la Avicultura Nacional. Diferentes investigaciones epidemiológicas han demostrado la asociación de *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) en brotes de contaminación alimentaria. Sólo en Estados Unidos de Norte América en la década de 1980, *S. enteritidis* representó un 6% del total de los serotipos aislados y para 1990, constituyó el 21% (3, 4, 17).

Actualmente se requiere que la industria avícola contribuya con productos finales como pollo de engorda y huevo libres de *S. enteritidis*, para lograrlo, se han realizado programas de prevención, confirmando mediante el aislamiento e identificación de este género con la finalidad de una posible erradicación (3).

Se ha encontrado que los huevos para abasto comercial están relacionados con muchos brotes de gastroenteritis en humanos, debido a la contaminación durante la colección de éstos, su mal almacenaje y transportación, los cuales no son realizados a una temperatura por abajo de los 10°C, contribuyéndose así al rápido deterioro del producto (9,15,17, 19).

Las infecciones por *Salmonella* se clasifican dependiendo del serotipo adaptado a la especie involucrada. De tal forma, que *S. typhi* afecta al hombre, *S. pullorum* y *S. gallinarum* a las aves, *S. dublin* a los bovinos, *S. abortus-egui* a los equinos y, a los cerdos, *S. cholera-suis* (1).

Se ha observado que los serotipos patógenos para los animales afectan en menor grado al hombre, excepto con *S. enteritidis*, la cual se transmite de manera horizontal entre el hombre y los animales (12).

Numerosos factores como alimento, agua y cama contaminada pueden aumentar la susceptibilidad de los pollos para ser colonizados por *S. enteritidis* y un factor importante, es la edad del animal. Se describe que los pollitos de un día de edad podrían ser infectados con tan sólo cinco células bacterianas; por tal razón, las infecciones en parvadas son muy comunes y los brotes agudos principalmente en aves jóvenes menores de una semana de edad, dan como resultado la presencia de infecciones clínicas, de allí que se

mencione a las aves de una semana de edad, o bien, aves en condiciones de tensión como las de mayor susceptibilidad para ser colonizadas e infectadas por *Salmonella* (5, 6, 22).

Una vez infectada una caseta, la bacteria puede sobrevivir y multiplicarse con rapidez en el polvo, equipo, alimento y agua, siendo un factor importante en la transmisión y diseminación de la enfermedad, favoreciendo así, la contaminación del cascarón de huevos en las parvadas comerciales de ponedoras (3, 10).

En pollitos la mortalidad se inicia a partir de los días 2 al 4 de vida, pudiendo alcanzar hasta un 10% en las primeras dos semanas de edad. Condiciones ambientales, grado de exposición y presencia de infecciones, tienen una influencia importante en la gravedad del brote (18, 21).

Los signos clínicos en aves jóvenes incluyen: crecimiento pobre del pollo, estado progresivo de somnolencia y tendencia a quedarse en una posición con la cabeza hacia abajo, ojos cerrados, alas caídas, plumas erizadas, anorexia marcada, aumento en la ingestión de agua, diarrea acuosa profusa y aspecto pastoso en la cloaca, se observa que las aves tienden a amontonarse cerca de la fuente de calor, también hay ceguera y conjuntivitis, no es común observar signos respiratorios. Los signos observados en los pollos infectados por vía parenteral u oral de manera experimental por *S. enteritidis* incluyen inapetencia, diarrea, deshidratación y apatía (19,21).

En aves jóvenes las lesiones que se pueden encontrar en casos avanzados son emaciación, deshidratación, hepatomegalia, riñones congestionados y pericarditis (19).

En aves adultas con infección aguda causada por *S. enteritidis* se ha observado invasión de la bacteria hacia los órganos internos causando inflamación y congestión en hígado, bazo, riñones, corazón y peritoneo. También se reduce la producción total de huevo, afecta fertilidad, incubabilidad e índice de conversión alimenticia, por lo general no presentan signos de infección. Los brotes agudos en aves semiadultas en condiciones naturales son poco frecuentes (9,19,21,22).

El diagnóstico diferencial debe realizarse con colibacilosis e infecciones por otras *Salmonellas* móviles (21).

Los datos clínicos y los hallazgos en la necropsia pueden ser sugestivos de infección de paratifoidea, pero sólo la historia clínica permite llegar a un diagnóstico presuntivo, sólo

con el aislamiento e identificación de las bacterias responsables de la enfermedad, se podrá emitir un diagnóstico final, pudiendo así dar recomendaciones para su control (19).

El aislamiento se debe realizar a partir de las aves enfermas o bien de la mortandad, así como de huevos, embriones, alimento y carne (10).

Para el cultivo directo a partir de órganos frescos de las aves enfermas, se transfieren los tejidos con un asa o hisopo a la superficie de las cajas con medios nutritivos, como agar de infusión de carne de res, o bien, tomar las muestras y depositarlas en medios líquidos como caldo de enriquecimiento, e incubarlas por 24 a 48 hrs a 37°C. También se pueden triturar los tejidos y sembrarlos en medios enriquecidos por 24 a 48 hrs a 37°C, antes de ser colocados en un agar selectivo, como el verde brillante, donde las colonias de *Salmonella* se observan con una coloración rosa pálido que alcalinizan el medio (10).

Igual que en otros cultivos, existe variación de colonias, las denominadas lisas, que se observan circulares convexas, enteras y relucientes; por el contrario, una colonia rugosa, es de superficie plana, granular e irregular, el cambio de lisa a rugosa se manifiesta como una alteración de la morfología de la colonia y pérdida de la virulencia, debida a la ausencia de cadenas laterales O específicas del lipopolisacárido liso, afectando sólo los antígenos somáticos mientras que los antígenos flagelares permanecen sin modificación (7, 12).

Las colonias rugosas cultivadas en caldo, presentan un sedimento pesado después de la incubación por 24 horas; en el caso de cultivos lisos, se observa turbidez homogénea y sedimento escaso. Se han identificado más de 2100 serotipos basándose en los antígenos O y H, los cuales son fundamentales para la serotipificación por la gran diversidad en su composición química y estabilidad antigénica (19, 26).

Los métodos serológicos juegan un papel importante dentro de la identificación y caracterización de algunas especies bacterianas, incluido el género *Salmonella*, el cual es necesario conocer para una evaluación epidemiológica (28).

La estructura antigénica de *Salmonella* comprende antígenos O (somáticos) de la membrana externa, H (flagelar) y Vi (capsular). El antígeno Vi está presente en *S. typhi*.

Existe una variación en la estructura antigénica flagelar y somática de los tipos de *Salmonella* que afectan a las aves domésticas (16, 8).

Los antígenos O son lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y el término O proviene de la palabra alemana "ohne Hauch" que significa "sin", son termoestables y denominados con números arábigos. El antígeno H deriva su nombre de la palabra alemana "Hauch" que indica "en expansión". Los antígenos H, son proteínas que constituyen los flagelos peritricos de estas bacterias, son lábiles al calor y al tratamiento con ácido o etanol y son designados por letras minúsculas del alfabeto (a-z, z₁, z₂, z₃....) para la primera fase y con números arábigos para la segunda fase flagelar (8, 14, 24). Las limitaciones del alfabeto hicieron necesario el uso de subíndices (z₁, z₂) para nombrar antígenos que fueran caracterizados después de designar z, no son subdivisiones de z, por ejemplo los antígenos z¹ al z_n, todos ellos relacionados con el complejo de g (g, m; g, m, s; g, q; etc.) (8,12,13).

Los flagelos bacterianos son apéndices filiformes compuestos de una sola clase de subunidad proteínica denominada flagelina y miden de 12-30 nm de diámetro. El flagelo está formado por la agregación de subunidades que forman una estructura cilíndrica hueca. Son un órgano de locomoción insertada a la célula bacteriana mediante una estructura formada por un gancho y un cuerpo basal que en el caso de las bacterias Gram-negativas es de 2 pares y hay diferentes arreglos de éstos: monótricos (un solo flagelo polar); lofótricos (mechones de flagelos polares) y peritricos (flagelos distribuidos alrededor de toda la célula). Este último tipo corresponde al género *Salmonella* con excepción de *S. pullorum* y *S. gallinarum*. (13, 14).

Los flagelos pueden ser removidos mediante agitación mecánica de una suspensión de bacterias, pero se forman nuevos flagelos por síntesis, agregación y extrusión de subunidades de flagelina y la movilidad es restaurada en 3 a 6 minutos, los flagelos son una herramienta de diagnóstico (13).

Las células bacterianas individuales no contienen antígenos de ambas fases, por lo general, aproximadamente la mitad de la población bacteriana estará en una fase y el resto en la otra (8, 18).

Las cepas que contienen ambos tipos de antígenos flagelares son bifásicos, mientras que las que poseen sólo un tipo son monofásicos y pueden estar tanto en fase 1 como en 2 (8).

Los antígenos en fase 1, llamados también específicos de fase, son exclusivos y contribuyen a la identidad inmunológica de un serotipo. Los antígenos flagelares en fase 2, son limitados en número, esta numeración se extiende del 1 al 12 y tienden a ser compartidos por varios serotipos; un ejemplo característico de serotipo monofásico es *S. enteritidis* cuya fórmula antigénica es 9, 12: g,m (12).

La clasificación serológica de *Salmonella* consiste en examinar primero el grupo al cual pertenecen de acuerdo a su antígeno O, lo cual se realiza con la técnica de aglutinación en placa y como segundo paso, es clasificar su antígeno flagelar proteico, esto es, por la prueba de aglutinación en tubo con los antiseros flagelares que correspondan a cada *Salmonella*. Debido a que la identificación del serotipo *enteritidis* en *Salmonella* es costosa, es necesario producir antiseros de bajo costo en los laboratorios de diagnóstico como en el Departamento de Producción Animal (D.P.A): Aves (2, 8).

OBJETIVO.

Producir antiseros policlonales H:g, H:t, H:s y H:q en el D.P.A.: Aves para la identificación de *S. enteritidis* así como implementar y facilitar el diagnóstico de salmonelosis aviar.

MATERIAL Y METODOS.

I. Metodología.

Para realizar este trabajo se partió de cepas proporcionadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E.). A partir de cada cepa se realizó su confirmación bioquímica y serológica, se seleccionaron las colonias que fueron lisas, circulares, convexas, enteras y relucientes; para la producción de sueros, se promovió el desarrollo de flagelo para la producción tanto de los antígenos de evaluación como de inmunización, una vez preparados se procedió a inmunizar conejos con el antígeno específico para lo que se deseaba obtener siguiendo un calendario de inmunización propuesto por el Centro de Control de Enfermedades (C.D.C.) en Atlanta, Georgia; el cual una vez completado, se procedió a realizar una sangría de prueba 4 días después de la última inmunización, si el título era satisfactorio se procedía a sangrar los conejos a blanco por punción intracardiaca previa anestesia del animal.

Una vez obtenida la sangre se procedió a obtener el suero por centrifugación, se dejó en refrigeración y una semana después se procedió a su titulación con el antígeno homólogo y los heterólogos. Se procedió a separar 25 ml de suero y absorber los anticuerpos no deseados poniendolo en contacto con cepas de *Salmonella* (previamente inactivadas con Solución Salina Formalinizada al 0.6% (S. S. Formalinizada)) que contenían los antígenos específicos para absorber los anticuerpos heterólogos (Cuadro 7).

Una vez que se obtuvo el antisuero monoespecífico se mezcló con glicerina al 50% se filtró por medio de membranas de 0.22 micras y se envasó en condiciones de esterilidad. A continuación se describe los métodos detallados para la realización de este trabajo.

2. Obtención de cepas.

Se utilizaron diferentes cepas de *Salmonella* : *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. derby*, *S. oranienburg*, *S. montevideo*, *S. moscow*, *S. rostock*; las cuales son conservadas en tubos conteniendo B. S. A.¹ (base agar sangre) inclinado y almacenados a temperatura ambiente. Posterior a la simbra en B. S. A. se seleccionaron seis colonias de morfología característica de una cepa lisa de *Salmonella*; sembrándose en forma masiva dividiendo una caja de petri en 6 partes inoculando una sola colonia de *Salmonella* por cada espacio. A cada colonia bacteriana se les realizaron pruebas bioquímicas con TSI² (agar-hierro tres azúcares), LIA² (agar de hierro y lisina), SIM² (azufre, indol, movilidad), MIO¹ (movilidad, indol, ornitina). Aquellas cepas que bioquímicamente no correspondían con *Salmonella* o bien presentaron contaminación se desecharon. Finalmente fueron aglutinadas las cepas bacterianas con antisueros somáticos específicos comerciales³, para comprobar su grupo; también se comprobaron antígenos flagelares^{3,4}.

¹ BIOXON Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

² MERCK Naucalpan de Juárez, Edo. de México

³ DIFCO Detroit Michigan, U.S.A.

⁴ I.N.D.R.E.

3. Desarrollo de flagelo

Cada *Salmonella* fue sembrada por separado en tubos conteniendo medio especial de movilidad que contenía extracto de carne¹ 13.63%, bacto-peptona¹ 45.45%, agar-agar² 18.18% y cloruro de sodio³ 22.72%, a un pH de 7.4; el sembrando se realizó en la superficie del medio, a partir de una colonia bacteriana e incubándose por 24 horas a 37°C. Posteriormente la superficie del medio se retiró casi en su totalidad con una pipeta Pasteur transfiriendo la parte final del medio en que había desarrollo bacteriano a otro tubo para permitir nuevamente el desplazamiento de las *Salmonellas*, para constatar esto se verificaba la turbidez del medio. Este procedimiento se repitió las veces necesarias hasta conseguir clonas móviles. Para cada cepa en particular el cambio se realizó cada 24 hrs. para promover el desarrollo de los flagelos.

4. Producción de Antígenos de Inmunización.

Los antígenos de inmunización fueron preparados a partir de *Salmonella derby* (H:f,g), *S. enteritidis* (H: g,m), *S. oranienburg* (H: m,t), *S. dublin* (H:g,p), *S. moscow* (H: g,q) y *S. montevideo* (H: g,m,s); cada uno por separado. Cada *Salmonella* fue sembrada en B. S. A. incubándose 24 hrs. a 37°C y posteriormente se transfirió una colonia a un frasco conteniendo 50 ml de T. S. B. (caldo de soya tripticasa¹ 54.54% y caldo triptosa¹ (45.45%) incubándose 18 horas a 37°C para obtener una turbidez similar al tubo N°6 del Nefelómetro de McFarland (1.8×10^9 U.F.C. por ml), finalmente cada cepa fue inactivada con S. S. Formalinizada al 0.6% (23).

¹ DIFCO Detroit Michigan, U.S.A.

² MERCK Naucalpan de Juárez, Edo. de México

³ BAKER Xalostoc, México

5. Producción de Antígenos de evaluación.

Los antígenos de evaluación se elaboraron con *S. rostock* (H:g,p,u), *S. enteritidis* (H:g,m), *S. moscow* (H: g,q), *S. derby* (H: f,g), *S. oranienburg* (H:m,t), *S. dublin* (H:g,p) y *S. montevideo* (H:g,m,s). Cada una de éstas cepas fue sembrada en B. S. A., incubándose a 37°C por 24 hrs. Posteriormente se transfirió una colonia de cada *Salmonella* por separado en un frasco con 100 ml de T. S. B. incubándose 18 hrs. a 37°C, obteniendo una turbidez similar al tubo N° 6 del Nefelómetro de McFarland (1.8×10^9 U.F.C. por ml), después fueron inactivadas con 100 ml de S. S. Formalinizada al 0.6%.

6. Titulación de los Antígenos de inmunización y de evaluación.

Se utilizaron los antisucros flagelares comerciales específicos para cada antígeno producido. Se realizaron diluciones dobles seriadas con S. S. F. al 0.85% de los antisucros comerciales (0.1 ml) a partir de una dilución 1:100 hasta una dilución de 1: 51,200 depositándose en cantidad constante (0.9 ml de antígeno) para cada una de las diluciones, teniendo como meta obtener un título mínimo de 1: 6,400 (Ewing 1986).

7. Esquema de Inmunización a conejos con el Antígeno producido.

Se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 1500 g de peso. por cada antígeno, utilizando el esquema de inmunización recomendado por el C.D.C. El antígeno se inyectó en la vena marginal de la oreja del conejo a las dosis marcadas y en los días estipulados que se muestran a continuación:

1er semana 0.3 ml Viernes

2da semana 0.6 ml Lunes

3er semana 1.5 ml Lunes

3er semana 3 ml Jueves

4ta semana 4 ml Martes

Terminado este esquema de inmunización, se realizó una sangría de prueba a partir de la arteria central de la oreja del conejo, 4 a 5 días después de la última inmunización, obteniéndose 5 ml de sangre. El suero se tituló, alcanzando títulos mayores de 1: 6,400 con su antígeno homólogo por lo que se procedió a sangrar en blanco.

Durante toda la etapa de inmunización, los conejos recibieron alimento comercial y agua *at libitum*.

8. Sangría y obtención de los antisueros.

Ocho días después de la última inmunización se realizó la sangría. Los conejos fueron tranquilizados por medio de inhalación con cloroformo y sangrados a blanco por punción intracardiaca con agujas del número 18 x 38 y jeringas de 20 ml, obteniéndose un promedio de 150 ml de sangre por animal. La sangre fue depositada en tubos cónicos de 50 ml. Los sueros se obtuvieron por centrifugación a 3500 r.p.m. durante 20 minutos, posteriormente se depositaron en viales estériles y se almacenaron en refrigeración a 4° C .

9. Titulación de los antisueros.

Los antisueros obtenidos se titularon partiendo de un suero diluido 1:10 para realizar diluciones dobles seriadas con su antígeno homólogo y los antígenos heterólogos, en todos los casos partiendo de una dilución inicial de 1:100 utilizando como diluyente S. S. F. (0.1 ml), agregando 0.9 ml de antígeno para cada dilución; el número de diluciones para cada suero y el título obtenido fue efectuado de acuerdo a lo publicado por (Ewing 1986).

10. Absorción de los sueros.

Suero policlonal flagelar H:t

Una colonia de *S. monteideo* (H:g,m,s) fue sembrada en un tubo de T. S. B. incubándose por 18 hrs a 37°C; de éste inóculo se sembraron 25 cajas de petri con B. S. A. (con 1 ml cada caja) extendiéndose en toda la superficie del medio, incubándose 24 hrs. a 37°C y se cosechó con S. S. Formalinizada al 0.6% para centrifugarse a 3500 r.p.m. durante 30 min. decantándose la S. S. Formalinizada y recuperándose el paquete celular el cual fue depositado en un matraz ErlenMeyer conteniendo 20 ml de suero H:m,t (*S oranienburg*).

El matraz con suero y paquete celular se incubaron en baño maría a 50°C durante 2 hrs. agitándolo cuatro o cinco ocasiones durante éste tiempo. Posteriormente el matraz permaneció a temperatura ambiente durante 10 min. para después refrigerarlo a 0°C por 40 min.

El suero fue centrifugado a 3500 r.p.m. durante 40 min. filtrado y almacenado en condiciones de esterilidad en refrigeración. La titulación se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto 10 existiendo aglutinación con el antígeno H:m,t (*S. oranienburg*) solamente. Posteriormente el antisuero se almacenó como lo descrito en el punto 1.

Suero policlonal flagelar H:q

Una colonia de *S. enteritidis* (H: g,m) fue sembrada en un tubo de T. S. B., incubándose por 18 horas a 37°C; de éste inóculo se sembraron 35 cajas de petri con B. S. A. (1 ml por caja) extendiéndose en toda la superficie e incubándose 24 hrs a 37°C, posteriormente fue cosechado con S. S. Formalinizada al 0,6% para centrifugarse durante 30 minutos a 3500 r.p.m. La S. S. Formalinizada se decantó, recuperándose el paquete celular y se depositó en un matraz ErlenMeyer que contenía 25 ml de suero H: g,q (*S. moscow*).

El matraz con el suero y el paquete celular se incubaron en baño maría a 50°C durante 2 horas agitándose manualmente en cuatro ocasiones. Posteriormente el matraz permaneció a temperatura ambiente y refrigerado finalmente 40 minutos a 0°C.

El suero fue centrifugado a 3500 r. p. m. durante 40 minutos y posteriormente se realizó la titulación como se describe en el punto 10, encontrando sólo aglutinación con el antígeno H: g,q (*S. moscow*). El antisuero fue almacenado de acuerdo a lo descrito en el punto 1.

Suero policlonal H: s

Una colonia de *S. enteritidis* (H: g,m) y otra de *S. oranienburg* (H: m,t) fueron sembradas por separado en tubos con T. S. B. incubándose a 37°C por 18 horas, de éste inóculo se sembraron 13 cajas de petri con B. S. A. de *S. enteritidis* y 12 para *S. oranienburg* (1 ml de inóculo por caja), extendiéndose en toda la superficie del medio, incubándose 24 horas a 37°C. Posteriormente en la superficie de cada caja se agregó de 5 a 10 ml de S. S. Formalinizada al 0.6% para cosechar el paquete celular y centrifugar a 3500 r. p. m. por 40 minutos. La S. S. Formalinizada fue decantada recuperándose el paquete celular de ambas bacterias y se colocaron juntas en un matraz ErlenMeyer con el suero H:g,m,s (*S. monteideo*). El matraz con el suero y el paquete celular se incubaron en baño maria a 50°C 2 hrs. Agitando el matraz cinco veces durante éste tiempo. Posteriormente éste permaneció a temperatura ambiente para después refrigerarlo a 0°C por 40 min.

El suero fue centrifugado a 3500 r.p.m. por 40 min. y posteriormente se realizó la titulación del suero como se describe en el punto 10, encontrando solo aglutinación con el antígeno H: g,m,s (*S. monteideo*). El antisuero mono específico se almacenó como lo descrito en el punto 1.

Suero polivalente H:g

Este antisuero se preparó mediante la inmunización en conejos con antígeno de *S. enteritidis* (H: g,m), para lo cual, una vez obtenido el antisuero, se tituló con todos los antígenos homólogos de grupo H: g y se verificó aglutinación y reacciones cruzadas con antígenos heterólogos. Una vez comprobado, se transfirió a un vial estéril filtrando a través de membranas de 0.22 micras de porosidad y agregandose el mismo volumen de glicerina estéril, quedando así como suero de trabajo.

RESULTADOS

Se confirmó la viabilidad y pureza de las cepas así como el grupo somático y serotipo flagelar de las cepas de salmonela, para la obtención de los inmunógenos y la producción de sueros, los cuales se muestran en el cuadro N° 1.

Se produjeron los siguientes antígenos de inmunización: H: g,m; H: g,m,s; H: g,p; H: f,g; H: g,q; H: m,t. La cantidad producida de cada antígeno en todos los casos fue de 100 ml. obteniéndose títulos variables desde 1:1,600 a 1:12,800 (cuadro N° 2).

Los antígenos de evaluación producidos fueron: H: g,p,u; H: f,g; H: g,m; H: g,m,s; H: g,p; H: g,q; H: m,t. Sus respectivos títulos variaron desde 1:1,600 a 1:12,800, la cantidad preparada en todos los casos fue de 200 mililitros (cuadro N° 3).

Con los antígenos preparados se produjeron seis antisueros: H: m,t, H: f, g, H: g, p, H: g,q, H: g,m y H: g,m,s. La cantidad obtenida de cada suero fue de 120 ml hasta 200 ml y los títulos con su antígeno homólogo fue desde 1:12,800 hasta 1: 51,200 (cuadro N° 4).

La evaluación de los sueros con sus antígenos heterólogos y homólogo se muestran en el cuadro N° 5.

El resultado final del trabajo fue la producción de sueros policlonales flagelares mono-específicos: H: t, H: q y H: s, los títulos finales con su antígeno homólogo se muestran en el cuadro N° 6; así como los títulos con sus antígenos heterólogos. El título del antisuero polivalente H: g con sus antígenos heterólogos fue negativo y con sus antígenos homólogos que cruza fue positivo y alto en títulos. Cuadro N° 8.

DISCUSION

La salmonelosis (*S. enteritidis*) se considera como una enfermedad zoonótica, por ello es necesario contar con antisueros para establecer el serotipo presente en brotes epizooticos en aves o bien en las intoxicaciones alimentarias en el humano (11, 28).

Se menciona que cerca del 82% de los brotes de *S. enteritidis* en Estados Unidos de Norte América entre 1985 y 1989 estuvieron asociados con el consumo de huevos contaminados, los cuales estaban a la venta del público provocando intoxicación alimentaria a nivel masivo (9).

El C.D.C. propone que para la producción de antisueros monoespecificos, es recomendable partir de cepas serotificadas (27).

Los antígenos producidos en este trabajo fueron los necesarios para obtener resultados similares a Ewing 1986, quien ha mencionado que para la producción de antisueros H:g, H:t, H:q, H:s; se necesita producir los antígenos de inmunización H:g,m; H:m,t; H:g,q; H:g,m,s y tener las cepas de *S. enteritidis*, *S. oranienburg* y *S. montevideo* para absorción.

En el caso de los antígenos de evaluación se produjeron seis de los ocho que menciona Ewing 1986, pero se pudieron obtener resultados comparables con Ewing 1986 en este trabajo.

Los títulos obtenidos en este estudio para los antígenos de inmunización y de evaluación fueron similares a los descritos por Ewing 1986.

La evaluación de los antisueros producidos en este trabajo con su antígeno homólogo y los antígenos heterólogos fue muy similar a los reportados por Ewing 1986.

Los resultados finales de los sueros monoespecificos de este estudio tuvieron un descenso en su título homólogo. Este resultado se debió a que al absorber los anticuerpos no deseados y permitir que solamente permanecieran anticuerpos especificos de un determinante antigénico, el título de los anticuerpos especificos disminuye proporcionalmente según lo descrito por Ewing 1986.

Según Ewing (1986) un suero polivalente H:g es necesario que se absorban anticuerpos cuando existe reacción cruzada con antígenos heterólogos

En este caso no fue necesario absorber ningún anticuerpo, debido a que no se detectó reacción cruzada con antígenos heterólogos y todos los antígenos homólogos que cruzan con H₁g fueron detectados con este antisuero según lo descrito por Ewing 1986.

CONCLUSIONES

Se prepararon antisueros policlonales monoespecíficos H:g, H:q, H:s y H:t los cuales tienen como fin el apoyo a trabajos relacionados con la serotipificación de *Salmonella enteritidis* en los laboratorios de diagnóstico o para su aplicación en otros trabajos.

Los antígenos de inmunización y de evaluación pueden producirse en los laboratorios de diagnóstico obteniendo resultados similares respecto a los títulos obtenidos con antisueros comerciales.

Es posible producir antisueros flagelares moespecíficos en México y con esto facilitar el diagnóstico y la identificación de *S. enteritidis* a través de la serotipificación.

LITERATURA CITADA

1. Acha, P. N.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales 2a. ed., Pag. 160. *Organización Panamericana para la Salud*, Washington, D.C. E.U.A., 1986.
2. Anónimo: Manual de prácticas de Inmunología: Preparación de los antígenos "O" y "H" de salmonella. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N. (1992) Pag.73.
3. Barrow, P. A.: *Salmonella control-past, present and future. Avian Pathol.*, 22: 651-669 (1993).
4. 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).
5. Carrier, D.E.: *Salmonella prevention ideas in broilers, broiler breeders. Poultry Dig.*, 49: 12-15 (1990).
6. Cox, N. A., Bailey, J. S., Mauldin, J.M. and Blankenship, L. C.: Research note: Presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. *Poultry Sci.*, 69: 1606-1609 (1990).
7. Davis, B. D.: Tratado de Microbiología. 2a. ed. *Ed. Salvat*, 1979.
8. Ewing, P. R., Edwards, W. H.: Identification of enterobacteriaceae. *Elsevier*, New York, (1986).
9. Gast, R. K., Beard, C. W.: Research to understand and control *Salmonella enteritidis* in chickens and eggs. *Poultry Sci.*, 72: 1157-1163 (1993).
10. Gillingham, S.: Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis*. XVII Convención Nacional ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*. 100-108, (1992).
11. González, B.C., Becerril, M. P., Mendoza, H., Bessudo, D.: Serotipos de *Salmonellas* identificadas en México entre 1974 y 1981. *Bol. OfSant Panam.* 99:34-39, (1985).
12. Freeman, B.A.: Microbiología de Burrows. 22a. ed. *Ed. Interamericana*, México, D.F., 1989.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

13. Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A.: Microbiología Médica. 12 a. ed. *Ed. El Manual Moderno*, México, D.F., 1987.
14. Joklik, W. K., Willett, H. P. and Amos, D. B.: Zinsser Microbiología. 17a. ed. *Ed. Panamericana*, Argentina, 1983.
15. Kim, C. J., Emery, D. A., Rinke, H. M., Nagaraja, K.V. and Halvorson, D.A.: Effect of time and temperature on growth of *Salmonella enteritidis* in experimentally inoculated eggs. *Avian Dis.*, **33** : 735-742 (1989)..
16. Levinson, W. E. and Jawetz, E.: Microbiología e Inmunología. *Ed. Manual Moderno*, México, D.F. (1992).
17. Mishu, B., Koehler, J., Lee, L. A., Rodrigue, D., Brenner, F. H., Blake, P. and Tauxe, R.V.: Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States 1985-1991. *J. Infect. Dis.*, **169**: 547-552 (1994).
18. Monte, N. F.: El dilema de *Salmonella enteritidis*. *Avic. Prof.*, **6**: 132-134 (1989).
19. Nagaraja, K.V., Pomeroy, B.S. y Williams, J. E.: Enfermedades de las aves. 1a. ed., 117-130. *Ed. Manual Moderno*, México, 1985.
20. O'Brien, J. D. P.: *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Vet. Rec.*, **122** :214 (1988).
21. Padrón, N. M.: Diagnóstico de *Salmonella enteritidis*. Memorias del Curso de actualización sobre criterio diagnóstico avícola. ANECA. México, D. F. *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*. 37-39, (1992).
22. Padrón, N. M.: Infecciones paratifoideas en el pollo engorda. *Avic. Prof.*, **6**:123-130 (1989).
23. Paik, G.: Reagents, stains, and test procedures. In Blair, J. E., Lennette, E. H., and Truant, J. P. (Eds.) Manual of Clinical Microbiology., 219. *Amer. Soc. Microbiol.* Bethesda, Md. (1970).
24. Quentin, N. M. and Russell, S. W.: Bacteriología y micología médicas 2a ed. *Ed. Interamericana*, México, 1991.
25. Swierzko, A., Brade, L., Paulsen, H. and Brade, H.: Specificity of rabbit antisera against the rough lipopolysaccharide of *Salmonella minnesota* R4 (Chemotype Rd2P-). *Infect. Immun.*, **61**: 3216-3221 (1993).

26. Tizard, I.: *Inmunologia Veterinaria*. 3a ed. *Ed. Interamericana*, México, 1987.
27. U. S. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service Health Services and Mental Health Administration. Laboratory Division, Scientific Resources Branch.: Center for Disease Control. Biological Reagents Section, Reagents Evaluations Unit, Atlanta, Georgia 30333 November 1970
28. Wen-Chuan Lin, A., Goldsby, R.A. and Snoeyenbos, G.H.: *Salmonella enteritidis* specific monoclonal antibodies. *Avian Dis.*, **36**: 455-458 (1992).

CUADRO 1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS Y SEROLOGIA SOMATICA Y FLAGELAR DE *SALMONELLA* sp.

CEPAS	BIOQUIMICAS			GRUPO SOMATICO			SEROTIPO FLAGELAR							
	TSI ¹	LIA ²	MIO ³	B	C	D E	g	m	s	p	u	f	q	t
<i>ROSTOCK</i>	2 ⁺	m/n ³	+/-/+ ³			+	+			+	+			
<i>DERBY</i>	2	m/n	+/-/+	+			+					+		
<i>ENTERITIDIS</i>	2	m/n	+/-/+			+	+	+						
<i>ORANIENBURG</i>	2	m/n	+/-/+		+			+						+
<i>DUBLIN</i>	2	m/n	+/-/+			+	+		+					
<i>MOSCOW</i>	4 ⁷	m/n	+/-/+			+	+							+
<i>MONTEVIDEO</i>	2	m/n	+/-/+			+	+	+	+					

¹ agar- hierro tres azúcares

² agar de hierro y lisina

³ motilidad , indol, ornitina

⁴ fondo ácido/ superficie alcalina con H₂S

⁵ alcalino/ neutro

⁶ motilidad (+)/ indol (-)/ ornitina (+)

⁷ fondo ácido/ superficie ácida con H₂S

CUADRO 2. RESULTADOS DE LOS TITULOS OBTENIDOS DE LOS ANTIGENOS PREPARADOS PARA INMUNIZACION.

SEROTIPO	FORMULA ANTIGENICA FLAGELAR	TITULO CON ANTIGENO HOMOLOGO
<i>ENTERITIDIS</i>	g, m	1: 6,400
<i>MONTEVIDEO</i>	g, m, s	1: 3,200
<i>DUBLIN</i>	g, p	1: 12,800
<i>DERBY</i>	f, g	1: 12,800
<i>MOSCOW</i>	g, q	1: 1,600
<i>ORANIENBURG</i>	m, t	1: 6,400

CUADRO 3. RESULTADOS DE LOS TITULOS OBTENIDOS DE LOS ANTIGENOS DE EVALUACION. SU FORMULA ANTIGENICA Y TITULO OBTENIDO.

SEROTIPO	FORMULA ANTIGENICA FLAGELAR	TITULO CON ANTIGENO HOMOLOGO
<i>ROSTOCK</i>	g, p, u	1: 3,200
<i>MONTEVIDEO</i>	g, m, s	1: 1,600
<i>ENTERITIDIS</i>	g, m	1: 6,400
<i>DUBLIN</i>	g, p	1: 12,800
<i>MOSCOW</i>	g, q	1: 3,200
<i>ORANIENBURG</i>	m, t	1: 6,400
<i>DERBY</i>	f, g	1: 6,400

CUADRO 4 RESULTADOS DE LOS TITULOS OBTENIDOS DE LOS ANTISUEROS PRODUCIDOS. VOLUMEN Y TITULO OBTENIDO.

FORMULA ANTIGENICA	VOLUMEN ANTISUERO (ml)	TITULO CON ANTIGENO HOMOLOGO
H: g, m	200	1: 51,200
H: g, m, s	120	1: 12,800
H: f, g	130	1: 25,600
H: m,t	120	1: 12,800
H: g,q	150	1: 25,600
H: g,p	130	1: 51,200

CUADRO 5. RESULTADOS DE LOS TITULOS DE LOS ANTISUEROS PRODUCIDOS CON SUS ANTIGENOS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS A PARTIR DEL SUERO DE TRABAJO (1:10).

ANTIGENOS	Suero	Suero	Suero	Suero	Suero	Suero
	H: g,m	H: g,m,s	H: f,g	H: m,t	H: g,q	H: g,p
H: g,m,s	1: 25,600	1:12,800	1: 3,200	1: 200	1: 6,400	1: 12,800
H: g,p	1: 12,800	1:12,800	1: 12,800	1: 200	1: 3,200	1: 51,200
H: g,p,u	1:12,800	1: 6,400	1: 12,800	1: 400	1: 3,200	1: 25,600
H: g,q	1: 51,200	1: 6,400	1: 6,400	1: 100	1: 25,600	1: 12,800
H: m,t	1: 100	1: 100	1: 100	1: 12,800	-----	-----
H: f,g	1:6,400	1: 1,600	1: 25,600	-----	1: 600	1: 6,400
H: g,m	1:51,200	1: 12,800	1: 6,400	1: 200	1: 12,800	1: 25,600

CUADRO 6. RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LOS ANTISUEROS POLICLONALES MONOESPECIFICOS CON SUS ANTIGENOS HETEROLOGOS Y HOMOLOGOS.

SUEROS MONOESPECIFICOS	Antigenos H: m,t	H: g,m,s	H: g,m	H: g,p	H: g,q	H: g,p,u
H: t	1: 400	-----	-----	-----	-----	-----
H: q	-----	-----	-----	-----	1:400	-----
H: s	-----	1:800	-----	-----	-----	-----

CUADRO 7 PREPARACION DE LA ABSORCION DE ANTISUERO H¹

FACTOR	ANTISUERO	CULTIVO DE ABSORCION
q	ser <i>Moscow</i> : g,q	ser <i>Enteritidis</i> : g, m
s	ser <i>Montevideo</i> : g,m,s	ser <i>Enteritidis</i> : g, m + ser <i>Sefenberg</i> : m,t
t	ser <i>Oranienburg</i> : m, t	ser <i>Montevideo</i> : g,m,s

¹ Ewing, 1986.

CUADRO 8. RESULTADOS DE LOS TITULOS DEL ANTISUERO POLIVALENTE H:g CON SUS ANTIGENOS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS A PARTIR DEL SUERO DE TRABAJO (1:100).

ANTIGENOS	REACCION DE AGLUTINACION
a ¹	-
b ¹	-
c ¹	-
d ¹	-
f, g ¹	4 + ³
g, m ¹	4 +
g, m, s ¹	4 +
g, p ¹	4 +
g, p, u ¹	4 +
g, q ¹	4 +
g, z, L ¹	4 +
g, z51(2)	tr ⁴
j ¹	-
k ¹	-
l, v ¹	-
y ¹	-
z44 ^{1(1,2)}	tr.
gz4, z32(2)	4 +

¹ antígeno heterólogo

² antígeno homólogo

³ aglutinación del 100% de los organismos, el sobrenadante es claro.

⁴ aglutinación del 25% de los organismos, el sobrenadante es turbio.