

01690

3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Patogenicidad e Inocuidad de *Salmonella*
enteritidis var. 17F-4 en animales de laboratorio
y determinación de proteínas con actividad
enterotóxica.

295959

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTADA POR:

MVZ ODETTE URQUIZA BRAVO

ASESORES:

MVZ GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

MVZ LEOPOLDO PAASCH MARTINEZ

MVZ HILDA JANDETE DIAZ

MVZ FERNANDO CONSTANTINO CASAS



MEXICO, D. F.

2001



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.

DEDICATORIAS.

A mis padres:

Manuel y Berta por su comprensión.

A mis hermanos

A mis tíos y primos

A los que ya no están aquí: †

Tía Mey (1997), Carmen (1998), Tío Fafo (2000),

Tía Susy (2000), Tsuky (2000),

Tía Kikis (2001),

Jacky (2001)

Algún día nos reuniremos...

A todos mis amigos a quienes les dediqué aún menos tiempo:

Angelita y Gus; Lupita y Raúl;

Chris y Ricardo; Julia, Gaby,

Diana, Rosa, Amelia, Ma. B., Ma. Elena R.,

Juan Carlos, Alejandro, Gaby Gómez, Luz Ma. R.,

Luz Charles, Nestor, Pepetón, Lariza, Fernando, Concha,

Lupita Reyna, Nassima, Nasser, Choi,

Shiung, Alena, Olav, Ahmed, Rafael, Padre José, ...

A Chela, despierta ya.

A mis nuevos amigos:

Adriana, Luis, Sergio, Susy,

Paty, Martha, Silvia, Alberto, Claudia ...

A Ricardo.

A todos, me encantan.

AGRADECIMIENTOS.

Al Departamento de Producción Animal: Aves,
y al Departamento de Patología
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Departamento de Infectología del
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"
Por las facilidades brindadas para la elaboración de este trabajo.

Al Ing. Víctor Lomelí de la empresa Tecniorbe
por su apoyo financiero.

y

al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
por la beca crédito de Doctorado

A la Dra. Silvia Gómez Estrella
por sus consejos y amistad.

Al Dr. Guillermo Ruiz Palacios del
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"
por su atención y apoyo profesional.

A Rosy Saldivar, José González y Rodrigo y Juanito Merino, Adelfo Juárez
del Departamento de Producción Animal: Aves, por su apoyo incondicional.

Al Dr. José Antonio Quintana López y
Dra. Ma. Teresa Casaubon por su amistad y confianza.

Parte de este trabajo fue presentado en el 4th International symposium on
typhoid fever and other salmonellosis. Taipei, China en diciembre de 1999
y el congreso de PSA en Indianápolis, E. U. en julio de 2001.

A mis Asesores:

Dr. Guillermo Téllez Isaías
Dr. Leopoldo Paasch Martínez
Dr. Fernando Constantino Casas
Por sus consejos acertados.

A mi comité tutorial:

Dr. Guillermo Téllez Isaías
Dr. Leopoldo Paasch Martínez
Dr. Fernando Constantino Casas
Dr. Ernesto Ávila González
Dr. Tamas Fehervari Bone
Dr. Billy Hargis
Dr. Juan Carlos Valladares de la Cruz
Por su orientación y tiempo dedicado.

CONTENIDO	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Epidemiología	4
1.2. Patogenia de la Salmonelosis	6
1.3. Signos clínicos producidos en Salmonelosis	8
1.4. Lesiones macroscópicas en Salmonelosis	9
1.5. Lesiones microscópicas en Salmonelosis	10
1.6. Mecanismos de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	10
1.6.1. Toxinas bacterianas	12
1.6.2. Estructura y función de las exotoxinas	13
1.6.2.1. Enterotoxina de <i>Vibrio cholerae</i>	15
1.6.2.2. Enterotoxinas de <i>Escherichia coli</i>	17
1.6.2.3. Enterotoxinas de <i>Campylobacter jejuni</i>	18
1.6.2.4. Enterotoxinas de <i>Salmonella typhi</i> y <i>Salmonella typhimurium</i> y Proteínas con actividad enterotóxica de <i>S. gallinarum</i> .	19
1.6.3. Patogenicidad de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko)	21
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVO GENERAL	22
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22

4. MATERIAL Y METODOS	24
4.1. Estudios de virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) <i>in vivo</i>.	24
4.1.1. Determinación de la virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo mediante una prueba biológica.	25
4.1.2. Determinación de la virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en conejos raza Nueva Zelanda mediante una prueba biológica.	27
4.1.3. Determinación de la virulencia <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas cepa Wistar mediante una prueba biológica.	29
4.1.4. Determinación de la inocuidad <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en cobayos raza Abisinia mediante una prueba biológica.	31
4.1.5. Determinación de la virulencia <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollitos Leghorn de un día de edad mediante una prueba biológica.	33
4.1.6. Determinación de la virulencia <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollos de engorda de 1 y 8 días de edad mediante una prueba biológica.	34
4.1.7. Determinación de la patogenia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratón Albino Suizo <i>Mus musculus</i> mediante la observación de lesiones histológicas en Yeyuno e Íleon.	36

4.2. Estudios <i>In vitro</i> para la determinación de factores de virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).	38
4.2.1. Determinación de la existencia de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante ensayo celular con células de ovario de hamster chino (CHO).	38
4.2.2. Determinación de la actividad enterotóxica en células de ovario de Hamster Chino (CHO) mediante el empleo de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y proteínas periplasmáticas (PP) de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).	40
4.2.3. Purificación y caracterización parcial de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de proteínas periplasmáticas (PP) de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante geles SDS PAGE e <i>Immunoblot</i> .	41
 5. RESULTADOS	 45
5.1. Estudios de virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) <i>In vivo</i>.	45
5.1.1. Determinación de la virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo mediante una prueba biológica.	45
5.1.2. Determinación de la virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en conejos raza Nueva Zelanda mediante una prueba biológica.	46
5.1.3. Determinación de la virulencia <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas cepa Wistar mediante una prueba biológica.	46

5.1.4. Determinación de la inocuidad <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en cobayos raza Abisinia mediante una prueba biológica.	47
5.1.5. Determinación de la virulencia <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollitos Leghorn de un día de edad mediante prueba biológica.	47
5.1.6. Determinación de la virulencia <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollos de engorda de 1 y 8 días de edad mediante una prueba biológica.	48
5.1.7. Determinación de la patogenia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante la observación de lesiones histológicas a partir de muestras de yeyuno e íleon de <i>Mus musculus</i> .	49
5.2. Estudios <i>In vitro</i> para la determinación de factores de virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).	50
5.2.1. Determinación de la existencia de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante ensayo celular con células de ovario de hamster chino (CHO).	50
5.2.2. Purificación y caracterización parcial de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de proteínas periplasmáticas (PP) de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante geles SDS PAGE e <i>Immunoblot</i> .	51

6. DISCUSION	54
6.1. Estudios de virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) <i>in vivo</i>.	54
6.1.1. Determinación de la virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo mediante una prueba biológica.	54
6.1.2. Determinación de la virulencia <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas cepa Wistar mediante una prueba biológica.	60
6.1.3. Determinación de la inocuidad <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en cobayos raza Abisinia mediante un prueba biológica.	62
6.1.4. Determinación de la virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) contenida en el RBC en pollitos Leghom de un día de edad y de pollos de engorda de 1 y 8 días de edad mediante una prueba biológica.	63
6.1.5. Determinación de la patogenia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 grupo D1, mediante la observación de lesiones histológicas a partir de muestras de yeyuno e ileon de ratón (<i>Mus musculus</i>).	66
6.2. Estudios <i>in vitro</i> para la determinación de factores de virulencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).	69
6.2.1. Determinación de la existencia de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de <i>Salmonella enteritidis</i> variedad 17 F-4 (biovar. Issatschenko) por medio de ensayos biológicos en células CHO y la purificación y caracterización parcial de las proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de las proteínas periplasmáticas (PP) mediante geles SDS PAGE e <i>Immunoblot</i> .	69

7.	CONCLUSIONES	75
8.	ABREVIATURAS	77
9.	REFERENCIAS	78

CUADROS

Cuadro 1.	Calendario de Inmunización para la producción de anticuerpos contra PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en conejos.	93
Cuadro 2.	Mortalidad en ratones Albino Suizo y aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).	94
Cuadro 3.	Mortalidad ocasionada por el RBC y <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo.	95
Cuadro 4.	Análisis bacteriológico de las muestras de heces tomadas cada tercer día de los grupos de ratones Albino Suizo.	96
Cuadro 5.	Mortalidad conejos Nueva Zelanda y aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).	97
Cuadro 6.	Mortalidad en ratas cepa Wistar y aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).	98
Cuadro 7.	Mortalidad ocasionada por el RBC y <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas cepa Wistar.	99
Cuadro 8.	Mortalidad en cobayos raza Abisinia y aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).	100
Cuadro 9.	Mortalidad en pollos Leghom y aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).	101
Cuadro 10.	Análisis bacteriológico de las muestras de heces de los pollitos Leghom.	102

Cuadro 11. Aglutinación Rápida en placa con el antígeno K polivalente de <i>Salmonella pullorum</i> y prueba de Microaglutinación de los sueros de los pollitos Leghorn.	103
Cuadro 12. Mortalidad en pollos de engorda y aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).	104
Cuadro 13. Aglutinación rápida en placa con el antígeno K polivalente de <i>Salmonella pullorum</i> y prueba de microaglutinación de los sueros de los pollos de Engorda.	105
Cuadro 14. Cuantificación de proteínas y valores de absorbancia (D.O. 660 nm) a las 24 horas de crecimiento.	106
Cuadro 15. Pesos Moleculares en kDa de las PSNC y las PP de <i>Salmonella enteritidis</i> biovariedad Issatschenko encontrados por medio del ensayo de <i>Immunoblot</i> con Inmunoglobulinas conjugadas con Peroxidasa.	107
Cuadro 16. Pesos Moleculares en kDa de las PSNC y las PP de <i>Salmonella enteritidis</i> biovariedad Issatschenko encontrados por medio del ensayo de <i>Immunoblot</i> con Inmunoglobulinas conjugadas con Avidina-Biotina y Peroxidasa.	108

FIGURAS

Figura 1. Extracción de PSNC y PP de <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).	109
Figura 2. Elaboración de <i>Immunoblot</i> de las PSNC y las PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko con anticuerpos marcados con Peroxidasa.	110

Figura 3. Elaboración de <i>Immunoblot</i> de las PSNC y las PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko con anticuerpos marcados con Avidina-Biotina y Peroxidasa.	111
Figura 4. Mortalidad de los ratones Albino Suizo por la inoculación experimental del RBC y <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).	112
Figura 5. Mortalidad de las ratas cepa Wistar por la inoculación experimental del RBC y <i>Salmonella enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).	113
Figura 6. Efecto de las proteínas del sobrenadante del cultivo o las proteínas periplasmáticas de <i>S. enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) células en células CHO a las 24 horas posexposición.	114
Figura 7. Efecto citotónico producido por las proteínas del sobrenadante del cultivo o las proteínas periplasmáticas de <i>S. enteritidis</i> var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en las células CHO a las 72 y 96 horas posexposición.	115
Figura 8. Gel SDS-PAGE con Tinción de Plata de las PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko.	116
Fig. 9. Pesos moleculares en kDa de las PSNC y las PP de <i>Salmonella enteritidis</i> biovar. Issatschenko encontrados por medio del ensayo de <i>Immunoblot</i> con inmunoglobulinas conjugadas con Peroxidasa.	117
Figura 10. <i>Immunoblot</i> con PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko contra Anti – LT.	118
Figura 11. <i>Immunoblot</i> con PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko contra Anti – PSNC.	119
Figura 12. <i>Immunoblot</i> con PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko contra Anti – PP.	120

Figura 13. <i>Immunoblot</i> con PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko contra Anti – CT.	121
Figura 14. Gel SDS-PAGE con Tinción de Plata de las PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko y de las PP de <i>S. gallinarum</i> .	122
Figura 15. <i>Immunoblot</i> con PSNC y PP de <i>S. enteritidis</i> biovar. Issatschenko contra Anti – Sg.	123
Figura 16. Pesos Moleculares en kDa de las PSNC y las PP de <i>Salmonella enteritidis</i> biovariedad Issatschenko encontrados por medio del ensayo de <i>Immunoblot</i> con conjugados Avidina-Biotina y Peroxidasa.	124

URQUIZA BRAVO ODETTE. Patogenicidad e Inocuidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 en animales de laboratorio y determinación de proteínas con actividad enterotóxica (bajo la dirección de los MVZ: GUILLERMO TÉLLEZ ISAIAS, LEOPOLDO PAASCH MARTINEZ, HILDA JANDETE DÍAZ, FERNANDO CONSTANTINO CASAS)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar si *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) es inocua para aves domésticas, cobayos y conejos, y si es patógena para ratones y ratas, en los que la presencia de enterotoxinas inducen un proceso de invasión y colonización similar a lo descrito en otras enterobacterias. Dicha bacteria, al ser inoculada en ratones (*Mus musculus*), y ratas (*Rattus rattus*), produjo signos de Salmonelosis y mortalidad, reasistándose la bacteria aún de los animales sobrevivientes, hasta el término del ensayo (20 días), y de heces, en los primeros días posadministración. En conejos, no produjo signos de enfermedad, ni mortalidad, ni eliminación bacteriana en heces. En cobayos, aunque hubo mortalidad, no hubo recuperación de la bacteria a partir de los órganos internos de los animales muertos, ni de los sobrevivientes y tampoco de las heces. En pollos de engorda de 1 y 8 días de edad y en pollitos Leghom de un día de edad, produjo mortalidad en la primera semana posinoculación, y eliminación esporádica de la bacteria en heces en los primeros dos días posinoculación. La salmonela de este estudio produjo proteínas que se liberan al medio (PSNC) y proteínas periplasmáticas (PP), causando efecto citotónico y de vacuolización temprana en células CHO. Al emplear anticuerpos anti LT en *Immunoblot*, se observó mejor reactividad cruzada contra las PP de *S. gallinarum* (97, 66.2 y 45 kDa), las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) (97 y 66.2 kDa en ambas), que con CT, lo que indica que son más parecidas a LT y su presencia podría inducir un proceso de invasión.

Palabras clave: *Salmonella issatschenko*, *S. danysz*, *S. gallinarum*, Enterotoxinas de *Salmonella*, actividad enterotóxica de *Salmonella*.

URQUIZA BRAVO ODETTE. Pathogenicity and harmless of *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 in laboratory animals and protein enterotoxin activity determination (under the direction of the MVZ: Guillermo Tellez Isaias, Leopoldo Paasch Martínez, Hilda Jandete Díaz and Fernando Constantino Casas).

SUMMARY

The objective of this work was to determine if *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), is harmless in domestic birds, Guinea pigs and rabbits, and if it is pathogenic in mice and rats, where the presence of enterotoxins induce a process of invasion and colonization similar to the one described by other enterobacteria. This bacterium, was inoculated in mice (*Mus musculus*), and rats (*Rattus rattus*) producing signology of Salmonellosis and mortality. The bacteria was re-isolated from dead animals and those which had survived at the end of the test (20 days), and from feces during the first days post-inoculation. There was no signology, neither mortality, nor bacterial feces elimination in rabbits. Although there was mortality, no bacterium recovery from internal organs, nor from feces, was possible in Guinea pigs which had survived. In one and 8-day-old broiler chickens, and one-day old Leghorn chicks, the bacteria produced mortality during the first week post-inoculation, as well as sporadic bacteria elimination from feces in the first two days post-inoculation. In relation to the enterotoxins, *Salmonella* in this study produced supernatant proteins (PSNC) and periplasmic proteins (PP), which caused a cytotoxic and early vacuolization effect in Chinese Ovary Hamster cells (CHO). Better crossed reactivity was observed in Immunoblot using antibodies anti LT, against *S. gallinarum* PP (97, 66.2 y 45 kDa) and *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) PSNC and PP (97 y 66.2 kDa in both) than CT, indicating that they are more similar to LT and its presence could be related to invasion process.

Key Words: *Salmonella issatschenko*, *S. danysz*, *S. gallinarum*, *Salmonella* enterotoxins, *Salmonella* enterotoxin activity.

Patogenicidad e Inocuidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 en animales de laboratorio y determinación de proteínas con actividad enterotóxica.

1. INTRODUCCION.

La salmonelosis es una enfermedad de gran importancia económica en el hombre, animales domésticos y silvestres. El género *Salmonella* produce enteritis de origen alimenticio en el humano y en algunos casos provoca mortalidad, sobre todo en niños, ancianos e individuos inmunodeprimidos quienes son los más susceptibles. En los animales domésticos la salmonelosis se transmite de forma vertical y horizontal; los animales que sobreviven quedan como portadores asintomáticos de la enfermedad, siendo esta la manera en que se contribuye a la contaminación de las explotaciones pecuarias, ocasionando pérdidas económicas y zoonosis (Anónimo html; Hassan y Curtiss, 1994; Madden y Fujiwara, 1982; Jawetz *et al.*, 1992; Anónimo, 1992).

Las pérdidas económicas debidas a la salmonelosis en los Estados Unidos de América se estiman en más de un billón de dólares anuales, debido en gran parte a la pérdida de ingresos, al costo del tratamiento médico y a una baja productividad. Las infecciones por *Salmonella* aumentan día con día a pesar de los esfuerzos de prevención y control que se realizan para resolver este problema (Anónimo html; Hassan y Curtiss, 1994; Madden y Fujiwara, 1982; Rivera *et al.*, 1991; Jawetz *et al.*, 1992; Anónimo, 1992).

La salmonelosis es causada por un microorganismo de la familia Enterobacteriaceae, género *Salmonella*. Son bacterias Gram negativas, miden alrededor de 2-4 X 0.5 μm , tienden a formar cadenas, no esporulan, ni tampoco poseen cápsula excepto *S. typhi* (Ashton, 1990; Ewing, 1986). Este género fue descrito por primera vez en 1880 (Le Minor, 1984), y comprende mas de 2,400 serotipos (Yongsheng *et al.*, 1999; Euseby, 1999), de los cuales, pueden ser divididos en dos grupos principales: el de las salmonelas no móviles, representado por *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum* quienes sólo infectan a las aves y el de las salmonelas móviles, que incluye a los demás serotipos del género, afectando a todos los animales incluyendo al hombre (Anónimo,

1992; Davies *et al.*, 1979; Yongsheng *et al.*, 1990; Bouzoba *et al.*, 1987; Chopra *et al.*, 1987; Cox y Bailey, 1991; Snoeyenbros *et al.*, 1991).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Los serotipos de *Salmonella* se dividen en tres grupos: el primero comprende a *Salmonella typhi* (sin serotipos) (Davies *et al.*, 1979; Davies y Wray, 1995; Yongsheng *et al.*, 1999; Salyers y Whitt, 1994) y *S. paratyphi* "A" y "C" respectivamente, que infectan al hombre y se propagan en forma directa o indirecta por medio de alimentos o agua contaminada (Comité de expertos OMS, 1988). El segundo grupo incluye serovariedades adaptadas al huésped en especies particulares de vertebrados, por ejemplo: *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum* en aves, *S. dublin* en ganado vacuno y *S. cholerae-suis* (sin serotipos) en cerdos (Davies *et al.*, 1979; Yongsheng *et al.*, 1999; Salyers y Whitt 1994; Comité de expertos OMS, 1988; Acha y Szyfres, 1992) y *Salmonella enteritidis*, subespecie entérica, bioserotipo enteritidis, variedad 17 F-4, subgrupo 1, grupo D (*Salmonella enteritidis* var. 17 F-4, biovariedad Issatschenko) exclusivamente en roedores (Kazimiers, 1973). El tercer grupo está formado por las demás serovariedades de *Salmonella*, sin tener ninguna preferencia particular por el huésped que infectan, ya sea al hombre o animales (Comité de expertos OMS, 1988; Davies *et al.*, 1979; Bouzouba *et al.*, 1987; Salyers y Whitt, 1994; Urquiza, 1993; Kazimiers, 1973; Hetch, 1979). 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 (Freeman, 1989).

Uno de los reservorios más grandes de *Salmonella*, lo constituye la producción avícola, siendo *S. enteritidis* y *S. typhimurium* los serotipos que producen enfermedades en las aves y en muchos otros animales incluyendo el hombre. Estos serotipos también poseen una gran capacidad de causar problemas de origen alimenticio en humanos, principalmente por el consumo de productos de origen avícola. Por otro lado, el control inadecuado de plagas como los ácaros, aves silvestres, artrópodos, insectos y roedores quienes a través de sus heces contaminan agua, alimento, material de cama y equipo ha favorecido la permanencia de *Salmonella* en la naturaleza (Guillingham, 1993; Urquiza, 1994y 1993).

El control de plagas es importante, debido a que estas pueden favorecer un ambiente de sobrevivencia ideal para *Salmonella* y otros patógenos que afectan a las aves y a otros animales (Nagaraja *et al.*, 1991) como por ejemplo, Urquiza²⁷ *et al.*, (1998), demostraron que el escarabajo *Alphitobius diaperinus* es un portador de *Salmonella enteritidis* PT-13-A por largos periodos de tiempo, llegándose a recuperar la bacteria hasta las 10 semanas posteriores a su inoculación experimental, comportándose como un vector mecánico, siendo capaz de contaminar un alimento estéril aún con concentraciones mayores a la inoculada al alimento original, manteniendo un ambiente permanentemente contaminado. El *Alphitobius diaperinus* es capaz de portar externamente una cantidad de bacterias igual o mayor a las que portan internamente.

Los roedores de la familia Muridae, son otra de las plagas en la que se ha confirmado la transmisión de *Salmonella* por vía horizontal y debido a la falta de interés en almacenar alimentos en forma adecuada, estos han seguido al hombre a muchas áreas donde se ha situado, provocando también grandes pérdidas económicas por la destrucción de instalaciones domésticas y agropecuarias además de la transmisión de otros agentes causales de enfermedades (Ghoneim, 1996; Porres, 1996; US Department of agriculture, 1989).

Así como en la avicultura actual se ha registrado el aumento de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, se ha observado también, que las ratas son quienes llevan más frecuentemente estos serotipos, los cuales, son de las especies más estudiadas en los Estados Unidos de América. La salmonelosis puede ser un serio problema en ratas de laboratorio, debido a que esta enfermedad puede convertirse en crónica y así difundirse hacia las demás ratas, además de que el personal que maneja a estos animales puede transmitirla a humanos y a otros animales (Steven, 1979; Pomeroy y Nagaraja, 1991; Urquiza *et al.*, 1994).

Con relación a la salmonelosis en aves, se ha comprobado que a mayor edad, estas se vuelven más resistentes a la infección por *S. gallinarum* y *S. pullorum*, pero lo anterior no se cumple con *S. enteritidis* o *S. typhimurium*, debido a que se ha observado que las gallinas adultas en producción o pelecha son más susceptibles. Se han infectado aves adultas experimentalmente con dichas bacterias en dosis superiores de 10 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y estas han sido recuperadas por medio de aislamiento bacteriano a partir de órganos internos (Urquiza, 1993; Padrón, 1991).

En infecciones por *S. enteritidis*, se ha observado su permanencia en ciegos sin producir signos clínicos. Las parvadas infectadas en forma natural pueden permanecer en este estado durante toda su vida, como resultado de la colonización del intestino (Urquiza, 1992).

La mayoría de los estudios de aves infectadas experimentalmente, se han basado en el uso de alimento contaminado o la administración directa de microorganismos en el buche, en aerosol o por vía conjuntival. Después de dos días posinfección, *S. enteritidis* ha sido aislada de vísceras, ovario y heces, sin embargo, en las heces, la bacteria fue aislada después de 28 días y en forma intermitente (Urquiza, 1992).

Otros estudios han indicado que *Salmonella thompson* ha podido aislarse de heces aún después de 18 meses posinfección y también en forma intermitente (Ashton, 1990).

Se ha demostrado que la transmisión de *S. gallinarum* y *S. pullorum* puede ser por vía vertical (transovárica) y horizontal y en el caso de los demás serotipos, la vía horizontal es muy importante. Estudios recientes han comprobado que los serotipos de *Salmonella* encontrados en el producto final (sea pollo procesado o carne de cualquier tipo), provienen del manejo insalubre de dichos productos, como lo es el agua empleada para el lavado de las canales, equipo de rastro contaminado, polvo, suelo y personal enfermo. *S. enteritidis* puede sobrevivir hasta por dos años en esos sitios (Urquiza²⁷, 1998 y 1992; Ashton, 1990).

1.2 PATOGENIA DE LA SALMONELOSIS

La dosis mínima media para producir infección subclínica en animales y hombre puede ser de tan solo 10^3 UFC, mientras que para la forma clínica es de 10^5 a 10^8 UFC, dependiendo de la resistencia del hospedero, que puede ser:

a) Genética.- Algunas especies animales son menos susceptibles a una infección por *Salmonella*.

b) Resistencia por la edad.- Los animales adultos son más refractarios a Salmonelosis que los jóvenes.

c) Acidez del contenido intestinal.- Se ha observado que las aves alimentadas con dietas que acidifican el tracto intestinal, son menos susceptibles a la colonización por *S. gallinarum*.

d) Flora microbiana intestinal nativa.- Presencia de bacterias no patógenas en tracto gastrointestinal para evitar la adherencia por *Salmonella*.

e) Inmunidad intestinal local.- Presencia de células T, macrófagos y otras células inflamatorias.

f) Inmunidad Humoral.- Aumento de anticuerpos circulantes desde los primeros estadios de infección por *Salmonella* (Anónimo html, Madden y Fujiwara, 1982; Jawetz *et al.*, 1992; Davies y Wray, 1995; Kazimierz, 1973; Pomeroy y Nagaraja, 1991; Arnold y Holt, 1995; Schat y Myers, 1991; Mosqueda, 1987; Cooper y Thoms, 1996).

La enfermedad producida por *Salmonella* también depende del serotipo involucrado en la infección. En los Estados Unidos de América y México, *S. enteritidis* ha reemplazado a *S. typhimurium* como el serotipo más comúnmente aislado. En el Reino Unido, Canadá y algunos países de Europa Occidental, *S. enteritidis* fagotipo 4 (PT 4), es la cepa mayormente aislada y en los Estados Unidos de América predominan los PT 8 y 13 A (Salyers y Whitt, 199; Poppe *et al.*, 1993; Urquiza *et al.*, 1994; Urquiza, 1992; Garcia *et al.*, 1996).

Una vez que *Salmonella* ha sido ingerida y alcanza intestino delgado, esta se adhiere a los enterocitos y coloniza el intestino después de un periodo de incubación, que puede ser desde 8 horas hasta 15 días. La bacteria pasa hacia el torrente sanguíneo además de ser excretada por vías urinarias y heces. Las bacterias que están en sangre, infectan órganos internos como hígado, bazo, duodeno, ciegos, y gónadas, desarrollando fiebre remitente, malestar general, náuseas, vómitos y diarrea profusa (Salyers y Whitt, 1994; Poppe *et al.*, 1993).

Debido a que *Salmonella* tiene tropismo por las vías biliares, en vesícula biliar se multiplica de forma abundante y en ocasiones la bacteria se mueve de hígado a vías biliares, originándose un flujo continuo de microorganismos hacia intestino delgado por segunda vez, donde tienden a localizarse en las placas de Peyer (tejido linfóide intestinal asociado), de aquí puede determinarse el estado de portador eliminando en forma intermitente *Salmonella* por heces (Salyers y Whitt, 1994; Poppe *et al.*, 1993).

Salyers y Whitt (1994), mencionan que una vez que *Salmonella* spp se encuentra dentro del organismo, crece dentro de los macrófagos de hígado y bazo. En el caso de *Salmonella typhimurium* vive principalmente dentro de las células del hospedero que fuera de ellas. Existen algunas evidencias donde se observa que cuando *Salmonella typhimurium* es ingerida por fagocitos *in vitro*, muchas de las que son ingeridas son aniquiladas, pero una subpoblación sobrevive, hasta el momento se desconoce acerca de las características de esta subpoblación o de que si la bacteria que sobrevive puede crecer en los fagocitos.

1.3 SIGNOS CLÍNICOS PRODUCIDOS EN SALMONELOSIS

Los signos clínicos que se registran frecuentemente en la infección por *S. pullorum* y *S. gallinarum* en aves jóvenes son: apatía, somnolencia, deshidratación, empastamiento cloacal, depresión, ceguera, diarrea y alta mortalidad y las aves que sobreviven pueden presentar aumento de leucocitos y pobre crecimiento. En aves adultas, la producción se reduce hasta un 30%, existiendo deshidratación, anorexia y cianosis de la cresta y las barbillas (Ashton, 1990; Snoyenbros y Williams, 1991; Arnold y Holt, 1995; Padrón, 1991; Padrón, 1987; Whiteman y Bicckford, 1983). Con la infección por *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, los signos clínicos no son específicos, sin embargo, en los pollitos de 1 a 4 semanas de edad hay mayor susceptibilidad y la mortalidad puede llegar al 20 %, especialmente cuando se trata del fagotipo 4. Existe retraso en el crecimiento, poca ganancia de peso, decaimiento y muerte. En gallinas no se observan signos, pero puede haber una reducción en la producción de huevo. La mortalidad puede estar asociada con peritonitis y ooforitis. En humanos hay dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, escalofrío y fiebre en las 6 a 96 horas posinfección y en algunos casos, muerte sobre todo en pacientes muy susceptibles y pacientes inmunodeprimidos aunque esto depende del fagotipo involucrado. (Urquiza, 1992).

En infecciones por *S. typhimurium* en múridos existe depresión, anorexia, deshidratación, pérdida de peso y diarrea, la cual es inconstante en infecciones naturales. La diarrea puede ser un signo dosis dependiente y esta puede observarse a los 4 días posinfección y persistir hasta 21 días. La apariencia de esta diarrea puede ser mucoide y ocasionalmente salpicada de sangre. Con *S. enteritidis* se produce vómito, dolor abdominal, fiebre y diarrea. En los animales jóvenes los signos son más severos. Con *S.*

choleraesuis se observa aumento de neutrófilos y disminución de linfocitos. La signología en infecciones por *Salmonella* en animales con los demás serotipos de este género es muy similar (Jawetz *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1979; Salyers y Whitt, 1994; Pomeroy y Nagaraja, 1991; Songer *et al.*, 1960; Nagaraja *et al.*, 1991; Cooper y Thoms, 1991).

1.4 LESIONES MACROSCÓPICAS EN SALMONELOSIS

Algunos órganos internos pueden ser severamente afectados por ciertos serotipos de *Salmonella*, como: *S. typhi*, que puede perforar el intestino delgado, ocasionando hemorragia, peritonitis y muerte. *S. choleraesuis* produce focos de necrosis pequeños que pueden ser escasos o abundantes en pulmón, huesos, articulaciones y meninges, dependiendo de la severidad de la infección (Davies *et al.*, 1979). En el caso de *S. pullorum*, puede causar inflamación crónica degenerativa en ovario y salpingitis, desarrollo de pericarditis, enteritis catarral, orquitis y neumonía supurativa focal. *S. gallinarum* puede producir hepatomegalia, esplenomegalia y necrosis multifocal en hígado, riñón y bazo así como focos de necrosis en miocardio y coloración bronceada en hígado, bazo, pulmón y corazón. *S. typhimurium* produce lesiones inflamatorias en intestinos delgado y grueso en diferentes animales y en mórvidos congestión de hígado y bazo, en mesenterio, congestión y edema, adelgazamiento de las paredes del íleon y ciego con acumulación de líquidos y gas y petequias que pueden extenderse hasta el yeyuno cuando existe diarrea, pudiéndose encontrar pequeñas úlceras en el epitelio cecal con exudado fibrinoso. Las lesiones producidas por *S. enteritidis* son muy similares a las descritas anteriormente, dependiendo también del fagotipo involucrado. En el proceso puede observarse en aves esplenomegalia, hepatomegalia, enteritis, onfalitis, peritonitis y ooforitis. En pollos de 2 a 3 semanas hay panoftalmis, pericarditis y a veces tiflitis. (Jawetz *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1979; Salyers y Whitt, 1994; Arnold y Holt, 1995; Songer *et al.*, 1960; Nagaraja *et al.*, 1991; Urquiza, 1992).

1.5 LESIONES MICROSCÓPICAS EN SALMONELOSIS

Las lesiones microscópicas observadas en la infección por *S. typhi* son: hiperplasia en el tejido linfoide intestinal asociado (TLIA) (placas de Peyer), ganglios linfáticos y bazo, necrosis focal de hígado, inflamación de la vesícula biliar y lesiones inflamatorias focales en pulmón, médula ósea y periostio. Las hemorragias intestinales o perforaciones del intestino son generalmente consecuencia de ulceraciones necróticas en el TLIA. En las lesiones activas pueden observarse a los bacilos intracelularmente en los fagocitos mononucleares. Para el caso de las lesiones producidas por *S. pullorum*, se observa en hígado de pollitos hiperemia, hemorragias, degeneración focal y necrosis, focos proliferativos de células endoteliales en hígado, necrosis focal de miocardio, bronquitis catarral, enteritis catarral e inflamación intersticial en hígado, pulmón y riñones y pericarditis. Los hallazgos por la infección por *S. gallinarum* son hepatitis difusa, focos de necrosis en el parénquima hepático con infiltrado linfocitario. El miocardio presenta infartos y áreas de necrosis fibrinoide y esclerosis. *S. typhimurium* produce focos necróticos en hígado y corazón y los roedores afectados que no tienen diarrea, pueden tener lesiones similares y cuantitativamente menores que los que presentan diarrea. Los intestinos de los animales sobrevivientes se observan reparados después de 4 a 5 semanas posinfección. El TLIA se encuentra edematoso y con infiltrado inflamatorio con necrosis focal o formación de granulomas. El bazo con coloración grisácea en la cápsula o rojo oscuro y agrandamiento del órgano. En el parénquima, infiltrado inflamatorio con células fagocíticas, necrosis y en ocasiones formación de granulomas. El hígado puede observarse congestionado o pálido, la necrosis focal debajo de la cápsula es de tipo coagulativa (Davies *et al.*, 1979, Davies y Wray, 1995; Salyers y Whitt, 1994; Pomeroy y Nagaraja, 1991; Runnels, *et al.*, 1960; Nagaraja *et al.*, 1991).

1.6 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE SALMONELLA

Muchas de las bacterias patógenas entéricas tienen la capacidad de invadir cultivos celulares de mamíferos por medio de la acción de la actina, que como resultado, induce la formación de pseudópodos para que sea fagocitada la bacteria. *Salmonella* spp, fuerza a las células del hospedero a que sean fagocitadas. La unión de *Salmonella typhimurium* y *S. choleraesuis* en cultivos celulares, produce cambios en la superficie de la célula del hospedero, semejante a un líquido que salpica (efecto "splash"), haciendo

contacto con la superficie de la célula. Este efecto "splash" provoca que la membrana celular se deforme y adquiera un aspecto rugoso (membrana rugosa), que finalmente, tiene como resultado, la penetración de la bacteria dentro de una vesícula endocítica. Una vez que la bacteria es fagocitada, la célula recupera su forma normal; dentro de la vesícula endocítica las bacterias se dividen y diferentes vesículas crecen juntas formando grandes vesículas llevando en su interior muchas bacterias (Salyers y Whitt, 1994).

El mecanismo mediante el cual la membrana celular adquiere el aspecto rugoso para la penetración de la bacteria, parece ser mediada por un grupo de genes cromosomales designados *inv* (*inv A-P*). Se ha sugerido que muchos de los genes *inv* codifican para la producción de algunas proteínas auxiliares en el proceso de invasión. Existen otros genes llamados *hil* (hiperinvasión), que están localizados cerca de la cadena *inv* en *S. typhimurium* los cuales se encargan de aumentar la frecuencia de invasión (Salyers y Whitt, 1994).

S. typhimurium contiene plásmidos de virulencia con genes llamados, *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD* organizados en un operón y *spvR* que es una unidad transcripcional separada, estos genes se expresan durante la fase estacionaria de la bacteria. Los genes *spv* (*Salmonella* plasmid *virulence*) contienen de 50-90 kilobases, y su ausencia, reduce la capacidad de la bacteria para causar infecciones sistémicas en ratón, sugiriendo que los plásmidos llevan genes de virulencia importantes. Se ha obtenido la secuencia de DNA de estos genes, pero el único gene que tiene una secuencia significativa similar con los genes de funciones conocidas, es *spvR*, un gene regulador. Los genes *spvA-D* codifican para las proteínas de membrana pero aún no se conoce su función completa (Salyers y Whitt, 1994).

S. typhimurium ha desarrollado un complejo de adaptación a la ingestión por fagocitos. La sobrevivencia en fagocitos es debida a dos características que son: la resistencia al oxígeno y la resistencia a las defensinas. Los genes *oxy* se expresan en presencia de tensión por oxígeno y codifican también para catalasa y para superóxido dismutasa, se encuentran localizados en el operón *phoP/phoQ*, los cuales controlan genes para la sobrevivencia en macrófagos. La falta de *phoP/phoQ* aumenta la DL50 en más de 10,000 veces, indicando que este operón regulador controla genes esenciales para la virulencia en ratones (Salyers y Whitt, 1994).

Los genes *pag* son controlados por *phoP/phoQ* y son llamados *pag* por que provienen de "*phoPQ activated*", se expresan con la limitación de carbono, bajo pH y condiciones aeróbicas. Los genes de represión son llamados *prg* (*phoPQ-repressed genes*), son expresados en medios enriquecidos, en condiciones aeróbicas y pH neutro. La ausencia de algunos genes *pag* (*pagA* y *pagB*) no tienen efecto en la DL50, pero la ausencia de *pagC* aumenta la DL50 hasta 1,000 veces. El gene *pagC* codifica una proteína para la membrana externa de la cual se desconoce aún su función. Los genes *prg A-H* codifican para proteínas excretadas. *prgH* es necesaria para que la virulencia de la bacteria en la administración oral o inyectada continúe, sin embargo, su función específica en el proceso de infección, no está bien establecida. La ausencia de *prgH* disminuye la invasión de macrófagos cultivados. Este hecho junto con el que *prgH* esta intimamente unido a *hil*, que a su vez esta unido a *invA-H*, sugiere que *prgH* probablemente codifique para una invasina o una proteína involucrada en el proceso de invasión (Salyers y Whitt, 1994).

Otro factor de virulencia importante de *Salmonella* spp, en el suero, es la resistencia al sistema complemento, el cual, es debido a las grandes cadenas del antígeno O del LPS, además, existe una proteína de membrana externa producida llamada Rck (*Resistance to complement killing*), codificada por el gene del plásmido de virulencia en *S. typhimurium*. Rck, actúa previniendo la formación y la inserción, del complejo C9 completamente polimerizado dentro de la membrana externa de la bacteria (Salyers y Whitt, 1994).

1.6.1 Toxinas Bacterianas

Las toxinas bacterianas se clasifican en endotoxinas y exotoxinas. Las endotoxinas forman una parte estructural del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (pared celular), mientras que las exotoxinas pueden ser producidas extracelularmente durante el crecimiento o ser liberadas durante la muerte bacteriana mediante lisis celular (Ruttler, 1988).

En aves inoculadas experimentalmente con la endotoxina (parte del LPS) de *S. gallinarum* se observa aumento de la temperatura corporal, disminución del peso de la

bolsa de Fabricio y cambios en los parámetros hematológicos y serológicos (Tsuji *et al.*, 1990).

Las exotoxinas clásicas son considerablemente más tóxicas que las endotoxinas, son proteínas termolábiles y pueden convertirse en toxoides, que pueden estimular la producción de anticuerpos, neutralizando la actividad biológica de los efectos de la toxina, antes y frecuentemente después de ser administrada a los animales. Muchas de las bacterias Gram negativas producen exotoxinas y a las producidas por enterobacterias se les denomina enterotoxinas (Bouzouba *et al.*, 1987; Chopra *et al.*, 1987; Jawetz *et al.*, 1992; Perez- Perez *et al.*, 1992).

1.6.2 Estructura y Función de las Exotoxinas

Las exotoxinas pueden dividirse en tres tipos con base en su estructura y actividades.

1) Toxina tipo A-B.- Son aquellas toxinas que poseen dos fragmentos: El fragmento A que posee actividad enzimática y es el responsable de la toxicidad, este fragmento está separado del fragmento B el cual se une al receptor de la célula del hospedero. El fragmento B, puede estar formado por un solo polipéptido o tener varias subunidades. El receptor en la célula del hospedero es reconocido frecuentemente por la subunidad B, pero no siempre se trata de carbohidratos en la superficie de la célula del hospedero. La subunidad A, penetra al citoplasma de la célula blanco ya sea inmediatamente después de la unión del fragmento B a su receptor o después de la endocitosis de la toxina completa. El fragmento A de muchas de las toxinas A-B, inactivan proteínas del huésped por unión covalente de un grupo ADP ribosil (ADP ribosilación).

2) Toxinas que desorganizan las membranas de las células del hospedero.- Son aquellas toxinas que pueden formar poros o hidrolizan fosfolípidos en la membrana celular. Las primeras, permiten que los componentes celulares salgan, entonces entra agua y por ende la célula muere. Estas toxinas pueden ayudar a la bacteria fagocitada a escapar de la vesícula fagocítica y entrar al citoplasma de la célula del hospedero, no tienen actividad enzimática, pero producen un efecto tóxico por medio de la inserción dentro de las membranas, usualmente uno de sus receptores es el colesterol. Las segundas, son fosfolipasas, las cuales remueven una porción de lípidos de los fosfolípidos

de la membrana plasmática de las células del hospedero y entonces, al ser removidos estos lípidos, la membrana se desestabiliza y ocurre la muerte celular. Ejemplo de estas toxinas son las "hemolisinas" (citotoxinas).

3) Superantígenos.- Son proteínas bacterianas que necesitan una estructura tipo A-B y actúan estimulando a las células T para liberar citocinas (Salyers y Whitt, 1994).

Existen dos grupos de exotoxinas basados en su mecanismo de acción:

1.- Toxinas citolíticas.- Fueron las primeras en ser descritas, debido a que causan hemólisis alrededor de los cultivos de agar sangre. Las toxinas citolíticas modifican la membrana celular, permitiendo la salida de los componentes intracelulares, dando como resultado la lisis de la célula, aunque se ha descrito que muchas de estas toxinas son capaces de provocar cambios de permeabilidad en la membrana, sin causar lisis celular como se observa con la exotoxina de *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Pasteurella haemolytica*.

2.- Toxinas con actividad intracelular. Son aquellas que afectan la actividad metabólica de la célula mediante 2 formas principalmente:

a) Toxinas citotóxicas.- Inhiben la síntesis de proteínas en el interior de la célula como se observa con las toxinas de *Shigella dysenteriae* y *Campylobacter jejuni* (Koupal y Deibel, 1975; Prasad *et al.*, 1992; Ruttler, 1988; Sandefur y Peterson, 1977; Suárez, 1990).

b) Toxinas citotónicas . - Activan intracelularmente la adenilciclase, ejemplos de éstas son la toxina de *Vibrio cholerae* (CT) y la toxina termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigénica (LT). Algunas de las bacterias que colonizan el tracto intestinal, producen exotoxinas a las cuales se les conoce como enterotoxinas y ejercen su acción en los enterocitos. *Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) , *S. typhi* y *S. typhimurium* producen enterotoxinas, las cuales juegan un papel muy importante en la producción de diarreas durante la infección. Se ha descrito también en *Salmonella gallinarum* proteínas con actividad enterotóxica similares a CT, las cuales pueden formar parte de los mecanismos que producen diarrea en las aves (Urquiza, 1995).

1.6.2.1 Enterotoxina de *Vibrio cholerae*

Durante la infección, *V. cholerae* no penetra a las células epiteliales del intestino, sino que el daño lo provoca por medio de la producción de una potente enterotoxina, además, la bacteria se multiplica colonizando gran parte del epitelio intestinal, interfiriendo con la capacidad de absorción del colon, dando como resultado una gran pérdida de agua del organismo (Betley *et al.*, 1986; Holmgren, 1981; Hunt y Hardy, 1991; Mekalanos *et al.*, 1979; Middlebrook y Dorland, 1984; Spangler, 1992).

La enterotoxina de *V. cholerae* (*cholera toxin: CT*) es una toxina de tipo A-B ADP-ribosiladora, es termolábil y está compuesta por dos subunidades: la subunidad A con un peso molecular (PM) de 27.215 kilo Daltons (kDa) y una subunidad B con un PM de 11.67 kDa que está codificada por los genes *ctxA* y *ctxB*, respectivamente, que se encuentran en el cromosoma de la bacteria (Betley *et al.*, 1986; Mekalanos, 1985; Salyers y Whitt, 1994; Spangler, 1992).

La molécula de la toxina biológicamente activa, esta compuesta por cinco subunidades B y una subunidad A (Betley, 1986; Mekalanos, 1985). La subunidad B constituye el sitio de unión de la toxina con receptor de membrana de las células eucarióticas, el gangliósido G_{M1} , y posiblemente facilita la entrada de la subunidad A dentro de la célula blanco (Salyers y Whitt, 1994). La subunidad A tiene actividad enzimática y toxigénica y puede ser cortada proteolíticamente generando dos cadenas denominadas A1 y A2 (Betley, 1986; Cuatrecasas, 1973; Eidels *et al.*, 1983; Filkenstein *et al.*, 1983; Holmgren, 1981; Lopez-Vidal *et al.*, 1981; Mekalanos, 1985; Middlebrook y Dorland, 1984; Spangler, 1992).

Cuando *V. cholerae* coloniza el intestino delgado excreta CT, la cual se une a las células de la superficie de la mucosa del hospedero, por medio de la unión del gangliósido. G_{M1} es un ácido siálico que contiene un oligosacárido covalentemente unido a un lípido ceramida. La porción del lípido está embebida en la célula de la membrana del hospedero y el oligosacárido está expuesto en la superficie de la célula del hospedero. El oligosacárido es la mitad reconocida por la subunidad B de la toxina. *V. cholerae* secreta una neuraminidasa llamada sialidasa, que remueve los residuos del ácido siálico del complejo oligosacárido para hacerlo estructuralmente más similar a G_{M1} . Se ha sugerido

que la neuraminidasa contribuye a la virulencia de *V. cholerae* aumentando el número de receptores disponibles para que se una CT (Salyers y Whitt, 1994).

Una vez que CT se une a G_{M1} , la subunidad A1 es liberada de la toxina, probablemente por medio de una reducción de la unión disulfuro que une a A2, y penetra a la célula del hospedero por medio de un mecanismo de translocación desconocido. La subunidad A1, ADP-ribosila una proteína de membrana llamada Gs. A1, ADP-ribosila a otras proteínas de las células del hospedero, pero Gs parece ser el primer blanco. Gs es una proteína de la familia GTP-hidrolizantes (llamadas proteínas G) que regulan muchos de los aspectos de las funciones de las células eucarióticas. Gs es una proteína G que regula la actividad de la adenilato ciclasa de la célula del hospedero, a manera de una hormona-dependiente y entonces determina el nivel del AMP cíclico (AMPc) en las células blanco. La forma activa de Gs (Unión GTP), aumenta la actividad de la adenilato ciclasa, mientras que la forma inactiva de la unión GDP, extrae la adenilato ciclasa inactiva. Normalmente la forma activa es producida en respuesta a la estimulación hormonal y es convertida en forma inactiva después de un período corto. Esta "activación y desactivación", asegura que el AMPc (una molécula reguladora en células eucarióticas) se produzca en altos niveles, suficientes, para realizar su función, pero no le es permitido la acumulación por interrupción de las actividades normales de la célula. Los "corto circuitos" (activación y desactivación sin control) de la ADP ribosilación de Gs, provocan que Gs permanezca "activa", y entonces, los niveles de AMPc permanecen sin control y son liberados en altos niveles. Esta variedad de efectos, provoca que exista una alteración en el transporte de sodio y cloro que producen un desequilibrio de iones que causa la pérdida de agua asociada a cólera humano (Holmgren, 1981; Mekalanos *et al.*, 1979; Mekalanos, 1985; Middlebrook, 1984; Salyers y Whitt, 1994).

El proceso por el cual la toxina de completa de cólera es excretada hacia el líquido extracelular aún no está bien estudiado, pero CT está estructuralmente y funcionalmente relacionada a la enterotoxina lábil de *Escherichia coli* (LT) (Moseley y Falcow, 1980; Salyers y Whitt, 1994; Shinji, *et al.*, 1988; Spicer y Noble 1982).

1.6.2.2 Enterotoxinas de *Escherichia coli*

Existe evidencia de que muchos de los casos llamados "diarrea del viajero", son causados por una infección de algunas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). ETEC produce dos tipos de enterotoxinas, una es conocida como LT (*lábil toxin*: toxina termo lábil), y la segunda es conocida como ST (*heat -stable toxin*: toxina termoestable) (Eidels *et al.*, 1983; Kunkel y Robertson, 1979; Middlebrook, 1984; Spangler, 1992).

La enterotoxina ST de *E. coli*, ha sido asociada a algunos casos de diarrea en viajeros y en niños. Es una proteína extracelular, no tiene reactividad humoral cruzada con LT o CT, tiene un peso molecular bajo (2,000 daltons) y es estable a 100°C por 15 - 30 minutos. Los genes que codifican para ST se encuentran en plásmidos y son conocidos como *stA*. Los plásmidos de ST han sido transferidos por conjugación a *V. cholerae* y otras enterobacterias, y han estimulado la acumulación de líquidos en ensayos en ratón y asas ligadas ileales en conejo, aunque la respuesta es rápida, ésta no se sostiene por más de 6 horas (Betley *et al.*, 1986; Eidels *et al.*, 1983; Evans *et al.*, 1974; Middlebrook, 1984; Ruttler, 1988; Salyers y Whitt, 1994).

ST se divide en dos subgrupos; metanol soluble (STa) y metanol insoluble (STb). STa provoca un aumento en el nivel del GMP cíclico (GMPc) del citoplasma del enterocito del hospedero, este aumento, provoca la pérdida del mismo tipo de líquidos causados por la liberación descontrolada de AMPc. El sitio de unión de ST es la parte apical de la membrana de la célula intestinal del hospedero y esta unión es la que activa la guanilato ciclasa. Hallazgos recientes, han sugerido que STa imita una hormona que normalmente activa a GMPc. El proceso de activación requiere ATP, pero el papel del ATP no está bien entendido aún y existen muchos factores auxiliares (como las proteínas ATP unidoras) también involucrados. STa y STb actúan de manera diferente y tienen una secuencia de aminoácidos diferente. Existe la evidencia de que los receptores de ST son diferentes a los de CT y LT (Betley *et al.* 1986, Evans *et al.* 1974, Salyers and Whitt 1994).

LT tiene un peso molecular de 91 kDa, y está compuesta por una subunidad A con un PM de 25,500 daltons y una subunidad B de 59,000 daltons. Los genes que codifican para LT se conocen como *elt A* y *elt B* respectivamente (Betley *et al.*, 1986; Evans *et al.*, 1974; Ruttler, 1988; Spangler, 1992; Timmins *et al.*, 1984). Los genes de LT se localizan

en una familia de plásmidos denominados *ert*, de los cuales se ha determinado la secuencia nucleotídica, observándose una alta similitud con la del gene *CT* (80 % de la secuencia de aminoácidos en la porción amino terminal de la subunidad A1, y de un 31 a 55% de similitud con el péptido A2 (Eidels *et al.*, 1983). Sin embargo, *LT* no es secretada hacia el sobrenadante durante el crecimiento en un medio de cultivo en el laboratorio, sino que se localiza en el espacio periplasmático de la bacteria (Betley *et al.*, 1986; Evans *et al.*, 1974; Fukuta *et al.*, 1988; Hunt and Hardy, 1991; Kunkel and Robertson, 1979; Mekalanos *et al.*, 1979; Salyers y Whitt, 1994).

Muchas de las cepas de *E. coli* producen una *LT* de tipo I (*LT-I*) que causan una diarrea secretora y activan la adenilato ciclasa en las células de la mucosa del intestino delgado (Cox y Bailey, 1991). Existe un segundo grupo de enterotoxinas de *E. coli* denominadas *LT-II*, cuyos genes se localizan en el cromosoma bacteriano. Las *LT-II* no son neutralizadas por antisueros dirigidos contra *CT* y *LT*, aunque poseen una reacción inmunosérica cruzada muy débil con *LT-I* y *CT*. Dos miembros de la familia *LT-II* (*LT-IIa* y *LT-IIb*) están formados por subunidades A y B similares a las de *CT* y *LT-I*, con la diferencia de que la subunidad B de las toxinas del grupo *LT-II* no tiene la capacidad de unirse a G_{M1} (Dallas *et al.*, 1988; Fukuta *et al.*, 1988; Green *et al.*, 1983; Hunt and Hardy, 1991; Ruttler, 1988, Salyers y Whitt, 1994).

1.6.2.3 Enterotoxinas de *Campylobacter jejuni*

Se ha demostrado que *C. jejuni* produce una enterotoxina que se encuentra en el espacio periplasmático, y sus propiedades inmunológicas y actividad enzimática son similares a *CT* y *LT*. Esta enterotoxina induce elongación en células de ovario de hamster chino (*chinese ovary cell*: CHO), lo cual indica que el AMP cíclico intracelular se encuentra elevado. Los hallazgos obtenidos por Daikoku *et al.*, (1990) y Díaz-Barroso *et al.*, (1995), sugirieron que existe una banda de 68 kDa y 62 kDa empleando anticuerpos IgG anti *CT* y anti *CT-B*, respectivamente. La toxina de *C. jejuni* (*CJT*), puede ser neutralizada con antisuero de *CT* y *LT*. Sin embargo, aunque *CT* se une preferentemente al gangliósido G_{M1} mas que al GD1b, *CJT* no se une al gangliósido GD1b pero si se une al gangliósido G_{M1} . *CJT* está muy relacionada con la producción de enfermedades diarreicas (Angeles, 1986; Calva *et al.*, 1989; Daikoku *et al.*, 1990; Gill y Meren 1978, Konkel *et al.*,

1992, Perez- Perez *et al.* 1992; Ruiz-Palacios *et al.*, 1983; Suzuki *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1986).

Las preparaciones concentradas de *Campylobacter jejuni*, inducen acumulación de líquidos en asas ileales ligadas de rata y conejo, pero no en ensayos de ratón lactante (Perez- Perez *et al.*, 1992).

1.6.2.4 Enterotoxinas de *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium* y Proteínas con actividad enterotóxica de *S. gallinarum*.

En trabajos recientes sobre la patogenia de las infecciones intestinales causadas por *S. typhi* y *S. typhimurium*, se ha propuesto que producen una enterotoxina que altera la secreción de líquidos y electrolitos en el intestino, como las que inducen las toxinas de *V. cholerae*, *E. coli* y *C. jejuni*. Dichas enterotoxinas podrían tener un papel importante en los padecimientos entéricos producidos por *Salmonella* (Chopra *et al.*, 1987, Ruttler, 1988).

Fernandez *et al.*, (1988), aislaron un gene de *S. typhi* que codificaba para una enterotoxina que tenía similitud con *CT* y *LT*. La enterotoxina codificada por un colifago recombinante λ FDC1, induce secreción de líquidos en asas ileales en rata, elonga células CHO, y es antigénicamente similar a *LT* cuando se confrontó con anticuerpos por medio de ELISA. El DNA del λ FDC1, contiene una secuencia que hibrida con el gene que codifica para la subunidad B de *LT*; y cuando fue hibridado en las mismas condiciones para su detección, no se observó homología con el gene para la subunidad A de *LT*. Sin embargo, el hecho de que la actividad enterotóxica pueda ser detectada en asas intestinales ileales ligadas en rata y en elongación en células CHO, sugiere que la enterotoxina de *S. typhi* tiene una subunidad funcionalmente similar a *CT-LTA*.

Estudios hechos por Prasad *et al.*, (1992), donde clonaron el gene de plásmido *stn* de *S. typhimurium* en *E. coli*, que codificaba para enterotoxina *CT-like*, mostraron que existió secreción de líquidos en el modelo de asas intestinales ligadas en conejo y posteriormente Chopra *et al.*, (1994), demostraron que el título de elongación en células CHO, se incrementa cuando el gene *stn* es mayormente expresado en medios con alta osmolaridad.

La actividad biológica de las enterotoxinas similares a CT y LT de *S. typhimurium*, evaluadas *in vitro*, también producen una elongación en células CHO, así como un incremento en la secreción de líquidos en asas ligadas intestinales ileales de ratón, sugiriendo una similitud en el mecanismo de patogenia entre las enterotoxinas de *S. typhi* y *S. typhimurium*, con CT y LT subunidad A (Chopra *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1988; Fukuta *et al.*, 1988; Gianella *et al.*, 1973).

La enterotoxina de *S. typhi* parece tener un receptor diferente a G_{M1} de las membranas eucarióticas (Chopra *et al.*, 1987), mientras que la enterotoxina de *S. typhimurium* puede ser neutralizada por una antitoxina de cólera y su efecto biológico en células CHO es bloqueado por el gangliósido G_{M1} (Chopra *et al.*, 1987; Fukuta *et al.*, 1988).

Se ha demostrado también que anticuerpos contra el fragmento B de CT (CT-B) de *V. cholerae*, puede neutralizar la actividad biológica de la toxina de *S. typhimurium*, así como la elongación de células CHO que induce. Por lo antes mencionado, se resume que existe una relación antigénica entre las enterotoxinas de *V. cholerae*, *E. coli*, *C. jejuni*, *S. typhi* y *S. typhimurium* y que la LT de *E. coli* y *S. typhimurium* poseen determinantes antigénicos presentes en CT-B (Chopra *et al.*, 1987; Sandefur and Peterson, 1977).

Recientemente, se demostró que *S. gallinarum* posee una secuencia nucleotídica homóloga con un fragmento del gene *elt A* de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en un 95% y con el gene *ctx A* de *V. cholerae* en un 83%. Así mismo, mediante ensayos de asas intestinales ligadas de rata, se observó que lisados de *S. gallinarum* generaban un incremento en la secreción de líquidos (Balcázar, 1993; Verdugo *et al.*, 1994).

En ensayos realizados por Urquiza (1995), se demostró que *S. gallinarum*, contiene proteínas con actividad enterotóxica observada mediante elongación en células CHO; además, estas proteínas tuvieron un efecto citotóxico capaz de producir lisis celular. Así mismo, mediante ensayos de asas intestinales ligadas de rata, se observó que lisados de *S. gallinarum* generaban un incremento en la secreción de líquidos (Balcázar, 1993; Urquiza, 1995; Verdugo *et al.*, 1994). Confirmando que *S. gallinarum* produce una enterotoxina similar a CT de *V. cholerae* y a LT de ETEC (Urquiza, 1995).

1.6.3 Patogenicidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko)

Estudios realizados por algunos investigadores^{a, b, c} principalmente en ratones (*Mus musculus*), ratas (*Rattus rattus*) conejos (*Oryctolagus cuniculus*), cobayos (*Cavia purcellus*), cerdos (*Sus scroffa scroffa*) y aves (*Gallus gallus*), observaron que *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) produce mortalidad en la familia Muridae y no en otras especies animales (Biofam, 1996; Espino, *et al.*, 1986). La mayoría de dichos estudios han incluido como modelo biológico al hombre y a algunas especies animales de los archipiélagos cubanos, así como animales de regiones específicas de los países en donde se han realizado dichos ensayos. Los desafíos han sido por medio de inoculación por vía oral y parenteral y los resultados obtenidos han mostrado que dicha cepa no produjo mortalidad ni signología clínica de salmonelosis en animales que no son de la familia Muridae, sin embargo, estos hallazgos no permiten hacer una generalización de la virulencia específica de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) hacia la familia Muridae. (Biofam, 1986; Villafaña *et al.*, 1995; Urquiza^{91, 92} *et al.*, 1997).

2. JUSTIFICACIÓN

La *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) ha sido poco estudiada y los ensayos que se han realizado a la fecha, han sido con relación a la patogenicidad hacia la familia Muridae y a su inocuidad en especies domésticas clínicamente sanas. No se han realizado estudios para conocer su virulencia con dosis mayores a las descritas para el género *Salmonella* y se desconoce si ésta es capaz de producir mortalidad en aves jóvenes, cobayos, conejos y roedores de la familia Muridae en México. Tampoco se conoce su patogenia, ni sus mecanismos de patogenicidad y tampoco se ha descrito si existen proteínas con actividad enterotóxica involucradas en la enfermedad en los ratones, con lo que se motivo a la formulación de los siguientes objetivos:

^a Del Águila B C.: Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Zona 12, Guatemala, Centroamérica, Ref. DM 590695, Jun, 1995. Datos No Publicados.

^b Hernández Carlos Miguel, Microbiólogo. Centro de Investigaciones Veterinarias, Universidad Centroamericana, Apartado 69, Managua, Nicaragua, Tel. 746559, Julio, 1995. Datos No publicados.

^c Ayala, R.: Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Octubre, 1995, El Salvador, San Salvador, Datos No Publicados.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), es inocua para aves domésticas, cobayos y conejos y es patógena para ratones y ratas, en los que la presencia de enterotoxinas inducen un proceso de invasión y colonización similar a lo descrito en otras enterobacterias.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar mediante una prueba biológica, la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovariedad Issatschenko), en ratones Albino Suizo.
- 2.- Determinar mediante una prueba biológica, si *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovariedad Issatschenko), produce mortalidad en conejos raza Nueva Zelanda.
- 3.- Determinar mediante una prueba biológica, la virulencia *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovariedad Issatschenko), en ratas Cepa Wistar
- 4.- Determinar mediante una prueba biológica, si *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovariedad Issatschenko) produce mortalidad en cobayos raza Abisinia.
- 5.- Determinar mediante una prueba biológica, la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovariedad Issatschenko), en pollitos Leghom de 1 día de edad.
- 6.- Determinar mediante una prueba biológica, la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovariedad Issatschenko), en pollos de engorda de 1 y 8 días de edad.
- 7.- Deducir la patogenia de la cepa *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), mediante la observación de lesiones histológicas en hígado, bazo, íleon y yeyuno de *Mus musculus*.
- 8.- Determinar si *S. enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) produce proteínas con actividad enterotóxica similares a las descritas en otras enterobacterias.
- 9.- Determinar si las proteínas con actividad enterotóxica de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), inducen elongación en células de ovario de Hamster Chino (CHO).

- 10.- Determinar si existe similitud de las proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y periplasmáticas (PP) de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovariedad Issatschenko) y las toxinas *CT* y *LT*, detectadas mediante el uso de antisueros anti *CT* y anti *LT* producidos en conejo y de antisueros anti *S. gallinarum* producidos en pollo por medio de la técnica de *Immunoblot*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Estudios de virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) *in vivo*.

Cepa de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko). La cepa de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) fue obtenida a partir de un Rodenticida Biológico Comercial (RBC)^d que contenía: *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) 25 %, sal de hidroxycumarina 0.02% e ingrediente Inerte (arroz entero) 74.98%. Cabe mencionar que la presentación comercial del RBC es húmeda. Para el aislamiento e identificación de la cepa bacteriana, el RBC fue macerado y sembrado en caldo nutritivo^e (CN) (1 g de RBC en 105 mL de CN), e incubado 24 h a 37° C. Una vez obtenido el crecimiento, se transfirieron 20 µL de este cultivo a placas de agar con Agar Verde Brillante (VB)^g, incubándose durante 24 horas a 37 °C para su purificación y posterior identificación por medio de pruebas bioquímicas convencionales incluyendo lisina descarboxilasa^o y rhamnosa^f y su serotipificación con antisueros comerciales^g. Una vez serotipificada la cepa por los métodos convencionales, se procedió a fagotipificarla (Ward *et al.*, 1987).

La cepa fue mantenida en un medio de mantenimiento conteniendo CN^o 0.8%, extracto de levadura^e 0.013%, glicerol^h 0.002%, K₂hPO₄ 0.0026%^h, KH₂PO₄^h 0.010 % y agar agar^d 0.8%, y subcultivos frescos fueron empleados en todos los experimentos.

La inoculación de la cepa se realizó como se describe posteriormente, con el uso de subcultivos frescos o por la administración del producto comercial de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

^d Laboratorios Labiofam, La Habana, Cuba.

^e Bioxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. de Méx.

^f Sigma Chemicals. St. Louis, MO. USA.

^g Difco, Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

^h J.T.Baker, S.A. de C.V., Edo. de Mex.

4.1.1. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo mediante una prueba biológica.

Animales de Experimentación. La prueba se realizó con ratones Albino Suizo adultos, clínicamente sanos, libres de *Salmonella* spp. Todos los animales fueron observados durante 3 días anteriores a las pruebas a realizar para su adaptación. Se les proporcionó alimento comercial en pastillas y agua *ad libitum*, alojándose en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA:Aves), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ, UNAM), en cajas cómodas durante el desarrollo de las pruebas. Al arribo de los ratones se tomaron muestras del alimento para análisis bacteriológico y 5 ratones fueron sacrificados para descartar la presencia de *Salmonella* spp utilizando métodos de cultivo estándar (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Diseño Experimental. Se utilizaron 90 ratones hembras y machos de la raza Albino Suizo con un peso promedio de 20-30 g, agrupándose de la siguiente manera:

Grupos I A y I B. Constó de 20 ratones (hembras y machos respectivamente), a los que se les administró 2g/ratón del RBC como alimento único durante 24 horas. Posteriormente se le proporcionó alimento comercial en pastillas y agua *ad libitum*.

Grupos II A y II B. A 20 ratones (hembras y machos respectivamente) se les administró 6g/ratón del RBC como alimento único por 24 horas. Posteriormente se les administró alimento comercial en pastillas y agua *ad libitum*.

Grupos III A y III B. Constó de 20 ratones (hembras y machos respectivamente) a los que se les administró una suspensión al 20% de un inóculo de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) conteniendo 10^9 UFC/mL a razón de 60ml/grupo como agua de bebida durante 24 horas. Posteriormente se les proporcionó agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo IV. Constó de 10 ratones sexo indistinto, a quienes se les administró un inóculo de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), por vía Intra-peritoneal a razón de 0.5 mL/ratón, proporcionándoles agua y alimento comercial en pastillas a libre acceso.

Grupo V. Formado por 10 ratones sexo indistinto a los que se les inoculó 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), por vía subcutánea, a razón de 0.5 mL/ratón para confirmar su patogenicidad, proporcionándoles agua y alimento comercial en pastillas a libre acceso.

Grupo VI. Formado por 10 ratones sexo indistinto quienes fungieron como grupo testigo negativo, sin recibir ningún tratamiento, solamente agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum* durante todo el tiempo que duró la prueba.

Los ratones fueron observados diariamente durante 21 días que duró la prueba, registrándose diariamente su estado clínico y mortalidad en las hojas de registro correspondientes.

Los ratones que murieron durante la prueba se les realizó la necropsia y se puso especial interés en buscar lesiones sugestivas a salmonelosis. Se tomaron muestras de hígado, bazo y ciego para realizar análisis bacteriológicos (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978) con algunas modificaciones.

Los animales que no murieron durante el tiempo de la prueba, fueron sacrificados humanitariamente. Se realizó la necropsia y exámenes bacteriológicos a partir de hígado, bazo y ciego. El hígado, bazo y ciegos fueron colectados asépticamente y cultivados, trabajando bazo e hígado como una muestra combinada y el ciego por separado. Los órganos fueron incubados por 24 horas a 37 °C en caldo tetracionato (Ctet)^g. Después de la incubación, el caldo fue agitado y se procedió a realizar una siembra en placas con VB^h las cuales fueron incubadas 24 horas a 37 °C y examinadas para determinar la presencia de colonias sospechosas. Se realizaron pruebas bioquímicas a todas las colonias aisladas. Las colonias que resultaron positivas a *Salmonella*, fueron serotipificadas con los antisueros^h ya descritos (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) en heces. Cada tercer día hasta la finalización de los experimentos, se tomó una muestra de 2 gramos de heces de cada grupo experimental, las cuales fueron cultivadas

^g Difco, Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

^h Bloxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. de Mex.

para el aislamiento de *Salmonella* spp, según la NOM-005-ZOO-1993 con algunas modificaciones descritas adelante, y a la vez, la mitad de cada muestra fue almacenada en refrigeración durante 30 días, para posteriormente repetir el aislamiento y observar la viabilidad de bacterias en la misma muestra (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

4.1.2. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en conejos raza Nueva Zelanda mediante una prueba biológica.

Animales de Experimentación. La prueba se realizó en 27 conejos clínicamente sanos de la raza Nueva Zelanda Blanco, con un peso de 1.5 - 2.5 Kg de peso y sexo indistinto. Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación de 3 días antes de las pruebas a realizar. Se les proporcionó alimento comercial en pastillas y agua *ad libitum*, alojándolos en Unidades de aislamiento del DPA: Aves, de la FMVZ-UNAM, en jaulas que aseguraran la comodidad de los conejos durante el desarrollo de las pruebas. Al arribo de los conejos, se tomaron muestras para análisis bacteriológico del alimento y 2 conejos fueron eutanaciados para descartar la presencia de *Salmonella* spp utilizando métodos de cultivo ya mencionados (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Diseño Experimental. Los conejos fueron agrupados de la siguiente manera:

Grupo I. Formado por 5 conejos, a quienes se les administró 100g/conejo del RBC durante 48 horas dividido en 2 (50g/24 horas), posteriormente se les administró agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo II. Constituido por 5 conejos a quienes se les proporcionó 100g/conejo del RBC durante 24 horas mezclado con el concentrado comercial en pastillas, posteriormente se les proporcionó alimento comercial en pastillas y agua *ad libitum*.

Grupo III. Conató de 5 conejos quienes recibieron por vía oral en el agua de bebida, 5ml/conejo de un cultivo de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), a una concentración de 1×10^9 UFC/mL.

Grupo IV. Tres conejos (sin tratamiento) fueron marcados con tinta indeleble en las orejas y se colocó un conejo marcado de este grupo en cada jaula (de los grupos I, II y III) para que estuvieran en cohabitación con los conejos de los demás grupos.

Grupo V. Grupo testigo negativo, constituido por 7 conejos, a quienes solamente se les proporcionó agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Los animales se observaron durante 30 días anotando diariamente en el registro correspondiente, si había signología sugestiva a Salmonelosis.

Los animales que no murieron durante el tiempo de la prueba, fueron sacrificados humanitariamente, se les realizó la necropsia y exámenes bacteriológicos tomando como base las técnicas descritas (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978), con las siguientes modificaciones: el hígado, bazo y contenido cecal fueron colectados asépticamente y cultivados, trabajando bazo e hígado como una muestra combinada. Los órganos fueron incubados por 24 horas a 37 °C en Ctet^g. Después de la incubación, el caldo fue agitado y se procedió a realizar una siembra en placas de VB^f, las cuales fueron incubadas 24 horas a 37°C para posteriormente determinar la presencia de colonias sospechosas a *Salmonella* spp. Se realizaron pruebas bioquímicas a todas las colonias sugestivas a *Salmonella* spp. aisladas según NOM-005-ZOO-1993, y bioquímicas complementarias: LD^g, omitina descarboxilasa (OD)^g, ONPG^f, rhamnosa^f, y salicina^f, para su identificación (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) en heces. Cada tercer día hasta la finalización de los experimentos, se tomó una muestra de 2 gramos de heces de cada grupo experimental, las cuales fueron cultivadas para el aislamiento de *Salmonella* spp. según la NOM-005-ZOO-1993 y a la vez, la mitad de cada muestra fue almacenada en refrigeración durante 30 días, para posteriormente repetir el aislamiento y observar la viabilidad de la misma (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

^g Difco, Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

^f Bioxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. de Méx.

^f Sigma Chemicals. St. Louis, MO. USA.

4.1.3. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas cepa Wistar mediante una prueba biológica.

Animales de Experimentación. La prueba se realizó en ratas adultas, clínicamente sanas de la cepa Wistar, libres de *Salmonella*. Todos los animales fueron observados durante 3 días antes de las pruebas a realizar. Se les proporcionó alimento comercial en pastillas y agua *ad libitum* y se alojaron en unidades de aislamiento del DPA: Aves, de la FMVZ UNAM, en cajas que aseguraran la comodidad de los animales durante el desarrollo del experimento. Al arribo de las ratas se tomaron muestras para análisis bacteriológico del alimento y 2 ratas fueron sacrificadas humanitariamente para descartar la presencia de *Salmonella* spp utilizando métodos de cultivo estándar (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1980).

Diseño Experimental. En el presente ensayo se utilizaron 40 ratas de la cepa Wistar, con un peso promedio 250 - 400g de sexo indistinto, agrupándose de la siguiente manera:

Grupo I. Constó de 10 ratas a quienes se les proporcionó 15g/rata del RBC como alimento único durante 24 horas. Posteriormente se les proporcionó agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo II. Consistió de 10 ratas, proporcionándoles 40g/rata del RBC como alimento único durante 48 horas, dividido en 20g/rata las primeras 24 horas y 20g/rata las otras 24 horas. Posteriormente se les proporcionó agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo III. A 10 ratas se les administró una suspensión al 20% de un inóculo de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4(biovar. Issatschenko), conteniendo 10^9 UFC/mL, a razón de 60 mL/grupo como agua de bebida durante 24 horas con alimento comercial en pastillas *ad libitum*, posteriormente se les proporcionó agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo IV. Consistió de 8 ratas, las cuales no recibieron ningún tratamiento, fungió como testigo negativo, solamente se les administró agua y alimento comercial a libre acceso durante el tiempo de la prueba.

Las ratas fueron observadas diariamente durante 21 días que duró la prueba, anotándose diariamente su estado clínico y mortalidad en el registro correspondiente.

Las ratas que murieron durante la prueba se les realizó la necropsia, poniendo especial atención en buscar lesiones sugestivas a salmonelosis. Se tomaron muestras de hígado, bazo y ciego para realizar análisis bacteriológicos (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1980).

Los animales que no murieron durante el tiempo de la prueba fueron sacrificados humanitariamente, realizándoles la necropsia y exámenes bacteriológicos tomando como base las técnicas descritas (NOM 1994, Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978), con las siguientes modificaciones: el hígado, bazo y ciegos fueron colectados asépticamente y cultivados, trabajando bazo e hígado como una muestra combinada y el resto de los órganos por separado. Los órganos fueron incubados por 24 horas a 37°C en Ctet[®]. Después de la incubación, el caldo fue agitado y se procedió a realizar una siembra en placas de VB[®], las cuales fueron incubadas 24 horas a 37°C y examinadas para determinar la presencia de colonias sospechosas. Las colonias fueron identificadas de la misma forma que el experimento anterior. Las colonias que resultaron positivas a *Salmonella*, fueron serotipificadas con los antisueros⁹ ya descritos (NOM 1994; Andrews *et al.*, 1978).

Determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) en heces. Cada tercer día hasta la finalización de los experimentos, se tomó una muestra de 2 gramos de heces de cada grupo experimental, las cuales fueron cultivadas para el aislamiento de *Salmonella* spp. según la NOM-005-ZOO-1993 y a la vez, la mitad de cada muestra fue almacenada en refrigeración durante 30 días, para posteriormente repetir el aislamiento y observar la viabilidad de la misma (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1980).

⁹ Difco, Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

[®] Bioxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. de Méx.

4.1.4. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) en cobayos raza Abisinia, mediante una prueba biológica.

Animales de Experimentación. La prueba se realizó en cobayos clínicamente sanos de la raza Abisinia, con un peso promedio de 300-400 g. Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación de 3 días antes de las pruebas a realizar. Se les proporcionó alimento comercial en pastillas y agua *ad libitum* alojándose en unidades de aislamiento del DPA: Aves, de la FMVZ UNAM en cajas que aseguraran la comodidad de los animales durante el desarrollo de las pruebas. Al arribo de los cobayos se tomaron muestras para análisis bacteriológico del alimento y 2 cobayos fueron sacrificados humanitariamente para descartar la presencia de *Salmonella* spp. utilizando métodos de cultivo estándar (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Diseño Experimental. Los cobayos fueron agrupados de la siguiente manera:

Grupo I. Constituido por 5 cobayos a quienes se les administró 6g/cobayo del preparado RBC mezclado en el alimento comercial en pastillas durante 24 horas, posteriormente recibieron agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo II. Formado por 5 cobayos a quienes se les proporcionó 20g/cobayo del preparado RBC mezclado en el alimento comercial en pastillas durante 24 horas, posteriormente recibieron agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo III. Constó de 5 cobayos quienes recibieron una suspensión al 20% de un inóculo de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), conteniendo una concentración de 1×10^9 UFC/mL a razón de 60 mL/grupo como agua de bebida durante 24 horas, posteriormente se les proporcionó agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Grupo IV. Constó de 3 cobayos, quienes no recibieron ningún tratamiento, fungió como testigo negativo recibiendo agua y alimento comercial en pastillas *ad libitum*.

Los animales se observaron durante 30 días, anotando diariamente en el registro correspondiente, la existencia de signología clínica de salmonelosis.

Los cobayos que murieron durante la prueba se les realizó la necropsia en busca de lesiones sugestivas de salmonelosis. Se tomaron muestras de hígado, bazo y contenido cecal para realizar análisis bacteriológicos siguiendo parte de los lineamientos que señala la

Norma Oficial Mexicana para el control y erradicación de Salmonelosis Aviar NOM -005-ZOO- 1993 (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Los animales que no murieron durante el tiempo de la prueba fueron sacrificados, se les realizó la necropsia y análisis bacteriológicos tomando como base las técnicas descritas por (NOM 1994, Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978), con las siguientes modificaciones: el hígado, bazo y contenido cecal fueron colectados asépticamente y cultivados, trabajando bazo e hígado como una muestra combinada. Los órganos fueron incubados por 24 horas a 37°C en Ctet[®]. Después de la incubación, el caldo fue agitado y se procedió a realizar una siembra en placas de VB[®], las cuales fueron incubadas 24 horas a 37°C y examinadas para determinar la presencia de colonias sospechosas a *Salmonella* spp. Se realizaron las pruebas bioquímicas ya mencionadas a todas las colonias aisladas para su identificación (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) en heces. Cada tercer día hasta la finalización de los experimentos, se tomó una muestra de 2 gramos de heces de cada grupo experimental, las cuales fueron cultivadas para el aislamiento de *Salmonella* spp. según la NOM-005-ZOO-1993 y a la vez, la mitad de cada muestra fue almacenada en refrigeración durante 30 días, para posteriormente repetir el aislamiento y observar la viabilidad de la misma (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

[®] Difco, Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

[®] Bioxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. de Méx.

4.1.5. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollitos Leghorn de un día de edad mediante una prueba biológica.

Animales de Experimentación. Para el estudio se requirieron 195 pollitos Leghorn de un día de edad que fueron alojados en baterías eléctricas, ubicadas en las unidades de aislamiento del DPA: Aves de la FMVZ, UNAM. Al arribo de los pollitos se tomaron muestras para análisis bacteriológico de la paja de transporte, alimento y 20 pollitos fueron sangrados y sacrificados humanitariamente, para descartar la presencia de *Salmonella* spp. utilizando métodos de cultivo estándar. Los pollitos fueron alimentados con una ración balanceada comercial y agua *ad libitum* (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Diseño Experimental. Las aves fueron aleatoriamente asignadas en 5 grupos de 32 aves cada uno constituidos de la siguiente manera:

Grupo I. Se les administró una dosis de 0.25 mL, vía oral conteniendo una concentración de 10^9 UFC/mL/ave de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) al día de edad, administrándoles agua y alimento comercial *ad libitum* durante el tiempo del estudio.

Grupo II. Se les administró alimento comercial mezclado con el cultivo de *Salmonella* (el mismo del grupo 1), el primer día únicamente, durante el resto del estudio recibieron agua y alimento comercial *ad libitum*.

Grupo III. Se les administró alimento comercial mezclado a partes iguales con el RBC macerado el primer día únicamente, durante el resto del estudio recibieron agua y alimento comercial *ad libitum*.

Grupo IV. Se les administró alimento comercial mezclado a partes iguales con el RBC macerado durante dos días únicamente. Durante el resto del estudio recibieron agua y alimento comercial *ad libitum*.

Grupo V. Los animales de este grupo fungieron como grupo testigo negativo, proporcionándoles agua y alimento comercial *ad libitum*.

Todos los animales se observaron durante 30 días anotando diariamente la presencia de signología a *Salmonella* spp en el registro correspondiente.

Los pollos que murieron durante la prueba se les realizó la necropsia en busca de lesiones sugestivas a salmonelosis. Se tomaron muestras de hígado y bazo para realizar análisis bacteriológicos.

Los animales que no murieron durante el tiempo de la prueba fueron sacrificados al término de la observación de la prueba, realizándoles la necropsia y análisis bacteriológicos (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1980).

Exámenes serológicos. Cinco pollos de cada grupo fueron sangrados a los días 8, 15, 21 y 30. Los sueros fueron evaluados serológica e individualmente mediante las pruebas de aglutinación en placa (Ap) con los antígenos K polivalente¹ y la prueba de microaglutinación (MA) de producción local.

Determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) en heces. La evaluación bacteriológica de las heces de las aves fue realizada diariamente, durante 27 días para determinar posible eliminación bacteriana en las heces (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1980).

4.1.6. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollos de engorda de 1 y 8 días de edad mediante una prueba biológica.

Animales de Experimentación. Para el estudio se requirieron 116 pollos de engorda de la estirpe Arbor Acres de un día de edad que fueron alojados en baterías eléctricas, ubicadas en las unidades de aislamiento del DPA: Aves de la FMVZ, UNAM. Al arribo de los pollitos se tomaron muestras para análisis bacteriológico de la paja de transporte, alimento y 20 pollitos fueron sangrados y sacrificados humanitariamente para descartar la presencia de *Salmonella* spp (NOM 1994). Los pollos fueron alimentados con una ración balanceada comercial y agua *ad libitum*.

¹ Solvay Animal Health.

Diseño Experimental. Las aves fueron aleatoriamente asignadas en 3 grupos de 32 aves cada uno constituidos de la siguiente manera:

Grupo I. Se les administró una dosis de 10^8 UFC/mL ave de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el alimento que se administró al día de edad durante 24 horas como dosis única. Posteriormente las aves recibieron agua y alimento comercial *ad libitum* durante el tiempo del estudio.

Grupo II. Las aves durante los primeros 7 días de edad recibieron agua y alimento comercial *ad libitum*. A los 8 días de edad, se les administró una dosis de 10^8 UFC/ave de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el alimento que se administró durante 24 horas. Posteriormente las aves recibieron agua y alimento comercial *ad libitum*.

Grupo III. Los animales de este grupo fungieron como grupo testigo negativo, sin tratamiento.

Las aves se observaron durante 16 días anotando diariamente la presencia de signología a Salmonelosis en el registro correspondiente y las que murieron durante la prueba, se les realizó la necropsia en busca de lesiones sugestivas a salmonelosis tomándose muestras para análisis bacteriológico de la misma forma descrita en el primer ensayo.

Los animales que no murieron durante el tiempo de la prueba fueron sacrificados humanitariamente y se les realizó la necropsia y se tomaron muestras para el aislamiento de *Salmonella* spp (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1980).

Análisis serológicos. Cinco pollos de cada grupo fueron sangrados a los días 8 y 16. Los sueros fueron evaluados serológica e individualmente mediante Ap con el antígeno K polivalente¹, así como la prueba de MA con el antígeno de *Salmonella pullorum*.

Determinación de la presencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) en heces. La evaluación bacteriológica de las heces de las aves fue realizada diariamente durante 16, días para determinar la posible eliminación de *Salmonella*

spp en las heces tomándose un gramo de heces directamente de la charola de cada batería en cada grupo (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1980).

4.1.7. Determinación de la patogenia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante la observación de lesiones histológicas a partir de muestras de yeyuno e íleon de *Mus musculus*.

Animales de Experimentación. La prueba se realizó en 41 ratones clínicamente sanos de la raza Albino Suizo. Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación de 3 días antes de las pruebas a realizar. A todos los animales se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* alojándose en las unidades de aislamiento del DPA: Aves, de la FMVZ, UNAM, en cajas especiales para su comodidad durante el desarrollo de la prueba. Al arribo de los ratones, se tomaron muestras para análisis bacteriológico del alimento y 5 ratones fueron sacrificados para descartar la presencia de *Salmonella* spp utilizando métodos de cultivo estándar (NOM 1994; Villegas y Graham, 1980; Andrews *et al.*, 1978).

Cepa Bacteriana: Se empleó una cepa de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) la cual fue sembrada en caldo infusión cerebro corazón[§] (CICC) y se incubó durante 24 horas a 37° C. La cepa fue centrifugada[¶] a 12 000 RPM durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue desechado y se depositó en su lugar solución salina fisiológica (SSF) para resuspender y lavar la pastilla de bacterias y nuevamente centrifugar. El mismo procedimiento fue repetido una vez más. Después del último lavado, la bacteria fue ajustada con SSF a una concentración final de 1X10⁹ UFC/mL para su posterior inoculación por vía oral (Roy *et al.*, 1985).

Diseño Experimental. En el presente estudio se utilizaron 36 ratones de la raza Albino Suizo con un peso promedio de 20-30 g., de sexo indistinto y se lotificaron de la siguiente manera:

[§] Solvay Animal Health.

[¶] Difco, Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

[‡] Sorvall, RC-5B, DuPont Company, Wilmington, DE, USA.

4.2. Estudios *In vitro* para la determinación de factores de virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).

4.2.1. Determinación de la existencia de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante ensayo celular con células de ovario de hamster chino (CHO).

Extracción de las proteínas: Las cepas que se utilizaron para este estudio fueron: 1) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) de referencia Núm. 5-II, obtenida del INNSZ; 2) *E. coli* no enterotoxigénica de referencia HS, del Centro para el Desarrollo de Vacunas en Maryland, donada del INNSZ (Urquiza, 1995); 3) *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) (Biofam, 1996), 4) Toxina CT comercial^m.

Se realizó un cultivo primario con 80 colonias de las cepas de ETEC y *E. coli* HS por separado, en matraces Erlen-Meyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio líquido de Casaminoácidos^s (CAA), suplementándose con 0.15 % de extracto de levadura^e, 0.25 % de NaCl^h, 0.87% de K₂HPO₄^h, 0.005% de MgSO₄^h, 0.005% de MnCl₂^h, 0.005 % de FeCl^h, 0.8% de NaOH 3M^h y 0.2% de CAA^g, incubándose en agitación a 200 rpmⁿ durante 24 horas a 37° C (Urquiza, 1995, Verdugo *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1973).

Diez mL de cada cultivo primario fueron sembrados en matraces Erlen-Meyer de 500 mL conteniendo 200 mL de CAA^g y se incubaron en agitaciónⁿ a 200 rpm durante 24 horas a 37° C, tomando alícuotas de 20 mL a las 0, 12 y 24 horas. El crecimiento fue medido por espectrofotometría^o a una densidad óptica (D.O.) de 660 nm, y se almacenaron en refrigeración para la posterior extracción de enterotoxinas.

Para la extracción de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de proteínas periplasmáticas (PP) de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) se empleó CICC^e en lugar de CAA^g, además, se obtuvieron alícuotas de 20 mL cada 120

^m List Biological Laboratories, Inc. Campbell CA. USA.

^g Difco, Laboratories, Detroit Michigan 48232-7058 USA.

^e Bioxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. de Méx.

^h J.T. Baker S.A. de C.V., Edo. de Méx. México.

ⁿ New Brunswick Scientific Co. Inc., USA, Mod. G-24.

minutos para medir D.O. a 660 nm, por medio de espectrofotometría (Sadrudin, 1981; Chopra *et al.*, 1994).

Cada alícuota de cada cepa fue centrifugada¹ a 12,000 RPM durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se mantuvo en refrigeración para posteriormente ser filtrado a través de membranas de 0.22 µm^p. El precipitado de células obtenido, fue lavado 2 veces con una solución de PBS con pH 7.4 y centrifugado¹ en cada ocasión a 12,000 rpm a 4°C. En el último lavado, la pastilla de bacterias fue resuspendida con PBS tratándose con 0.001g/10 mL de sulfato de polimixina B^f, y fue incubada en agitaciónⁿ (200 rpm) durante 30 minutos a 37 °C. El sobrenadante obtenido fue filtrado como lo anteriormente descrito (Urquiza, 1995; Evans *et al.*, 1974; Prasad *et al.*, 1992).

Las proteínas PSNC y PP obtenidas de las células tratadas con polimixina, fueron precipitadas posteriormente con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)^f al 70% y se dializaron contra una solución de trizma^o base al 0.05 M, NaCl^h 0.2 M, Na₂ EDTAⁱ 0.001 M, NaN₃ 0.003 Mⁱ, pH 7.5 (Figura 1).

Cuantificación de Proteínas.- La cuantificación de las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko se realizó mediante el micrométodo de Bradford (1976). La lectura se realizó por espectrofotometría^o a 595 nm en absorbancia.

Las proteínas precipitadas se analizaron mediante geles de poliacrilamida-SDS al 15 %, depositándose en cada carril, aproximadamente 1µg de cada muestra, tanto de los controles positivos y negativos, y de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) (Angeles, 1986; Laemmli 1970).

En la preparación de los geles de poliacrilamida-SDS al 15 %, se utilizó una solución madre de bisacrilamidaⁱ 30:0.8%, persulfato de amonio al 10%ⁱ, duodecil sulfato^f (SDS) al 10 %, TEMED^g y agua desionizada (Angeles, 1986; Laemmli 1970).

^o Beckman, USA, Mod. DU.

¹ Sorvall, RC-5B, DuPont Company, Wilmington, DE, USA..

^p Millipore HVLPO2500.

^f Sigma Chemicals. St. Louis, MO. USA.

^f Sigma Chemicals. St. Louis, MO. USA.

^h J.T. Baker S.A. de C.V., Edo. de Méx. México.

^g Bio Rad Laboratories, Richmond, CA. USA.

Las muestras fueron tratadas con una solución amortiguadora de disociación, que consistió en tris HCl^f al 0.626M, pH 6.8, glicerol^f al 20%, mercaptoetanol 14M^f, SDS^f 10%, y azul de bromofenol^f al 0.1%, en relación 1:1, calentándose a 100°C durante 5 minutos. El voltaje administrado fue de 100 volts durante 3 horas (Angeles, 1986; Laemmli 1970).

4.2.2. Determinación de la actividad enterotóxica en células de ovario de Hamster Chino (CHO) mediante el empleo de proteínas del sobrenadante del cultivo y proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).

La actividad biológica de las PSNC y de las PP *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) fue realizada en ensayos con células CHO (Guerrant *et al.*, 1974; Urquiza, 1995; Rahman *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 1992).

Para observar si existía actividad biológica en células CHO, un cultivo confluyente de 48 horas de éstas, fue tratado con tripsina^g al 0.25% para desprender las células, posteriormente se resuspendieron en medio F-12^h con suero fetal bovinoⁱ al 2%, depositándose 200µL de esta suspensión en cada pozo de una placa de cultivo celular de 96 pozos. La concentración fue 1,000 células/pozo. La placa fue incubada durante 20 minutos para permitir la adherencia de las células al fondo de la placa. Las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) fueron diluidas en el medio F-12^h desde la dilución 1:2 a 1: 128, al igual que las PSNC y las PP de *ETEC* y las de HS. El volumen final depositado de las PSNC y de las PP de cada cepa fue de 30 µL en cada pozo. El control positivo conocido fue CT^m comercial y el control negativo fue el medio F-12^h, la solución de dializado y las PSNC y PP de *E. coli* HS (Guerrant *et al.*, 1974; Urquiza, 1995; Angeles, 1986; Rahman *et al.*, 1992).

Las placas fueron incubadas durante 96 horas, realizándose lecturas cada 24 horas para la observación de elongación, considerándose como positivos aquellos pozos en donde se observó el 50% de elongación.

^f Sigma Immunochem. St. Louis. MO.

^g Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Grand Island, NY. USA.

ⁱ Microlab, México.

^m List Biological Laboratories, Inc. Campbell CA. USA.

4.2.3. Purificación y caracterización parcial de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de proteínas periplasmáticas (PP) de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante geles SDS PAGE e *Immunoblot*.

Material biológico: 1) una cepa de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko obtenida a partir del RBC^d, 2) CT de *V. cholerae* comercial^m, 3) anti CT, anti LT de ETEC, anti PSNC y anti PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko producidos en conejo, 4) anti *S. gallinarum* obtenida de un brote de campo, 5) Anticuerpos anticonejo marcados con Avidina - Biotina^f, 6) Anticuerpos anticonejo marcados con Peroxidasa^u y 7) anticuerpos anti pollo marcados con Avidina Biotina^w.

Extracción de las proteínas: La cepa de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko, fue tomada a partir de un cultivo puro. Cien colonias se sembraron en 100 mL de CICC^c y se incubó durante 24 horas a 37° C. Posteriormente, 50 mL del cultivo se sembraron en 500 mL de CICC^c en un matraz Erlen-Meyer de 1000 mL de capacidad y se incubó a 37°C durante 18 horas a 200 rpm. Transcurrido ese tiempo, el cultivo fue centrifugado^j a 12 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante (PSNC) se mantuvo en refrigeración para posteriormente realizar la concentración con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)^h al 70%. El precipitado de células obtenido, fue lavado 2 veces PBS con pH 7.4 y centrifugado^j en cada ocasión a 12,000 RPM a 4°C. En el último lavado, la pastilla fue resuspendida con PBS tratándose con 0.001g/10 mL de sulfato de polimixina B^f y fue incubada en agitación durante 30 minutos a 37 °C, transcurrido ese tiempo, este lavado fue centrifugado nuevamente, obteniéndose las PP que fueron guardadas en refrigeración para su posterior proceso (Urquiza, 1995; Evans *et al.*, 1974; Spicer y Noble 1982).

^d Laboratorios Labiofam, La Habana, Cuba.

^m List Biological Laboratories, Inc. Campbell CA. USA.

^f Sigma Immunochem. St. Louis. MO.

^u Dako A/S Produktions Vej 42. Dk-2600. Glostrup-Denmark.

^w Zymed Laboratories, Inc. So. San Francisco, CA 94080, USA.

^c Bioxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. De Méx.

^j Sorvall, RC-5B, DuPont Company, Wilmington, DE, USA.

^h J.T. Baker S.A. de C.V., Edo. de Méx. México.

ⁱ Sigma Chemicals. St. Louis, MO. USA.

Las PSNC y las PP, fueron precipitadas con sulfato de amonio^f al 70% mediante agitación magnética a baja velocidad y en refrigeración a 8°C durante 24 horas. Las soluciones obtenidas con el sulfato de amonio fueron centrifugadas a 12 000 rpm a 4 °C durante 30 min. Las proteínas obtenidas se depositaron en membranas de diálisis^w contra una solución de trizma^f base al 0.05 M, NaCl^h al 0.2 M, Na₂ EDTA^f al 0.001 M, NaN₃ al 0.003 M^f, con pH 7.5 durante 48 horas a 4°C, realizando dos cambios de la solución en ese período.

Cuantificación de Proteínas.- La cuantificación de las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko se realizó mediante el micrométodo de Bradford (1976). La lectura se realizó por espectrofotometría^o a 595 nm en absorbancia.

Producción de anticuerpos policlonales - Se utilizaron 4 conejos hembras raza Nueva Zelanda blancos de 1.5 Kg de peso para la inmunización. El antígeno para la inmunización de los conejos se preparó con una concentración de 5 µg/ mL de PSNC y 5 µg de PP de la cepa en estudio, 5 µg/ mL de CT comercial y 5 µg/ mL de LT ya producida en otros estudios. Como vehículo de las proteínas se empleó agua destilada y el adyuvante completo de Freund^g. Cada antígeno por separado fue mezclado a alta velocidad mediante un vortex para producir una emulsión. El calendario de inmunización se muestra en el Cuadro 1.

Para la segunda inmunización se empleó el adyuvante incompleto de Freund^g. La 3ª y la 4ª inmunización solamente se utilizó agua destilada como vehículo. Antes de la 1ª inmunización se tomaron sueros basales y en el día 54 de inmunización se tomaron muestras de sueros para la realización de la titulación de los mismos mediante el Inmunoensayo asociado a enzimas (ELISA).

Los conejos fueron sacrificados a los 55 días posteriores a la inmunización mediante la inhalación con ether y sangrados a blanco para obtener el suero hiperinmune.

Geles SDS - PAGE al 15%. - Las proteínas precipitadas se analizaron mediante geles de poliacrilamida-SDS al 15 %, depositándose en cada carril, aproximadamente 3.5

^w Spectra/Por 12000-14000. Spectrum Medical Industries, Inc. 1100.

^o Beckman, USA, Mod. DU.

^g Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Grand Island, NY. USA.

µg de cada muestra de proteínas (PSNC y PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko), así como de Toxina CT comercial^m. También se emplearon para este estudio las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko con un año de antigüedad y PP de *S. gallinarum* FVA-1 (Urquiza, 1995; Angeles, 1986; Calva *et al.*, 1989).

En la preparación de los geles de poliacrilamida-SDS al 15 %, se utilizó una solución madre de bisacrilamida^q 30:0.8%, persulfato de amonio al 10%^q, duodecil sulfato (SDS) al 10 %^f, TEMED^g y agua desionizada (Urquiza, 1995; Laemmli, 1970; Calva *et al.*, 1989).

Las muestras fueron tratadas con una solución amortiguadora de disociación, que consistió en tris HCl^f al 0.626M, pH 6.8, glicerol^h al 20%, mercaptoetanol 14M^f, SDS^f 10%, y azul de bromofenol^f al 0.1%, en relación 1:1, calentándose a 100°C durante 5 minutos. El voltaje administrado fue de 100 voltios durante 3 horas (Angeles, 1986; Laemmli, 1970). Parte de los geles fueron teñido con Coomassie y Plata^y por separado (Calva *et al.*, 1989).

Ensayos Inmunoenzimáticos

Inmunoensayo asociado a enzimas (ELISA).- EL ELISA se empleó para la titulación de los anticuerpos policlonales de las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. Los pozos de las placas de ELISA se sensibilizaron con 100 µL de dichas proteínas a una concentración de 5 y 10 µg/ mL durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se depositaron los anticuerpos producidos en conejo de las PSNC y las PP *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko diluidos 1:25 realizando diluciones quintuples. Se empleó un anticuerpo conjugado con Peroxidasa^u y alfa Naftol^f para la lectura, la cual fue realizada mediante espectrofotometría^o a 492 nm en absorbancia (Calva *et al.*, Díaz- Barroso, 1997).

^m List Biological Laboratories, Inc. Campbell CA. USA.

^q Blo Rad Laboratories, Richmond, CA. USA.

^f Sigma, Chemicals. St. Louis, MO. USA.

^h J.T. Baker S.A. de C.V., Edo. de Méx. México.

^r Sigma Immunochem. St. Louis. MO.

^y Pierce, Rockford, Il. 61105, USA.

^u Dako A/S Produktions Vej 42. Dk-2600. Glostrup-Denmark.

^o Beckman, USA, Mod. DU.

Inmunotransferencia (Immunoblot). - Una vez corridas las muestras en los geles SDS-PAGE al 15%, las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa^f, con una corriente de 100 voltios durante una hora a 4°C. Posteriormente se procedió a la sensibilización de las membranas con los anticuerpos diluidos en una solución salina amortiguada de Tris^f (TBS) – Tween 20 por separado; anti CT 1:500, anti LT 1:100, anti PSNC y anti PP de la cepa en estudio 1:500 y un suero hiperinmune de *S. gallinarum* obtenido a partir de aves infectadas de un brote de campo de Tifoidea Aviar 1: 100. Los anticuerpos se dejaron actuar durante 18 horas a temperatura ambiente en agitación lenta (50 rpm).

Se realizaron dos métodos de inmunotransferencia. En el primero, solamente se empleó un anticuerpo anticonejo conjugado con Peroxidasa^u y en el segundo se empleó anticuerpo anticonejo conjugado con Avidina- Biotina^f y luego el anticuerpo marcado con Peroxidasa^u. Para la inmunotransferencia del suero hiperinmune de Sg, se eutilizó un anticuerpo anti pollo conjugado con Avidina – Biotina^w y luego el marcado con Peroxidasa (Figuras 2 y 3).

^f Sigma Immunochem. St. Louis. MO.

^w Zymed Laboratories, Inc. So. San Francisco, CA 94080, USA.

5. RESULTADOS

5.1. Estudios de virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) *in vivo*

5.1.1. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo mediante una prueba biológica.

La concentración de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) encontrada en el RBC fue de 4×10^9 UFC/gramo de muestra. Los resultados de las pruebas de serotipificación y fagotipificación confirmaron que se trató de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), lisina descarboxilasa (LD) negativa (-), con reacción positiva (+) a rhamnosa y con antígenos somáticos O:1, 9, 12 y flagelares H: g, m; fagotipo 6A.

En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos a partir de los grupos de ratones albino suizo de experimentación tratados con el RBC y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), donde se observa que en los grupos I,II,IV y V la mortalidad fue del 95 al 100%, con una recuperación de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 a partir de la mortalidad del 100%. En el grupo III se observó una mortalidad del 65% con una recuperación de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 del 100 % a partir de la mortalidad. El grupo VI que fue el testigo negativo, aunque tuvo un 20 % de mortalidad, no se recuperó ningún tipo de *Salmonella* spp, aún después de haber intentado su recuperación posterior a su sacrificio.

En el cuadro 3 y la Figura 4, se encuentran los resultados de la mortalidad ocasionada por el uso del RBC y de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), en ratones albino suizo, donde se observa que el máximo número de animales muertos ocurrió entre los días 7y 8 posinoculación para los grupos I, II y III, mientras que en los grupos IV y V, fue desde el 2ª al 6ª día posinoculación.

En el cuadro 4 se presenta el muestreo bacteriológico de las heces que se realizó cada 3er día, donde se observa la recuperación de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en los grupos I y II, a los 3 y 5 días posinoculación. Posteriormente ya no hubo

recuperación de la bacteria. En los grupos III, IV y V, no hubo recuperación de la bacteria en ningún momento de la prueba.

De las heces refrigeradas durante 30 días, no se logró el reaislamiento de la bacteria a partir de ninguno de los grupos.

5.1.2. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en conejos raza Nueva Zelanda mediante una prueba biológica.

En el cuadro 5, se encuentran los resultados obtenidos a partir de los grupos de conejos Nueva Zelanda de experimentación tratados con el RBC y de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) donde se observa que en ningún grupo hubo mortalidad, ni tampoco se recuperó ningún tipo de *Salmonella* a partir de los conejos sobrevivientes.

En el muestreo bacteriológico de las heces, tampoco se logró recuperación de *Salmonella* spp.

5.1.3. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas Cepa Wistar mediante una prueba biológica.

En el cuadro 6, se encuentran los resultados obtenidos a partir de los grupos de ratas Wistar de experimentación tratados con el RBC y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), donde se observa que en los grupos I, II y III, la mortalidad registrada fue del 70 al 100%, con una recuperación de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad del 100%. En el grupo VI que fue el testigo negativo, no se observó mortalidad, ni tampoco se recuperó ningún tipo de *Salmonella* spp, después de haber intentado su recuperación en las ratas sobrevivientes.

El cuadro 7 y la figura 5, se muestran los resultados de la mortalidad registrada por la administración del RBC y de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en las ratas cepa Wistar, donde se observa que dicha mortalidad comenzó desde el día 14 posinoculación hasta el día 18 en los grupos I, II y III. La mortalidad mayor correspondió al grupo II, donde la administración del RBC fue mas prolongada, mientras que con la

administración de la cepa de *Salmonella* en estudio, proporcionada en suspensión en agua de bebida, fue la menos severa. En el muestreo bacteriológico de las heces, tampoco se logró la recuperación de *Salmonella* spp.

5.1.4. Determinación de la virulencia *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en cobayos raza Abisinia, mediante una prueba biológica.

En el cuadro 8 se encuentran los resultados obtenidos a partir de los grupos de cobayos raza Abisinia de experimentación tratados con el RBC y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), donde se observa que en los grupos II, III y IV, hubo mortalidad, sin embargo, realizar la necropsia, no se observaron lesiones sugestivas a *Salmonella* spp y en los aislamientos bacteriológicos a partir de los cobayos muertos, no se logró recuperar ningún tipo de bacteria. Los animales que sobrevivieron fueron sacrificados al término de la prueba, obteniéndose resultados negativos al aislamiento *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) al igual que en el muestreo de las heces, no se logró ninguna recuperación de *Salmonella* spp.

5.1.5. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollitos Leghorn de un día de edad mediante una prueba biológica.

En el cuadro 9, se encuentran los resultados obtenidos a partir de los grupos de pollitos Leghorn de un día de edad tratados con el RBC y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), donde se observa que en los grupos I, II y III la mortalidad registrada fue del 9.3 al 28.1%, de los cuales en el grupo I se recuperó el 33.3% de la *Salmonella* inoculada, en el grupo II fue del 66.6% y en el grupo III fue del 20.0%. Esta mortalidad fue registrada en la primera semana posinoculación del tratamiento y no se logró aislar *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) posterior a la primera semana de tratamiento hasta la finalización de la prueba. En el grupo IV no se registró mortalidad ni tampoco se recuperó la *Salmonella* en estudio en las aves sobrevivientes al término de la

prueba. El grupo V que fungió como testigo negativo, se registró mortalidad sin recuperación de *Salmonella* spp en ningún momento de la prueba. En la necropsia realizada en cada uno de los grupos no se observaron lesiones sugestivas a salmonelosis, aún en las aves de donde fue recuperada la bacteria.

En el cuadro 10, se pueden observar los resultados del análisis bacteriológico del aislamiento de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), a partir de las muestras de las heces obtenidas diariamente durante 27 días de los grupos de pollos Leghorn con los diferentes tratamientos. Sólo en los grupos I y IV se logró recuperar *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en el 2o día posinoculación, el resto de los grupos y hasta el término de la prueba las heces fueron negativas al aislamiento de *Salmonella* spp.

En el cuadro 11, se encuentran los resultados del análisis serológico por medio de Ap con suero de los pollos Leghorn contra el antígeno K polivalente de *Salmonella pullorum* y la prueba de MA, donde se observa que en los grupos I y II, la aglutinación rápida en placa es positiva a partir de los 21 días posinoculación con un 20% de reactividad y a los 27 días existe un 40 % de positividad en el grupo I y en el grupo II es de 20%. Los grupos restantes fueron negativos durante el tiempo de la prueba. Los resultados de MA fueron negativos en todos los grupos durante el tiempo de la prueba.

5.1.6. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollos de engorda de 1 y 8 días de edad mediante una prueba biológica.

En el cuadro 12, se encuentran los resultados obtenidos a partir de los grupos de pollo de engorda de experimentación tratados con *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), donde se observa que en el grupo I, la mortalidad fue del 3.1% (1/32) y de esta también fue recuperada la bacteria en estudio, en la primera semana posinoculación. En los grupos II y III no hubo mortalidad en los 16 días que duró la prueba, sin embargo, en el grupo II, se logró recuperar la bacteria a partir de un ave que sobrevivió (3.1%) después de finalizado el estudio. En la necropsia realizada en cada uno de los grupos no se

observaron lesiones sugestivas a salmonelosis, aún en las aves de donde fue recuperada la bacteria.

Los resultados del examen bacteriológico del aislamiento de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de las muestras de las heces obtenidas diariamente durante 16 días de los grupos de pollos de engorda con los diferentes tratamientos fueron negativos en todos los grupos.

En el cuadro 13 se encuentran los resultados del análisis serológico por medio de Ap con suero de los pollos de engorda contra el antígeno polivalente de *Salmonella pullorum* y la prueba de MA, los cuales fueron negativos en todos los grupos durante el tiempo de la prueba.

5.1.7. Determinación de la patogenicidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante la observación de lesiones histológicas a partir de muestras de Yeyuno e Íleon de *Mus musculus*

Análisis Bacteriológico.

Las bacterias que crecieron en órganos internos fueron enterobacterias lactosa negativa en su mayoría y con crecimiento abundante desde las primeras 4 horas posinoculación. Sin embargo, la identificación fue negativa a *Salmonella* spp.

Las heces fueron negativas al aislamiento de *Salmonella* spp.

Hallazgos Macroscópicos.

En pulmón y corazón no se observaron cambios patológicos aparentes. El hígado y bazo mostraron una congestión leve y en intestino delgado, en ninguna de las 3 porciones se mostró enteritis o congestión sugestivas a *Salmonella*. Algunos ratones presentaron tenosis severa y enteritis catarral asociada a los parásitos internos.

Examen Histológico.

Las lesiones observadas en los cortes de los diferentes órganos fueron las siguientes:

Pulmón.- A las 117 horas se observó infiltración intersticial de mononucleares y congestión difusa moderada en el 33 % de las muestras. En el mismo porcentaje, a las 72 horas posinfección se observó neumonía supurativa moderada focal. El resto de las muestras no mostraron cambios patológicos aparentes.

Hígado.- A las 117 horas posinfección se observó necrosis coagulativa severa en el 66% de las muestras e infiltración linfoide multifocal de discreta a moderada a las 93 horas posinoculación. Hasta antes de las 57 horas posinfección no se observaron cambios patológicos significativos sugestivos a salmonelosis.

Intestino.- En la mayoría de los cortes se observó teniosis severa. En el 33% de las muestras, las vellosidades presentaron atrofia e hiperplasia linfoide en la submucosa. No se observó adherencia ni colonización sugestivas a *Salmonella* en ningún momento del estudio.

Bazo.- No se observaron cambios patológicos aparentes.

Corazón.- No se observaron cambios patológicos aparentes en ningún momento de duración de la prueba,

5.2. Estudios *in vitro* para la determinación de factores de virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).

5.2.1. Determinación de la existencia de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante ensayo celular con células de ovario de hamster chino (CHO)

Cuantificación Proteica.- La cuantificación de PSNC de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) fue obtenida por medio del micrométodo de Bradford, (1976). Teniendo como resultado una concentración máxima de proteínas correspondiente a 622 µg/mL a las 24 horas de crecimiento.

En la cuantificación de las PP de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), previa liberación con polimixina B, se observó una concentración máxima de 71µg/mL a las 24 horas de crecimiento (Cuadro 14).

No fueron detectadas las PSNC de *E. coli* HS, en contraste, las PP de este mismo cultivo fue de 1.770 mg/mL a las 24 horas de crecimiento.

Las PP de *ETEC* tuvieron una concentración de 3.904 mg/mL a las 24 horas del cultivo, tampoco fueron detectadas las PSNC.

Geles de poliacrilamida.- Los geles de poliacrilamida SDS al 15% (Fig. 3) teñidos con plata, muestran la existencia de PSNC y PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 con diferentes pesos moleculares (PM).

Actividad Biológica en células CHO.- Los pozos fueron revisados cada 12 horas durante 96 horas sin observarse elongación en células CHO por las PSNC y por las PP de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), sin embargo, durante ese tiempo, se pudo observar arendondamiento de las células a las 24 y 48 horas posexposición y efecto citotónico con recuperación de la morfología normal a las 72 y 96 horas. En contraste, se observó que el efecto de CT comercial de *V. cholerae*, así como las PP de *ETEC*, fue a las 24 horas posexposición. Con las PP de *E. coli* HS, el medio F-12 y la solución de dializado, no se observó elongación aún después de 96 horas posexposición (Fig. 6 y 7).

5.2.2. Purificación y caracterización parcial de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de proteínas periplasmáticas (PP) de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante geles SDS PAGE e *Immunoblot*.

Cuantificación Proteica.- Las PSNC de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko, tuvieron una concentración máxima de 1.7mg/mL mientras que las PP fue 0.303 mg/mL a las 24 horas de crecimiento.

Geles de Poliacrilamida.- Los geles de poliacrilamida SDS al 15% (Fig. 8) teñidos con plata, muestran la existencia de bandas de PSNC de 97, 66.2, 45 y menores a 31 kDa tanto para las proteínas recientes como las de un año de antigüedad. Por otro

lado, en las PP las bandas que se observan son en mayor número, fluctuando entre los mismos PM de las PSNC, pero con mayor claridad las de 66, 42, 35, 33, 32 y 24 kDa principalmente.

Ensayos Inmunoenzimáticos

Inmuno ensayo asociado a enzimas (ELISA).- Las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko confrontadas contra sus antisueros homólogos producidos en conejo, tuvieron un punto de inflexión aproximado a la dilución 1:1000, por lo que para las pruebas de *immunoblot* se utilizaron los sueros diluidos 1:500.

Inmunotrasferencia (Immunoblot).- Del ensayo con inmunoglobulinas conjugadas con Peroxidasa, se permitió una incubación de 18 horas a temperatura ambiente y en agitación continua de 50 r.p.m. con los anticuerpos anti CT, anti LT, anti PSNC y anti PP, producidos en conejo y anti Sg producidos en pollo, al confrontarlos con las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko recientes y de un año de antigüedad, se observó reactividad cruzada entre anti LT y las PSNC (97 kDa), PP (97, 66.2 y 45 kDa) y las PSNC (66.2 kDa) y PP de un año de antigüedad (97 y 66.2 kDa), al igual que con los anticuerpos PSNC y PP contra sus homólogos y heterólogos respectivamente y contra las PSNC y las PP de 1 año de antigüedad. Ninguno de los anticuerpos detectó reactividad contra las PP de FVA -1 de Sg y los anticuerpos anti CT solamente detectaron las proteínas homólogas (CT) (control positivo) y no las PSNC ni las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko ni las PP de FVA-1 de Sg (Cuadro 15, Figura 9).

En el ensayo con Inmunoglobulinas conjugadas con Avidina - Biotina^f y posteriormente con Peroxidasa^u, al confrontarlos con las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko recientes y de un año de antigüedad, se observó reactividad cruzada y homóloga más intensa de los anticuerpos anti LT, anti PSNC, y anti PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko y anti Sg de *S. gallinarum*, contra las PSNC, las PP *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko y las PSNC y PP de la misma Salmonela de un año de antigüedad. Con anticuerpos anti LT, las bandas de

^f Sigma Immunochem. Sn. Louis. MO.

^u Dako A/S Produktions Vej 42. DK. Dk-2600. Glostrup-Denmark.

proteínas mejor observadas fueron las PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko recientes (97 y 66.2 kDa) (Fig. 10), las PSNC (Fig. 11) y las PP de un año de antigüedad (97 y 66.2 kDa en ambas) (Fig. 12). Ninguno de los anticuerpos empleados detectaron reactividad contra CT, excepto los anticuerpos homólogos, los cuales fungieron como controles positivos (Fig. 13). Por otro lado, empleando el anticuerpo anti Sg contra las PSNC, PP y las PSNC y PP de un año de antigüedad de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko y las PP de FVA -1 de Sg, se revelaron mayor número de bandas sobre todo contra las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko recientes (Cuadro 18 y Figuras 14 y 15).

La figura 16, muestra el gel de poliacrilamida SDS al 15% teñido con plata, donde se observan las bandas de las PSNC y de PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko recientes, y las de un año de antigüedad, se observan también las bandas de PP de *S. gallinarum* FVA-1, con pesos moleculares de 100, 97, 95, 70, 66.2 55, 47, 45, 31, 21 y 16 kDa.

6. DISCUSIÓN

6.1. Estudios de virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) *in vivo*

6. 1.1. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo mediante una prueba biológica.

Las infecciones por *Salmonella* fueron las primeras en ser reconocidas como enfermedades que naturalmente ocurren en forma epizootica o enzoótica en ratas y ratones de laboratorio. De hecho, el primer aislamiento de *S. typhimurium* fue realizado por Loeffler a partir de una epizootia en ratones de laboratorio en 1892. Desde entonces y durante los 30 años siguientes casi todos los temas de investigación fueron con relación a *Salmonella* (Hecht, 1979; Pomeroy y Nagaraja, 1991).

En una epizootia ocurrida en 1893 en Francia, Danysz observó que morían ratones de campo y él logró el aislamiento de una cepa de *Salmonella* que finalmente mató a ratones de laboratorio. Danysz empleó este microorganismo (*S. enteritidis* var. Danysz) para el control de ratones de campo y posteriormente para roedores domésticos. En 1895, Mereshkowky obtuvo un aislamiento de la misma bacteria a partir de una epizootia en marmotas y en 1898 en San Petesburgo, Issatschenko obtuvo un cultivo de *Salmonella* (*S. enteritidis* var. Issatschenko) a partir de una epizootia en ratas de campo cafés (*Rattus norvegicus*) (Hecht, 1979; Steven, 1979; Leslie, 1941; Danysz, 1900 y 1914; Salmonella subcommittee, 1934).

Debido a las observaciones antes descritas, en La Habana, Cuba, se comenzaron a realizar estudios con esta cepa, para ser empleada como un rodenticida biológico (Biofam, 1996), sin embargo, existe confusión del empleo de esta bacteria por ser muy parecida antigénicamente a *Salmonella enteritidis* que produce paratifoidea en todas las especies animales (Urquiza, 1992 1997^{91, 92}, 1999, 2000).

La literatura antigua menciona sinónimos de *S. enteritidis* variedad 17 F-4, subgrupo 1, grupo D que mata a múridos como: *S. enteritidis* var. Issatschenko, Danysz, Gaertner, Liverpool, Ratin, Projorov y *Salmonella enteritidis*, subespecie entérica, bioserotipo

enteritidis. Según la clasificación de Kauffmann – White, *S. enteritidis* pertenece al grupo D, subgrupo 1 con antígenos O: 1,9,12 y H: g, m; pero esta especie afecta a todas las especies animales incluyendo al hombre (Ewing, 1986; Le Minor, 1984; Urquiza, 1992; Kazimierz, 1973; Keteibom, 1987; Padrón, 1991; Mancera *et al.*, 1996; Mainas *et al.*, 1994; Euzebý, 1999). Por otro lado, estudios realizados con roedores en Cuba y experiencias de campo y de laboratorio en algunos países de Asia y América Central, se ha observado que *S. enteritidis* variedad 17 F-4, subgrupo 1, grupo D (var. Danysz) solamente afecta a roedores de la familia Muridae y no a otras especies domésticas ^{a,b,c}. Cabe mencionar que esta salmonela también contiene antígenos somáticos 1,9,12 y flagelares g, m; con la diferencia de contener antígenos flagelares en fase 2, I-7, la descarboxilación a la lisina es negativa y la fermentación de Rhamnosa es negativa también (Leslie, 1941; Bykovskii y Kandybin, 1988; Threlfall *et al.*, 1996; Threlfall^d, 1996; Nelli *et al.*, 1976).

Según los análisis realizados en el Laboratorio de Servicios de Salud Pública en Inglaterra en 1996 (PHLS), una cepa identificada como *S. enteritidis* var. Issatschenko que se emplea para la producción de un rodenticida biológico comercial (RBC) en Cuba, la descarboxilación a la lisina fue negativa, pero la fermentación a la rhamnosa fue positiva. Los resultados obtenidos por medio de electroforesis con geles de poliacrilamida y con la digestión con enzimas de restricción *Spe I*, fue positiva a fagotipo 6A y con *Xba I*, Issatschenko fue diferente a las cepas Liverpool, Ratin y Danysz (Threlfall^d). Los resultados del presente estudio con relación a la identificación de la cepa bacteriana contenida en dicho RBC, coincidieron con la información de Biofam (1996), Espino (1989) y Threlfall^d, en ser positivos a *S. enteritidis* PT 6 A y con fermentación a la rhamnosa positiva y la descarboxilación de la lisina negativa; por lo que estos resultados, coinciden con la cepa bacteriana contenida en el RBC, indicando que es *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko y no *S. enteritidis* biovar. Danysz.

En estudios realizados por Espino (1989), la concentración de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) en el RBC, ha sido desde 1.4×10^9 a

^a Del Águila B C.: Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Zona 12, Guatemala, Centroamérica, Ref. DM 590695, Jun, 1995. Datos No Publicados.

^b Hernández Carlos Miguel, Microbiólogo. Centro de Investigaciones Veterinarias, Universidad Centroamericana, Apartado 89, Managua, Nicaragua, Tel. 746559, Julio, 1995. Datos No publicados.

^c Ayala, R.: Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Octubre, 1995, El Salvador, San Salvador, Datos No Publicados.

^d PHLS: Public Health Laboratory Service. Laboratory of enteric Pathogens. 61 Colindale Avenue, London NW 95111.

4.5x10⁹ UFC/g de muestra. En este trabajo, la concentración *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) obtenida en el RBC fue de 4x10⁹, la cual se encuentra dentro del rango de carga bacteriana del RBC producido en el laboratorio de origen.

El hecho de que existan concentraciones variables en el producto, puede ser debida al manejo de la cadena fría y a la fecha en que se haya producido el RBC (Biofam, 1996; Morilla, 1989), ya que si el producto se almacena entre los 8 y 16°C, la concentración se mantiene estable durante 6 meses, provocando un 100% de mortalidad en ratas y ratones, mientras que si el producto es almacenado a temperatura ambiente (25° durante 5 días ó 31.4°C durante 2 horas), se reduce la concentración bacteriana (de 4.5x10⁹ a 2.6x10⁹) teniendo aún 100% de efectividad (Biofam, 1996). Aunque el RBC empleado en este trabajo, fue de reciente fecha de elaboración (menos de 15 días), saliendo del laboratorio de origen con una concentración alta (4.5x10⁹) (Biofam, 1996), debido al tiempo de transporte (6 horas sin refrigeración), permaneció con una concentración de 4x10⁹, dentro de los límites aceptables de efectividad hasta su utilización.

En trabajos realizados anteriormente por Hernández^b se observó que utilizando una dosis única por vía oral de 50 g de RBC, conteniendo una concentración de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) de 2.5x10⁹/g, obtuvieron 100% de mortalidad en los roedores entre los días 9 y 10 posinoculación y aislamiento positivo de la misma cepa a partir de la mortalidad de los ratones.

La dosis mínima de RBC sugerida por el laboratorio de origen^d es de 50 g de RBC por cada 2-5 m² como cebo único, con una concentración *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) de 1.4x10⁹ /g de RBC, demostrando 100% de efectividad.

Considerando que un ratón adulto consume en promedio diario de 4-6 g. de alimento, en este presente trabajo se utilizaron de 2 a 6 g. de RBC/ratón como dosis única, con una concentración de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) de 4x10⁹ UFC/g. por vía oral. Los resultados obtenidos fueron del 95% al 100% de mortalidad en los ratones de los grupos I y II respectivamente, coincidiendo el grupo I con el 95% de mortalidad al cual se le proporcionó menor cantidad de RBC.

^b Hernández Carlos Miguel, Microbiólogo. Centro de Investigaciones Veterinarias, Universidad Centroamericana, Apartado 69, Managua, Nicaragua, Tel. 746559, Julio, 1995. Datos No publicados.

^d Laboratorios Labiofam, La Habana Cuba

Si se comparan los resultados de los estudios anteriores (Biofam, 1996; Espino, 1989) y los presentes, a pesar de haberse empleado una concentración mayor de bacterias (4×10^9), no se obtuvo el 100 % de mortalidad en el grupo I. La mortalidad máxima registrada para este grupo I sucedió en el día 8 posinoculación finalizando hasta el día 21 posinoculación, mientras que para el grupo II, la mortalidad máxima fue en el día 7 concluyendo en el día 8 posinoculación. Los estudios registrados por otros investigadores^{a, b, c}, han coincidido en que la mortalidad de los ratones en su mayoría se ha presentado entre los días 3 y 7 posinoculación, extendiéndose hasta el día 21, aclarando que todo depende de la vía, dosis y concentración bacteriana proporcionada. Aunque en este estudio se utilizó una concentración mayor de bacterias contenida en el RBC (4×10^9 ufc/g), los resultados obtenidos mostraron tener un comportamiento similar de signología y mortalidad del Tifo de roedores (Biofam, 1996; Porres, 1996; US Department, 1989).

El aislamiento de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) a partir de la mortalidad fue del 100% en ambos grupos, coincidiendo con los resultados obtenidos en otros ensayos^{a, b, c} (Biofam, 1996).

En uno de los trabajos realizados por Ayala^d, con ratones albino suizo, se observó que utilizando una dosis bacteriana de 0.5×10^9 en agua peptonada como agua de bebida, la mortalidad ascendió a 100% en 5 días, mientras que los resultados obtenidos en este trabajo en el grupo III, se obtuvo el 65% de mortalidad, aclarando que los ratones recibieron una dosis oral mayor de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) (1×10^9 UFC/mL en suspensión al 20% en el agua de bebida) que la utilizada en el estudio anterior. Probablemente, debido al empleo del agua peptonada como vehículo para proporcionar una suspensión bacteriana a los ratones albino suizo en el estudio llevado a cabo por Ayala³, las bacterias tuvieron una mejor oportunidad de multiplicarse en un lapso de 24 horas, tiempo en que se proporcionó el agua de bebida. En este estudio, además de la dosis empleada, el único vehículo utilizado fue agua purificada, por lo que hubo menor posibilidad de que las

^a Del Águila B C.: Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Zona 12, Guatemala, Centroamérica, Ref. DM 590695, Jun, 1995. Datos No Publicados.

^b Hernández Carlos Miguel, Microbiólogo. Centro de Investigaciones Veterinarias, Universidad Centroamericana, Apartado 69, Managua, Nicaragua, Tel. 746559, Julio, 1995. Datos No publicados.

^d Ayala, R.: Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Octubre, 1995, El Salvador, San Salvador, Datos No Publicados.

bacterias se multiplicaran, hecho que posiblemente influyó en que los resultados fueran diferentes.

La mortalidad máxima registrada (65%) del grupo III, fue al día 7 posinoculación y finalizó en el día 11, pudiéndose obtener de los roedores muertos el 100% de aislamiento positivo a *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), lo cual al compararlo con los estudios realizados por Ayala^c la mortalidad comenzó al día 5 posinoculación y finalizó al día 10, recuperándose la bacteria en el 100% de la mortalidad a partir de los órganos internos. El tiempo en que fueron muriendo los ratones en este estudio fue mas largo.

Los resultados antes citados para el grupo III, sugieren que *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), no puede producir por si misma el 100% de mortalidad, de ahí la necesidad de potencializar su acción por medio del uso de sal de hidroxycumarina (fórmula original del RBC^d), la cual provoca en los roedores daño directo en la permeabilidad capilar y que en pequeñas dosis (0.02%) y en una sola exposición facilita la acción de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) (US Department, 1989; Biofam, 1996) Los grupos IV y V, que fueron inoculados por vía subcutánea e intraperitoneal respectivamente, con una dosis de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), se obtuvo el 100% de mortalidad, 100% de aislamiento positivo a la cepa inoculada a partir de la mortalidad y los ratones comenzaron a morir a partir del 2º día posinoculación finalizando en los días 5 y 6 respectivamente, coincidiendo estos resultados con los obtenidos en otros trabajos anteriormente realizados por Del Águila^a y Ayala^c.

Del grupo VI (control negativo) murieron 2 ratones, obteniéndose aislamiento negativo a *Salmonella* spp, en ambos ratones y al término de la prueba, los sobrevivientes que fueron sacrificados también resultaron negativos al aislamiento de *Salmonella* spp.

En el muestreo bacteriológico de las heces que se realizó cada 3er día, se logró recuperar *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), en los grupos I y II, a

^d Laboratorio Labiofam, La Habana Cuba.

^a Del Águila B C.: Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Zona 12, Guatemala, Centroamérica, Ref. DM 590695, Jun, 1995. Datos No Publicados.

^c Ayala, R.: Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Octubre, 1995, El Salvador, San Salvador, Datos No Publicados.

los 3 y 5 días posinoculación. Posteriormente no hubo recuperación de la bacteria. En los grupos III, IV y V, no hubo recuperación de la bacteria en ningún momento de la prueba. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios realizados por Espino (1989), donde se ha observado que la eliminación de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), sucede solamente durante los primeros 5 días posinoculación, cuando el RBC es administrado por vía oral. Se desconoce la razón del aislamiento negativo de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) en los grupos III, IV y V a partir de heces y los mismos resultados se han obtenido en estudios realizados por otros investigadores (Biofam 1996).

Salyers y Whitt (1994), mencionan que una vez que *Salmonella* spp se encuentra dentro del organismo, crece dentro de los macrófagos de hígado y bazo. En el caso de *Salmonella typhimurium* vive principalmente dentro de las células del hospedero que fuera de ellas. Existen algunas evidencias de ensayos *in vitro*, donde se observa que cuando *Salmonella typhimurium* es ingerida por fagocitos, muchas de estas bacterias son destruidas, pero una subpoblación sobrevive. Hasta el momento se desconoce acerca de las características de esta subpoblación o de que si la bacteria que sobrevive puede crecer en los fagocitos.

Por otro lado, Ishibashi (1996), demostró que la sobrevivencia de los serovariedades de *Salmonella* es hospedero-dependiente, ya que *S. typhimurium* fue capaz de resistir la muerte intracelular en macrófagos de murinos y no así *S. typhi*, en contraste, *S. typhi*, fue capaz de sobrevivir en macrófagos humanos y *S. typhimurium* no.

Por lo anterior, es aconsejable realizar ensayos *in vitro* con *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) exponiéndolos a macrófagos y enterocitos de ratón y de otros animales, de esta forma se conocería un poco más acerca del mecanismo de patogenicidad de esta *Salmonella* y la razón del por qué después de siete días posinoculación e inoculándola sin presencia de hidroxicumarina, se encuentra ausente en muestras de heces en los estudios de aislamiento bacteriano.

Respecto a la viabilidad de la bacteria en heces mantenidas en refrigeración durante 30 días, el resultado fue negativo. Aunque *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) se mantiene estable durante 6 meses en refrigeración, empleando como vehículo arroz, (medio nutritivo), puede permanecer viable, pero cuando este medio es

mantenido a temperatura ambiente, la viabilidad de la bacteria se reduce debido a los carbohidratos contenidos en el arroz. Es probable que la bacteria comience a multiplicarse rápidamente agotando los nutrientes y acumulando materiales tóxicos, causando cese de su multiplicación, además de acidificarse el medio por su fermentación, provocando así la muerte de la bacteria (Biofam, 1996; Claus, 1991).

Por otra parte, en estudios realizados con exposiciones del producto al medio ambiente, se ha comprobado su inactivación (muerte de las bacterias) hasta un 70% en 3 horas (Biofam 1996).

Es probable que la viabilidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) en heces haya resultado nula debido que las heces no son un vehículo que favorezca la viabilidad bacteriana y a que se mantuvieron en refrigeración durante 30 días. Bykovskii y Kandybin, (1988), mencionan que para mantener la viabilidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), es necesario almacenar a la bacteria en medios con deficientes nutrientes y en congelación y si la virulencia disminuye, esta puede recuperarse mediante pases en roedores susceptibles.

6.1.2. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas Cepa Wistar mediante una prueba biológica.

En trabajos de campo realizados anteriormente (Biofam, 1996), en diferentes poblaciones en Viet Nam, en granjas porcinas, avícolas y almacenes de grano para la elaboración de alimento para animales, se observó que utilizando una dosis única de 50 g de RBC por vía oral, se obtuvo aparentemente una reducción de la población de roedores de aproximadamente el 76%. Aunque debido a la alta diversidad y disponibilidad de alimento tanto en granjas como en los almacenes de alimento, fue difícil calcular el número de roedores existentes en cada área en aquel momento. El cálculo fue realizado por medio de captura mediante entrampado y cantidad de excretas presentes. Cuando se concluyó con la desratización habiendo utilizado el RBC, se encontró un 76% más de roedores que lo recuperado por medio de entrampados.

Considerando que una rata adulta consume en promedio diario de 12-15 g de alimento (Porres, 1996), en este ensayo se utilizaron 15 g de RBC/rata como dosis única y 40 g de RBC/rata (dividida en dos tomas de 24 horas c/u) con una concentración de 4×10^9 bacterias/g por vía oral. La mortalidad registrada fue del 70 al 100% para los grupos I y II respectivamente observándose el total de la mortalidad en el día 18 posinoculación. Los resultados anteriores, muestran que en el grupo I, habiendo tenido una dosis única de 15 g./rata de RBC, podría no ser suficiente para obtener el 100% de mortalidad, como se ha observado en otros ensayos (Biofam, 1996), en comparación de cuando se proporcionó 20 g. cada 24 horas. Aunque no se obtuvo el 100% de mortalidad en el grupo I, el aislamiento de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), a partir de la mortalidad fue del 100% en ambos grupos.

En ensayos realizados con ratones Albino Suizo^a, como ya se mencionó, se observó que utilizando una dosis de 0.5×10^9 en agua peptonada como agua de bebida, la mortalidad ascendió a 100% en 6 días. Aunque el estudio anterior fue realizado con *Mus musculus*, los resultados obtenidos en este ensayo trabajo para el grupo III, se obtuvo el 80% de mortalidad, aclarando que las ratas recibieron una dosis oral mayor de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) (1×10^9 UFC/mL en suspensión al 20% en el agua de bebida) que la utilizada en el estudio anterior.

La mortalidad máxima registrada del grupo III, fue al día 14 posinoculación y finalizó al día 18 con el 80% de mortalidad total, pudiéndose obtener de las ratas muertas, 100% de aislamiento positivo a *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko).

En el caso de los estudios realizados por Del Águila^a con *Mus musculus*, la mortalidad fue del 100%, comenzando el día 8 posinoculación y finalizando el día 10, recuperándose la bacteria en el 100% de la mortalidad a partir de los órganos internos. Una situación similar, también la obtuvo Ayala^c con *Mus musculus*, donde la mortalidad comenzó en el día 3 posinoculación y finalizó al día 6, recuperándose la bacteria en el 100% de la mortalidad a partir de los órganos internos.

^a Del Águila B C.: Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Zona 12, Guatemala, Centroamérica, Ref. DM 590695, Jun, 1995. Datos No Publicados.

^c Ayala, R.: Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Octubre, 1995, El Salvador, San Salvador, Datos No Publicados.

Del grupo IV (control negativo), ningún animal murió. El aislamiento bacteriano realizado fue negativo a *Salmonella* spp al término de la prueba.

En el muestreo bacteriológico de las heces que se realizó cada 3er día, no se logró recuperar *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) en ninguno de los grupos en ningún momento que duró la prueba. Estos resultados no coinciden con los resultados obtenidos anteriormente (Biofam, 1996), donde se ha observado que la eliminación de *Salmonella enteritidis* 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) ha sido durante los primeros 5 días posinoculación, cuando el RBC es administrado por vía oral. Se desconoce la razón del aislamiento negativo de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) en todos los grupos a partir de heces.

6.1.3. Determinación de la virulencia *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en cobayos raza Abisinia, mediante una prueba biológica.

En estudios realizados anteriormente (Biofam, 1996), se demostró que cuando *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) fagotipo 6A es administrada en cobayos por vía oral, teniendo un título de 2×10^6 ufc/g. de arroz, los cobayos nunca enfermaron, su temperatura corporal no aumentó, inclusive cuando en uno de esos grupos, la *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) fagotipo 6A fue administrada por vía subcutánea, su comportamiento fue aparentemente normal durante 3 meses que duro la prueba, sin encontrarse eliminación de la bacteria en heces ni a partir de los órganos internos después de su sacrificio. En este estudio, se obtuvieron resultados similares, no hubo signología de alguna enfermedad, no se logró la recuperación de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en heces ni a partir de los órganos internos de los cobayos al término de la prueba.

Aunque murieron cobayos de los grupos III y IV, al realizarles la necropsia, no se observaron lesiones sugestivas a Salmonelosis y tampoco se logró la recuperación de la bacteria a partir de sus órganos internos, aún habiéndose inoculado una concentración de 4×10^9 /g de RBC.

Por los resultados anteriormente expuestos, *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) fagotipo 6A empleada en estos ensayos solamente produjo infección y muerte en los múridos y no produjo infección en las otras especies empleadas en este ensayo y es diferente a *Salmonella enteritidis* fagotipo 6 A que se ha utilizado en otros trabajos y que ha causado infecciones paratifoideas en distintas especies animales. (Schroeter *et al.*, 1995).

En el mundo existen aproximadamente 43 fagotipos de *Salmonella enteritidis*, incluyendo el 6A, quien también provoca signología de Salmonelosis muy similar al fagotipo 4. El fagotipo 6A se ha aislado de productos cármicos, ocasionando intoxicación alimenticia en el hombre y produce signología clínica severa de salmonelosis y mortalidad variable en las diversas especies animales, sin embargo, mucho depende del fagotipo involucrado en el proceso infeccioso, como lo son en los casos de los fagotipos 4, 8 y 13 que existen en México y que son los más virulentos en cualquier especie animal incluyendo al hombre. *S. enteritidis* en el humano y en los animales infectados puede ser excretada hasta por más de tres meses y en algunos casos, la bacteria puede ser excretada hasta por un año (Salyers y Whitt, 1994; Ward, 1987; Mancera *et al.*, 1996; Mainas, *et al.*, 1994; Scroeter *et al.*, 1995, Urquiza, 1992).

6.1.4. Determinación de la virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) contenida en el RBC en pollitos Leghorn de un día de edad y de pollos de engorda de 1 y 8 días de edad mediante una prueba biológica.

Con la administración del RBC mezclado con el alimento y la suspensión de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) por vía oral en pollitos Leghorn de 1 día de edad con una dosis de 1×10^9 UFC/mL, se registró mortalidad en la primera semana posinoculación; sin embargo, no se logró recuperar *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar Issatschenko) posterior a la primera semana de tratamiento hasta la finalización de la prueba. En el muestreo bacteriológico diario de las heces, en dos de los grupos se logró la recuperación de la *Salmonella* en estudio en el segundo día posinoculación y las muestras de hígado tomadas al término de la prueba fueron negativas.

Según estudios realizados por Biofam (1996), el RBC administrado hasta 3 veces la dosis mayor a la empleada en este estudio y durante 5 días consecutivos, en aves ligeras de

3 semanas o mayores, no se registró mortalidad. Cabe mencionar que las aves mayores de 3 semanas de edad, ya comienzan a tener un sistema inmune maduro y que probablemente debido a esto, las aves reaccionaron en contra antígeno administrado en la forma esperada, habiendo eliminado el antígeno por completo (Sharma, 1997).

En estudios llevados a cabo por Aviña *et al.*, (2000) y Barranco *et al.*, (2000), con gallinas SPF en postura y gallina ponedora comercial de 25 semanas de edad respectivamente, mostraron que con la inoculación por vía oral de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) no se registró mortalidad alguna durante 30 días que duró la prueba, tampoco se redujo la postura y no fue posible la recuperación de *Salmonella* spp en huevo, ni en heces en ningún momento de dichos ensayos.

En este estudio, las aves empleadas contaban con un día de edad al ser inoculadas con *S. enteritidis* 17 F-4 (biovar. Issatschenko), siendo susceptibles a agentes infecciosos.

Se ha observado que en infecciones por *S. enteritidis* en aves menores de 4 semanas de edad, la mortalidad puede llegar al 20%, (Urquiza, 1992) de ahí que la mortalidad registrada en este ensayo haya sido probablemente debida a la *Salmonella* en estudio. Por otro lado, en estas aves no fue posible la recuperación de la bacteria por medio de aislamiento bacteriológico al finalizar la prueba, coincidiendo con otros investigadores en que *Salmonella* aunque haya sido inoculada experimentalmente, puede no aislarse con facilidad a partir de los órganos de animales infectados (Salyers y Whitt, 1994). Experiencias de campo², indican que la existencia de un buen manejo en las aves, puede ocasionar que *Salmonella* no se manifieste en forma clínica y ni tampoco sea posible su aislamiento (Padrón, 1991).

Con relación en los resultados serológicos, Espino *et al.*, (1989). mencionan que después de la inoculación continua por vía oral de *S. enteritidis* 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en aves ligeras mayores a 3 semanas de edad, no se mostró existencia de anticuerpos contra *Salmonella* utilizando un antígeno de *Salmonella pullorum*⁴. En los análisis serológicos llevados a cabo en este ensayo, por medio de Ap con el antígeno K polivalente de *Salmonella pullorum*¹ con el suero de los pollos Leghorn, mostró seroconversión cruzada

² Urquiza comentario personal 2001.

⁴ Laboratorio Labiofam, La Habana Cuba.

¹ Solvay Animal Health, México

positiva a partir de los 21 días posinoculación, por otro lado, Aviña *et al.*, (2000), en el estudio de las aves SPF en postura, se registró seroconversión positiva en la prueba de Ap. Estos resultados no coinciden con Espino *et al.*, (1989) y Biofam (1996), donde no se ha observado seroconversión positiva en ningún momento de las pruebas. Los resultados obtenidos mediante la prueba de MA, en el estudio de Aviña *et al.*, (2000), fueron negativos en todos los grupos durante el tiempo de la prueba.

La reactividad cruzada obtenida en este ensayo, pudo haber sido debida a la similitud de los anticuerpos que reaccionan contra las bacterias de la familia Enterobacteriaceae a la cual también pertenece *Salmonella* (Morilla, 1989; Nagaraja, *et al.*,1991; Pomeroy y Nagaraja, 1991), por lo que al comprobar dicha reacción mediante MA, ésta resultó negativa, como también lo explican Aviña *et al.*, (2000), donde obtuvieron aislamiento bacteriano de *Proteus* sp, quien posiblemente provocó la reacción cruzada en la prueba de Ap .

Las pruebas de MA han ayudado durante muchos años a diferenciar las reacciones "falsas positivas" en la prueba de Ap debido a reacciones cruzadas con otras enterobacterias, y a su vez, comprobando la existencia de reactividad cruzada entre salmonelas del grupo D1 como lo son *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. enteritidis* y sugiriendo en este caso también con *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) por contener antígenos O:1,9,12 y H: g,m (Opitz, 1992, Gast, 1994 ; Euzeby, 1999). Los resultados negativos obtenidos de este ensayo con la prueba de MA, sugieren que en la Ap existió reacción cruzada con otras enterobacterias y no debida a la infección experimental con *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Con en el ensayo para la determinación de la inocuidad *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en pollos de engorda de 1 y 8 días de edad, administrada con el alimento y por vía oral a una dosis de 1×10^8 UFC/mL (0.25 mL/pollo), se registró una viabilidad de las aves del 96.9%, y en el muestreo bacteriológico diario de las heces y las muestras de hígado tomadas al término de la prueba fueron negativas, sin embargo, en la mortalidad registrada se logró recuperar *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en el 3.1% de los animales y si hubo recuperación de la bacteria a partir de un ave sobreviviente del grupo 2. Estos resultados no coinciden con los estudios realizados por Biofam, (1996), Espino, *et al.*, (1989), y Villafaña *et al.*,(1995), donde mencionan no haber aislamiento positivo a *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en las aves inoculadas experimentalmente en ningún momento de la prueba.

Por otro lado, en este ensayo, los resultados por medio de Ap contra el antígeno polivalente de *Salmonella pullorum* con suero de los pollos de engorda, mostraron seroconversión negativa y también mediante la prueba de MA se obtuvieron resultados negativos en estos grupos durante el tiempo de la prueba. Estos resultados si coinciden con otros estudios (Biofam, 1996), donde después de la inoculación continua por vía oral de *S. enteritidis* 17 F-4 en aves ligeras mayores a 3 semanas de edad, no se mostró existencia de anticuerpos contra *Salmonella* utilizando un antígeno de *Salmonella pullorum*^s (Biofam, 1996).

Debido a los resultados obtenidos en esos ensayos y las diferencias que se observan con los otros ensayos de inocuidad en otras especies, se sugiere realizar mas repeticiones para comprobar la posible inocuidad de esta salmonela, no se puede asegurar de manera concluyente que *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko) sea inocua para aves domesticas recién nacidas.

6.1.5. Determinación de la patogenia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 grupo D1, mediante la observación de lesiones histológicas a partir de muestras de yeyuno e íleon de ratón (*Mus musculus*).

Con relación a la patogenia de *Salmonella* en humanos, se ha observado que *S. enteritidis* una vez que ha sido ingerida y alcanza intestino delgado, los síntomas aparecen entre las 6 y las 24 horas posteriores a su ingestión y pueden durar hasta una semana. Los síntomas iniciales incluyen malestar general, fiebre remitente, nauseas, vómitos y diarrea profusa. Para el caso del periodo de incubación de *S. typhi* y *S. typhimurium*, éste puede ser desde una semana hasta 1 mes produciendo diarrea y ulceración de intestino. Cuando *S. typhi* se multiplica en la submucosa, pasa hacia el torrente sanguíneo y se dispersa en todo el organismo, de esta forma se multiplica en gran número en bazo e hígado, desplazándose en forma continua hacia vesícula biliar pudiendo persistir durante años y así eliminarse por heces (Salyers y Whitt, 1994).

Algunas especies de *Salmonella* pueden producir lesiones tan severas, que ocasionan la muerte en diferentes especies animales. Dichas lesiones como las de tipo hemorrágico, degenerativas, supurativas, necróticas, ulcerativas en epitelios, etc. se

encuentran en infecciones agudas por *Salmonella* o aún cuando ya existe cronicidad. En ninguno de estos estudios mencionan el tiempo posinfección en el que se encuentran dichas lesiones ni en el que mueren los animales (Jawetz *et al.*, 1992; Davies, y Wray, 1995; Pomeroy y Nagaraja, 1991; Songer, 1998; Runnells *et al.*, 1960, Nagaraja *et al.*, 1991).

En el ensayo para la determinación de la patogenicidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) mediante la observación de lesiones histológicas a partir de muestras de yeyuno e íleon de *Mus musculus*, a pesar de que los ratones fueron inoculados con una dosis de 1×10^9 UFC/mL y de que fueron observados y sacrificados en el transcurso de 117 horas, las lesiones observadas por medio de microscopía de luz, no reflejaron lesiones tan severas en intestino (yeyuno e íleon) de *Mus musculus* como para producir su muerte (menos de 6 días). Las lesiones en hígado se comenzaron a observar a partir de las 57 horas post-infección. Con lo antes expuesto, se puede sugerir que la *Salmonella* en estudio contenida en el RBC, no es capaz por sí sola de producir 100% de mortalidad en roedores, ni tampoco de ser mortal para otras especies animales y que mucho depende de la resistencia del hospedero, así como de que es muy probable de que *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 (biovar. Issatschenko), sea muy inestable con relación a su virulencia, de ahí la variabilidad de los resultados que se han obtenido por otros investigadores, donde la mortalidad no es constante en roedores (Pomeroy y Nagaraja 1991; Pascal, 1999; Kunestova *et al.*, 1985; Trakhanov y Kadirov, 1972).

En el presente estudio no se observaron bacterias abundantes en la luz del yeyuno e íleon, ni tampoco lesiones que indicaran una infección por *Salmonella*. Sin embargo, al revisar hígado, se observaron focos necróticos y hemorragias que sugieren una infección por *Salmonella* sp. Dichas lesiones podrían estar indicando la acción de una exotoxina.

Las exotoxinas clásicas son considerablemente más tóxicas que las endotoxinas, son proteínas termolábiles y pueden ser convertidas en toxoides, que pueden estimular la producción de anticuerpos, neutralizando la actividad biológica de los efectos de la toxina, antes y frecuentemente después de ser administrada a los animales (Jawetz *et al.*, 1992; Bouzouba, *et al.*, 1987; Chopra *et al.*, 1987, Perez-Perez *et al.*, 1992).

Por otro lado, de *Salmonella typhi* se han aislado endotoxinas que pueden producir zonas de hemorragia en la pared gastrointestinal y otras alteraciones circulatorias. En las

lesiones histológicas existe la presencia de leucocitos y plaquetas en las vénulas. Aunque las endotoxinas poseen numerosos efectos biológicos, sólo son liberadas si se altera la integridad de la pared bacteriana (lipopolisacáridos, LPS) y no pueden ser transformadas en toxoides (Ruttler, 1988).

En estudios realizados por Urquiza *et al.*, (1999 y 2000) se menciona sobre la existencia de proteínas con actividad citotónica y citotóxica que son liberadas al medio de cultivo durante su crecimiento (PSNC) y de igual forma de las que se encuentran en el espacio periplasmático (PP). Dichas proteínas tuvieron actividad biológica detectable mediante un ensayo en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) además de tener un efecto de vacuolización temprano antes de cumplir 24 horas posexposición. Estas proteínas con actividad tóxica pudieran sugerir la existencia de una citotóxica que produce focos necróticos en algunos órganos como corazón intestino, páncreas e hígado en ratones moribundos infectados en forma natural por este género (Baker *et al.*, 1979).

Si bien *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 (biovar. Issatschenko), no es capaz de producir alta mortalidad en roedores por si sola, se sugiere que por ello en el RBC esta combinada con sal de hidroxycumarina al 0.02%, un anticoagulante, que actúa a nivel sanguíneo interrumpiendo el ciclo de la vitamina K en los microsomas del hígado. Los anticoagulantes inhiben a nivel hepático la formación de protombina (factor II) y los factores VII, IX y X. Durante algún tiempo después de la ingestión de una dosis letal, suficientes factores están circulando en la sangre para mantener la coagulación, estos eventualmente se van agotando, el mecanismo falla y la hemorragia interna inicia. La muerte del animal ocurre de 3 a 8 días después de su ingestión (Porres, 1996). La combinación de hidroxycumarina y *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) sugiere que la mortalidad de los roedores podría ser debida a la acción de exotoxinas o endotoxinas de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) y al efecto del anticoagulante de manera conjunta.

6.2. Estudios *in vitro* para la determinación de factores de virulencia de *Salmonella enteritidis* var. 17 F- 4 (biovar. Issatschenko).

6.2.1. Determinación de la existencia de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 (biovar. Issatschenko) por medio de ensayos biológicos en células CHO y la purificación y caracterización parcial de las proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y de las proteínas periplasmáticas (PP) mediante geles SDS PAGE e Immunoblot.

Con relación a las toxinas bacterianas, en años recientes se ha demostrado la intervención de algunas enterotoxinas como factores importantes en los mecanismos de patogenia de muchas enfermedades diarreicas (Prasad *et al.*, 1990, Urquiza, 1993).

Algunos estudios han sugerido que en la patogenia de infecciones por *Salmonella*, existe la participación de proteínas con actividad enterotóxica del tipo de CT o LT que inducen elongación en células de ovario de hámster chino (CHO) (Fernandez *et al.*, 1988; Prasad *et al.*, 1992; Salyers y Whitt, 1994; Prasad *et al.*, 1990, Filkelstein *et al.*, 1983; Koupal y Deibel, 1975). Por otra parte se ha demostrado que existe una secuencia homóloga de DNA cromosomal entre algunas cepas de *Salmonella* (Evans *et al.*, 1974, Rutlier 1988) y los genes *ctxA* de CT y *elt A* de LT (Balcázar, 1993). Se ha comprobado que lisados de *Salmonella gallinarum*, inducen acumulación de líquidos en asas ligadas intestinales en rata (Verdugo *et al.*, 1994), y que las PSNC y PP de *S. gallinarum*, tienen actividad enterotóxica detectada mediante elongación en células CHO y un efecto de citotoxina capaz de producir lisis celular además de un efecto vacuolizante temprano, además en ensayos de *Immunoblot* se observó la existencia de reactividad cruzada entre las PP de *S. gallinarum* en su forma desnaturalizada y CT-A de *V. cholerae*, habiéndose empleado anticuerpos anti subunidad A de la toxina de *V. cholerae* (Urquiza, 1995).

Tomando en cuenta lo anterior y que las diarreas producidas por *V. cholerae*, *E. coli*, (Salyers y Whitt 1994, Chopra *et al.*, 1987; Evans *et al.*, 1973) *C. jejuni*, (Ruiz-Palacios *et al.*, 1983; Mizuno *et al.*, 1994) *S. typhi* (Roy *et al.*, 1985), *S. typhimurium* (Prasad *et al.*, 1990) y *S. gallinarum* (Pomeroy y Nagaraja, 1991, Urquiza, 1993) son de tipo secretor y que se desconocen los mecanismos de patogenia de *S. enteritidis* var. 17

F-4 (biovariedad Issatschenko), en este estudio, se sugirió que la cepa de este ensayo, sintetiza proteínas con actividad de enterotoxina, pudiéndose observar mediante ensayos de elongación en células CHO, además de tener reactividad cruzada con anticuerpos anti-CT, anti - LT, anti *S. gallinarum* y contra las Proteínas del Sobrenadante del Cultivo (PSNC) y las Proteínas Periplasmáticas (PP) de la misma *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) por medio de *Immunoblot*.

La actividad biológica de las enterotoxinas similares a CT, LT y CJT de *S. typhi* y de *S. typhimurium*, evaluadas *in vitro*, producen elongación de las células CHO, así como un incremento en la secreción de líquidos en asas ligadas intestinales ileales de rata, sugiriendo una similitud en el efecto entre las enterotoxinas de *S. typhi* y *S. typhimurium* con CT y LT (Gianella *et al.*, 1973; Fernandez *et al.*, 1988; Fukuta *et al.*, 1988).

Por otro lado, Kunkel *et al.*, (1975), demostraron la existencia de una enterotoxina de *S. enteritidis* que estaba muy relacionada a la membrana externa de la bacteria. Sadruddin (1981), Prasad *et al.*, (1990 y 1992); y Chopra *et al.* (1994), demostraron la existencia de una enterotoxina similar a CT producida por *S. typhimurium* y que inducía elongación en células CHO.

Se ha demostrado que es suficiente 1 µg /mL de CT de *V. cholerae* para producir una elevación de AMP cíclico intracelular en 18 diferentes líneas celulares de mamíferos y la respuesta máxima (elongación) en células CHO, se ha observado a las 24 horas posteriores a una exposición de CT (Green, *et al.*, 1983).

Por otra parte, se ha demostrado que CT de *V. cholerae* es liberada al medio y una mínima cantidad permanece en el espacio periplasmático (Salyers y Whitt, 1994; Moseley y Falkow, 1980; Shirji *et al.*, 1988; Spicer y Noble, 1982). En contraste, se ha observado que LT de ETEC es liberada al ambiente durante la fase estacionaria de crecimiento o cuando la membrana del espacio periplasmático es lisada por la acción de antibióticos (Salyers y Whitt, 1994; Fukuta *et al.*, 1988; Kunkel y Robertson, 1979; Eidels *et al.*, 1983, Hunt y Hardy, 1991; Mekalanos, 1985). En este estudio, se demostró que en *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) existen proteínas que son liberadas al ambiente (PSNC) y que también existen en el espacio periplasmático (PP). Las PSNC se encontraron en una concentración de 1.7mg/mL y las PP tuvieron 0.303 mg/mL, sin embargo, estas no indujeron elongación en células CHO, habiéndose expuesto a una

concentración de 18.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNC y 2.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PP, sin embargo, pudo observarse un efecto citotónico, tóxico y vacuolizante a las 48 horas posexposición.

La evidencia de falta de elongación en células CHO, tanto con las PSNC como con las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), aún después de las 96 horas posexposición, sugiere que la actividad biológica de estas proteínas es diferente a la de CT. En un trabajo realizado por Urquiza (1995), se demostró, que con 18.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNC y 21.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las PP de *S. gallinarum* se produjo elongación en células CHO a las 48 horas posexposición. Esta misma situación ha sido descrita por Díaz-Barroso *et al.*, (1995) y Díaz-Barroso (1997), para la enterotoxina de *Campylobacter jejuni* (CJT), cuya actividad específica en células CHO también es observada después de 48 horas posexposición. Cuando se evaluó CT comercial, usada como control positivo, la elongación fue observada a las 24 horas posexposición, mientras que en el PBS, CICC, Medio F-12 y la solución de dializado utilizados como controles negativos, no se observó elongación, aún después de 96 horas posexposición.

Un hallazgo interesante, es que en las células CHO expuestas, tanto a las PSNC como a las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), diluidas 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16, se observó un efecto temprano de vacuolización a las 24 horas posexposición, similar a lo descrito por Cover y Blazer (1992), Papini *et al.*, (1993) y Schmitt y Haas (1994), con *Helicobacter pylori* y Urquiza, (1996 y 1997^{140, 141}) con *S. gallinarum*, durante las primeras 24 horas posexposición. Por otra parte, las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), mostraron un efecto citotónico que fue observado entre las 48 y 72 horas posexposición. Estos hallazgos sugieren, que aunque no se observó efecto de elongación en células CHO, podrían existir componentes proteicos con actividad citotóxica, que ocasionan que las células se observen redondas en las primeras 24 horas posexposición y posteriormente recuperen su forma normal por lo que una vez que se evitara el efecto de cito tonicidad, posiblemente se expresaría el de enterotoxina, sugiriendo que dichas proteínas están relacionadas en el proceso de patogénesis en infecciones por *Salmonella*.

Urquiza (1995), encontró que con las PSNC y las PP de *Salmonella gallinarum* existía un efecto citotóxico al confrontarlas con células CHO. Este efecto fue eliminado al realizar diluciones dobles seriadas, observando elongación a las 48 horas posexposición. En este trabajo, a pesar de haberse diluido las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4

(biovariedad Issatschenko), no se logró observar el efecto de enterotoxina, pero sí un efecto citotónico, a partir de la dilución 1:2 hasta la dilución 1:16, posteriormente, en la dilución 1:32 las células se observaban normales desde las 24 horas posexposición.

Por otra parte, Urquiza (1995), optimizó el método de obtención de las proteínas de cada género bacteriano empleado, para que sus concentraciones en ese estudio fueran similares. Las cantidades de PSNC y de PP procedentes de cultivos de 24 horas de *ETEC*, *E. coli* HS, *V. cholerae* y *S. gallinarum* FVA-1, fueron en promedio muy similares (2.8 mg/mL), utilizando los métodos descritos para su extracción. Duhamel, (1970), detectó que la misma cantidad de proteínas se puede encontrar desde las primeras 6 horas de cultivo hasta las 24 horas, no así en este estudio con *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), quien a las 24 horas de crecimiento se encontró en promedio 0.303 mg/mL de PP y 1.7 mg/mL de PSNC.

En ensayos de *Immunoblot* realizados por Rahman *et al.*, (1994) y Hame *et al.*, (1994), demostraron la existencia de una enterotoxina de *S. typhimurium* y *S. newport* con un peso molecular aproximado de 100 kDa, pero que no estuvo antigénicamente relacionada con CT, LT o la toxina de *Shigella*. Las enterotoxinas de *S. typhimurium* y la de *S. typhi*, tampoco se unieron al gangliósido G_{M1}, aunque sí tuvieron actividad biológica en células CHO (Chopra *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 1994). Urquiza, (1995), encontró una banda en *S. gallinarum* FVA-1 de las PP, que tuvo un peso molecular aproximado de 66 kDa, teniendo relación con la subunidad A de CT, habiéndose empleado anticuerpos anti-CT-A y el extracto de PP de *S. gallinarum* FVA-1 produjo elongación en células CHO. Sin embargo, en el presente estudio, las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), empleando anticuerpos anti CT y dejándolos actuar más tiempo, tampoco fue posible la observación de bandas con reactividad positiva contra anti CT por medio de *Immunoblot*, no obstante con los anticuerpos anti LT y anti Sg y con anticuerpos anti PSNC y anti PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), fue posible la observación de bandas, las cuales por su PM (de 60- 97 kDa y menores a 45) son similares al PM de proteínas con actividad enterotóxica en *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis* y las toxinas CT y LT quienes han producido efecto de elongación en células CHO, por lo que se sugiere que las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), podrían tener mejor relación con la toxina LT que con CT y si se obtuvieran las proteínas purificadas, eliminando el efecto de

agregación de otras proteínas, posiblemente podrían tener el efecto de elongación en células CHO.

Por otro lado, el hecho de haber observado reactividad negativa con anti CT, no es indicativo de que las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) no tengan relación con CT, ya que los anticuerpos producidos en conejo fueron obtenidos mediante la inmunización con CT purificada comercial^m y no a partir de la cepa de *V. cholerae* de donde se podrían haber obtenido proteínas de agregación junto con CT, como en el caso de la cepa de la *Salmonella* en estudio, donde a partir del cultivo puro de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), se extrajeron las proteínas mediante la precipitación con sulfato de amonio obteniendo muchas otras proteínas. Cabe recordar que en este estudio tampoco fue posible la observación de las bandas de 66 kDa de *S. gallinarum* FVA-1 con la misma anti CT, probablemente debido a que las PP de *S. gallinarum* FVA-1, fueron producidos hace varios años y es posible que dichas proteínas ya tuvieran cierta degradación (Rasulova, *et al.*, 1998), sin embargo, con los anticuerpos anti PSNC y anti PP de *S. enteritidis*, anti LT de producción reciente y anti Sg conteniendo proteínas totales de *S. gallinarum* fue posible la observación de bandas con diferentes pesos moleculares.

Por otra parte, Prasad *et al.*, (1992), demostraron que la afinidad de la enterotoxina de *S. typhimurium* hacia G_{M1} fue 3,000 veces menor que la de CT, y Urquiza (1995), concentró las PP de *S. gallinarum* FVA-1 más de 20 veces para observar el efecto de elongación en células CHO y la banda de proteínas en *Immunoblot*, de aquí la importancia de realizar ELISA con G_{M1} a partir de las PSNC y de las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), para encontrar si existe afinidad o no hacia el gangliósido G_{M1}, u otros ensayos con receptores diferentes concentrando posiblemente aún más. En el presente trabajo, la forma de obtención de proteínas fue con sulfato de amonio al 70%, concentrando 17 veces las PSNC y 22 veces las PP para la realización de ensayos celulares e *Immunoblot*, mientras que en otros ensayos se ha empleado desde el 60% hasta el 90% (Evans *et al.*, 1974; Angeles, 1986; Rahman *et al.*, 1992; Filkestein *et al.*, 1983), y en otros trabajos, las proteínas fueron

^m List biological Laboratories, Inc. Campbell CA, USA

concentradas desde 6 a 30 veces a través de membranas de ultrafiltración^a (Duhamel *et al.*, 1970; Evans *et al.*, 1974; Filkelstein *et al.*, 1983; Kunkel, 1979). En vista de que se ha demostrado que la enterotoxina de *S. typhi* parece tener un receptor diferente a G_{M1} de las membranas eucarióticas (Chopra *et al.*, 1987) y que la enterotoxina de *S. typhimurium* puede ser neutralizada por una antitoxina de cólera y su efecto biológico en células CHO es bloqueado por el gangliósido G_{M1} (Chopra *et al.*, 1987; Kazimierz, 1973), sería conveniente que para estudios posteriores se purifiquen y caractericen las proteínas producidas de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) para conocer su actividad y comprender el papel de dichas proteínas dentro de la patogénesis de esta especie, así como el posible reconocimiento hacia los receptores de membrana G_{M1}, en ensayos de ELISA y determinar que proteínas de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) pueden producir elongación en células CHO, determinar su efecto en otras líneas celulares, así como la inhibición de citotoxicidad, citolicidad y vacuolización mediante el empleo de anticuerpos anti PSNC y anti PP de la Salmonela en estudio.

Por otro lado, debido a que la actividad biológica de las enterotoxinas similares a CT y LT de *S. typhimurium*, evaluadas *in vitro*, también producen una elongación en células CHO, así como un incremento en la secreción de líquidos en asas ligadas intestinales ileales de ratón, sugiriendo una similitud en el mecanismo de patogenia entre las enterotoxinas de *S. typhi* y *S. typhimurium*, con CT y LT subunidad A (Fernandez *et al.*, 1988; Chopra *et al.*, 1994; Gianella *et al.*, 1973; Fukuta *et al.*, 1988), se podrían evaluar las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) en ensayos biológicos como es el asa ileal ligada de ratón o su administración por vía oral en ratones y otras especies.

Si bien en los estudios realizados por Balcázar (1993), se demostró que *S. gallinarum* posee una secuencia nucleotídica homóloga con un fragmento del gene *elt A* de ETEC en un 95% y con el gene *ctx A* de *V. cholerae* en un 83% y que en los estudios realizados por Urquiza^{140, 141} *et al.* (1997), se observó que anticuerpos anti CT tuvieron reactividad positiva hacia las PP de *S. gallinarum*, en este ensayo, se obtuvo mejor reactividad de los anticuerpos anti LT contra las PP de *S. gallinarum* y las PSNC y las PP

^a Amicon Corp., Lexington, Mass.

de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), estos resultados sugieren que las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), son más parecidas a *LT*.

Cabe mencionar que la reactividad observada con anti *LT* contra las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) y las PP de *S. gallinarum*, podrían discriminar diferentes bandas de proteínas por medio de *Immunoblot*, las cuales son visibles empleando anticuerpos totales anti *Sg*. Dicha discriminación podría emplearse como una herramienta de diagnóstico para la diferenciación entre algunas cepas de *Salmonella* y buscar alguna metodología alternativa más sencilla para la diferenciación entre cepas de este género.

CONCLUSIONES

Salmonella enteritidis var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) al ser inoculada en ratones Albino Suizo (*Mus musculus*), y ratas cepa Wistar (*Rattus rattus*), produjo signología clínica de Salmonelosis después de 6 días posinoculación, y se logró recuperar la bacteria a partir de la mortalidad después de que fueron muriendo los animales, hasta el término del ensayo (20 días), en el que aún había animales sobrevivientes, y a partir de las heces, el aislamiento a *Salmonella* spp fue positivo en los primeros días posadministración de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), por lo que se comprobó que es patógena para dichas especies.

Salmonella enteritidis var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), no produjo signología clínica de salmonelosis, mortalidad ni eliminación bacteriana en heces de conejos infectados experimentalmente, por lo que se considera inocua para dicha especie.

En cobayos inoculados experimentalmente con *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), a pesar de la mortalidad obtenida, no hubo recuperación de la bacteria a partir de los órganos internos de los animales muertos, ni de los sobrevivientes después de haberlos sacrificado y tampoco a partir de las heces. Se desconocen los motivos del por qué murieron estos animales.

En pollos de engorda de 1 y 8 días de edad y en pollitos Leghom de un día de edad, *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) inoculada experimentalmente,

de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), estos resultados sugieren que las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), son más parecidas a LT.

Cabe mencionar que la reactividad observada con anti LT contra las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) y las PP de *S. gallinarum*, podrían discriminar diferentes bandas de proteínas por medio de *Immunoblot*, las cuales son visibles empleando anticuerpos totales anti Sg. Dicha discriminación podría emplearse como una herramienta de diagnóstico para la diferenciación entre algunas cepas de *Salmonella* y buscar alguna metodología alternativa más sencilla para la diferenciación entre cepas de este género.

CONCLUSIONES

Salmonella enteritidis var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko) al ser inoculada en ratones Albino Suizo (*Mus musculus*), y ratas cepa Wistar (*Rattus rattus*), produjo signología clínica de Salmonelosis después de 6 días posinoculación, y se logró recuperar la bacteria a partir de la mortalidad después de que fueron muriendo los animales, hasta el término del ensayo (20 días), en el que aún había animales sobrevivientes, y a partir de las heces, el aislamiento a *Salmonella* spp fue positivo en los primeros días posadministración de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), por lo que se comprobó que es patógena para dichas especies.

Salmonella enteritidis var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), no produjo signología clínica de salmonelosis, mortalidad ni eliminación bacteriana en heces de conejos infectados experimentalmente, por lo que se considera inocua para dicha especie.

En cobayos inoculados experimentalmente con *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko), a pesar de la mortalidad obtenida, no hubo recuperación de la bacteria a partir de los órganos internos de los animales muertos, ni de los sobrevivientes después de haberlos sacrificado y tampoco a partir de las heces. Se desconocen los motivos del por qué murieron estos animales.

En pollos de engorda de 1 y 8 días de edad y en pollitos Leghom de un día de edad, *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) inoculada experimentalmente,

produjo niveles bajos de mortalidad en la primera semana posinoculación, así como eliminación esporádica de la bacteria en heces en los primeros dos días posinoculación. En pollo de engorda la mortalidad fue mínima (1/32) y se logró el reaislamiento de la bacteria inoculada así como de los pollitos Leghorn que murieron. Se sugiere realizar estudios posteriores para determinar la significancia de estos hallazgos, debido a que también fue posible el reaislamiento de la bacteria inoculada a partir de los órganos internos de una de las aves que sobrevivió.

Salmonella enteritidis var. 17 F-4 (biovariedad Issatschenko), produce proteínas que se liberan al medio (PSNC) y además contiene proteínas en el espacio periplasmático (PP), las cuales son capaces de producir efecto de citotónico en células CHO después de las 48 horas posexposición, así como el efecto de vacuolización temprana en células CHO antes de las 24 horas posexposición; lo que pudiera sugerir la existencia de una citotoxina que produce los focos necróticos que se observaron en los ratones infectados experimentalmente. Por otra parte, se observó mejor reactividad de los anticuerpos anti *LT* contra las PP de *S. gallinarum* y las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4(biovariedad Issatschenko), sugiriendo que las PSNC y las PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4(biovariedad Issatschenko), son más parecidas a *LT* que a *CT* y sería el primer reporte descrito para esta especie.

Aún se conoce poco acerca de la patogenia de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 (biovar. Issatschenko) y por todo lo antes expuesto, se sugiere realizar ensayos para encontrar la dosis letal 50% y la inhibición de mortalidad en roedores (protección), y desafíos con mejor control en animales clínica y subclínicamente sanos, así como en aves y otros animales domésticos para conocer su virulencia, y el efecto del posible papel de las proteínas con actividad citotónica y citotóxica y los LPS de dicha *Salmonella*, en combinación con el anticoagulante del RBC.

Abreviaturas

Biovar.	Biovariedad
CAA	Caldo Casaaminoácidos
CICC	Caldo Infusión Cerebro Corazón
CJT	Enterotoxina de <i>Campylobacter jejuni</i>
CN	Caldo Nutritivo
CT	Toxina Termolábil de <i>V. Cholerae</i>
CT-A	Subunidad A de la toxina de <i>V. Cholerae</i>
CT-B	Subunidad B de la toxina de <i>V. cholerae</i>
Ctet	Caldo tetrionato
CHO	Células de Ovario de Hamster Chino
D.O.	Densidad Óptica
<i>E. coli</i> HS	<i>Escherichia coli</i> no enterotoxigénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
G _{M1}	Receptor de membrana (Gangliósido)
kDa	Kilodaltons
LT	Enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i>
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PM	Peso Molecular
PP	Proteínas Periplasmáticas
PSNC	Proteínas del Sobrenadante del Cultivo
PT	Fagotipo
RBC	Rodenticida Biológico comercial
rpm	Revoluciones por minuto
SSF	Solución Salina Fisiológica
ST	Toxina termoestable de <i>E. Coli</i>
TLIA	Tejido Linfoide Intestinal Asociado
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
VB	Agar Verde Brillante

REFERENCIAS

- 1 **Anónimo.** Salmonox. www.Intewe.com/salmonox.html 1997.
- 2 **Hassan JO, Curtiss III R.** Development and evaluation of an experimental vaccination program using immunized a live avirulent *Salmonella typhimurium* strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologus *Salmonella* serotypes. *Infect Immun* 1994;62:5519-5527.
- 3 **Madden DL, Fujiwara K.** In *The mouse in biomedical research*. Vol. IV. Foster H L., Small J David and Fox JG, editors. Selected bacterial diseases. Academic press, 1982:262-263.
- 4 **Jawetz E, Melnick J L, Adelberg E A.** *Microbiología Médica*. 14a ed. El Manual Moderno, México, D.F., 1992.
- 5 **Anónimo:** All about *Salmonella*. *Misset World Poultry* 1992;4:25-27.
- 6 **Rivera MJ, Rivera N, Castillo J, Rubio MC, Gomez-Lus R.** Molecular and epidemiology study of *Salmonella* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1991;29: 927-932.
- 7 **Ashton WLG.** *Poultry diseases*. In: Jordan FTW. editor. *Fowl typhoid*. 3rd Ed. Baillière Tindall, London, England, 1990:11-31.
- 8 **Ewing HW.** *The genus Salmonella*. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co. Identification of Enterobacteriaceae. New York, 1986.
- 9 **Yongsheng H, James E K, Kathy E F.** Detection of *Salmonella* serogroup B and differential identification of *S. typhimurium* and *S. typhimurium* copenhagen using monoclonal antibodies. URL:<http://www.anl.usda.gov/ttic/tektran/data/000007/05/0000070587.html>. 1997.
- 10 **Euzeby JP.** Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kaufman and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. Nov., nom. Rev. As the neotype species of the genus *Salmonella* lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int J Sys Bacteriol* 1999;49:927-930.

- 11 **Davies BD, Dubelco R, Eisen HN, Grisberg HS, Wood WB.** Tratado de microbiología. 2da ed. Barcelona, España: Salvat, 1979.
- 12 **Bouzouba K, Nagaraja VK, Newman AJ, Pomeroy SB.** Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. Avian Dis 1987; 31:699-704.
- 13 **Chopra KA, Houston WC, Peterson WJ, Prasad R, Mekalanos JJ.** Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. J Bacteriol 1987;169:5095-5099.
- 14 **Cox NA, Bailey JS.** Salmonela en la avicultura. El problema y la intervención en la investigación. Memorias del curso de actualización sobre *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter* en las aves domésticas. ANECA; 1991 octubre 10-11; México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1991:1-3.
- 15 **Snoeyenbos GH, Williams JE.** Diseases of Poultry. Edited by Calnek B W. *Salmonellosis*. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1991:72-86.
- 16 **Davies RH, Wray C.** Mice as carries of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units. Vet Rec 1995;137: 337-341.
- 17 **Salyers A A, Whitt DP.** Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. *Salmonella* infections. American Society for Microbiology Press. Washington (DC), 1994:229-243.
- 18 **Comité de expertos de la OMS.** Control de la salmonelosis: Importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal: Organización Mundial de la Salud. Serie de informes técnicos 744, Ginebra, Suiza 1988; 9-11.
- 19 **Acha P N, Szyfres P.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2ª ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC 1992.
- 20 **Kazimierz W.** Prospects for biological control of rodent populations. Bull. Org. Mon. Santé 1973; 48: 461-467.
- 21 **Urquiza BO.** Causas de diarreas en aves domésticas. IV Jornada Médico Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México (DF) 1993, agosto; México (D F), 1993:245-249.

- 22 Hecht EG. Health hazards for man. Baker HJ, Russell LJ, Weisbroth SH editors. Salmonellosis (*Salmonella* sp.) The laboratory rat. Vol.1. Accademic Press. Inc, 1979:404-410.
- 23 Freeman B A. Microbiología de Burrows. 22ª ed. Ed. Interamericana, Mexico, D.F. 1989.
- 24 Gillingham S. Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis*, International Poultry Consultants. Cambridge. Ontario, Canada., 1993:1-8.
- 25 Urquiza BO, Castañeda E, Tavera S, Valladares JC. El diagnóstico de *Salmonella* sp en aves domésticas en los últimos 12 años. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET); 1994 Octubre 10-14; Acapulco, Guerrero, México (DF): 1994; 149.
- 26 Nagaraja KV, Pomeroy BS, Williams JE. Diseases of Poultry. Calnek. B.W. editor. Paratyphoid Infections. Iowa State University Press, Ames Iowa, 1991:99-130.
- 27 Urquiza BO, Alcalá, IA y Téllez IG. Infección experimental de *Alphitobius diaperinus* con *Salmonella enteritidis* PT13-A durante 6 días. Los avicultores y su entorno 1998; Febrero- Marzo 39-45.
- 28 Ghoneim N. Roedores en granjas avícolas. Importancia económica y control. Memorias del curso Producción y Sanidad Avícola; 1996 enero-marzo; Cairo (Egipto). Egipto: Centro Egipcio Internacional de Agricultura (EICA):1996.
- 29 Porres HH. Biología, hábitos y control de roedores. Boletín Zeneca Mexicana, S.A. de C.V. Laboratorios. Departamento de Salud Pública. México, D.F. 1996;1-15.
- 30 U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. Veterinary Services, Publication APHIS, U.S. Government Printing Office. August, 1989;91-40.
- 31 Steven H W. Salmonellosis (*Salmonella* sp.) The laboratory rat. Vol.1. Baker H J, Russell L J, Weisbroth SH. editors. Biology and diseases. Accademic Press. Inc, 197:219-225.
- 32 Pomeroy B S, Nagaraja K V. Fowl typhoid. Calnek BW, Barnes HJ, Heard CW, Raid WM, Yoder HW. Editors.. Diseases of Poultry Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1991:87-98.

- 33 **Padrón NM.** Control y prevención de la tifoidea aviar en las aves reproductoras pesadas. II Jornada Médico Avícola. DPA: Aves Fac. Med. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. José Antonio Quintana López y Carlos López Coello editores. México (DF) 1991;128-149.
- 34 **Urquiza BO.** Paratifoideas. Memorias de la III Jornada Médico Avícola, F.M.V.Z.; U.N.A.M., México. México (D F); 1992:235 - 239.
- 35 **Urquiza BO.** Enfermedades de las aves de importancia sanitaria nacional que se encuentran bajo proceso de control y erradicación. Sistema de Producción Animal 1: Aves. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. , División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia. Xóchitl Hernández Velasco, Ernesto Bachtold Gómez y Octavio Rivera Vergara Editores. Salmonelosis Aviar, 1998:137-144.
- 36 **Arnold JW, Holt PS.** Response to *Salmonella enteritidis* infection by the immunocompromised avian host. Poultry Sci 1995;74:656-665.
- 37 **Schat K A, Myers T.J.** Avian Intestinal Immunity. Crit Rev Poutl Biol 1991;3:19-34.
- 38 **Mosqueda TA.** Medidas Sanitarias para prevenir la Tifoidea Aviar. Memorias del VII Curso sobre el control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México. 1987. Comisión permanente para el control y erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar, 1987: 22-32.
- 39 **Cooper LG, Thoms JC.** Evaluation of SEF14 fimbrial dot blot and flagellar western blot tests as indicators of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. Vet Rec 1996;38:49-153.
- 40 **Poppe C, McFadden KA, Brouwer AM, Demezuk W.** Characterization of *Salmonella enteritidis* strains. Can J Vet Res 1993;57:176-184.
- 41 **García MA, Téllez IG, García EG, Valladares de la CJC, Urquiza BO.** Determinación de la existencia de *S. enteritidis* serotipo enteritidis a partir de 95 aislamientos de *Salmonella* sp provenientes de brotes de campo de aves domésticas. Vet Mex 1996;27:343-345.

- 42 **Padrón N M.** Generalidades sobre pulorosis y tifoidea aviar. Memorias del VII Curso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, 1987. Comisión Permanente para el control y Erradicación de la Pulorosis y Tifoidea Aviar. México, D.F. 1987: 13-20 .
- 43 **Whiteman EC, Bicckford A A.** Manual de Enfermedades de las Aves. 2a ed. Asociación Americana de Patólogos Aviáres, Kennett Square, Pennsylvania, 1983.
- 44 **Songer G.** Diseases caused by members or the gennus *Salmonella*. www.mocrovet.arizona.edu/courses/MIC420/lecture_1997.
- 45 **Runnells RA, Monlux WS, Monlux AW.** Principles of Veterinary Pathology. Digestive System. The Iowa State University Press, 1960:478-486.
- 46 **Ruttler JM.** Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Roth, A.J. Editor. Bacterial toxins as a virulence determinants of veterinary pathogens: an overview. Library of Congress Cataloging in Publication Data. American Society of Microbiology. Ames, Iowa Sate University, 1988:213- 227.
- 47 **Tsuji T, Inone T, Miyama A, Okamoto K, Honda T, Miwatani T.** A single aminoacid substitution in the A subunit of *Escherichia coli* enterotoxin results in a loss of its toxic activity. J Biol Chem 1990; 256:22520-22525.
- 48 **Perez-Perez IG, Taylor ND, Echeverría DP, Blaser JM.** *Campylobacter jejuni*. Nachamkin I, Blaser JM, Tomkins SL, Editors. Lack evidence of enterotoxin involvement in pathogenesis of campylobacter diarrhea. Current Status and future trends. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1992: 184-192.
- 49 **Koupal RL, Deibel HR.** Assay characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella* . Infect Immun 1975; 11:14-22.
- 50 **Prasad R, Chopra KA, Parvathi Ch, Peterson WJ.** Expression and characterization of cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin. Microb Pathogen 1992;13:109-121.
- 51 **Sandefur DP, Peterson WJ.** Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of chinese hamster ovary cells by Cholera antitoxin. Infect Immun 1977;15: 988-992.

- 52 **Suárez GF.** Bacteriología general, principios químicos biológicos. Editado por Pérez MJ, Suárez GF, Flores CR. Mecanismos de patogenidad bacteriana. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1990:363-399.
- 53 **Urquiza BO.** Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum*. (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
- 54 **Betley JM, Miller LV, Mekalanos JJ.** Genetics of bacterial enterotoxins. *Ann Rev Microbiol* 1986;40:577-605.
- 55 **Holmgren J.** Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature* 1981;292:413-417.
- 56 **Hunt DP, Hardy SJS.** Heat-Labile enterotoxin can be release from *Escherichia coli* cells by host intestinal factors. *Infec Immun* 1991;59:168-171.
- 57 **Mekalanos JJ, Collier JR, Roming RW.** Enzymatic activity of cholera toxin. II Relationship to proteolytic processing, disulfide bond reduction and subunit composition. *J Biol Chem* 1979;254:5855-5861.
- 58 **Middlebrook LJ, Dorland B R.** Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiol Rev* 1984;48:199-221.
- 59 **Spangler DB.** Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992;56:622-647.
- 60 **Mekalanos, JJ.:** Cholera toxin: Genetic Analysis, Regulation, and role in pathogenesis. *Current topics in Microbiol. and Immun.* 1985; 118:97-118.
- 61 **Cuatrecasas P.** Interaction of *Vibrio cholerae* enterotoxin with cell membranes. *Biochemistry* 1973;18:3547.
- 62 **Eidels L, Proia LR, Hart A.** Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol Rev* 1983; 47:596-620.

- 63 Filkelstein A R, Marchlewiks A B, Mcdonald J R, Boesman-Finkelstein M. Isolation and characterization of a cholera-related enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. FEMS Microbiol Lett 1983;17:239-246.
- 64 Lopez-Vidal Y, Angeles V, Pech MD, Ruiz-Palacios MG. Monoclonal antibodies against *Campylobacter jejuni* enterotoxin. Proceedings of the fifth International Workshop on *Campylobacter* Infections. *Campylobacter V*. 1981; Puerto Vallarta, Mexico, 1981, Guillermo M. Ruiz-Palacios, Edmundo Calva y Beatriz R. Ruiz-Palacios editors. Mexico, D.F. 1981; 206-208.
- 65 Moseley SL, Falkow S. Nucleotide sequence homology between the heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* deoxiribonucleic acid. J Bacteriol 1980;144:444-446.
- 66 Shinji F, Magnani JL, Twiddy EM, Holmes, RK, Ginsburg V. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. LT_H-I, LT_H-IIa and LT_H-IIb. Infect Immun 1988; 52:1748-1753 1988.
- 67 Spicer EK, Noble J A. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: nucleotide sequence of the A subunit gene. J Biol Chem 1982; 257: 5716-5721.
- 68 Kunkel LS, Robertson CD. Purification and characterization of the Heat-Labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect and Immun 1979; 25: 586-596.
- 69 Evans JD J Jr, Evans GD, Gorbach SL. Polymixin B-induced release of low-molecular-weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. Infect Immun 1974;10: 1010-1017.
- 70 Timmis K N, Montenegro M A, Bulling E, Chakraborty T, Sanyal S. Genetics of toxin synthesis in pathogenic gram-negative enteric bacteria. JE Alont, editors. Bacterial Proteins Toxins, London, 1991:12-27,
- 71 Fukuta S, Magnani LJ, Twiddy ME, Holmes KR, Ginsburg V. Comparison of carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT_H-I, LT_H-IIa, LT_H-IIb. Infect Imm 1988;11:445-452.
- 72 Dallas SW, Gill MD, Falkow S. Cistrons encoding *Escherichia coli* heat labile toxin. J Bacteriol 1988;139:850-858.

- 73 **Green A B, Neill J R, Ruyechan T W, Holmes K R.** Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucariotic target cells is not plasmid mediated. *Infect Imm* 1983; 41:383-390.
- 74 **Daikoku T, Kawuaguchi M, Takama K, Suzuki S.** Partial purification and characterization of enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1990;58:2414-2419 .
- 75 **Diaz-Barroso A, Lopez-Vidal Y, Cervantes L E, Ruiz-Palacios GM.** Partial purification and immunological characterization of *Campylobacter* enterotoxin. Abstracts of 95th General Meeting American Society of Microbiology; 1995 mayo 21-25; Washington DC: American Society of Microbiology, 1995: 182.
- 76 **Angeles MV.** Obtención y caracterización de la enterotoxina de *Campylobacter jejuni* (tesis de licenciatura). México (DF) Facultad de Ciencias Biológicas. IPN. 1986.
- 77 **Calva E, Torres J, Vazquez M, Angeles V, de la Vega, H, Ruiz-Palacios GM.** *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes. *Gene* 1989;75:243-25.
- 78 **Gill MD, Meren R.** ADP-rybosilation of membrane protein catalyzed by cholera toxin:basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75:3050-3054.
- 78 **Konkel EM, Lobet Y, Cieplak W Jr.** *Campylobacter jejuni*, Current Status and future trends. Nachamkin I, Blaser, J M, Tomkins S L editors. Examination of multiple isolates of *Campylobacter jejuni* for evidence of cholera toxin-like activity. American Society for Microbiology, Washington, DC., 1992:193-198.
- 80 **Ruiz-Palacios GM, Torres N, Escamilla, E, Ruiz-Palacios, RB, Tamayo J.** Cholera like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni* characterization and clinical significance. *Lancet* 1983;2 :250-253.
- 81 **Suzuki S, Kaguaguchi M, Mizuno K, Takama K, Yuki N.** Immunological properties and ganglioside recognitions by *Campylobacter jejuni*-enterotoxin and cholera toxin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;8:207-21.

- 82 Walker IR, Cadwel MB, Lee, CE, Guerry, P, Trust JT, Ruiz-Palacios MG. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis, *Microbiol Rev*;1986;50:81-94.
- 83 Fernandez M, Sierra-Madero J, de la Vega H, Vazquez M, Lopez-Vidal Y, Ruiz-Palacios MG, Calva E. Molecular cloning of a *Salmonella typhi* LT- like enterotoxin gene. *Mol Microbiol* 1988;2:821-825.
- 84 Chopra KA, Brasier RA, Das M, Xin-Jing Xu, Peterson WJ. Improved synthesis of *Salmonella typhimurium* enterotoxin using gene fusion expression systems. *Gene* 1994;144:81-85.
- 85 Gianella R A, Formal SB, Dammin GJ, Collins H. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion and morphologic reactions in rabbit ileum. *J Clin Invest* 1973; 52:441-453.
- 86 Balcázar QJ. Determinación de la existencia de un gene para una enterotoxina LT *like* en *Salmonella gallinarum*. (tesis de licenciatura). México. (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
- 87 Verdugo-Rodriguez A, Balcazar J, Urquiza BO, Suarez F, Quintana LA, Calva E, Lopez-Vidal Y. Partial characterization of a *Salmonella gallinarum* elt A-like gene. 65th^o. Second Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis. Bangkok, Thailand, 1994:65.
- 88 Biofam, Lab. Expediente de registro Biorat, 1996. Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba.
- 89 Espino LL R, Montero G, Bomote J, Díaz M. Influencia de los factores ambientales sobre un biopreparado microbiológico contra roedores dañinos. *Rev Cub Cienc Vet* 1989;20:267-278.
- 90 Villafaña F, Montero G, Diaz M, Bomote J. Efectividad del rodenticida Salmocumarin en objetivos pecuarios y urbano. *Rev Cub De Med Trop* 1995; Jul-Dic.
- 91 Urquiza BO, Nava GM, Paasch ML, Jandet H, Fehervari T, Espino R, Fustes E, Fraga A, Téllez I G. Determinación de la inocuidad de *Salmonella enteritidis* var 17 F-4, en un rodenticida biológico comercial en pollitos leghorn de un día de edad. Memorias del XV Congreso Latinoamericano de Avicultura México, 1997 Septiembre 23-26; Cancún (Q. Roo). México (DF), 1997: 369-372.

- 92 **Urquiza BO, Nava GM, Paasch ML, Jandet H, Fehervari T, Espino R, Fustes E, Fraga A, Téllez IG.** Determinación de la inocuidad de *Salmonella enteritidis* var 17 F-4, en un rodescida biológico comercial en pollitos leghorn de un día de edad. Memorias del XV Congreso Latinoamericano de Avicultura México, 1997 Septiembre 23-26; Cancún (Q. Roo). México (DF), 1997:373-377.
- 93 **Ward RL, De Sa HDJ, Rowe BA** phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epiem Inf* 1987; 99:291-294.
- 94 **Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993:** Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Diario Oficial. México (DF):Septiembre, 1994.
- 95 **Villegas P, Graham P.** Titration of biological suspensions. Isolation and identification of avian pathogens. 2nd ed. New York : The American Association of Avian Pathologists 1980.
- 96 **Andrews WH, Poelma PL, Wilson CR, Romero A.** Isolation and identification of *Salmonella*. In: bacteriological analytical and manual, 5th ed. Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists, 1978:1-29.
- 97 **Williams JE, Mallinson, ET, Snoeyenbos GH.** Salmonellosis and Arizonosis. Isolation and identification of avian pathogens. Edited by Hitchner S.B, Domermuth Ch H, Purchase H G, Williams JE, The American Association of Avian Pathologists second edition. 1980:1-8.
- 98 **Roy SK, Speelman P, Butler T, Nath S, Rahman H, Stoll BJ.** Diarrhoea associated with typhoid fever. *J Infect Dis* 1985;151:1138-1143.
- 99 **Gordon K.** Tissue processing. Bancroft J F and Stevens A editors. Theory and practice of histological techniques. 2d. edition. Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York, 1982:41-60.
- 100 **Evans GD, Evans JD Jr Pierce FN.** Differences in the response of rabbit small intestine to Heat-Labile and Heat-Stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1973; 7:873-880.
- 101 **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram cuantitative of proteins utilizing the principal of proteins dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

- 102 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- 103 Rahman H, Singh VB, Sharma VD. Purification and characterization of enterotoxigenic moiety present in cell-free culture supernatant of *Salmonella typhimurium*. *Vet Microbiol* 1994;39: 245-254.
- 104 Rahman H, Singh VB, Sharma VD, Hame, SD. *Salmonella* cytotoxic and cytolytic factors: their detection in Chinese hamster ovary cells and antigenic relatedness. *Vet Microbiol* 1992;31:379-387.
- 105 Guerrant LR, Brunton LL, Schnaiman CT, Rebhun IL, Gilman GA. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: A rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1974;10:320-327.
- 106 Díaz-Barroso A. Caracterización inicial de la enterotoxina de *Campylobacter*. (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Química. UNAM, 1997.
- 107 Leslie PH. The bacteriological classification of the principal cultures used in rat and mouse control in Great Britain. *J of Hyg* 1941;42:552-562.
- 108 Danysz J. Un microbe pathogène por les rats. *Ann Inst Pasteur* 1900;14: 193-201.
- 109 Danysz J, Skrzynski Z. Essais d'immunization des petits rongeurs contre les paratyphiques naturellement pathogènes por ces animaux. *Ann Inst Pasteur* 1914;55-70.
- 110 *Salmonella* Subcommittee (Nomenclature Co. Int.Soc.Microbiol.) The genus *Salmonella* Lignigeres, 1900. *J Hyg Camb* 1934;34:333-350.
- 111 Urquiza BO, Téllez IG, Paasch ML, Diaz BA, Ruiz-Palacios G. Determination of proteins with enterotoxigenic activity CT like in *Salmonella enteritidis* var. Danysz. *Memorias de 4th International symposium on typhoid fever and other salmonellosis*. Taipei, China. Dec. 1999.
- 112 Urquiza BO, Téllez IG, Paasch ML, Díaz BA, Ruiz-Palacios G. Determinación de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT en *Salmonella enteritidis* biovar. *Issatschenko. Memorias de IX Congreso Nacional de la Sociedad de Patólogos Veterinarios; 2000 Mayo 24-27; Gómez Palacios (Durango) México. México (DF): SPMV AC, 2000:11.*

- 113 **Le Minor L.** Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. Kregg N R and Holt J G, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 1*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984:427-458.
- 114 **Ketelborn.** Catalogue of *Salmonella* first isolations 1965-1984. Boston/Lancaster: Martinus Nijhof. 1987.
- 115 **Mancera M A I, Vázquez N J, Heneidi Z A.** Situación actual de la *Salmonella enteritidis*, su distribución y posible origen. Memorias de la XXI Convención Anual de ANECA; 1996 Mayo 1-5; Cancún (Quintana Roo) México: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1996:245-247.
- 116 **Mainas E, Balis E, Kanelopoulou M, Threlfall J, Malamou-Lada H, Vatopoulou A, Kalapothaki V, Legakis N.** Antibiotic resistance in *Salmonella enteritidis* clinical isolates in Greece. *Acta Microbiol Hell* 1994;143-153.
- 117 **Bykovskii AV, Kandybin VN.** Rodent pest management. Ishuar Prakash. Biological principles, development, and perspectives of the use bacteria and viruses. CRC Press, Inc. Boca Raton Flo, 1988: 377-382.
- 118 **Threlfall E J, Ridley, A.M., Ward, L.R. and Rowe, B.** Assessment of health risk from *Salmonella* based rodenticides. *The Lancet* 1996;348:616-617.
- 119 **Threlfall EJ.** Report on work carried out on *Salmonella enteritidis* var. Issatschenko. Public Health laboratory Service (PHLS). October 9, 1996.
- 120 **Nelli A, Podesta A, Stazzi A.** Observations and studies on infectivity of *Salmonella enteritidis* var. Danysz. *Ig Mod* 1970; 63:57-66.
- 121 **Morilla GA.** Inmunología Veterinaria Cap III Inmunización. *El Manual Moderno*. México, (DF) 1989:372.
- 122 **Ishibashi Y, Arai T.** A possible mechanism for host-specific pathogenesis of *Salmonella* serovars. *Microb Pathog* 1996;6:435-446.

- 123 **Claus WC.** Microbial nutrition, metabolism and growth. Carter CR, Chengappa MM. 4th edition. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1991. Printed in USA. 16-39
- 124 **Schroeter A, Bockhorst W, Hartung M, Protz D, Helmuth R.** Incidence of *Salmonella enteritidis* phage type 6a in Germany. Bundesgesundheitsblatt 1995;38:10-12.
- 125 **Sharma JM.** The structure and function of the avian immune system. Acta Vet Hung 1997;45: 229-238.
- 126 **Aviña GL, Embriz MC, Téllez IG, Paasch ML, Valladares de la Cruz JC, Urquiza BO.** Evaluación de la inocuidad, posible respuesta antigénica y transmisión ovárica de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 en gallinas de postura libres de patógenos específicos (SPF). Memorias del la XXV Convención Anual de ANECA; 2000 mayo 3-6; Cancún, (Q. Roo), México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas AC, 2000:31-36.
- 127 **Barranco GR, Téllez IG, Paasch ML, Urquiza BO.** Evaluación de la inocuidad de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F- 4 en gallinas de postura comercial. Memorias del la XXV Convención Anual de ANECA; 2000 Mayo 3-6; Cancún, Q. Roo, México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas AC, 2000: 37- 40.
- 128 **Opitz MH.** Progress being made in *Salmonella enteritidis* reduction on the farm. Poultry Dig 1992;16-22.
- 129 **Gast KR.** Aplicación de los modelos experimentales para comprender y detectar las infecciones por *Salmonella enteritidis* en pollos. Memorias del curso de actualización sobre el control y prevención de la infección por *Salmonella enteritidis*. ANECA; 1994 febrero 24 y 25; México, DF. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas AC, 1994:1-7.
- 130 **Pascal M.** Perspectives de lutte biologique contre les rongeurs champêtres. <http://www.infra.fr/dpenv/pascac19.htm> (22/03/99)
- 131 **Kunestova OS, Ostedkin YuS.** Selection and storage of Isachenko's bacterium (*Salmonella enteritidis*) for the production of the rodenticide Baktorodantsid. Veterinariya, Moscow, URRS 1985;1:68-70.

- 132 Trakhanov DF, Kadirov A F. Izuchenie vospriimchivosti porosyat k bakteriyam Isachenko. Probl Vet Sanit 1972; 42:248-253.
- 133 Baker HJ, Rusell LJ, Weisbroth SH. Bacterial and Mycotic diseases. The laboratory rat. Vol I, Biology and diseases. Academic Press, Inc. USA, 1979:219-225.
- 134 Prasad R, Chopra KA, Peterson WJ, Pericas R, Houston W. Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. Microb Pathogen 1990;9:315-329.
- 135 Mizuno K, Takama K, Suzuki S. Characteristics of cytotoxin produced by *Campylobacter jejuni* strains. Microbios 1994;78:215-228.
- 136 Sadruddin FHJ: Probing for enterotoxigenicity among the salmonellae: an evaluation of biological assays. J Clin Microb 1981;14:463-472.
- 137 Cover LT, Blaser JM. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biological Chem 1992;267:10570-10575.
- 138 Papini E, Bugnoli M, De Bernard M, Figura N, Rappouli R, Montecucco C. Bafilomycin A1 inhibits *Helicobacter pylori*-induced vacuolization of HeLa cells. Mol Microbiol 1993;7: 323-327.
- 139 Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. Mol Microbiol 1994; 12:307-319.
- 140 Urquiza BO, Verdugo-Rodríguez A, López-Vidal Y, Suárez GF, Quintana LJA. Purificación y Caracterización Parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum*. Memorias de la XXI Convención Nacional de ANECA; 1996 mayo 1 -5 Cancún, (Quintana Roo), México (DF): Asociación Nacional de Ciencias Avícolas (ANECA) AC, 1996:270-271.
- Urquiza O, Verdugo-Rodríguez A, Lopez-Vidal Y, Suarez G, Quintana J. Proteins with enterotoxic activity CT like in *Salmonella gallinarum*. Memorias del XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association. 1997 agosto 18-22; Hungría, Budapest, 1997:328.

- 142 Hame SD, Sharma, VD, Rahman H. Purification and antigenicity of *Salmonella newport* enterotoxin. Indian J Med Res 1994; 99:13-17.
- 143 Rasulova SF, Dergousova IN, Starkova NN, Melnikov EE, Rumsh DL, Ginodman M L, Rotanova VT. The isolated proteolytic domain of *Escherichia coli* ATP-dependent proteasa Lion exhibits the peptidase activity. FEBS Letters 1998;432:179-181
- 144 Duhamel CR, Talbot P, Grady FG. Production, purification, and assay of cholera enterotoxin. J Infct Dis 1970;121:S85- S91.

Cuadro 1. Calendario de Inmunización para la producción de anticuerpos contra PSNC y PP de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en conejos.

Día	Vía de administración del antígeno	Concentración de proteína para la inmunización	Volumen de antígeno para administrar
1	Subcutánea	5 µg/ mL	1.0 mL
20	Intramuscular	5 µg/ mL	1.0 mL
45	Endovenosa	5 µg/ mL	0.5 mL
50	Endovenosa	5 µg/ mL	0.5 mL

Cuadro 2. Mortalidad en ratones Albino Suizo y aislamientos de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupos	Mortalidad	Porcentaje de Mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir órganos de los ratones sobrevivientes
Grupo I	19/20	95	19/19	100	0/1
Grupo II	20/20	100	20/20	100	0/0
Grupo III	13/20	65	13/13	100	0/7
Grupo IV	10/10	100	10/10	100	0/0
Grupo V	10/10	100	10/10	100	0/0
Grupo VI	2/10	20	0/2	0	0/8

94

Grupo I. Dosis única de 2g/ratón de RBC durante 24 horas.

Grupo II. Dosis única de 6g/ratón de RBC durante 24 horas.

Grupo III. Dosis por vía oral de una suspensión al 20% de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el agua de bebida durante 24 horas.

Grupo IV. Inoculación intraperitoneal con 0.5 mL/ratón de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo V. Inoculación por vía subcutánea con 0.5 mL/ratón de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo VI. Testigo negativo.

A+B (hembras y machos).

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial.

Cuadro 3. Mortalidad ocasionada por el RBC y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratones Albino Suizo.

Grupo	Días Posinoculación	No. de muertos
I	6	1
	7	3
	8	5
	9	2
	10	3
	11	3
	14	1
	21	1
II	6	3
	7	10
	8	7
	7	6
III	8	2
	9	1
	10	3
	11	1
IV	2	2
	3	5
	4	2
	6	1
V	4	7
	5	3
VI	21	2

Grupo I. Dosis única de 2g/ratón de RBC durante 24 horas.

Grupo II. Dosis única de 6g/ratón de RBC durante 24 horas.

Grupo III. Dosis por vía oral de una suspensión al 20% de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el agua de bebida durante 24 horas.

Grupo IV. Inoculación intraperitoneal con 0.5 mL/ratón de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo V. Inoculación por vía subcutánea con 0.5 mL/ratón de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo VI. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico comercial.

Cuadro 4. Análisis bacteriológico de las muestras de heces tomadas cada tercer día de los grupos de ratones Albino Suizo.

Días Posinoculación	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupos VI
3	+	+	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-

Grupo I. Dosis única de 2g/ratón de RBC durante 24 horas.

Grupo II. Dosis única de 6g/ratón de RBC durante 24 horas.

Grupo III. Dosis por vía oral de una suspensión al 20% de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el agua de bebida durante 24 horas.

Grupo IV. Inoculación intraperitoneal con 0.5 mL/ratón de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo V. Inoculación por vía subcutánea con 0.5 mL/ratón de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo VI. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial.

Cuadro 5. Mortalidad conejos Nueva Zelanda y aislamientos de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupos	Mortalidad	Porcentaje de Mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Numero de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir órganos de los conejos sobrevivientes
Grupo I	0/5	0	-	-	0/5
Grupo II	0/5	0	-	-	0/5
Grupo III	0/5	0	-	-	0/5
Grupo IV	0/3	0	-	-	0/3
Grupo V	0/7	0	-	-	0/7

97

Grupo I. Administración de 100g/conejo de RBC durante 48 horas dividido en dos tomas.

Grupo II. Administración de 100g/conejo de RBC durante 24 horas mezclado en el alimento comercial.

Grupo III. Administración oral de 5 mL/conejo de una suspensión de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) durante 24 horas.

Grupo IV. Cohabitación con los grupos I, II y III.

Grupo V. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial.

Cuadro 6. Mortalidad en ratas cepa Wistar y aislamientos de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupos	Mortalidad	Porcentaje de Mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) A partir de la mortalidad	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir órganos de las ratas sobrevivientes
Grupo I	7/10	70	7/7	100	0/3
Grupo II	10/10	100	10/10	100	0/0
Grupo III	8/10	80	8/8	100	0/2
Grupo IV	0/8	0	0/8	0	0/8

Grupo I. Dosis única de 18g/rata de RBC durante 24 horas.

Grupo II. Dosis única de 40g/rata de RBC durante 48 horas dividida en dos tomas.

Grupo III. Dosis por vía oral de una suspensión al 20% de 1×10^8 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el agua de bebida durante 24 horas.

Grupo IV. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial

Cuadro 7. Mortalidad ocasionada por el RBC y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en ratas cepa Wistar.

Grupo	Días Posinoculación	No. de muertos
I	14	1
	16	2
	18	4
II	7	2
	8	4
	18	4
III	14	3
	15	3
	17	1
	18	1

Grupo I. Dosis única de 18g/rata de RBC durante 24 horas.

Grupo II. Dosis única de 40g/rata de RBC durante 48 horas dividida en dos tomas.

Grupo III. Dosis por vía oral de una suspensión al 20% de 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el agua de bebida durante 24 horas.

Grupo IV. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial.

Cuadro 8. Mortalidad en cobayos raza Abisinia y aislamientos de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupos	Mortalidad	Porcentaje de Mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir órganos de los cobayos sobrevivientes
Grupo I	0/5	0	0	0	0/5
Grupo II	1/5	20	0/1	0	0/4
Grupo III	1/5	20	0/1	0	0/4
Grupo IV	1/3	33.3	0/1	0	0/2

100

Grupo I. Administración de 6g/cobayo de RBC durante 24 horas.

Grupo II. Administración de 20g/cobayo de RBC durante 24horas.

Grupo III. Administración oral de una suspensión al 20% conteniendo 1×10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) durante 24 horas como agua de bebida.

Grupo IV. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial

Cuadro 9. Mortalidad en pollos Leghorn y aislamientos de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupos	Mortalidad	Porcentaje de Mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir órganos de las aves sobrevivientes	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de las aves sobrevivientes
Grupo I	9/32	28.1	3/9	33.9	0/23	0
Grupo II	3/32	9.3	2/3	66.6	0/29	0
Grupo III	5/32	15.6	1/5	20	0/27	0
Grupo IV	0/32	0	0/0	0	0/32	0
Grupo V	2/32	6.2	0/2	0	0/30	0

101

Grupo I. Pollitos Leghorn de un día de edad tratados con una dosis de 0.25 mL de 10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo II. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial y un cultivo de 10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) durante 24 horas.

Grupo III. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial el RBC a partes iguales durante 24 horas.

Grupo IV. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial el RBC a partes iguales durante 48 horas.

Grupo V. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial.

Cuadro 10. Análisis bacteriológico de las muestras de heces de los pollitos Leghorn.

Grupos	I	II	III	IV	V
Días Posinoculación					
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-

Grupo I. Pollitos Leghorn de un día de edad tratados con una dosis de 0.25 mL de 10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo II. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial y un cultivo de 10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) durante 24 horas.

Grupo III. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial el RBC a partes iguales durante 24 horas.

Grupo IV. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial el RBC a partes iguales durante 48 horas.

Grupo V. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial.

Cuadro 11. Aglutinación Rápida en placa con el antígeno K polivalente de *Salmonella pullorum* y prueba de Microaglutinación de los sueros de los pollitos Leghorn.

Días posinoculación Grupos	Aglutinación Rápida en placa				Microaglutinación			
	8	15	21	30	8	15	21	30
I	0/5	0/5	1/5 (20%)	2/5 (40%)	0/5	0/5	0/5	0/5
II	0/5	0/5	1/5 (20%)	1/5 (20%)	0/5	0/5	0/5	0/5
III	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
IV	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
V	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Grupo I. Pollitos Leghorn de un día de edad tratados con una dosis de 0.25 mL de 10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupo II. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial y un cultivo de 10^9 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) durante 24 horas.

Grupo III. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial el RBC a partes iguales durante 24 horas.

Grupo IV. Pollitos Leghorn de un día de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial el RBC a partes iguales durante 48 horas.

Grupo V. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial.

Cuadro 12. Mortalidad en pollos de engorda y aislamientos de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).

Grupos	Mortalidad	Porcentaje de Mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de la mortalidad	Número de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir órganos de las aves sobrevivientes	Porcentaje de Aislamientos de <i>Salmonella enteritidis</i> var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) a partir de las aves sobrevivientes
Grupo I	1/32	3.1	1/1	100	0/31	0
Grupo II	0/32	0	0/0	0	1/32	3.1
Grupo III	0/32	0	0/32	0	0/32	0

104

Grupo I. Pollitos de engorda de un día de edad tratados con una dosis de 0.25 mL de 10^8 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) por vía oral.

Grupo II. Pollitos de engorda de 8 días de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial y un cultivo de 10^8 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) durante 24 horas.

Grupo III. Testigo negativo.

Cuadro 13. Aglutinación rápida en placa con el antígeno K polivalente de *Salmonella pullorum* y prueba de microaglutinación de los sueros de los pollos de Engorda.

Días posinoculación Grupos	Aglutinación Rápida en placa			Microaglutinación		
	1	7	15	1	7	15
I	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
II	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
III	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Grupo I. Pollitos de engorda de un día de edad tratados con una dosis de 0.25 mL de 10^8 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) por vía oral.

Grupo II. Pollitos de engorda de 8 días de edad alimentados con una mezcla de alimento comercial y un cultivo de 10^8 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) durante 24 horas.

Grupo III. Testigo negativo.

RBC.- Rodenticida Biológico Comercial

* Lab. Solvay Animal Health, Mexico.

Cuadro 14. Cuantificación de proteínas y valores de absorbancia (D.O. 660 nm) a las 24 horas de crecimiento.

Cepa	D.O.	PSNC mg/mL	PP mg/mL
<i>E. coli</i> HS	1.034	-	1.770
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	1.062	-	3.904
<i>S. enteritidis</i> (biovar. Issatschenko)	1.150	0.622	0.071

D.O.- Densidad óptica.

PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko.

PP.- Proteínas periplasmáticas de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko.

Cuadro 15. Pesos Moleculares en kDa de las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko encontrados por medio del ensayo de *Immunoblot* con Inmunoglobulinas conjugadas con Peroxidasa.

ANTI - CT						ANTI - PSNC						ANTI - PP						ANTI - LT					
CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 Sg	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 Sg	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 Sg	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 Sg
	116	195	97				116	97	97	97			97	97	97	97			97	97		97	
	97	97					97	94	94				66.2	75	66.2					66.2	66.2	66.2	
		66.2					66.2		45				45	68.2						45			
								66.2	40					61									
								63	36					40									
									34														

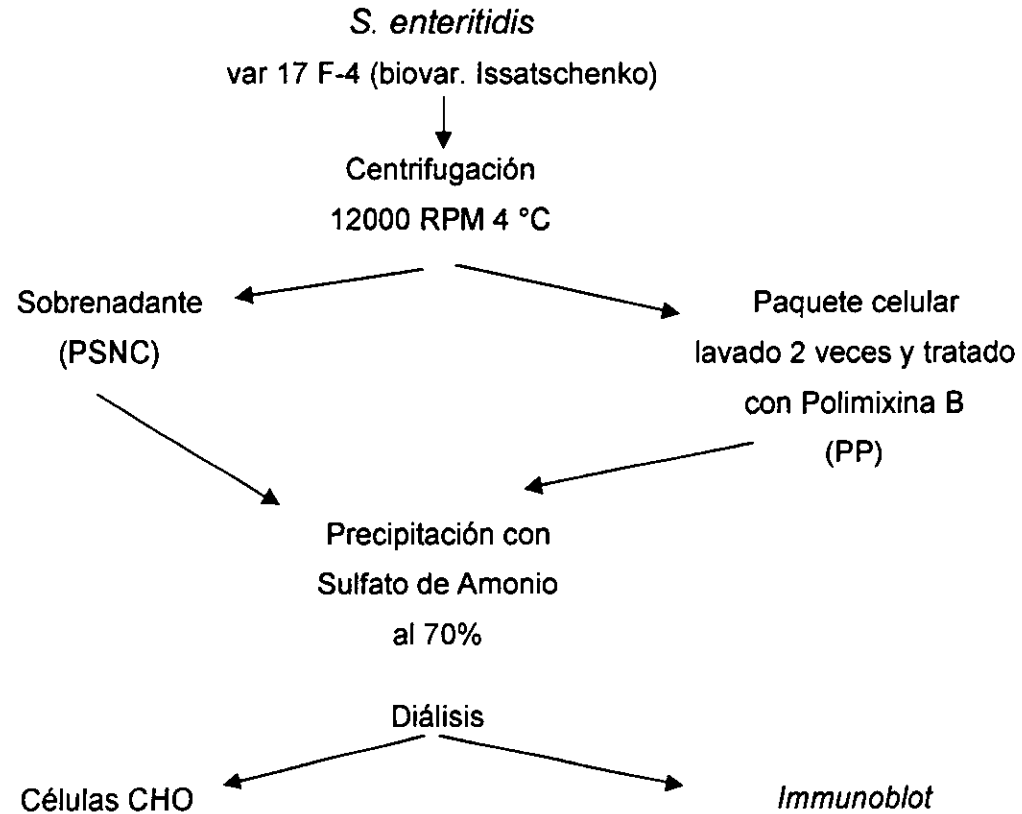
PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. PP.- Proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko CT.- Toxina de *V. cholerae*; LT.- Toxina lábil de *E. coli*; FVA-1 Sg.- Proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* FVA-1.

Cuadro 16. Pesos Moleculares en kDa de las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko encontrados por medio del ensayo de *Immunoblot* con Inmunoglobulinas conjugadas con Avidina-Biotina y Peroxidasa.

ANTI- CT						ANTI - PSNC					ANTI - PP					ANTI - LT					ANTI - Sg									
CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (Sg)	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (Sg)	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (Sg)	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (Sg)	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (Sg)	
45	97	97	97	97	97		97	116	195	116	97		200	200	200	200	97			97	97	97	97		68.2	116	200	97	190	
24		68.2			68.2		68.2	100	116	97	68.2		116	116	116	116	68.2			68.2	68.2	68.2	68.2			47	97	190	68.2	97
14.4								97	97	68.2	36		97	97	97	97	90						45			23	96	116	63	68.2
								90	90	45			68.2	80	68.2	73											92	97	62	64
								68.2	68.2				44	76	45	68.2											70	68.2	61	56
								60	45					66.2		44											68.2	43	49	63
								60	40					65													64	39		45
								46	31					60													62			39
									29					60													61			29
														60													60			26
														43													45			23
														42													43			20
														40													39			
														31													31			
														28													16			
																											14.4			

PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. PP.- Proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. CT.- Toxina de *V. cholerae*; LT.- Toxina lábil de *E. coli*; FVA-1 Sg.- Proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* FVA-1.

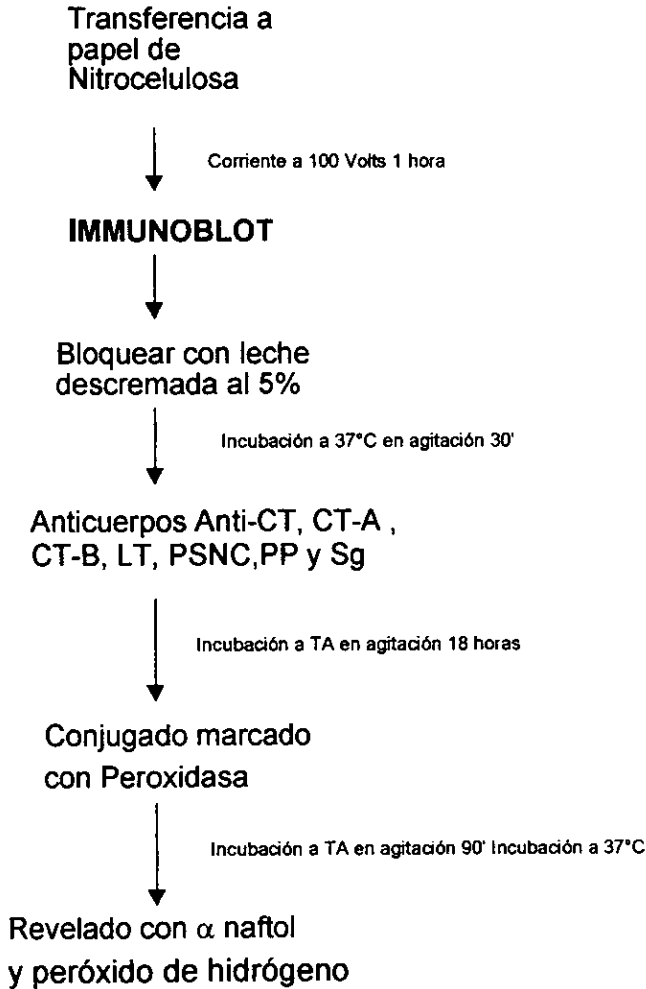
Figura 1. Extracción de PSNC y PP de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).



109

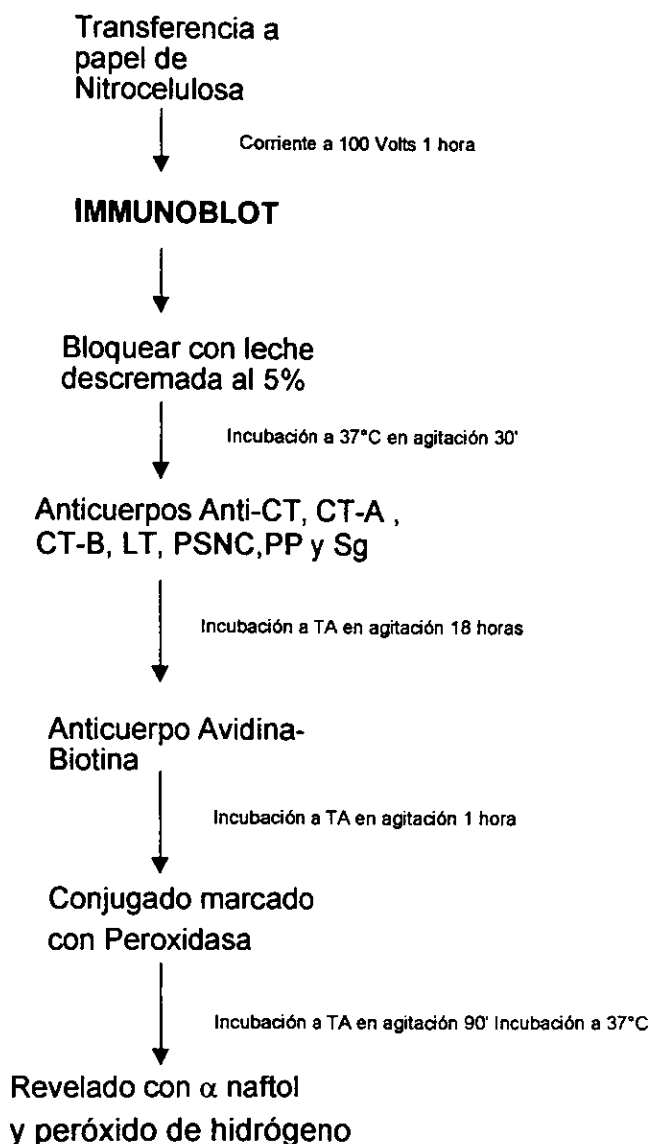
PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo. PP.- Proteínas periplasmáticas. CHO.- Células de ovario de hamster chino.

Figura 2. Elaboración de Immunoblot de las PSNC y las PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko con anticuerpos marcados con Peroxidasa.



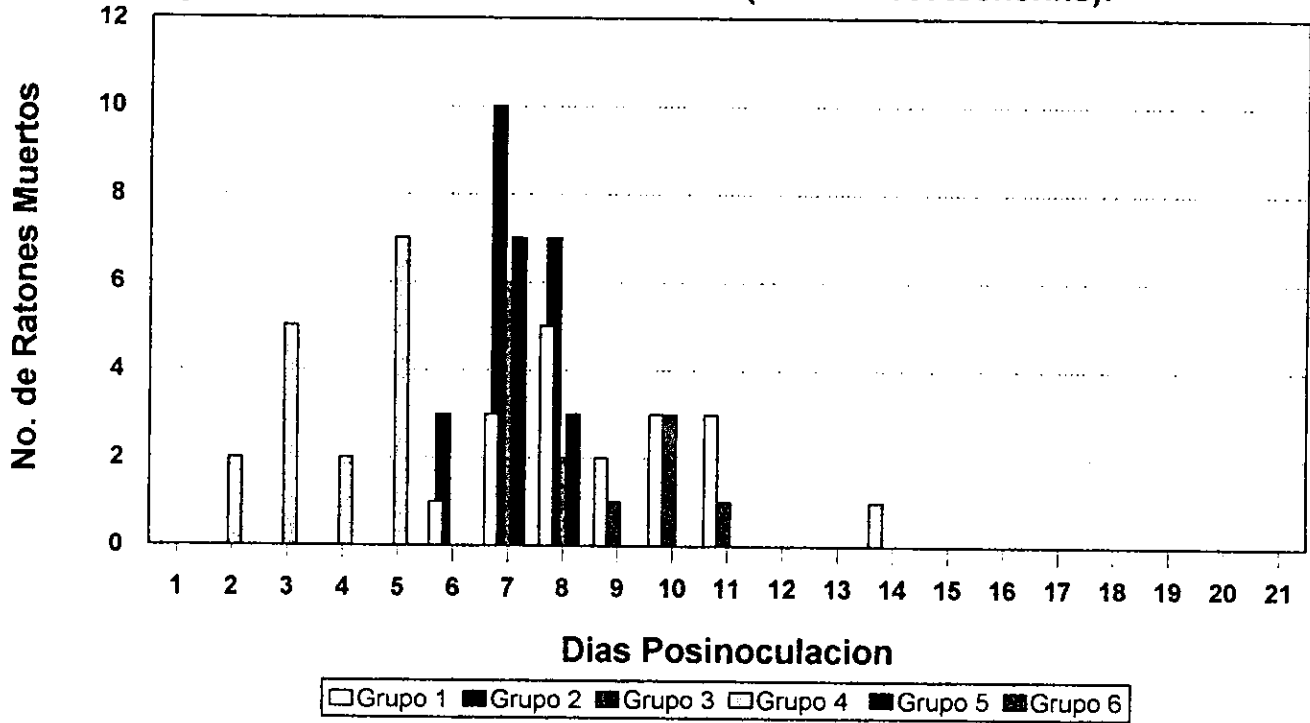
CT.- Toxina de *V. cholerae*. PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko. PP.- Proteínas periplasmáticas de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko. Sg.- *S. gallinarum*.

Figura 3. Elaboración de Immunoblot de las PSNC y las PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko con anticuerpos marcados con Avidina-Biotina y Peroxidasa.



CT.- Toxina de *V. cholerae*. PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko. PP.- Proteínas periplasmáticas de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko. Sg.- *S. gallinarum*.

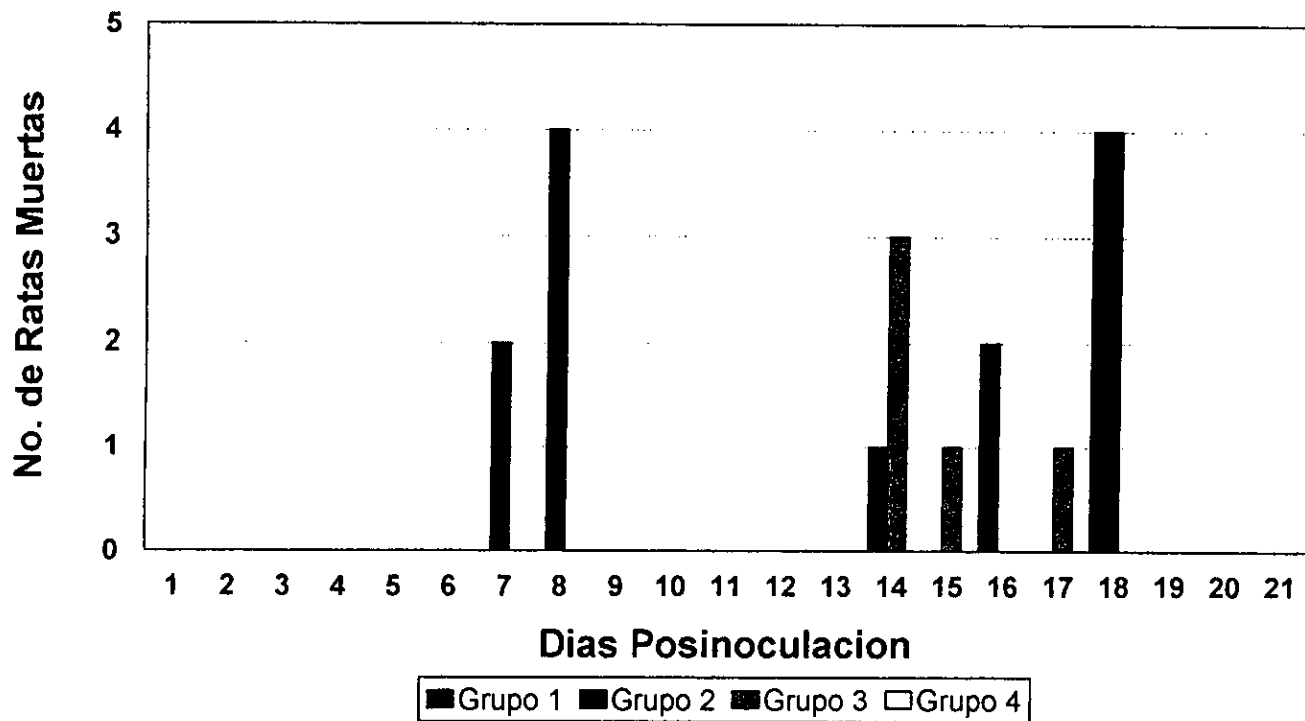
Figura 4.- Mortalidad de los ratones Albino Suizo por la inoculación experimental del RBC* y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).



Grupo I. dosis única de 2g/ratón de RBC durante 24 horas.
 Grupo II. dosis única de 6g/ratón de RBC durante 24 horas.
 Grupo III. dosis por vía oral de una suspensión al 20% de 1X10⁸ UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el agua de bebida durante 24 horas.
 Grupo IV. inoculación intraperitoneal con 0.5 mL/ratón de 1X10⁸ UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).
 Grupo V. inoculación por vía subcutánea con 0.5 mL/ratón de 1X10⁸ UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko).
 Grupo VI. testigo negativo sin tratamiento.

*RBC.- Rodenticida Biológico Comercial

Figura 5.- Mortalidad de las ratas cepa Wistar por la inoculación experimental del RBC* y *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko).



Grupo I. dosis única de 18g/rata de RBC durante 24 horas.
 Grupo II. dosis única de 40g/rata de RBC durante 48 horas dividida en dos tomas.
 Grupo III. dosis por vía oral de una suspensión al 20% de 1×10^6 UFC/mL de *Salmonella enteritidis* var.17 F-4 (biovar. Issatschenko) mezclada en el agua de bebida durante 24 horas.
 Grupo IV. testigo negativo sin tratamiento

*RBC - Rodenticida Biológico Comercial

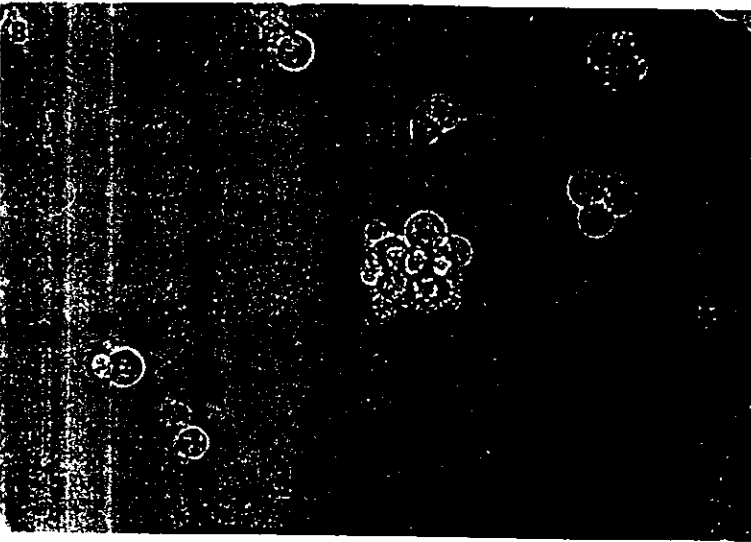
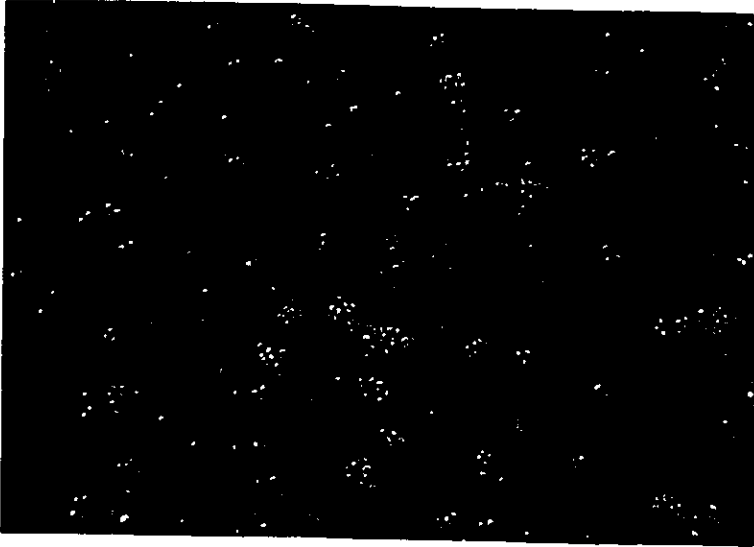


Figura 6. A) Muestra arredondamiento de células CHO a las 24 horas posexposición, producido por las proteínas del sobrenadante del cultivo o las proteínas periplasmáticas de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) (100X). B) Las mismas células descritas pero con aumento 320X.

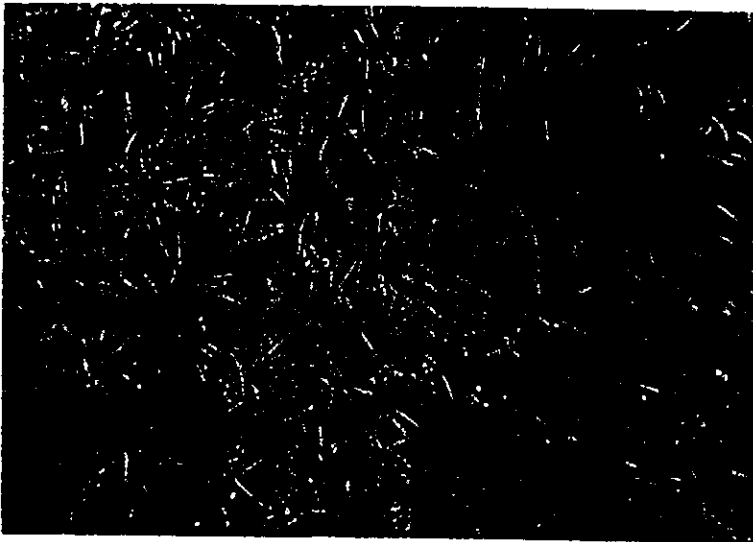
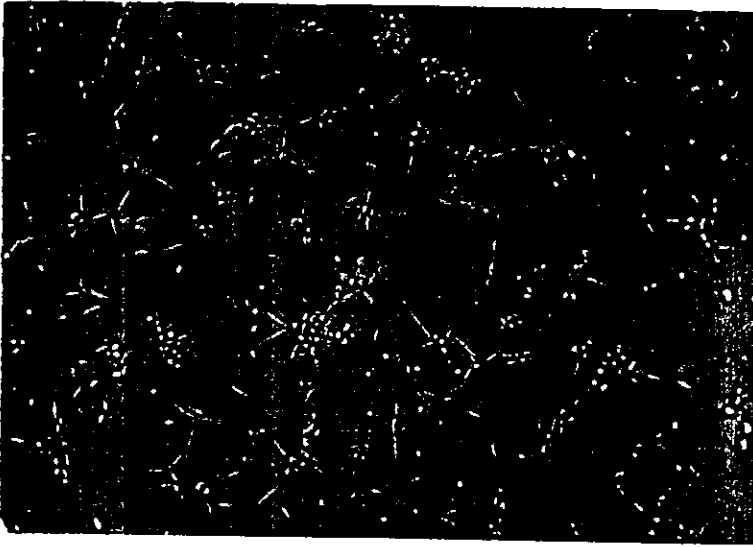


Figura 7. A) Muestra efecto citotónico producido por las proteínas del sobrenadante de cultivo o las proteínas periplasmáticas de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (biovar. Issatschenko) en las células CHO a las 72 horas posexposición. B) Se observan las mismas células descritas pero a las 96 horas posexposición, ambas con 100X.

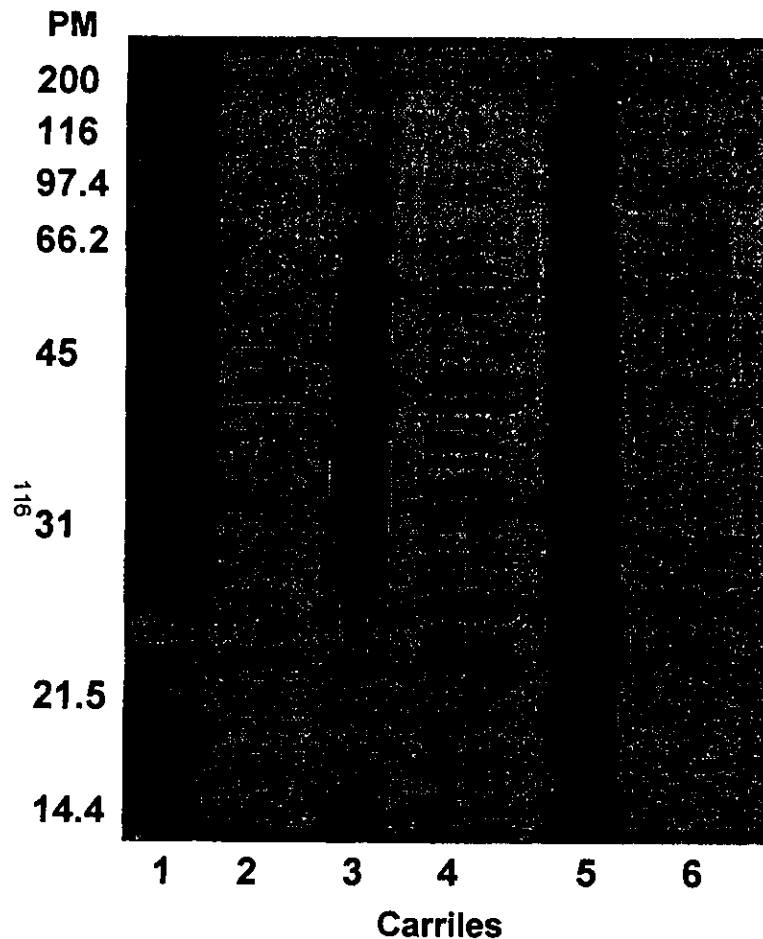


Fig. 8. Gel SDS-PAGE con Tinción de Plata de las PSNC y PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko.

Carril:

1.- PM

2.- CT

3.- PSNC

4.- PP

5.- PSNC 1 año

6.- PP 1 año

PM.- Peso molecular. CT.- Toxina de *V. cholerae*. PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo. PP.- proteínas periplasmáticas.

Fig. 9. Pesos Moleculares en kDa de las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko encontrados por medio del ensayo de *Immunoblot* con Inmunoglobulinas conjugadas con Peroxidasa.

PM	ANTI-CT					ANTI-PSNC					ANTI-PP					ANTI-LT									
	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (9g)	CT	PSNC	JPP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (9g)	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (9g)	CT	PSNC	PP	PSNC 1 AÑO	PP 1 AÑO	FVA-1 (9g)	
200										195															
118									116						116										
97			97	97	97			97	97	97	97			97	97	97	97					97	97	97	
66.2				66.2				66.2	66.2	63				66.2	75	66.2	66.2					66.2	66.2	66.2	
45		45							45					45								45			
31									40	36					40										
21.5									34																
14.4		14																							

PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. PP.- Proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. CT.- Toxina de *V. cholerae*; LT.- Toxina lábil de *E. coli*; FVA-1 Sg.- Proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* FVA-1.

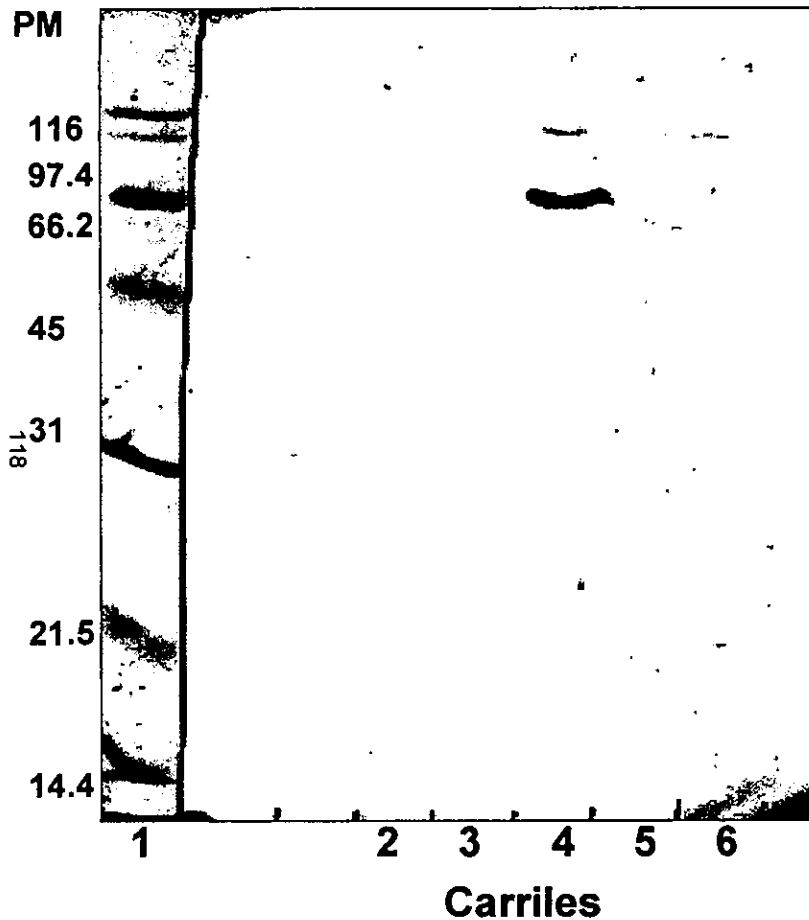


Fig. 10. Immunoblot con PSNC y PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko contra Anti - LT.

Carril:

1.- PM

2.- CT

3.- PSNC

4.- PP

5.- PSNC 1 año

6.- PP 1 año

PM.- Peso molecular. CT.- Toxina de *V. cholerae*.
PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo.
PP.- proteínas periplasmáticas.

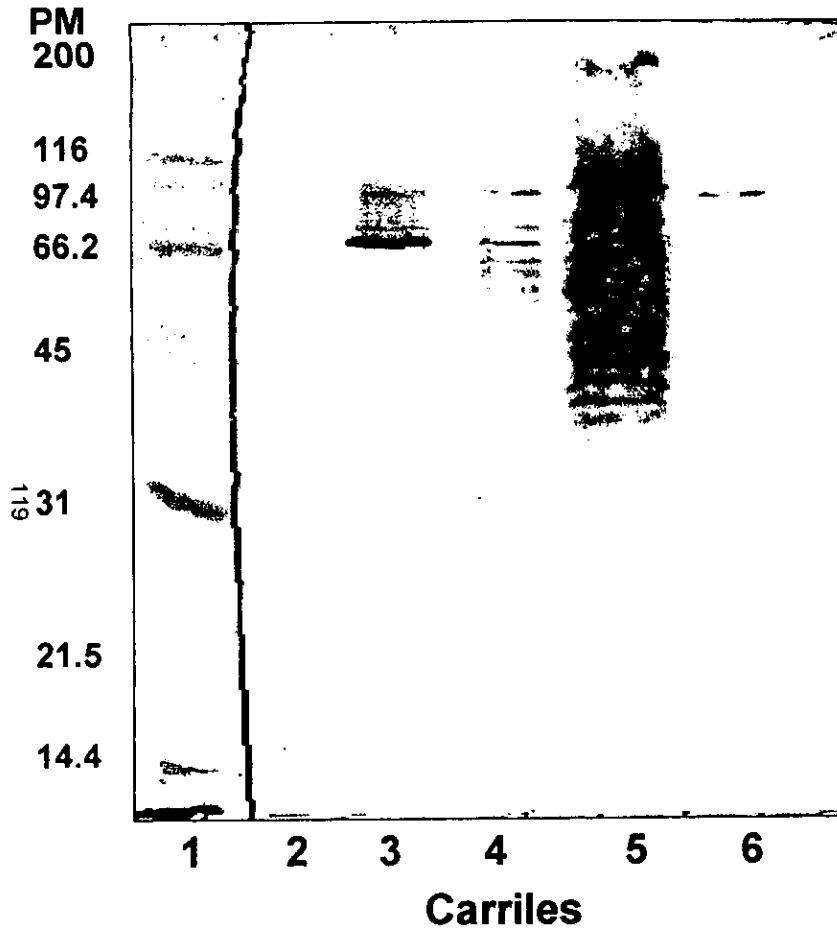


Fig. 11. Immunoblot con PSNC y PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko contra Anti - PSNC.

Carril:

1.- PM

2.- CT

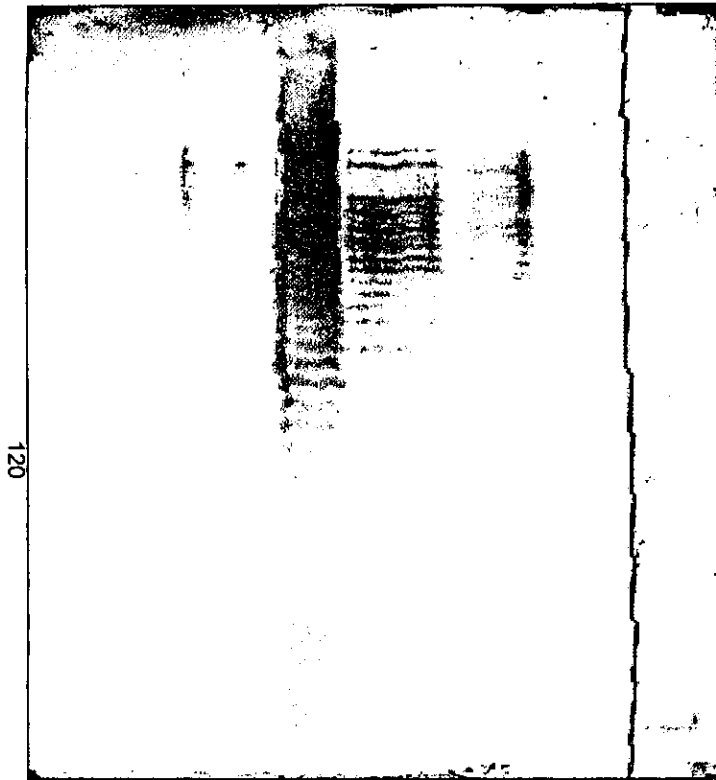
3.- PSNC

4.- PP

5.- PSNC 1 año

6.- PP 1 año

PM.- Peso molecular. CT.- Toxina de *V. cholerae*. PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo. PP.- proteínas periplasmáticas.



6 5 4 3 2 1

Carriles

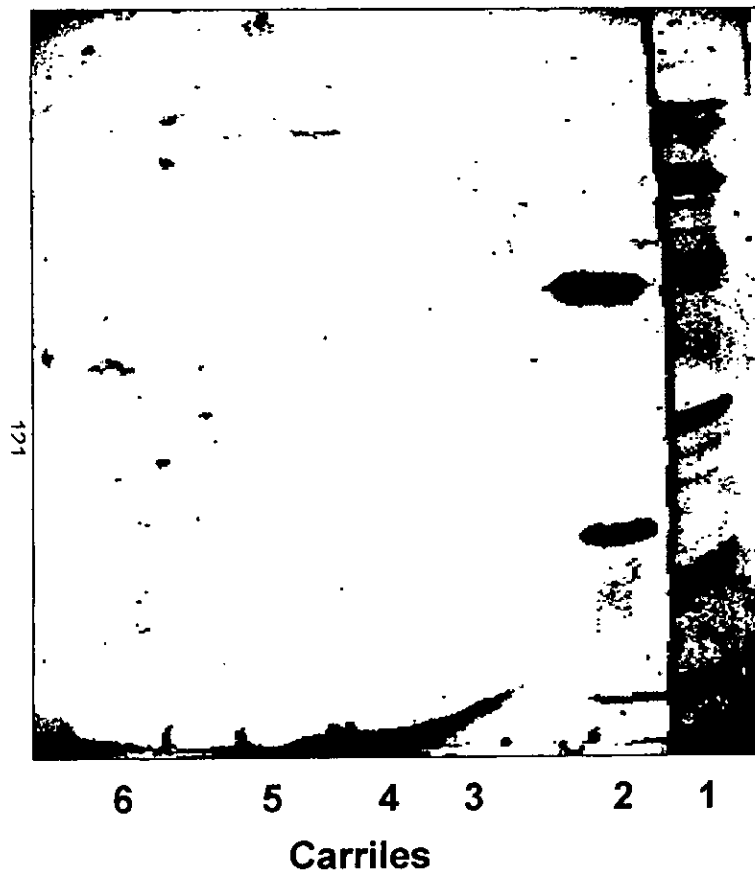
PM
116
97.4
66.2
45
31
21.5
14.4

Fig.12. Immunoblot con PSNC y PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko contra Anti - PP.

Carril:

- 1.- PM
- 2.- CT
- 3.- PSNC
- 4.- PP
- 5.- PSNC 1 año
- 6.- PP 1 año

PM.- Peso molecular. CT.- Toxina de *V. cholerae*.
PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo.
PP.- proteínas periplasmáticas.



PM **Fig.13. Immunoblot con PSNC y PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko contra Anti - CT.**

116
97.4

66.2

45

31

21.5

14.4

Carril:

1.- PM

2.- CT

3.- PSNC

4.- PP

5.- PSNC 1 año

6.- PP 1 año

PM.- Peso molecular. CT.- Toxina de *V. cholerae*. PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo. PP.- proteínas periplasmáticas.

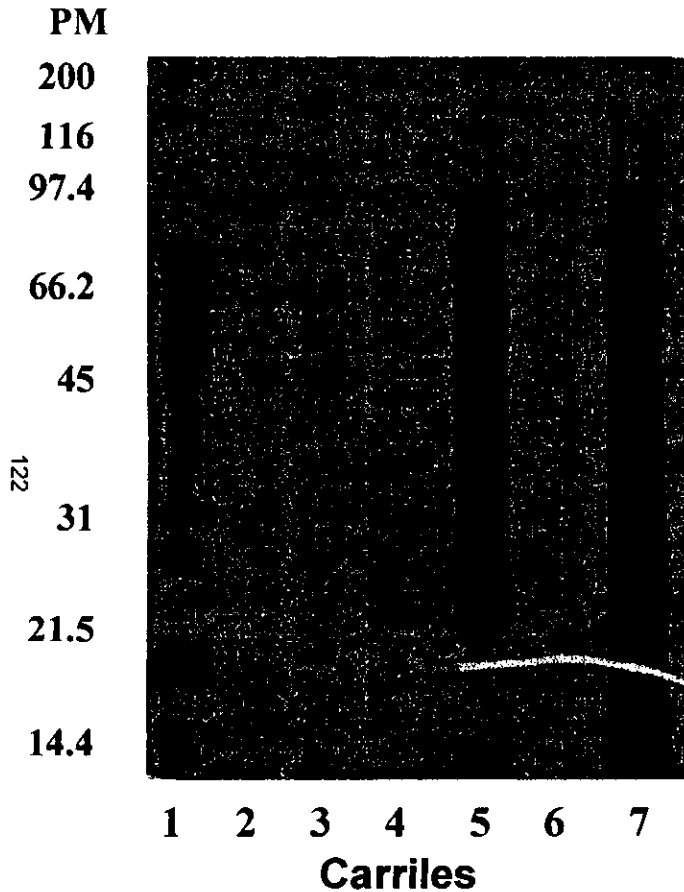


Fig. 14. Gel SDS-PAGE con Tinción de Plata de las PSNC y PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko y de las PP de *S. gallinarum*.

Carril:

1.- PM

2.- CT

3.- PSNC

4.- PP

5.- PSNC 1 año

6.- PP 1 año

7.- PP *S. gallinarum* FVA-1

PM.- Peso molecular. CT.- Toxina de *V. cholerae*. PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo. PP.- proteínas periplasmáticas. Sg.- *Salmonella gallinarum*.

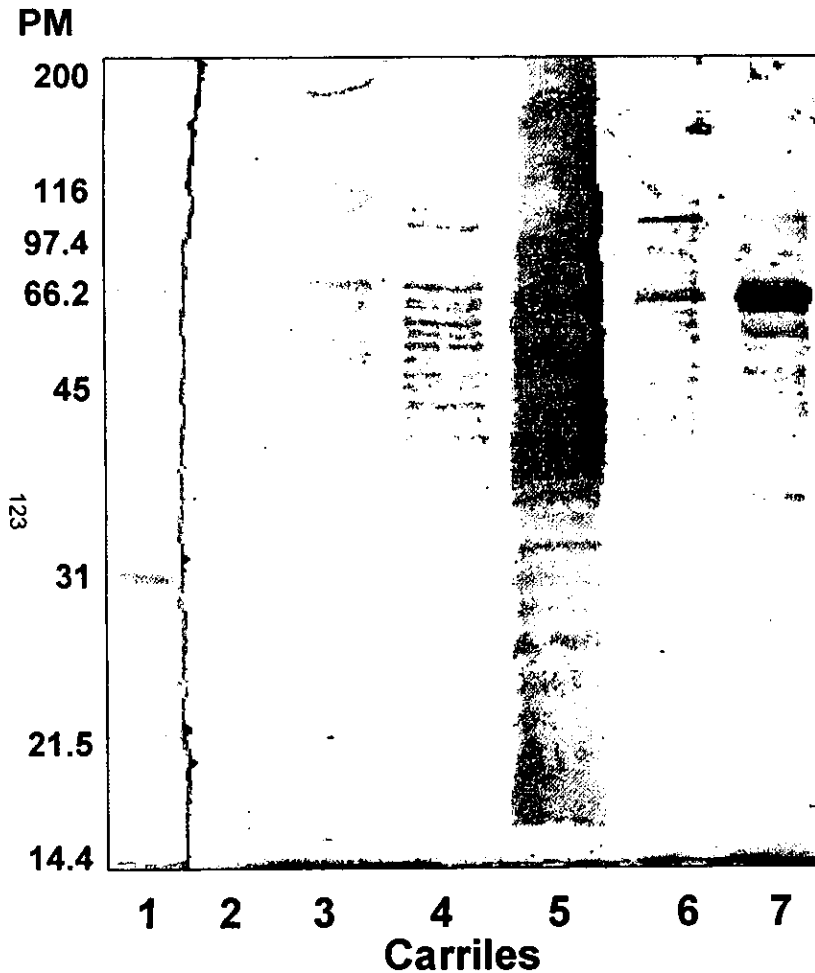


Fig.15. Immunoblot con PSNC y PP de *S. enteritidis* biovar. Issatschenko contra Anti - Sg.

Carril:

1.- PM

2.- CT

3.- PSNC

4.- PP

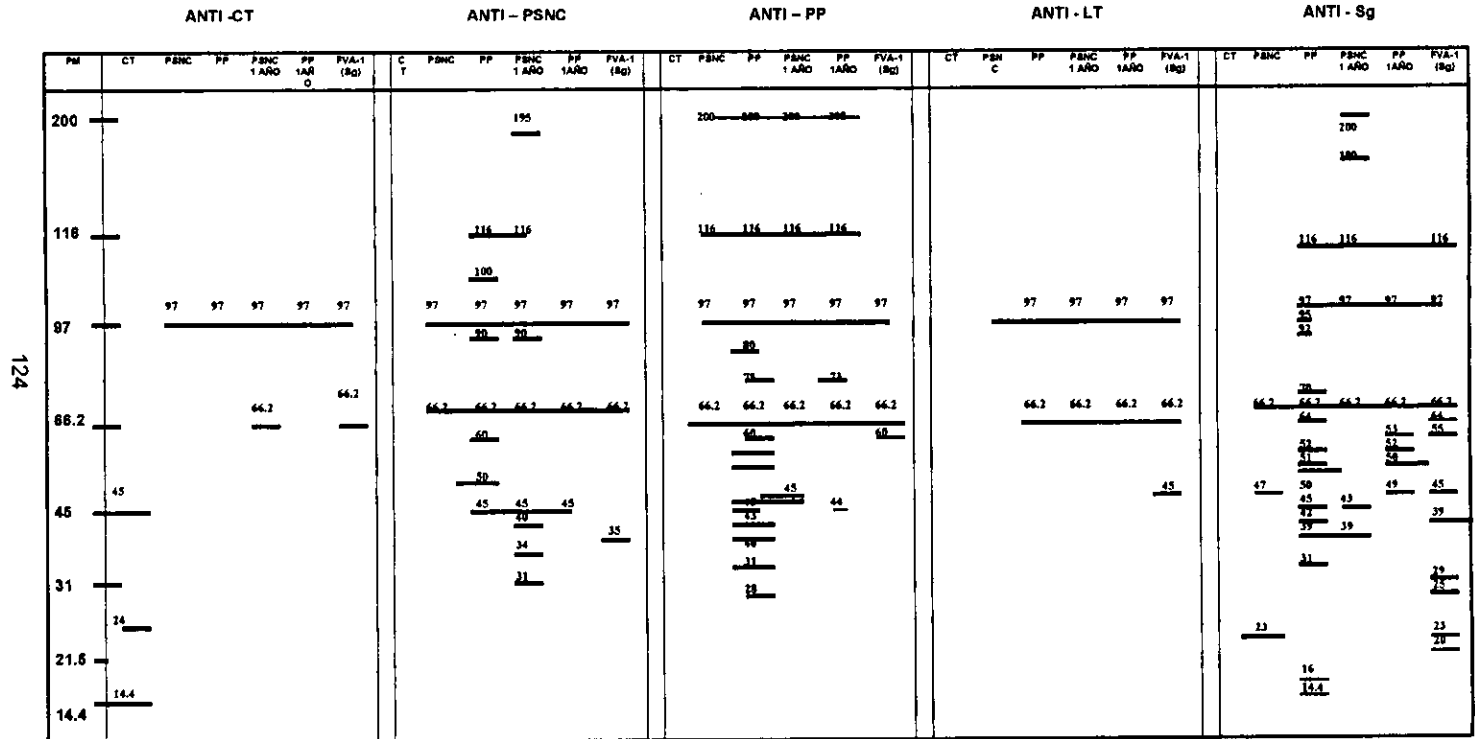
5.- PSNC 1 año

6.- PP 1 año

7.- PP *S. gallinarum* FVA-1

PM.- Peso molecular. CT.- Toxina de *V. cholerae*.
 PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo. PP.-
 proteínas periplasmáticas. Sg.- *Salmonella*
gallinarum.

Fig. 16. Pesos Moleculares en kDa de las PSNC y las PP de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko encontrados por medio del ensayo de *Immunoblot* con conjugados Avidina-Biotina y Peroxidasa.



PSNC.- Proteínas del sobrenadante del cultivo de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. PP.- Proteínas periplasmáticas de *Salmonella enteritidis* biovariedad Issatschenko. CT.- Toxina de *V. cholerae*; LT.- Toxina lábil de *E. coli*; FVA-1 Sg.- Proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* FVA-1.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إلى حتي الرحيم،

ريكاردو،

كلّ يوم أضعد منك

أزارك في كل مكان

أنا أورد أنت كنت معي

كلّ شيء، مست، أعله وأنا ألا حظ

كم أجيتك، كم أحاجك.

كلّ ليلة أحلم بك، أزارك في أحلامي

وأنا أحستك هنا معي.

أحلمك همل إلى البيت

ويخبرك، كم أجيتك،

كم ألقيتك.

أنا لا أجيتك بعيدا معي.

كلّ يوم وكلّ ليلة

أسأل إله واللائحة

تكون بجانبني دائما

لأن أجيتك

ريكاردو،

أنت حلمي، حياتي، شمسي، حتي،

ملاكي، لقمي، ملكي، للهي،

أزيتك بجانبني إلى الأبد وأبدا.

أجيتك.

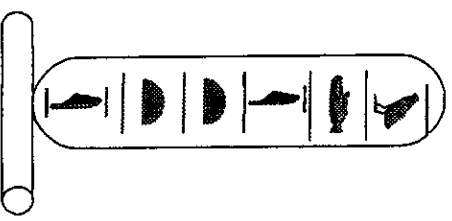
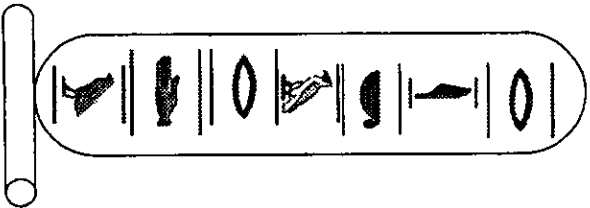
أنا سأجيتك إلى الأبد.

أنا سأجيتك دائما.

أكرتلك هذه الكلمات

بكلّ حتي

أوردت





Composición Caligráfica.
Palestina otomana, Akka 1890
Tinta, guache y oro sobre papel
Caligrafía Thuluth