



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto de la inactivación de los genes de las islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella* Typhimurium (SPI-1 y SPI-2) en el desarrollo de lesiones histológicas en órganos de pollos de un 1 día y 1 semana de edad

T E S I S

**Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista**

P r e s e n t a

Hugo Martínez Jarquin

Asesora

Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría

Ciudad universitaria, México 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi tío, que en vida me hubiera encantado que pudieras ver lo que he logrado.

A mi piquis

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi mamá, a mis abuelos Josefina y Gildardo, a mi hermano Diego, a mi cuñada Sandra, a mi tía Yasmín que siempre han estado apoyándome en mi desarrollo académico.

A mis amigos Citlali, Ricardo, Citlali B, Humberto y Daniel González por ser parte importante en mi vida, por ser mi soporte en muchos momentos difíciles.

A mis amigos del departamento de patología Alba, Manuel, Paola, Diana, Erick, Alberto, Xavier, Samir y Saulo, que sin su compañía y ayuda mi estancia en el departamento no sería tan alegre y divertida como lo es cada día que paso con ustedes.

A mis amigos del laboratorio de patología molecular, Jesús, Tatiana y Jazmín, por su enorme paciencia, comprensión y cariño que me demostraron desde el primer momento que entré a trabajar con ustedes, por darme ánimos para continuar y enfrentar cualquier adversidad que tuviera.

A Víctor, Valeria, Lizbeth y Roberto que no solo estuvieron conmigo alegrándome la vida mientras cursábamos el servicio social, si no por darme su amistad sincera y sus consejos valiosos que guardo con especial cariño.

A Jaime Eugenio Córdoba, por su trabajo en la edición de las fotografías utilizadas en este proyecto, a la histotecnóloga Maribel Nieto Miranda por su gran labor en la elaboración de las laminillas y las tinciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que me brindaron la oportunidad de cumplir mi sueño de ser profesionalista, por darme recursos y elementos de alta calidad para lograrlo.

Al departamento de patología, a todos los patólogos por haberme ofrecido su confianza, la oportunidad de pertenecer a este lindo grupo de personas y ayudarme a reafirmar mi gusto por la patología.

Finalmente quiero dar un especial agradecimiento a la Dra. Luary, A la Dra. Mireya por su confianza enorme, orientación y gran paciencia hacia mi en el desarrollo de esta tesis. A mi perro por alegrar mi vida cada día, a Cristian Osvaldo por su ayuda, cariño y a los pollitos del experimental que sin ellos nada de esto podría haberse logrado.

ÍNDICE

Resumen	7
Introducción.....	9
Género <i>Salmonella</i>	9
Islas de patogenicidad	10
SPI-1	10
SPI-2.....	11
Sistemas de secreción tipo 3 (SST3).....	12
Patogénesis de la salmonelosis.....	12
Lesiones.....	19
Justificación.....	20
Hipótesis	21
Objetivos	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	22
Materiales y métodos	22
Cepas bacterianas, cultivos y condiciones de crecimiento	22
Cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC) para la estandarización de los inóculos.	23
Infección en pollos	23
Estudio <i>post mortem</i> e histopatología.....	24
Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC)	27
Extracción de DNA.....	27
Amplificación de los genes <i>hilA</i> y <i>ssrB</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
Electroforesis en gel.....	29
Inmunohistoquímica.....	29
Análisis estadísticos.....	30
Resultados.....	30
Determinación de UFC's	30

Análisis histopatológico.....	33
Localización de <i>Salmonella</i> Typhimurium WT y las mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2 durante una infección.....	52
Discusión.....	57
Conclusiones	66
Referencias	67
Apéndice	76
Preparación de medio de cultivo Luria Bertani.....	76
Preparación de medio de cultivo Verde Brillante	76
Buffer TAE 1x.....	76
Gel de agarosa al 1%.....	77
PBS 10x.....	77

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo	22
Tabla 2. Criterios histopatológicos para evaluar secciones de ciego.	25
Tabla 3. Criterios histopatológicos para evaluar secciones de hígado.	26
Tabla 4. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 día de edad, inoculados con la cepa WT.	43
Tabla 5. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 día de edad, inoculados con la cepa Δ SPI-1.	43
Tabla 6. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 día de edad, inoculados con la cepa Δ SPI-2.	44
Tabla 7. Evaluación histopatológica de los pollos del grupo control, de 1 día de edad	44
Tabla 8. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa WT	45
Tabla 9. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa Δ SPI-1.	45
Tabla 10. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa Δ SPI-2.	46
Tabla 11. Evaluación histopatológica de los pollos del grupo control, de 1 semana de edad	46

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Patogenia de la salmonelosis.	18
Figura 2. Cálculo de unidades formadoras de colonia (UFC's)	32
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de DNA amplificados mediante la PCR.	33
Figura 4. Lesiones histológicas en pollos de un día de edad inoculados con la cepa WT.	35
Continuación figura 4.	36
Figura 5. Tinción de Gram de ciegos de los pollos de 1 día de edad, inoculados con la cepa WT.	37
Figura 6. Histopatología de los pollos de 1 día de edad, inoculados con las cepas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2.	40
Figura 7. Resumen de los hallazgos histopatológicos en ciegos de los pollos de 1 día y 1 semana de edad, inoculados con la cepa WT y sus derivadas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2.	41
Figura 8. Resumen de los hallazgos histopatológicos en hígados de los pollos de 1 día de edad inoculados con la cepa WT y sus derivadas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2.	42
Figura 9. Histopatología de pollos de 1 semana de edad inoculados con la cepa WT de <i>Salmonella</i> Typhimurium.	49
Figura 10. Tinción de Gram de ciegos de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa WT.	50
Figura 11. Histopatología de pollos de 1 semana de edad inoculados con las cepas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2.	52
Figura 12. Inmunohistoquímica de los pollos de 1 día de edad inoculados con la cepa WT.	54
Figura 13. Inmunohistoquímica de los pollos de 1 día de edad inoculados con las cepas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2 de <i>Salmonella</i> Typhimurium.	55
Figura 14. Inmunohistoquímica de los pollos de 1 semana de edad inoculados con las cepas WT, Δ SPI-1 y Δ SPI-2.	56

Resumen

MARTINEZ JARQUIN HUGO. Efecto de la inactivación de los genes de las islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella* Typhimurium (SPI-1 y SPI-2) en el desarrollo de lesiones histológicas en órganos de pollos de un día y una semana de edad, bajo la dirección de la Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría.

Salmonella enterica serovar Typhimurium es un patógeno común a humanos y animales. En pollos de un día de edad provoca enfermedad sistémica, mientras que en pollos de mayor edad causa enfermedad intestinal. *Salmonella* depende de sus genes de virulencia para provocar enfermedad, la mayoría se encuentran en regiones específicas de su genoma conocido como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI), las más estudiadas son las islas 1 y 2. Estudios previos han construido mutantes en las que se elimina el sistema de secreción tipo 3 (SST3) codificado por dichas islas; en este trabajo se han eliminado todos los genes de ambas islas. Se emplearon grupos de pollos SPF de un día y una semana de edad, con 15 integrantes cada uno, a los cuales se les inoculó vía oral una dosis de 10^{10} UFC de la cepa silvestre (WT) SL1344 de *S. Typhimurium* o las mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2 y un grupo control negativo inoculado con PBS. A los pollos de 1 día de edad se les aplicó eutanasia a las 24, 48 y 72 horas, y a los pollos de 1 semana de edad se les aplicó la eutanasia 1, 3 o 7 días post infección. Se realizó el estudio *post mortem*, se tomaron muestras de ciego e hígado para el cálculo de UFC's, histopatología e inmunohistoquímica. Se extrajo DNA de los bloques de parafina para amplificar al gen *invA* y *ssrB* de *Salmonella* mediante PCR y ser analizado mediante electroforesis en gel. Mientras que la cepa WT fue recuperada del ciego e hígado, las cepas mutantes estuvieron afectadas en su capacidad para colonizar el intestino o diseminarse al hígado pues se recuperaron de estos órganos en menor cantidad o no se recuperaron. En la evaluación histopatológica en las muestras infectadas con la cepa WT, se encontraron lesiones como tiflitis linfocítica y linfocítica e histiocítica o necrosis hepática, a diferencia de las muestras infectadas con las mutantes, donde las lesiones fueron ausentes o en menor cantidad y gravedad. Por medio de la técnica de inmunohistoquímica detectamos a la cepa WT

en intestino e hígado a lo largo de los días post infección, en el lumen cecal, adherida al intestino y dentro de enterocitos y macrófagos, así como en el hígado. Por otro lado, las cepas mutantes fueron detectadas en el lumen cecal e intestino en tiempos más retardados y en menor cantidad y en ningún pollo fue detectada en el hígado. Además, se detectaron en sitios en donde no había inflamación asociada. Nuestros resultados indican que los genes de SPI-1 y SPI-2 tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad sistémica y la colonización intestinal.

Palabras clave: *Salmonella*, pollos, islas de patogenicidad, SPI-1, SPI-2

Introducción

Género *Salmonella*

Salmonella es un género bacteriano que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y es conocido por ser un patógeno común a humanos y animales. Las bacterias incluidas dentro de este género son intracelulares facultativas, ubicuas, Gram negativas y se encuentran principalmente en el intestino de mamíferos. El género *Salmonella* está compuesto por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* posee seis subespecies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* y *salamae* (Barrow *et al.*, 2013).

El esquema de Kauffman-White publicado originalmente en 1929, divide a *Salmonella enterica* en más de 2500 serotipos con base en las reacciones serológicas hacia sus antígenos tales como el lipopolisacárido (LPS o antígeno O), el flagelo (antígeno H) y su cápsula (antígeno K). Según la patogénesis y la biología de la infección, las serovariedades de *Salmonella* pueden ser clasificadas por su asociación con la producción de al menos tres tipos diferentes de infecciones. Un pequeño número de serovariedades son capaces de producir enfermedad sistémica en individuos fisiológica e inmunológicamente sanos. Dichas infecciones están asociadas con *S. enterica* subsp *enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) y *S. enterica* subsp *enterica* serovar Paratyphi (*S. Paratyphi*) en humanos, *S. enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) en aves de producción (así como en otras aves) y *S. enterica* subsp *enterica* serovar Cholerasuis (*S. Cholerasuis*) en cerdos. Un segundo grupo de serovariedades están asociadas con infecciones sistémicas que progresan a infecciones del aparato reproductor en mamíferos gestantes o en aves de postura; estas incluyen a *S. enterica* subsp *enterica* serovar Dublin (*S. Dublin*) en bovinos, *S. enterica* subsp *enterica* serovar Abortusovis (*S. Abortusovis*) en borregas, *S. enterica* subsp *enterica* serovar Abortusequi (*S. Abortusequi*) en caballos y *S. enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum (*S. Pullorum*) en aves. (Prescott *et al.*, 2010). La gran mayoría de las serovariedades son incapaces de producir enfermedad sistémica en individuos sanos, pero son capaces de producir enfermedad entérica.

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es el patógeno con mayor variedad de hospedadores, siendo afectados los humanos, bovinos, roedores y aves (Santos *et al.*, 2000). Mientras que en humanos y bovinos causa enfermedad entérica que generalmente es autolimitante, en los ratones susceptibles atraviesa el epitelio intestinal y coloniza órganos tales como el bazo y el hígado, desarrollando así enfermedad sistémica (Wemyss *et al.*, 2019). En el caso de pollos de un día de edad, se presenta como enfermedad sistémica severa, mientras que en pollos de una semana de edad coloniza de manera constante el tracto digestivo (Addwebi *et al.*, 2014).

Islas de patogenicidad

La severidad de la infección provocada por *Salmonella* es dependiente del estado inmunológico del hospedero, así como de la presencia de factores de virulencia, tales como el lipopolisacárido (LPS), fimbrias, toxinas, etc (Andrews-Polymenis *et al.*, 2010).

Muchos de los factores de virulencia de *Salmonella* están codificados en genes que se localizan en regiones específicas del genoma conocidas como islas de patogenicidad, que determinan a un microorganismo la capacidad de provocar daño debido a los genes que contienen. Se han identificado más de 10 islas de patogenicidad en *Salmonella* (SPI, por *Salmonella Pathogenicity Island*), algunas de las cuales se encuentran solamente en algunos serotipos. Las islas más estudiadas son las SPI-1 y SPI-2; ambas codifican un sistema de secreción tipo 3 (SST3), así como diferentes proteínas efectoras y reguladoras (Chapell *et al.*, 2009).

SPI-1

Se trata de una isla que se mantiene en todos los serotipos de *S. enterica*; comprende 40 genes que están involucrados en la expresión de los componentes para el SST3, así como proteínas chaperonas y reguladoras (Wallis-Galyov *et al.*, 2000). La función primordial de SPI-1 se da durante la fase inicial de infección, dentro del lumen intestinal, ya que las proteínas efectoras de esta isla son

necesarias para invadir a los enterocitos (Layton *et al.*, 2007). La expresión de los genes de SPI-1 es controlada tanto por reguladores globales como reguladores codificados en la isla. Entre los reguladores globales se encuentra el sistema de dos componentes BarA/SirA y el sistema CsrBC, entre otros (Martínez *et al.*, 2011). Los reguladores HilD, HilC y HilA son propios de la isla (Bustamante *et al.*, 2008). Las proteínas efectoras codificadas en SPI-1 son AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SopA, SopB/SopD, SopE, SopE2, SptP y SlrP (Lou *et al.*, 2019). Algunas de estas proteínas están codificadas fuera de SPI-1 pero son translocadas por el SST3 codificado en esta isla (Hansen-Wester *et al.*, 2001).

SPI-2

Esta isla posee 44 genes, los cuales están organizados en 4 operones que son necesarios para la virulencia: *ssa*, *ssc*, *sse* y *ssr*. El operón *ssa* codifica para el SST3, *ssc* codifica las chaperonas del SST3, *sse* codifica las proteínas efectoras y *ssr* codifica las proteínas reguladoras. La función principal de la SPI-2 es la de favorecer la supervivencia y la replicación intracelulares, por ejemplo, dentro de los macrófagos, una vez que ha sido fagocitada, lo cual se relaciona directamente con la presentación sistémica de la enfermedad. La expresión de estos genes está controlada por los sistemas globales de dos componentes EnvZ/OmpR y PhoQ/PhoP, y por el sistema de dos componentes SsrA/SsrB que está codificado dentro de la isla, por el operón *ssr* que ya se mencionó (Jennings *et al.* 2017).

La expresión de SPI-1 y SPI-2 está relacionada, pues existe una comunicación transcripcional entre ellas, dada cuando HilD, el regulador codificado en SPI-1 induce la expresión de SsrAB, el regulador central de SPI-2 (Martínez *et al.*, 2014).

Sistemas de secreción tipo 3 (SST3)

Estos son estructuras proteicas complejas que se ensamblan con el objetivo de formar un complejo similar a una aguja, la cual es utilizada por *Salmonella* para translocar las proteínas efectoras desde el citosol de la bacteria hacia el citosol de las células hospedadoras (Wagner *et al.*, 2018). Los sistemas de secreción se encuentran en múltiples bacterias, siendo el sistema de secreción tipo 3 (SST3) específico de bacterias Gram negativas. Como ya se mencionó, *Salmonella* posee dos SST3 que se encuentran codificados en SPI-1 y SPI2, respectivamente. Las proteínas translocadas por estos sistemas modifican la transducción de señales de la célula hospedadora, lo cual genera diversos efectos que permiten que la bacteria entre a la célula, sobreviva y se replique (Andrews-Polymeris *et al.*, 2010)

Patogénesis de la salmonelosis

En la figura 1 se mencionan los eventos principales de la infección por *Salmonella*.

Los hospedadores de *Salmonella* adquieren la infección vía oral mediante el consumo de alimento o agua contaminada y una vez deglutidas, llegan al estómago, en donde las que sobreviven al pH ácido, atraviesan y continúan hacia el intestino delgado (Chapell *et al.*, 2009). Otros elementos con los que la bacteria tiene que contender son la gruesa capa de moco rica en mucina e IgA, péptidos antimicrobianos, así como la presencia de la microbiota intestinal, la cual está compuesta por una gran cantidad de especies bacterianas, virus, bacteriófagos, arqueas, hongos, protozoos y algunos nematodos (Somer y Bäckhed *et al.*, 2013). Estos microorganismos han demostrado brindar beneficios al organismo como es evitar el crecimiento de enteropatógenos, fenómeno conocido como resistencia a la colonización (Wotzka *et al.*, 2017). Esto se logra gracias a la competencia que existe por el espacio y los nutrientes, así como por la producción de bacteriocinas, cuya función es parecida a los péptidos antimicrobianos producidos por el hospedero (Buffie *et al.* 2013).

En el intestino, *Salmonella* utiliza distintos tipos de fimbrias que le permiten adherirse a enterocitos y células M, las cuales son células epiteliales intestinales especializadas con una menor cantidad de cubierta de moco, glicocálix y menores microvellosidades (Rehman *et al.*, 2019).

Se ha reportado que *Salmonella* también posee un sistema de secreción tipo seis (SST6), el cual es muy similar al SST3 de manera funcional; sin embargo, el proceso de inyección empleando el SST6 es filogenética, estructural y mecánicamente diferente. El SST6 es capaz de perforar la membrana celular para así traslocar enzimas o toxinas que pueden manipular la maquinaria celular o matarla directamente; con el objetivo de eliminar bacterias comensales, *Salmonella* Typhimurium emplea su SST6 para inyectar su amidasa antibacteriana Tae4 (Sana *et al.*, 2016, Wotzka *et al.*, 2017).

Una vez que ha entrado en contacto con el epitelio, *Salmonella* utiliza su SST3 codificado por SPI-1 y trasloca proteínas efectoras como SopB, SopE, SopE2, SopA, SipA y SipC. SopB es una inositol fosfatasa que afecta a múltiples señalizaciones celulares durante la infección incluyendo el reordenamiento de membranas; SopB activa a las GTP-asas de la familia RHO como RAC1 y CDC42 para reordenar la membrana de la célula hospedadora mediante el factor de intercambio de guanina (GEF) de los efectores SopE y SopE2 (LaRock *et al.*, 2015).

SipC es una proteína que es esencial para la nucleación y agrupación de los filamentos de actina *in vitro*, lo que resulta en reordenamientos citoesqueléticos *in vivo*. Mientras que SipA no se requiere para la invasión, ésta se une con la actina-F inhibiendo su despolimerización por lo que su acción mejora la eficacia de este proceso (Santos *et al.*, 2003).

La traslocación de las proteínas efectoras (específicamente SopE, SopE2 y SopB) y la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's por sus siglas en inglés Pathogen Associated Molecular Patterns) como el LPS o flagelina, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR's, que proviene de la abreviación en inglés de Pattern Recognition Receptors), especialmente hablando

receptores tipo toll (TLR) y receptores tipo nod (NLR), da como resultado el estímulo para la producción de interleucina 8 (IL-8) a través de las MAP cinasas (MAPK) así como la vía del factor NF- κ B. Esto desestabiliza las uniones celulares estrechas y favorece la migración transepitelial de polimorfonucleares (neutrófilos en mamíferos o heterófilos en las aves) hacia el lumen intestinal (Chapell *et al.*, 2009, LaRock *et al.*, 2015). SipA y SopA contribuyen a que se continúe este último proceso (Lou *et al.*, 2019).

La inflamación como respuesta ante *Salmonella* es también inducida por la activación de caspasas inflamatorias mediante el estímulo de receptores tipo NOD, algunas de ellas se han observado en diferentes hospederos, como caspasa 11 en el modelo murino, caspasa 1, 2 y 5 en humanos (Jesenberger *et al.*, 2000, Lara-Tejero *et al.*, 2006). Algunas proteínas codificadas por el SST3 de SPI-1 como PrgI y FliC activan a la caspasa 1 en los macrófagos; esto provoca que estos comiencen a producir más citocinas proinflamatorias como IL-18 e IL-1 β , lo cual promueve la síntesis de IL-17 e IL-22 por linfocitos T, aumentando así la inflamación de la mucosa intestinal.

El proceso inflamatorio exacerbado y la migración de polimorfonucleares comienza a afectar la conformación del epitelio intestinal, manifestándose como necrosis de los enterocitos y provocando un medio altamente favorable para que la bacteria pueda proliferar. Esta puede inducir diarrea mediante el aumento de la secreción de fluidos por el aumento de secreción de cloro, gracias a proteínas efectoras como SopB, que aumenta su secreción mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI3), que funge como un inhibidor de la secreción de cloro dependiente del calcio; así mismo la actividad de esta proteína produce 1,4,5,6-tetrakifosfato, un componente que incrementa la secreción de cloro (Andrews-Polimenis *et al.*, 2010).

Poco después de traslocar sus proteínas efectoras, *Salmonella* tiene la capacidad de restaurar la estructura normal del citoesqueleto de la célula hospedadora a través de otra proteína traslocada por el SST3 de SPI-1, denominada SptP, actuando sobre los efectos hechos por SopE y SopE2, ya que desactiva a las GTP-asas CDC42 y RAC1, devolviéndole su morfología normal a la célula. Este mecanismo se ve

favorecido gracias a regulación temporal, ya que SopE es una proteína cuya vida media es considerablemente menor a comparación de SptP, lo que favorece su ubiquitinación y degradación rápida. Otra acción de SptP es la de revertir la cascada de señalización pro-inflamatoria; bloqueando las MAPK y revirtiendo la producción de IL-8 después de que *Salmonella* ha invadido. Otras proteínas participan en este proceso, tales como AvrA (codificada por SPI-1) y SspH1 (por SPI-2), que tienen como efecto bloquear la expresión génica dependiente de NF- κ B (Collier-Hyams *et al.*, 2002).

Factores como el estado inmunológico del hospedero, así como el serotipo de *Salmonella*, influyen en que se controle la enfermedad entérica o continúe como enfermedad sistémica.

Como se mencionó previamente, *Salmonella* es un microorganismo intracelular facultativo y debe comenzar a replicarse dentro de vacuolas llamadas *Salmonella*-containing vacuole (SCV), que se formaron al momento de internalizarse en la célula hospedera. La supervivencia intracelular se da mediante la traslocación de efectoras codificadas dentro de la SPI-2 como son SseF, SseG, PipB, PipB2, SteA, SifA, SifB, SteD, SseL, SseJSteC, SlrP y SseK2. SipC, es la efectora que favorece la secreción de SseB, SseC y de SseD (Jennings *et al.*, 2017)

Para que dé inicio la replicación, es necesario que SseG localice al complejo de Golgi, facilitando así las interacciones entre la célula hospedera y adquiriendo nutrientes. SseG junto con SseF forman un complejo de anclaje con la proteína asociada al complejo de Golgi ACBD3. No está totalmente claro si este proceso opera de la misma manera en macrófagos, donde *Salmonella* Typhimurium generalmente no forma microcolonias estrechas (Andrews-Polymeris *et al.*, 2010).

Para que las SCV's mantengan su integridad, es necesario que se formen cerca de redes de actina. Una vez realizado esto la bacteria puede comenzar a replicarse, dando origen a los túbulos inducidos por *Salmonella* (Sits, del inglés *Salmonella*-induced tubules), que corresponden a estructuras tubulares y filamentosas que contienen glicoproteínas lisosomales, los cuales son más evidentes en células

epiteliales y se extienden desde las SCV's a lo largo de los microtúbulos (Knuff y Finlay 2017). *sifA* es un gen que se ha asociado con la formación de estas estructuras, codificando una proteína efectora (SifA) secretada por el SST3 de SPI-2. SifA se ancla a la membrana de las SCV's y a los Sit's mediante la prenilación en la porción C-terminal del motivo hexapeptido por una geranylgeranyltransferasa del hospedador (Figueira *et al.*, 2012).

Otras efectoras involucradas en la formación de los Sits son SseF, SseG, PipB2 y SopD2. SseF y SseG se encargan de inducir el reclutamiento masivo de los microtúbulos en los estadios tardíos de infección, promoviendo así la agregación de vesículas derivadas del complejo de Golgi hacia las SCV (Dumont *et al.*, 2010).

En el interior de las células, *Salmonella* debe evitar ser destruida, por lo que algunas proteínas secretadas por SPI-2 interfieren con el tráfico de oxidasas NADPH hacia las SCV's. En el modelo murino, SseB ha sido relacionada con este proceso, sin embargo, no se sabe si su efecto es directo (Gallois *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2020). SipC interfiere en el tráfico celular al inhibir la fusión de los lisosomas con las SCV's. Es importante mencionar que *Salmonella* puede expresar enzimas que inactivan directamente a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas por los fagocitos del hospedador, como la catalasa y superóxido dismutasa. Sin embargo, la producción de especies reactivas de oxígeno por parte del hospedador también puede llegar a favorecer a la bacteria, ya que mediante la reacción con el tiosulfato luminal produce tetrionato y este puede ser utilizado como aceptor terminal de electrones, permitiéndole producir energía de manera más eficiente (Jennings *et al.*, 2017).

Durante la infección, *Salmonella* puede inducir la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) tanto en células epiteliales como en macrófagos. Esta señalización típicamente refuerza la producción de citocinas pro-supervivencia o factores antiapoptóticos a través del NF- κ B o mediante MAPK. Sin embargo, efectoras como GtgA, SspH1, SptP y potencialmente SseL pueden prevenir la activación de estas vías en lugar de conducir la señalización del TNF hacia cascadas de muerte celular programada incluyendo apoptosis, necroptosis y piroptosis, desencadenadas por

TNF, así como otros ligandos de receptores de muerte o activación de inflammasomas (Wemyss *et al.*, 2019).

Para que *Salmonella* logre diseminarse de manera sistémica, debe evadir a los macrófagos, diseminándose hacia el torrente sanguíneo provocando septicemia y así logra colonizar otros órganos como el hígado y bazo. Este proceso septicémico puede ocurrir después de la infección entérica con o sin signos de ésta. De igual manera se ha reportado que *Salmonella* puede colonizar al hígado y bazo mediante una ruta alterna en la cual no es requerida la colonización intestinal ni la invasión de enterocitos. En este caso, la bacteria es transportada desde el lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo y posteriormente a bazo e hígado gracias a macrófagos capaces de expresar CD18 (Vazquez-Torres *et al.*, 1999).

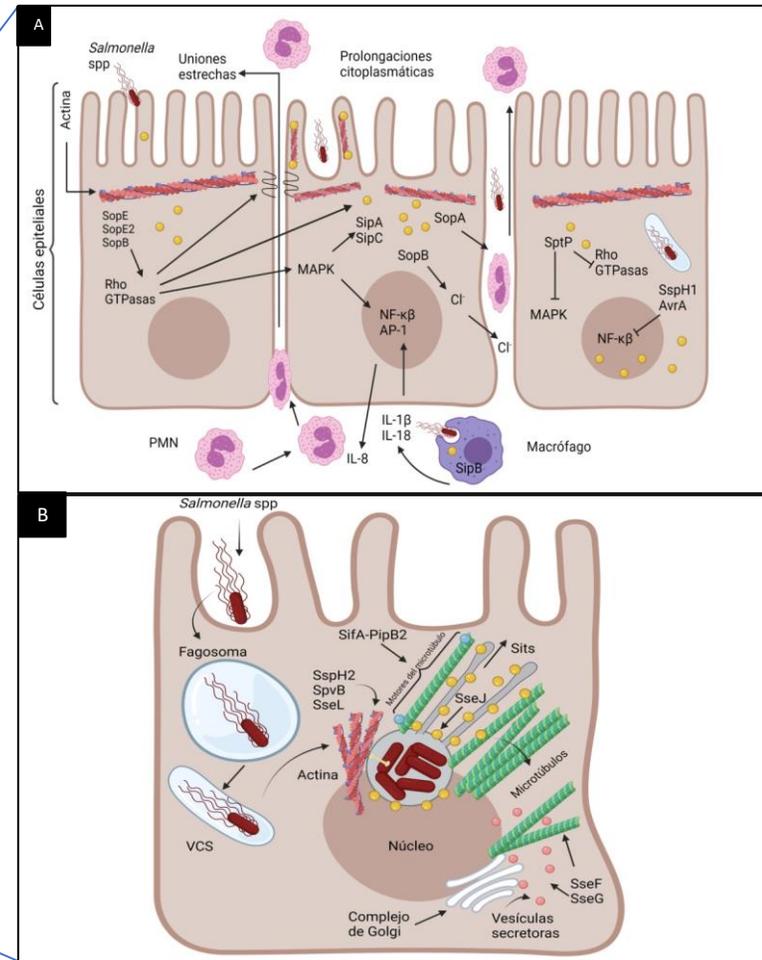
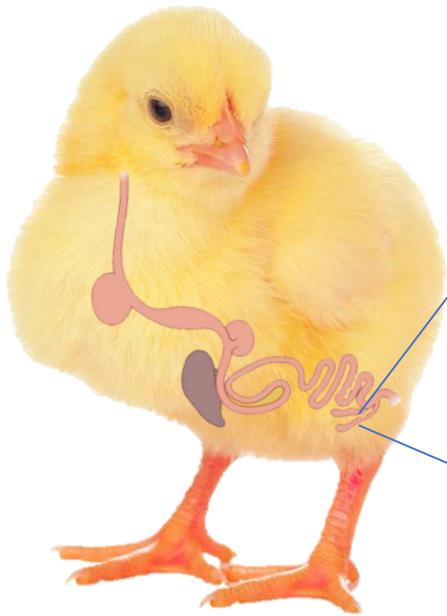


Figura 1. Patogenia de la salmonelosis. (A) al ingerir las bacterias vía oral, éstas pueden viajar a lo largo del tracto gastrointestinal y alcanzar la mucosa intestinal, donde mediante el uso de las proteínas efectoras codificadas en la SPI-1, se produce la internalización de la bacteria al citoplasma hospedero mediante la modificación de los arreglos del citoesqueleto, provocando la respuesta inflamatoria y migración de leucocitos. (B) Una vez dentro de las células, *Salmonella* se localiza dentro de las SCV's y comienza a utilizar efectoras de la SPI-2, para ubicarse cerca del complejo de Golgi y formar los Sits, para así poder adquirir nutrientes y continuar replicándose (Ver en el texto más detalles). **Modificado y adaptado de: Haraça et al., 2008.**

Lesiones

Las lesiones macroscópicas que se observan en infecciones por *Salmonella* se localizan en ciego, hígado y bazo principalmente. Se presenta enteritis fibrinonecrótica y ulcerativa, en ocasiones con la formación de pseudomembranas amarillas a cafés en casos agudos, mientras que en infecciones crónicas es posible encontrar abundante exudado tipo granulomatoso en los sacos ciegos, así como hemorragias multifocales en la mucosa intestinal, especialmente en las placas de Peyer. El hígado y el bazo pueden apreciarse aumentados de tamaño (hepatomegalia y esplenomegalia, respectivamente) con múltiples focos necróticos blancos y petequias a lo largo del parénquima. En aves, ocasionalmente tanto el hígado como el corazón pueden tener capas de fibrina adheridas (Swayne *et al.*, 2020).

Microscópicamente las lesiones intestinales se caracterizan por presentar pseudomembranas eosinofílicas sobre la mucosa, las cuales están compuestas por abundante fibrina, restos celulares, células inflamatorias y en ocasiones es posible encontrar colonias bacterianas. También se observa necrosis epitelial, hemorragias multifocales, atrofia y fusión de vellosidades con abundante infiltrado inflamatorio compuesto por polimorfonucleares (neutrófilos en mamíferos y heterófilos en aves), linfocitos, células plasmáticas y macrófagos que se localizan desde el epitelio hasta la lámina propia del órgano, llegando a abarcar la totalidad del intestino de manera transmural en casos graves. Comúnmente el hígado presenta focos multifocales de necrosis coagulativa, disociación de los cordones hepáticos, cúmulos linfoides e infiltrado inflamatorio compuesto de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos aunque ocasionalmente es posible observar polimorfonucleares en casos de infecciones agudas, mientras que en las aves con casos crónicos es posible observar lesiones granulomatosas con centros necróticos, abundantes linfocitos, macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas. En el bazo es posible encontrar focos necróticos, hiperplasia de la pulpa blanca e infiltrado inflamatorio (Swayne *et al.*, 2020).

Justificación

Salmonella es uno de los patógenos bacterianos más comunes a nivel mundial se estiman casi 94 millones de casos (Majowicz *et al.*, 2010), mientras que en nuestro país; hasta el año 2017 se tenía un promedio de 45,280 casos de fiebre tifoidea y más de 104,471 casos de fiebre paratifoidea u otras salmonelosis (Contreras-Soto *et al.*, 2019). *Salmonella* afecta a un amplio rango de hospederos, tanto animales como humanos; como se mencionó anteriormente, causa gastroenteritis autolimitante, pero en organismos jóvenes, adultos mayores e inmunocomprometidos puede causar enfermedad sistémica, septicemia y en ocasiones la muerte.

Para entender mejor la patogénesis de la salmonelosis, es necesario evaluar sus principales factores de virulencia. Los genes de SPI-1 y SPI-2 son los más estudiados debido a que son los más conservados a lo largo de todas las serovariedades. Para llevar a cabo el estudio de dichos factores de virulencia, es indispensable el uso de modelos animales. A este respecto, varios han sido los modelos que se han empleado para el estudio de las infecciones causadas por *Salmonella*, sin embargo, no en todos ellos es posible observar las mismas fases de la enfermedad.

Los bovinos como modelos de infección han sido utilizados para la evaluación de enterocolitis, pero esto conlleva importantes inconvenientes debido a su gran tamaño, así como el costo. Los ratones se han empleado para el estudio de las fases sistémicas de la enfermedad, ya que en ellos se puede reproducir la enfermedad que ocasiona *S. Typhi* en los humanos. Como estos animales son intrínsecamente resistentes al desarrollo de colitis, para el estudio de la enfermedad intestinal, se han adaptado ratones tratados con estreptomycin, lo que permite la colonización por *Salmonella*. Sin embargo, esto no se considera como un modelo natural de infección porque el uso de la estreptomycin permite la eliminación de bacterias comensales que favorecen la protección contra patógenos (Coombes *et al.*, 2005, Palmer *et al.*, 2017).

El pollo ha tenido una gran relevancia como una alternativa ante tales inconvenientes ya que dependiendo de la edad se puede observar la fase entérica o sistémica sin la necesidad de aplicar un tratamiento, además de proporcionar facilidades por su pequeño tamaño, fácil manejo y su reducido costo de mantenimiento. Otros modelos reportados han sido los conejos Nueva Zelanda y peces cebra (Panda *et al.*, 2014, Howlander *et al.*, 2016)

El papel de los genes de SPI1 y SPI2 se ha evaluado poco usando el modelo del pollo y esto se ha hecho utilizando mutantes que pierden únicamente el SST3, pero no los genes de toda la isla. En este trabajo se analizarán las capacidades de las mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2 al ser inoculadas en el modelo del pollo de 1 día de edad, así como su capacidad de diseminación hacia otros órganos, con la diferencia a trabajos similares, donde se utilizan mutantes en las cuales se elimina únicamente a los SST3.

Hipótesis

Dado que los genes de SPI-1 y SPI-2 son importantes para la enfermedad intestinal y sistémica de *S. Typhimurium*, cepas mutantes de Δ SPI-1 y Δ SPI-2 de *S. Typhimurium* se verán afectadas en su capacidad de producir lesiones histológicas con respecto a las cepas silvestres, en pollos de 1 día y 1 semana de edad.

Objetivos

Objetivo general

Determinar los efectos patológicos de las cepas mutantes de SPI-1 y SPI-2 de *Salmonella Typhimurium* en pollos de 1 día de edad.

Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la inactivación de los genes de SPI-1 y SPI-2, en el desarrollo de lesiones histopatológicas en los pollos infectados.

Realizar el conteo bacteriano en los órganos obtenidos en el estudio *post mortem* para evaluar la capacidad de las mutantes para diseminarse.

Determinar la localización de la bacteria durante la infección y si esta localización se afecta al remover los genes de SPI-1 y SPI-2

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, cultivos y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium SL1344	WT, Sm ^R	Hoiseth y Stocker, 1981
ΔSPI-1	ΔSPI- 1:: <i>kan</i>	Drecktrah <i>et al.</i> , 2006
ΔSPI-2	ΔSPI- 2:: <i>kan</i>	Knodler <i>et al.</i> , 2003

Las cepas mutantes se construyeron previamente, de acuerdo con la técnica descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner 2000). Todas las cepas se crecieron en medio LB adicionado con los antibióticos para los cuales tienen

resistencia (estreptomocina 100 µg/ml o kanamicina 20 µg/ml). Se crecieron durante 24 horas a 37°C.

Cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC) para la estandarización de los inóculos.

Las cepas empleadas se tienen conservadas en glicerol a -70°C. En 5 ml de medio LB con los antibióticos requeridos para cada cepa, se inocularon 15 µl de cada uno de los gliceroles de cada cepa y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 120 rpm. Al día siguiente, los 5 ml de cultivo se transfirieron a un matraz con 40 ml de medio LB con antibióticos para ser incubados de nuevo durante 5 a 6 horas (OD 0.6- 08) a 37°C en agitación a 200 rpm.

Terminado el tiempo de incubación, se cosecharon las bacterias en tubos Nalgene para ser centrifugadas a 5000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 30 ml de PBS 1x y se centrifugó de nuevo a 5000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante y las pastillas fueron resuspendidas en 2 ml de PBS 1x

Se transfirió 1ml de la pastilla a 10 ml de PBS 1x. Se transfirió 1 ml de esta suspensión a un tubo de 9 ml de PBS para realizar después diluciones décuplas seriadas con PBS 1x. 10 µl de cada una de estas diluciones fueron sembrados por cuadruplicado en agar LB y estas placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C. Al otro día se hizo el conteo de bacterias crecidas en cada caja y se calculó el número de bacterias/ml presentes en el inóculo original. Esto permitió determinar cuál sería la dilución a partir de la cual podríamos obtener los inóculos para infectar a los animales.

Infeción en pollos

Se adquirieron 120 pollos SPF de un día de edad, provenientes de la empresa ALPES. Se les ofreció alimento comercial, así como agua a libre acceso. Los pollos

fueron alojados en grupos de 15 individuos, en casetas separadas a una temperatura de 35°C.

Del total de pollos 60 fueron inoculados al día de edad y los otros 60 fueron inoculados hasta alcanzar la semana de edad. Cada uno de los 2 grupos se subdividió en grupos de 15 pollos cada uno, los cuales fueron inoculados vía oral (VO) con 1 ml de PBS que contenía 1×10^{10} UFC de la cepa silvestre, la cepa Δ SPI-1 o la cepa Δ SPI-2, respectivamente. Como controles negativos se empleó otro grupo de 15 pollos, quienes fueron inoculados con 1 ml de PBS 1x. Se aplicó eutanasia mediante decapitación; al grupo inoculado de un día de edad se realizó a las 24, 48 y 72 horas post infección (hpi), mientras que, a los inoculados a la semana de edad, se aplicó 1, 3 o 7 días post inoculación (dpi).

Estudio *post mortem* e histopatología

Durante la necropsia se tomaron muestras de 2 cm³ de ciego e hígado, que fueron conservadas y fijadas en formol al 10% durante 24 horas. Una vez fijados los órganos se procedió a cortarlos mediante el uso de navajas de microtomo. Se realizaron cortes transversales de las secciones de ciego e hígado, en los cuales fuera posible observar desde la serosa hasta la mucosa en el caso del ciego y tanto la cápsula como el parénquima en el caso del hígado. Después fueron embebidos en parafina, cortados con el microtomo, colocados en una laminilla y teñidos con la tinción de rutina hematoxilina y eosina (HyE) y Gram para su posterior evaluación microscópica. Cada órgano se revisó en su totalidad para así evaluar la presencia o ausencia de lesiones histológicas. Para cada órgano se asignó un puntaje de acuerdo con diferentes criterios histopatológicos cualitativos y cuantitativos (Tablas 2 y 3)

Tabla 2. Criterios histopatológicos para evaluar secciones de ciego.

Criterios de evaluación histopatológica				
Ciego				
Gradificación	Ausentes (0)	Escasas (1)	Moderadas (2)	Abundantes (3)
Lesión o hallazgo				
Bacterias intraluminales	0	Pocas, dispersas por el lumen	Las bacterias están abarcando el lumen y pocos focos del epitelio	Gran cantidad en el lumen, obstruyéndolo parcialmente y están sobre el epitelio de manera generalizada
Bacterias intracriptales	0	Menos del 10% de las criptas con presencia de bacterias	35% de ocupación de las criptas	75% o más de las criptas están ocupadas por bacterias
Cuerpos apoptóticos	0	1 a 10	1 a 25	>26
Exocitosis	0	20 a 160	160 a 250	>251
Degeneración vacuolar	0	1 a 10	11 a 20	>21

Infiltrado inflamatorio	0	Bien delimitado, no abarca la lámina propia	Bien delimitado, pero se expande sobre la lámina propia	Mal delimitado, expande lámina propia
Localización de heterófilos	Lámina propia (LP), Submucosa (SM), Muscular de la mucosa (MM), Muscular del órgano (MO)			
Gradificación	Ausencia		Presencia	
Lesión o hallazgo				
Congestión				
Edema				

Tabla 3. Criterios histopatológicos para evaluar secciones de hígado.

Criterios de evaluación histopatológica				
Hígado				
Lesión	Ausente (0)	Leve (1)	Moderado (2)	Abundante (3)
Focos necróticos	0	1 a 5	6 a 10	>11
Infiltrado inflamatorio	0	1 a 5	6 a 10	>11

Conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC)

Muestras de hígado y ciego fueron colectadas durante la necropsia en recipientes estériles y refrigeradas a 4 °C para realizar el conteo bacteriano. Las muestras se maceraron y homogeneizaron con solución PBS 1x estéril y posteriormente se elaboraron diluciones décuples seriadas que fueron sembradas en medio LB y verde brillante (preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante) suplementados con kanamicina o estreptomycin. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se calculó el número de UFC/mg de órgano empleando la siguiente fórmula:

$$UFC/g = \frac{(\text{No. de colonias}) (\text{Factor de dilución})}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

Extracción de DNA

Tanto de los bloques de parafina que contenían los órganos en los que se vieron bacterias, como de los cultivos bacterianos, se extrajo DNA.

Para extraer el ADN de los bloques de parafina se realizaron 5 a 8 cortes de tres micras que se colocaron en microtubos. Para eliminar la parafina, a cada tubo se le agregaron 1200 µl de xilol, se mezclaron y se centrifugaron durante 5 min a 14000 revoluciones por minuto (rpm). Se desechó el sobrenadante y se agregaron 1200 µl de etanol absoluto, se volvió a mezclar, y se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm. Esto se repitió una vez más. Posteriormente se decantó el etanol, se secaron las pastillas y se resuspendieron en 180-300 µl de buffer ATL del estuche comercial *DNeasy blood & tissue* (Qiagen). Se agregaron 20-40 µl de proteinasa K y se mantuvieron a 56°C toda la noche.

Para obtener DNA proveniente de los cultivos se agregó 200 µl del buffer ATL en un microtubo y con un asa esterilizada se tomó una colonia para posteriormente homogeneizar en el tubo. Una vez mezclada la colonia, se agregaron 40 µl de proteinasa K. El tubo se mantuvo a 56°C durante cuatro horas.

Después de la incubación a 56°C, tanto a los tubos provenientes de los bloques de parafina como los tubos provenientes de cultivos bacterianos, se les agregaron 200 µl de buffer AL, 200 µl de etanol absoluto y se mezcló. Esta mezcla se transfirió a una columna de purificación y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Se desechó el centrifugado y la columna se transfirió a un nuevo tubo de colección. Se le agregaron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm, se desechó el filtrado y se agregaron 500 µl de buffer AW2 para volverse a centrifugar durante 2 minutos a 14000 rpm. Finalmente, la columna se transfirió a un microtubo, en donde se agregaron 60 µl de agua y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos. El DNA así eluído fue conservado en refrigeración hasta su uso.

Amplificación de los genes *hilA* y *ssrB* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el DNA extraído de los cultivos bacterianos o de los órganos contenidos en bloques de parafina, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se amplificaron los genes *hilA* (de la SPI1) y *ssrAB* (de la SPI-2). Para amplificar *hilA* se emplearon los oligonucleótidos (diseñados manualmente en el departamento de patología, tomando como base la secuencia del genoma completo de la cepa *Salmonella* Typhimurium SL1344) *hilA*-F (5'-ACT GTA CGG ACA GGG CTA TC-3') y *hilA*-R (5'-GCG AAG TCC GGG AAT ACA TC-3') que amplifican un producto de 441 pb. Para *ssrAB*, se emplearon los oligonucleótidos *ssrB*-F (5'-GAT CTT AGT CTA CCT GGC ATC-3') y *ssrB*-R (5'-ACC TCA TTC TTC GGG CAC AG-3'), que amplifican un producto de 459 pb. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 microlitros, que contenía 12.5 µl de TopTaq Master Mix (1.21 unidades de la Taq polimerasa, buffer para PCR con 1.3 nM de MgCl₂, 200 microlitros de cada dNTP's), 1.5 µl de cada primer a una concentración de 25 pmol y 10 µl del DNA extraído. Las condiciones para la reacción fueron desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización 1 min a 94°C, alineamiento 1 min a 62°C y extensión 1 min a 72°C; y finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Electroforesis en gel

Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel. Para esto se separaron en un gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe y fueron visualizados mediante iluminación ultravioleta en un transiluminador UVP UV (Analytik jena).

Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes de 5 μm de las muestras de ciego e hígado embebidas en parafina los cuales se colocaron en laminillas electrocargadas. Los tejidos se desparafinaron a una temperatura de 55°C por 30 minutos y 10 pases en xilol absoluto. Después se rehidrataron en soluciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 80% y 70%), y se lavaron en agua destilada. Para inhibir las peroxidasas endógenas, las laminillas se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno y metanol en una proporción 3ml/100ml por 20 minutos a temperatura ambiente. Para la recuperación antigénica, las muestras fueron incluidas en solución Diva Decloaker 1/20 (Biocare Medical) y se colocaron en una olla a presión durante 3 minutos, se atemperó durante 5 minutos y se lavaron con PBS-TWEEN al 0.1%. Después del bloqueo, las muestras fueron incubadas con Background Sniper (Biocare Medical) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS-Tween al 0.1%. Posteriormente se aplicó a todas las muestras un anticuerpo policlonal primario anti-*Salmonella* Typhimurium (BIOSS) diluido en una proporción 1:300; se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y se volvió a lavar con PBS-Tween al 0.1%. Subsecuentemente las muestras fueron expuestas con un polímero-HRP (Biocare Medical) durante 30 minutos, se lavaron con PBS-Tween al 0.1% y finalmente se aplicó diaminobencidina (Betazoid DAB cromógeno de Biocare Medical) durante 1 min 10 segundos para detectar al anticuerpo secundario que está acoplado al polímero, mediante la reacción con la DAB. Como control positivo se emplearon muestras de pollos inoculados con una cepa WT y posteriormente incubados con un anticuerpo anti-S.Typhimurium. Como controles negativos se usaron muestras de pollos inoculados con la cepa WT e incubados con PBS y muestras de pollos no inoculados incubados con anticuerpos anti-S.Typhimurium.

Análisis estadísticos

Los puntajes histopatológicos fueron comparados mediante el uso de las pruebas no paramétricas Mann-Whitney U y Kruskall Wallis.

Los conteos bacterianos fueron analizados mediante el análisis de varianza mediante el software SPSS.

Resultados

Determinación de UFC's

A partir de los ciegos de los pollos inoculados con la cepa silvestre al día de edad, se obtuvieron 10^{10} UFC/g de manera constante a las 24, 48 y 72 hpi (Fig. 2A). En el hígado la cepa silvestre también fue recuperada a lo largo de los 3 días, aunque en cantidades menores (10^7 - 10^8) en comparación con el ciego (Fig. 2B). En contraste, las cepas mutantes se vieron afectadas en crecimiento, pues la mutante Δ SPI-1 fue recuperada de las muestras de ciegos a las 24 hpi en cantidades similares a la cepa WT, pero no recuperada a las 48 o 72 hpi (Fig. 2A), mientras que la mutante Δ SPI-2 no se recuperó de los ciegos en ningún tiempo (Fig. 2A). Y en el caso de los hígados, ninguna de las dos mutantes fue recuperada en ninguno de los tiempos de muestreo (Fig. 2B).

Por otro lado, en los ciegos de los pollos inoculados a la semana de edad, la cepa WT fue recuperada en cantidades bajas (10^3) 1 dpi, y estas cantidades aumentaron en los 3 y 7 dpi hasta recuperar 10^6 . Sin embargo, estas cantidades fueron considerablemente menores a las encontradas en los ciegos de los pollos de 1 día de edad (10^6) (Fig. 2C). En los hígados de estos pollos, la cepa WT también fue recuperada en cantidades crecientes durante los 7 dpi; sin embargo, su crecimiento se vio notablemente disminuido (10^3) (Fig. 2D) en comparación con la cepa silvestre obtenida de los ciegos en estos animales (10^6). La mutante Δ SPI-1 fue recuperada de los ciegos en cantidades similares a la WT durante los primeros 3 dpi, pero su

crecimiento se vio afectado en comparación con la WT a los 7 dpi, mientras que en los hígados únicamente fue recuperada a los 7 dpi, pero en cantidades significativamente menores a la cepa WT (Fig. 2C). La mutante Δ SPI-2 se vio más afectada en el crecimiento en los ciegos, puesto que únicamente fue recuperada a los 3 y 7 dpi pero en cantidades mucho menores (10^2 - 10^1 , respectivamente) que la cepa WT (10^6). En los hígados, la mutante Δ SPI2 también estuvo severamente afectada en crecimiento, aunque en dos pollos se recuperaron escasas colonias en el día 3 post inoculación; sin embargo, eso no fue significativo (Fig. 2D).

En todos los casos, se comprobó que las bacterias obtenidas a partir de los cultivos en LB y VB correspondiera a *S. Typhimurium* mediante PCR en la que se emplearon oligonucleótidos específicos que amplificaban a *hilA* o *ssrB*, genes pertenecientes a SPI-1 y SPI-2, respectivamente (Fig. 3).

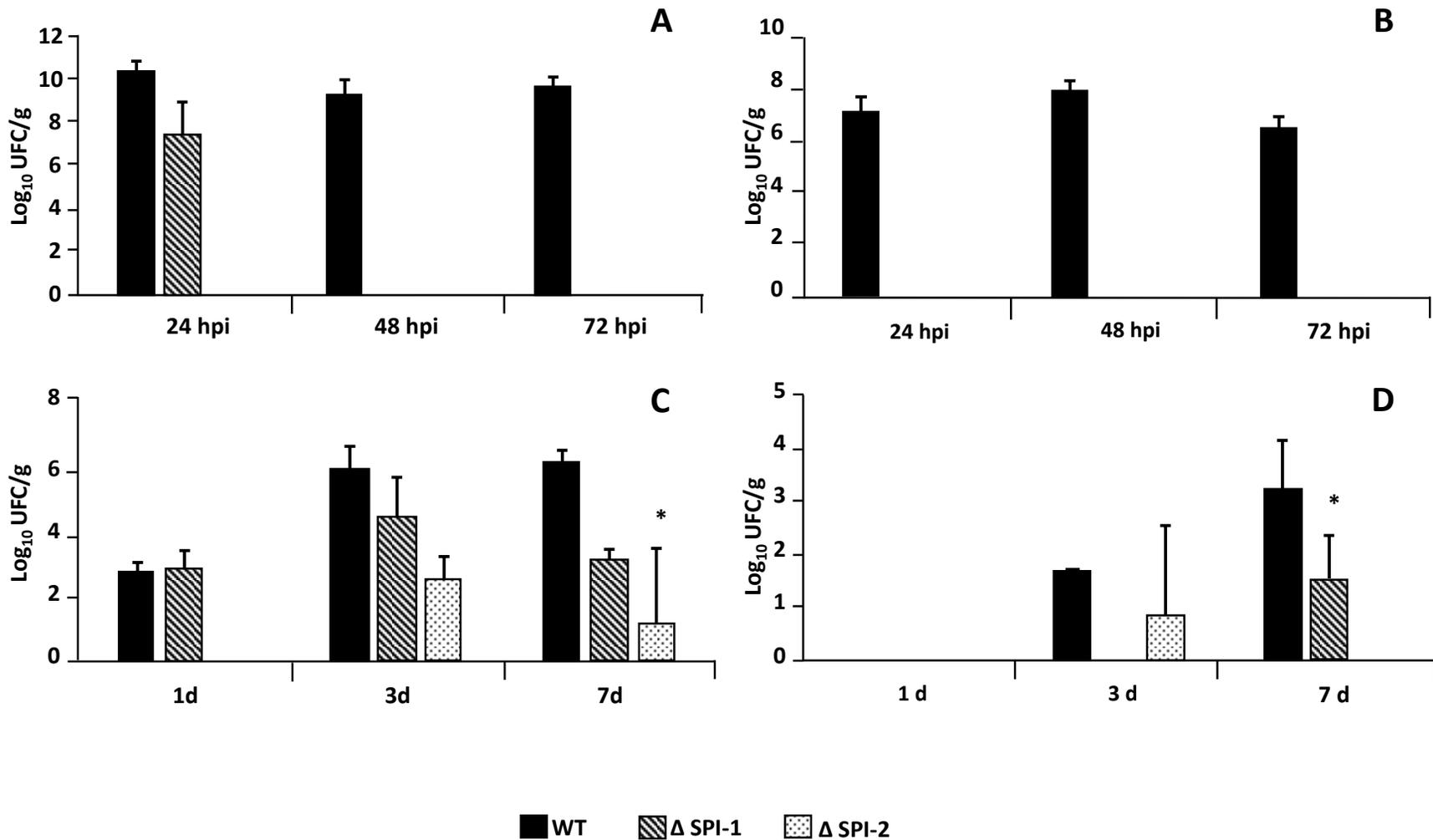


Figura 2. Cálculo de unidades formadoras de colonia (UFC) en ciegos (A, C) e hígados (B, D) de pollos de 1 día de edad (A, B) y 1 semana de edad (C, D), infectados con la cepa silvestre de *Salmonella* Typhimurium o sus derivadas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2. Análisis de varianza; las barras corresponden con el error estándar (\pm), los asteriscos la significancia ($P < 0.05$).

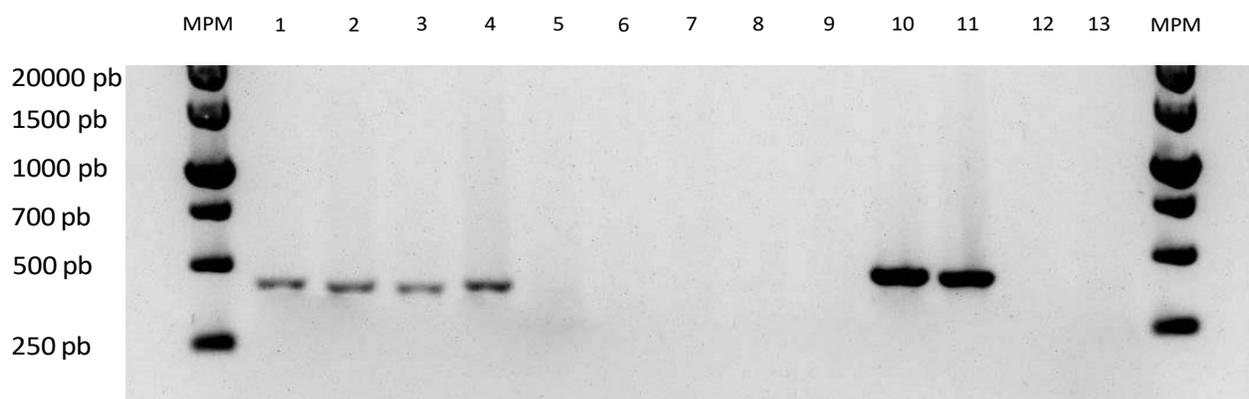


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de DNA amplificados mediante la PCR. Carriles 1-3: muestras de pollos inoculados con la cepa WT; carriles 4-6: muestras de pollos inoculados con la cepa Δ SPI-1; carriles 7-9: muestras de órganos inoculados con la cepa Δ SPI-2; carriles 10 y 11: controles positivos; carriles 12 y 13: controles negativos. MPM: Marcador de peso molecular 1 Kb plus

Análisis histopatológico

Los órganos de pollos de 1 día de edad inoculados con la cepa WT comenzaron a mostrar alteraciones morfológicas indicativas de enfermedad entérica a las 24 hpi, tales como exocitosis, numerosos cuerpos apoptóticos y abundante infiltrado inflamatorio linfocítico. En este punto se observaron muy pocos cambios vasculares como congestión leve de los vasos de la submucosa y escasos bacilos Gram negativos que se localizaron tanto en el lumen como adheridos al epitelio y dentro de las criptas intestinales. (Fig. 4A). La tinción de Gram permitió evidenciar que estos bacilos se encontraban dentro de vacuolas citoplasmáticas, tanto en enterocitos como en macrófagos (Fig. 5A) Los hígados de estos pollos no mostraron cambios histológicos aparentes.

A las 48 hpi la exocitosis fue más evidente, se apreciaron focos de degeneración vacuolar en los enterocitos (Fig. 4C) y el infiltrado inflamatorio granulocítico y mononuclear, con macrófagos dispersos sobre la lámina propia. El número de bacterias Gram negativas aumentó tanto en el lumen, el epitelio y ahora se encontraron dentro de la mayoría de las criptas intestinales, en enterocitos (Fig. 5B

y 5C), y dentro de algunos macrófagos se observaron además algunas lesiones con aspecto de volcán, compuestas por fibrina, restos celulares, granulocitos degenerados y ocasionalmente bacterias, que se encontraban adyacentes a grupos de heterófilos (Fig. 4B). En el caso del hígado, la presencia de focos necróticos e infiltrado inflamatorio comenzó a ser visible a esta hora. Los focos necróticos se caracterizaban por la presencia de heterófilos degranulados en el centro y por la disociación de los cordones hepáticos, debido a la presencia de material hipereosinofílico denso compatible con restos celulares. En la periferia de los focos necróticos, se observó abundante infiltrado linfocítico y plasmocítico que también se expandía entre los hepatocitos.

En los ciegos del grupo inoculado con la cepa WT, a las 72 hpi se encontró el mayor número de lesiones. Algunos de los vasos sanguíneos de la submucosa presentan en su interior material hipereosinofílico acelular (edema) mientras que los cuerpos apoptóticos fueron más evidentes (Fig. 4D y 4E). La cantidad de bacilos Gram negativos era mucho más abundante tanto en el lumen como en las criptas, enterocitos y dentro de vacuolas localizadas en la lámina propia (Fig. 4F y 4G) (Fig. 5C y 5D). La exocitosis se encontró en todas las secciones de ciego analizadas; el conteo de heterófilos aumentó de manera importante y algunos de ellos estaban degranulados. El infiltrado inflamatorio linfocítico, plasmocítico e histiocítico era más abundante, se distribuía a lo largo de toda la lámina propia y en algunos pollos de manera transmural. En el hígado los focos necróticos y el infiltrado inflamatorio aumentaron considerablemente. Estos focos eran de mayor tamaño y se localizaban de manera multifocal a lo largo del parénquima; algunos cercanos a venas centrales y triadas porta (Fig. 4H).

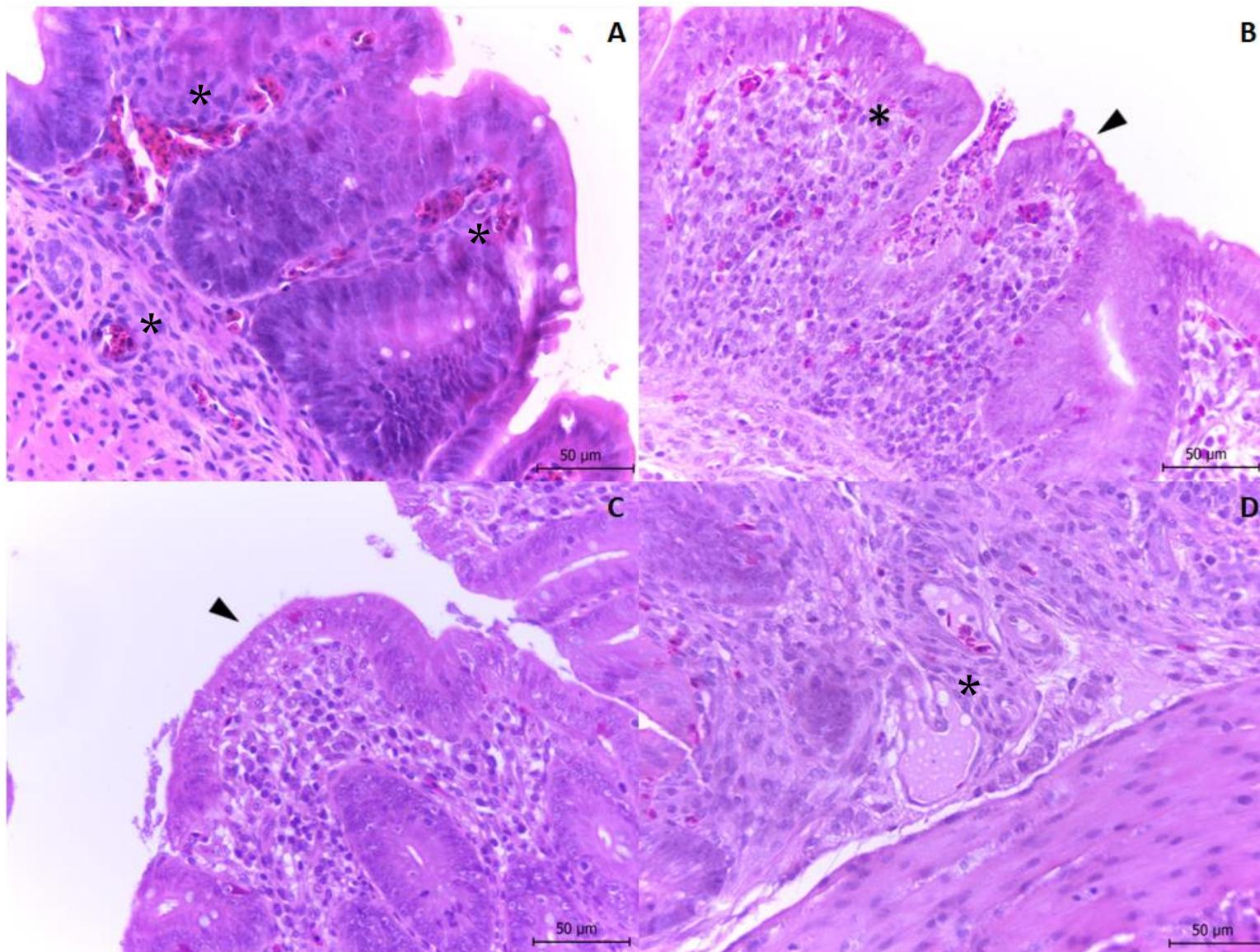
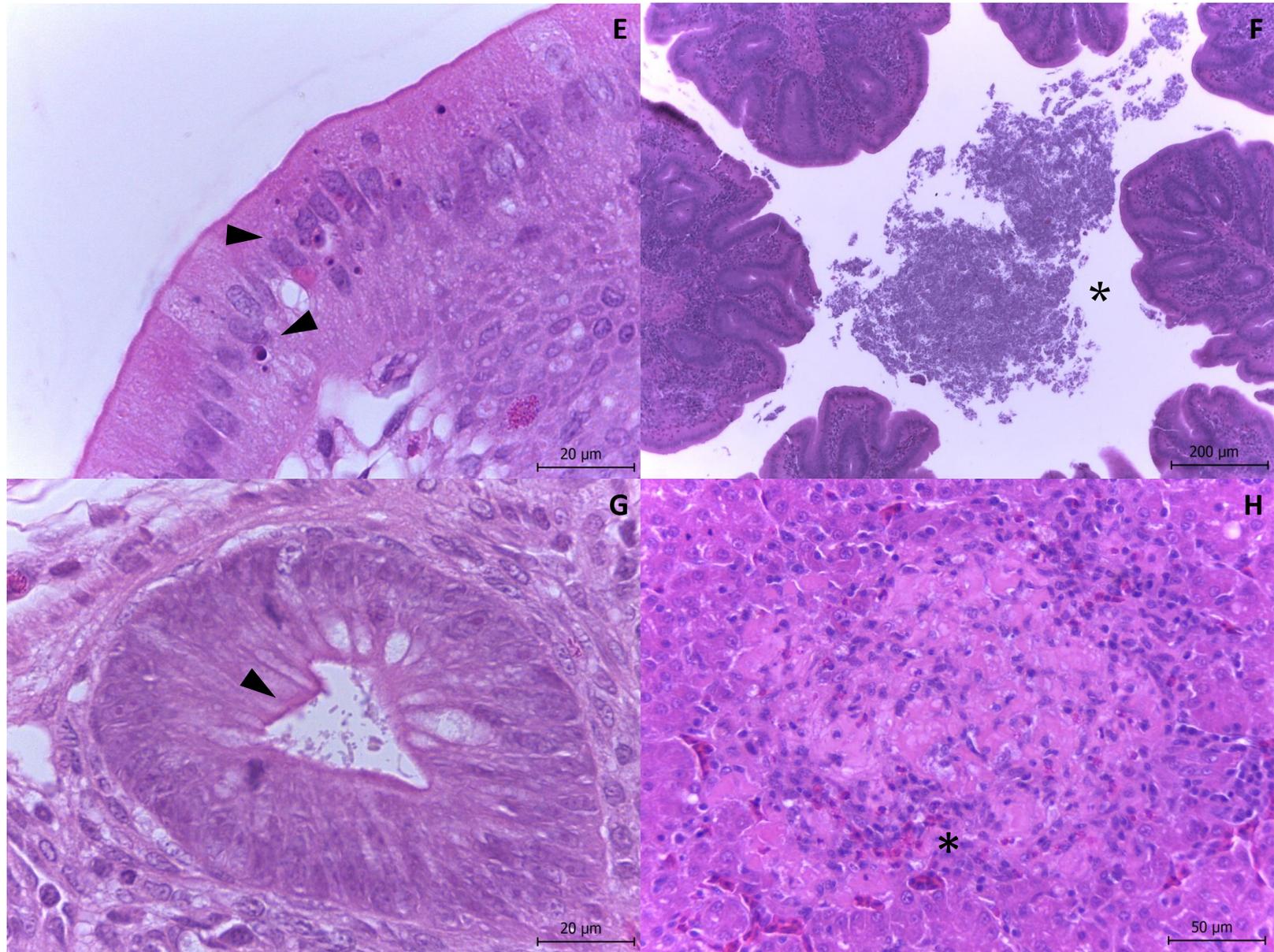


Figura 4. Lesiones histológicas en pollos de 1 día de edad inoculados con la cepa WT. (A) Los vasos sanguíneos de la lámina propia y de la submucosa se encuentran repletos de eritrocitos indicando congestión (Asteriscos). (B) La mucosa cecal presenta algunos enterocitos retraídos, con su núcleo fragmentado y citoplasma hipereosinofílico (punta de flecha). Algunos heterófilos están entremezclados en el epitelio (asterisco); así mismo es posible ver abundantes restos necróticos con aspecto de volcán y la lámina propia engrosada por infiltrado mononuclear. (C) El citoplasma de los enterocitos muestra múltiples vacuolas desplazando ligeramente al núcleo a la periferia (punta de flecha). (D) Los vasos sanguíneos de la submucosa se encuentran dilatados por la presencia de material acelular eosinofílico correspondiente con edema (Asterisco). (Continúa)



Continuación figura 4. (E) Algunos de los enterocitos muestran restos nucleares correspondientes a cuerpos apoptóticos (Puntas de flecha). (F) En la luz cecal es notoria la presencia de bacterias intraluminales (Asterisco), así mismo la lámina propia se encuentra engrosada por infiltrado inflamatorio. (G) En la luz de algunas criptas intestinales es evidente la presencia de bacterias, especialmente bacilos cortos (Punta de flecha). (H) Sección histológica de hígado. Los sinusoides hepáticos se encuentran disociados por focos hipereosinófilos correspondientes a áreas de necrosis, infiltrado inflamatorio mononuclear y escasos heterófilos degenerados (asterisco), Los vasos sanguíneos muestran congestión.

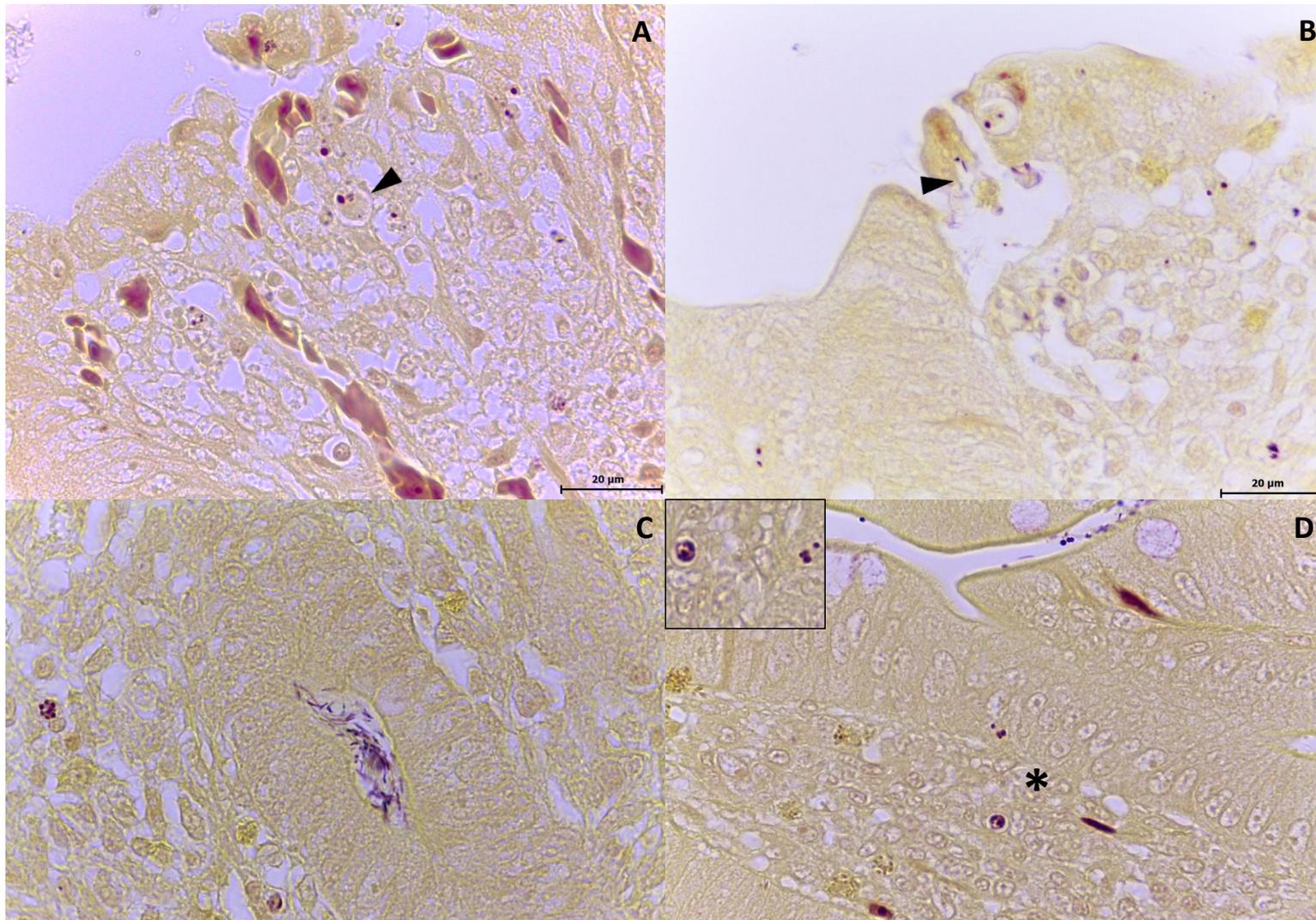


Figura 5. Tinción de Gram de ciegos de los pollos de 1 día de edad, inoculados con la cepa WT. (A) En algunas secciones, donde el epitelio presenta pérdida de la continuidad y hay reacción inflamatoria, es posible encontrar bacilos Gram negativos dentro de vacuolas (punta de flecha). (B) Es posible encontrar bacilos Gram negativos entremezclados en las zonas de lesiones, reacción inflamatoria y cuerpos apoptóticos (punta de flecha). (C) Las bacterias que se encuentran en la luz de las criptas intestinales, corresponden a bacilos Gram negativos. (D) Tanto en la lámina propia como en los enterocitos es posible encontrar vacuolas en cuyo interior se encuentran bacilos cortos Gram negativos (asterisco e inserto en la parte superior izquierda).

Los pollos de 1 día de edad inoculados con la cepa Δ SPI-1 presentaron una disminución considerable de lesiones en comparación con aquellos inoculados con la cepa WT. A las 24 hpi en el ciego los conteos de heterófilos y cuerpos apoptóticos fueron menores, la degeneración vacuolar fue escasa y no hubo presencia de bacterias ni exocitosis (Fig. 6A). A las 48 y 72 hpi los heterófilos aumentaron ligeramente y la presencia de bacterias comenzó a ser evidente en la luz intestinal y en algunas de las criptas. En uno de los pollos se observaron escasos focos de exocitosis leve sin cercanía a alguna lesión o bacterias. Sin embargo, todos estos hallazgos fueron mucho más leves que los encontrados en los ciegos de los pollos inoculados con la cepa WT. Ningún pollo presentó alguna lesión en el hígado en todos los tiempos de muestreo (Fig. 6B).

A diferencia de lo observado con la cepa SPI-1, en el grupo de pollos de 1 día de edad inoculados con la mutante Δ SPI-2, la presencia escasas bacterias lumbales e intracriptales se observó desde las 24 h y los conteos de heterófilos fueron ligeramente mayores; además se observaron cuerpos apoptóticos. Mientras que, en comparación con la cepa WT la disminución de lesiones fue evidente, ya que no se observó degeneración vacuolar ni exocitosis (Fig. 6C). A las 48 hpi las lesiones observadas fueron similares a las de las 24 hpi, con menor número de bacterias en el lumen y en las criptas, y número ligeramente mayor de cuerpos apoptóticos. Así mismo, el conteo de heterófilos disminuyó de manera significativa en comparación con las cepas WT y Δ SPI-1. A las 72 hpi se observó una cantidad escasa de bacterias tanto en el lumen, epitelio y las criptas en comparación con la cepa WT. Los cuerpos apoptóticos aumentaron ligeramente, pero sin evidencia de lesiones asociadas a microorganismos. El conteo de heterófilos fue ligeramente mayor que en la mutante Δ SPI-1, pero éstos estaban bien distribuidos a lo largo de la lámina propia sin atravesar el epitelio ni las criptas intestinales. Al igual que en la mutante Δ SPI-1, no hubo lesiones hepáticas ni alteraciones vasculares (Fig. 6D). En los pollos del grupo control, fue común encontrar áreas con gran cantidad de heterófilos; pero estos se encontraban distribuidos únicamente en la lámina propia y nunca se observaron lesiones ni microorganismos asociados (Fig. 6E). Así mismo, los hígados de estos pollos presentaron degeneración lipídica micro/macro vesicular,

hallazgo que se considera normal en pollitos neonatos y tiende a desaparecer en las primeras semanas de vida, debido a que es resultado de la movilización lipídica proveniente del saco vitelino, que servía como fuente de alimento en etapas embrionarias (Fig. 6D). El resumen del puntaje para la evaluación histopatológica de ambas infecciones se encuentra en las figuras 7, 8 y las tablas 4 a 11.

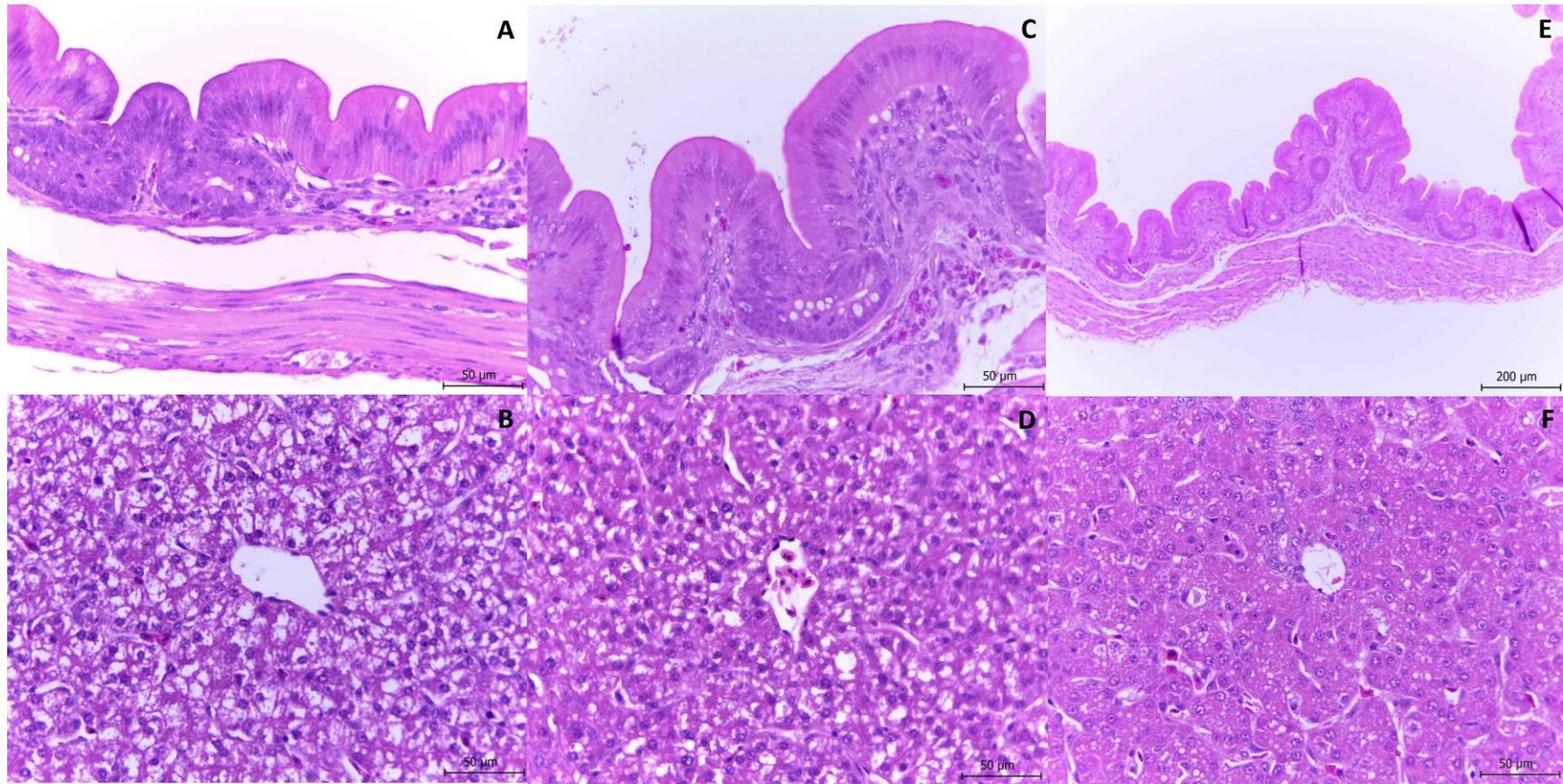
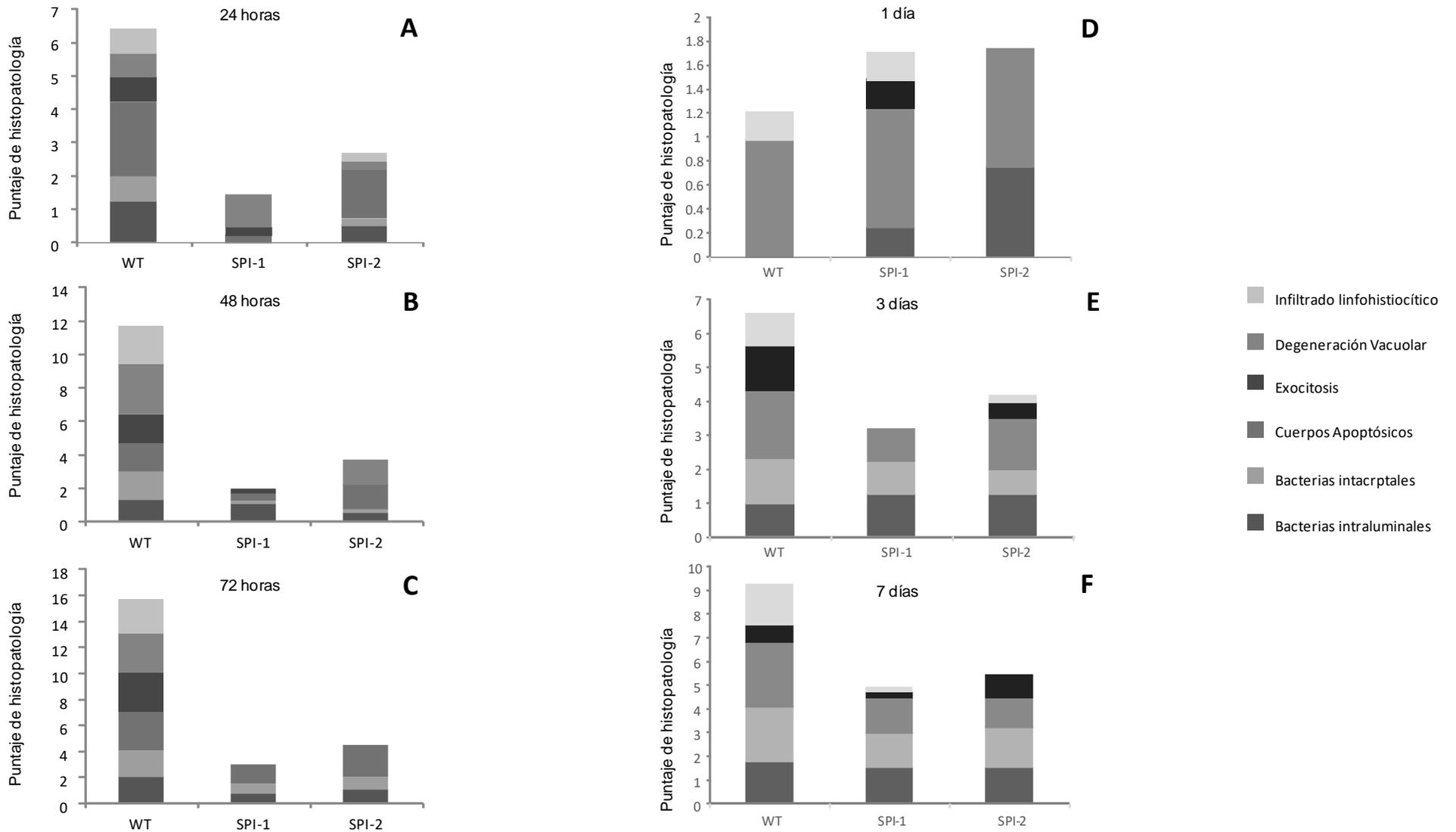


Figura 6. Histopatología de los pollos de 1 día de edad, inoculados con las cepas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2. (A) Ciego de pollo inoculado con la cepa Δ SPI-1, en la cual la arquitectura normal del órgano se mantiene y no hay evidencia de infiltrado inflamatorio. (B) Hígado de pollo inoculado con la cepa Δ SPI-1, donde es posible ver que los hepatocitos presentan degeneración vacuolar, hallazgo normal en aves de esta edad. (C) Ciego de pollo inoculado con la cepa Δ SPI-2, en donde la lámina propia está ligeramente engrosada por un discreto infiltrado linfocítico y heterófilo; sin embargo el epitelio carece de lesiones. (D) Hígado de pollo inoculado con la cepa Δ SPI-2; la arquitectura normal del hígado se encuentra conservada exhibiendo únicamente degeneración microvacuolar. Ciego (E) e hígado (F) de aves pertenecientes al grupo control.



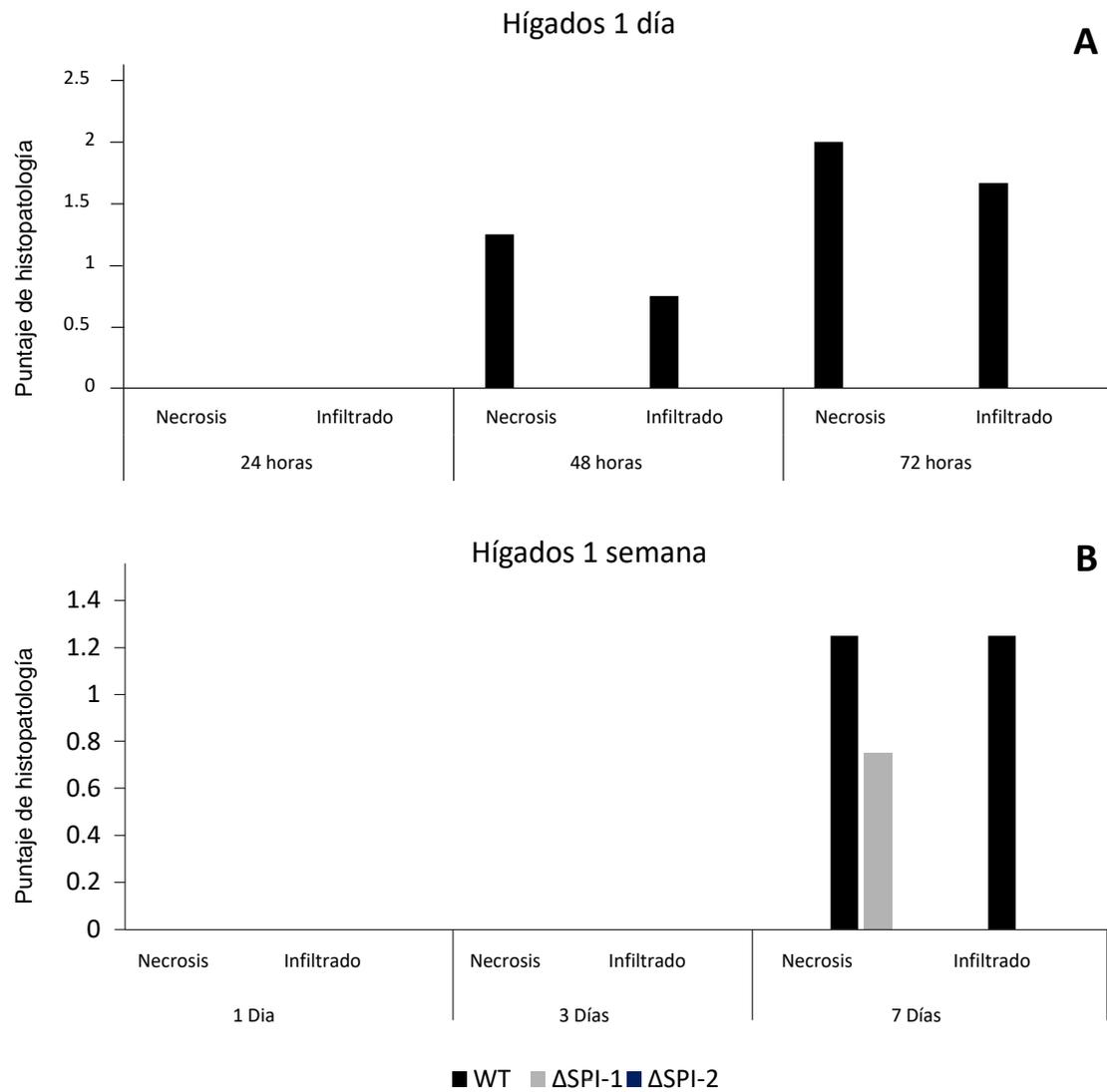


Figura 8. Resumen de los hallazgos histopatológicos en hígados de los pollos de 1 día (A) y 1 semana (B) de edad inoculados con la cepa WT y sus derivadas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2.

Tabla 4. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 día de edad, inoculados con la cepa WT

Órgano	Tiempo	24 horas				48 hrs				72 hrs			
	Cepa	WT				WT				WT			
	Numero de pollo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ciego	Bacterias intraluminales	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	ND
	Bacterias intacrtales	0	2	1	0	2	2	1	2	2	2	2	ND
	Cuerpos Apoptósicos	1	2	3	3	2	1	1	3	3	3	3	ND
	Exocitosis	1	1	0	1	1	1	3	2	3	3	3	ND
	Degeneracion Vacuolar	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	ND
	Infiltrado linfohistiocítico	1	1	0	1	2	2	2	3	3	2	3	ND
	Localización heterófilos	LP, SM	EP, LP, SM	LP	EP, LP, SM	EP, LP, SM	EP, LP, SM, MO	LP, SM, MB, EP	EP, LP	EP, LP, SM	EP, LP, SM, MO	EP, LP, SM, MO	ND
Hígado	Focos necróticos	0	0	0	0	1	1	1	2	2	1	3	ND
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	2	ND

Tabla 5. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 día de edad inoculados con la cepa Δ SPI-1

Órgano	Tiempo	24 horas				48 hrs				72 hrs			
	Cepa	Δ SPI-1				Δ SPI-1				Δ SPI-1			
	Numero de pollo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ciego	Bacterias intraluminales	0	0	0	0	1	0	2	1	0	1	1	1
	Bacterias intacrtales	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	Cuerpos Apoptósicos	0	1	0	0	1	0	0	1	2	1	2	1
	Exocitosis	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Degeneracion Vacuolar	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Localización heterófilos	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP
Hígado	Focos necróticos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 6. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 día de edad, inoculados con la cepa Δ SPI-2

Órgano	Tiempo	24 horas				48 hrs				72 hrs			
	Cepa	Δ SPI-2				Δ SPI-2				Δ SPI-2			
	Numero de pollo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ciego	Bacterias intraluminales	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	Bacterias intacrptales	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	Cuerpos Apoptósicos	0	2	1	3	0	2	2	2	3	2	3	2
	Exocitosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Degeneracion Vacuolar	0	0	1	0	0	0	3	3	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Localización heterófilos	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP
Hígado	Focos necróticos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 7. Evaluación histopatológica de los pollos del grupo control, de 1 día de edad

Órgano	Tiempo	24 horas				48 hrs				72 hrs			
	Cepa	Control				Control				Control			
	Numero de pollo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ciego	Bacterias intraluminales	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND
	Bacterias intacrptales	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND
	Cuerpos Apoptósicos	3	1	2	ND	3	0	0	ND	0	0	0	ND
	Exocitosis	0	0	0	ND	2	0	0	ND	0	0	0	ND
	Degeneracion Vacuolar	0	0	0	ND	3	0	0	ND	0	0	0	ND
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND
	Localización heterófilos	LP	LP	LP	ND	LP	LP	LP	ND	LP	LP	LP	ND
Hígado	Focos necróticos	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND

Tabla 8. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa WT

Órgano	Tiempo	1d				3d				7d			
	Cepa	WT				WT				WT			
	Numero de pollo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ciego	Bacterias intraluminales	0	0	0	0	1	1	1	ND	2	1	2	2
	Bacterias intacrptales	0	0	0	0	0	2	2	ND	2	(+)	2	3
	Cuerpos Apoptósicos	1	1	1	1	1	3	2	ND	3	2	3	3
	Exocitosis	0	0	0	0	1	1	2	ND	2	1	0	0
	Degeneracion Vacuolar	0	0	0	1	1	1	1	ND	2	1	1	3
	Infiltrado linfohistiocítico	0	0	0	0	1	3	2	ND	3	3	1	3
	Localización heterófilos	LP	LP	LP	LP	EP,LP	EP,LP	EP,LP	ND	LP	EP,LP	LP	LP
Hígado	Focos necróticos	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	0

Tabla 9. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa Δ SPI-1.

Órgano	Tiempo	1d				3d				7d			
	Cepa	Δ SPI-1				Δ SPI-1				Δ SPI-1			
	Numero de pollo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ciego	Bacterias intraluminales	0	0	0	1	1	1	2	1	2	1	2	1
	Bacterias intacrptales	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	2	2
	Cuerpos Apoptósicos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
	Exocitosis	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Degeneracion Vacuolar	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Localización heterófilos	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	EP,LP	LP	LP
Hígado	Focos necróticos	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 10. Evaluación histopatológica de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa ΔSPI-2.

Órgano	Tiempo	1d				3d				7d			
	Cepa	ΔSPI-2				ΔSPI-2				ΔSPI-2			
	Numero de pollo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ciego	Bacterias intraluminales	1	1	0	1	1	1	1	2	2	0	1	3
	Bacterias intacptales	0	0	0	0	2	0	0	1	3	0	2	2
	Cuerpos Apoptósicos	1	1	1	1	2	2	1	1	2	0	0	3
	Exocitosis	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2
	Degeneracion Vacuolar	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	3	1	0	0	3	3	3	3
	Localización heterófilos	LP	LP	LP	LP	EP,LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP	LP
Hígado	Focos necróticos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 11. Evaluación histopatológica de los pollos del grupo control, de 1 semana de edad

Órgano	Tiempo	1d				3d				7d			
	Cepa	Control				Control				Control			
	Numero de pollo	1	2	ND	ND	1	2	ND	ND	1	2	ND	ND
Ciego	Bacterias intraluminales	(+)	(+)	ND	ND	(+)	(+)	ND	ND	(+)	(+)	ND	ND
	Bacterias intacptales	(+)	(+)	ND	ND	(+)	(+)	ND	ND	(+)	(+)	ND	ND
	Cuerpos Apoptósicos	0	0	ND	ND	2	0	ND	ND	21	0	ND	ND
	Exocitosis	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND
	Degeneracion Vacuolar	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND
	Infiltrado inflamatorio	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND
	Localización heterófilos	LP	LP	ND	ND	LP	LP	ND	ND	LP	LP	ND	ND
Hígado	Focos necróticos	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND
	Infiltrado inflamatorio	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND	0	0	ND	ND

En los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa WT, en el día 1 pi (post infección) se observaron escasos cuerpos apoptóticos en los enterocitos, la lámina propia presentó escasos heterófilos y se observaron cantidades variables de bacterias Gram negativas intraluminales e intracriptales. A los 3 dpi el epitelio mostró degeneración vacuolar evidente, mayor cantidad de cuerpos apoptóticos y todos estos cambios se encontraban en áreas donde además se observó la presencia de bacilos. En otras secciones fue posible observar áreas con pérdida de la continuidad del epitelio superficial (erosión), asociadas a bacilos Gram negativos e infiltrado inflamatorio principalmente histiocítico, aunque también se observaron escasos heterófilos degranulados. Las criptas más cercanas a estas zonas ulceradas contenían gran cantidad de bacterias Gram negativas (Fig 9A, Fig 10A, 10B y 10C). La lámina propia se encontraba engrosada por infiltrado linfocítico y escasas células plasmáticas. Los vasos sanguíneos de la submucosa se encontraron dilatados y en algunos casos contenían material hipereosinófilo acelular (edema). A los 7 dpi la cantidad de bacterias intraluminales e intracriptales fue mayor, las zonas de erosión eran más extensas y se encontraban acompañadas de histiocitos (Fig 9B) y áreas hemorrágicas. En aquellas zonas donde se conservó el epitelio, se observó degeneración vacuolar y necrosis. La lámina propia en la mayoría de las secciones se encontró severamente engrosada por infiltrado linfocítico mientras que la exocitosis fue marcada en algunas zonas (Fig 9C). De igual manera los vasos sanguíneos de la submucosa se encontraban dilatados. En algunos pollos, en los vasos sanguíneos de la submucosa es posible ver que en su interior hay cúmulos de bacilos cortos entremezclados con fibrina, restos celulares y células inflamatorias (émbolos sépticos) (Fig 9D). En los hígados de este grupo de aves, se encontraron en el parénquima múltiples áreas circulares bien delimitadas de necrosis, que llegaban a medir casi 200 micrómetros e interrumpían la continuidad de los cordones hepáticos (Fig 9E). En el centro de estas áreas se observaban heterófilos degenerados (Fig 9F). En la periferia de dichas áreas de necrosis se observaba infiltrado linfocítico, así como hepatocitos degenerados. Los sinusoides adyacentes a estos focos necróticos estaban congestionados, y en algunas zonas también fue posible ver áreas de hemorragia leve. Con la tinción de

Gram, fue posible encontrar escasos bacilos Gram negativos entre los sinusoides hepáticos y en el interior de hepatocitos (Fig 10D).

En el grupo inoculado con la mutante Δ SPI-1 no se encontraron lesiones en ninguno de los tiempos; únicamente se encontraron bacterias intraluminales e intracriptales en diferentes cantidades (Fig 11A y 11B). En las aves que fueron inoculadas con la mutante Δ SPI-2 se encontraron lesiones cecales a los 3 y 7 dpi, tales como áreas de infiltrado inflamatorio mononuclear muy evidentes y úlceras acompañadas de hemorragia con bacterias intralesionales. La lámina propia de igual forma estaba severamente engrosada por infiltrado linfocítico y plasmocítico (Fig 11C). Los hígados de estas aves carecían de lesiones (Fig 11D).

Nuestros resultados en conjunto demuestran que SPI-1 es indispensable para la colonización intestinal y la producción de inflamación, mientras que SPI-2 juega un papel importante en la supervivencia intracelular y diseminación a otros órganos, sin embargo, también parece influir en la producción de lesiones intestinales ya que su delección disminuye la intensidad de las mismas a comparación con cepas WT.

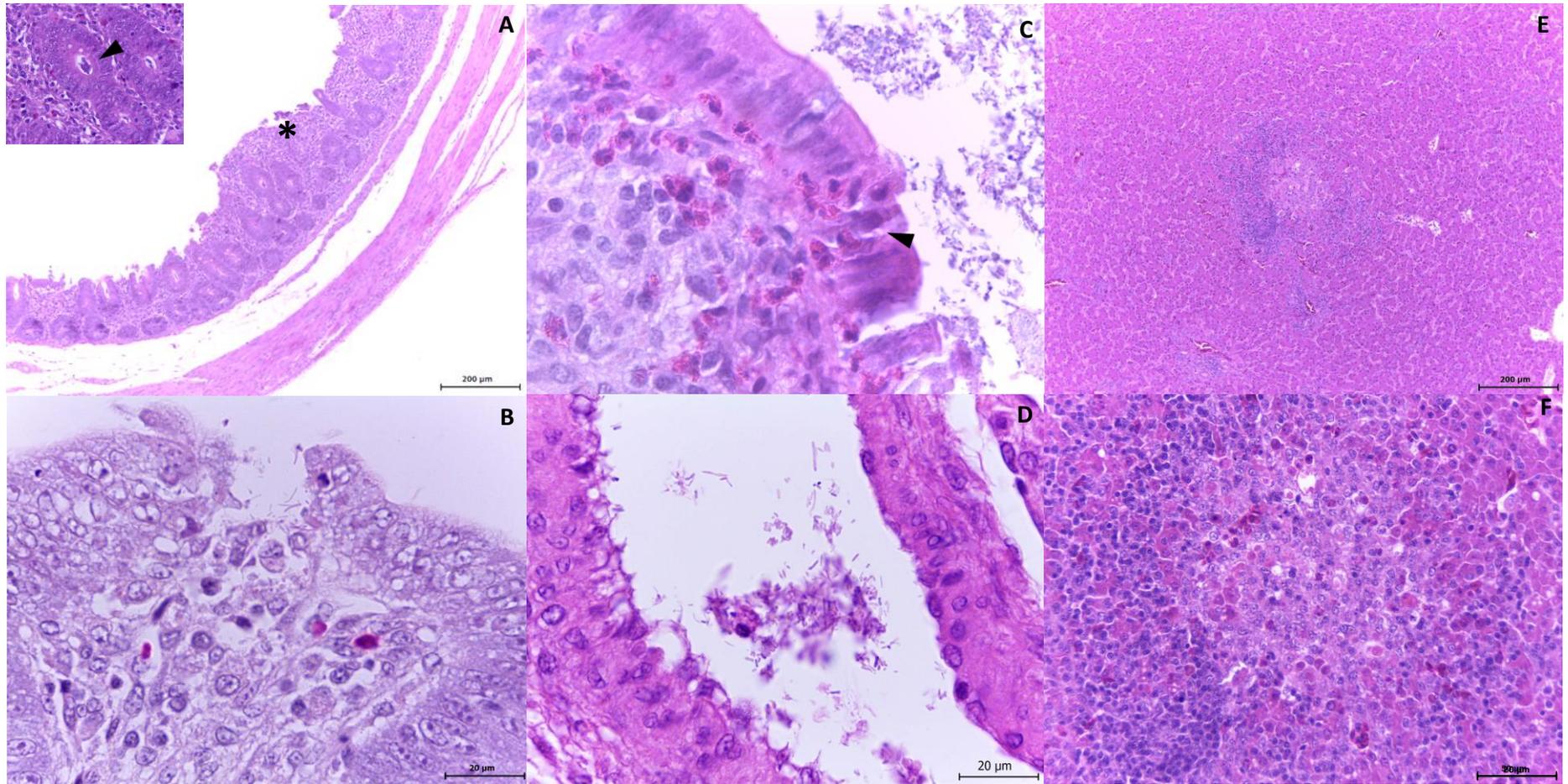


Figura 9. Histopatología de pollos de 1 semana de edad inoculados con la cepa WT de *Salmonella* Typhimurium. (A) El ciego presenta pérdida del epitelio, mientras que la lámina propia se observa severamente infiltrada por linfocitos y macrófagos (asterisco); en las criptas intestinales es posible encontrar bacilos cortos (punta de flecha en inserto superior). (B) En otras secciones del ciego es posible encontrar áreas de erosión con bacilos intraluminales así como infiltrado histiocítico. (C) Ciego. En zonas donde hay gran cantidad de bacterias intraluminales, algunos heterófilos atraviesan el epitelio (punta de flecha). (D) Ciego. En la luz de algunos vasos sanguíneos es posible encontrar bacilos cortos entremezclados con fibrina y heterófilos, correspondientes a un émbolo bacteriano. (E y F) Hígado. En algunas secciones, los cordones hepáticos se encuentran disociados por focos de necrosis, infiltrado mononuclear, heterófilos degenerados, así como hemorragia.

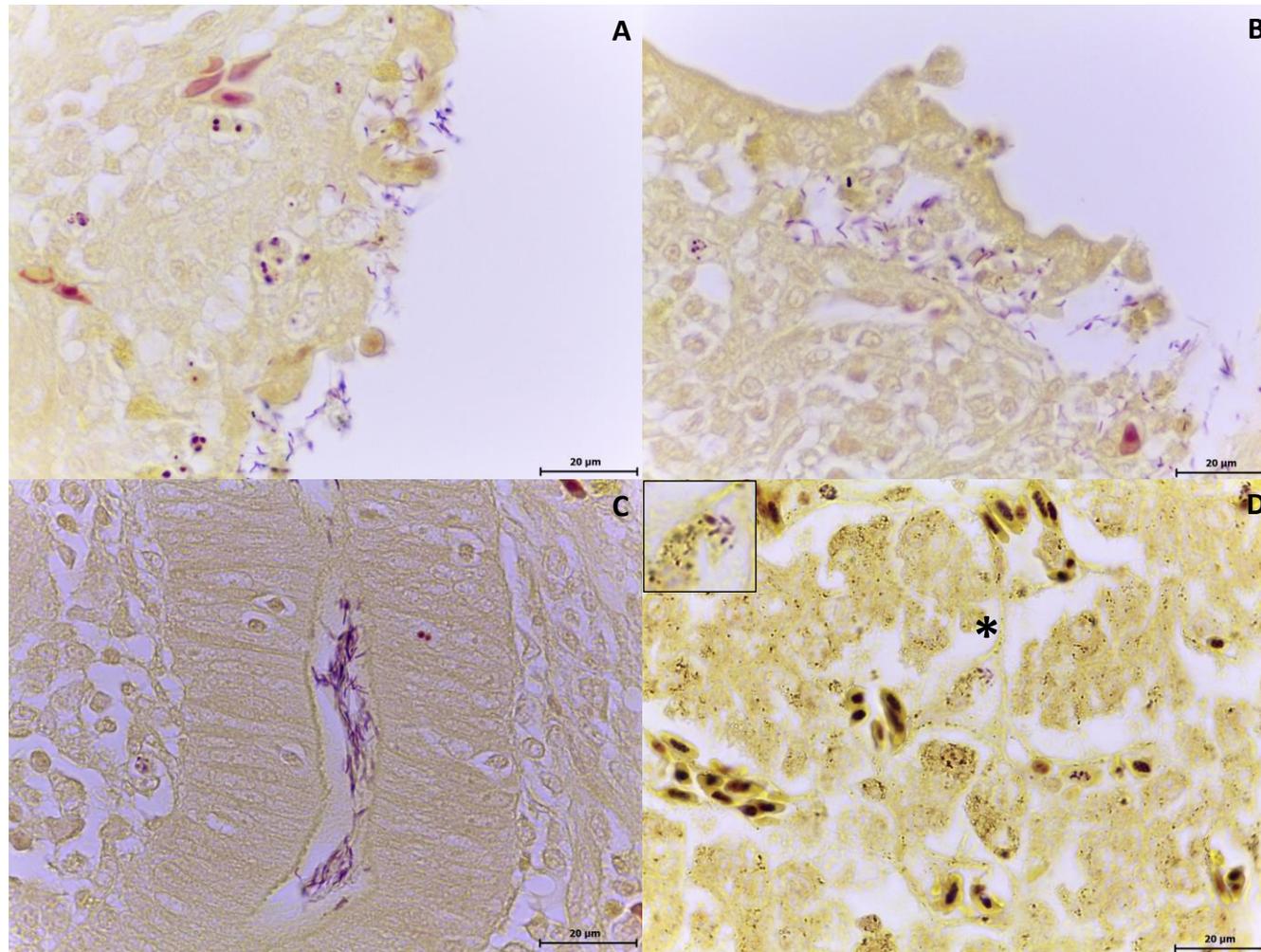


Figura 10. Tinción de Gram de ciegos de los pollos de 1 semana de edad, inoculados con la cepa WT. (A y B) Ciego. En las zonas de erosión, se lograron observar abundantes bacterias Gram negativas intralesionales. (C) Ciego. La mayoría de las criptas intestinales adyacentes a zonas de necrosis epitelial presentaban en su interior abundantes bacilos Gram negativos. (D) Hígado. Entre los sinusoides hepáticos así como en el interior de hepatocitos, se encontraron escasos bacilos Gram negativos (asterisco)

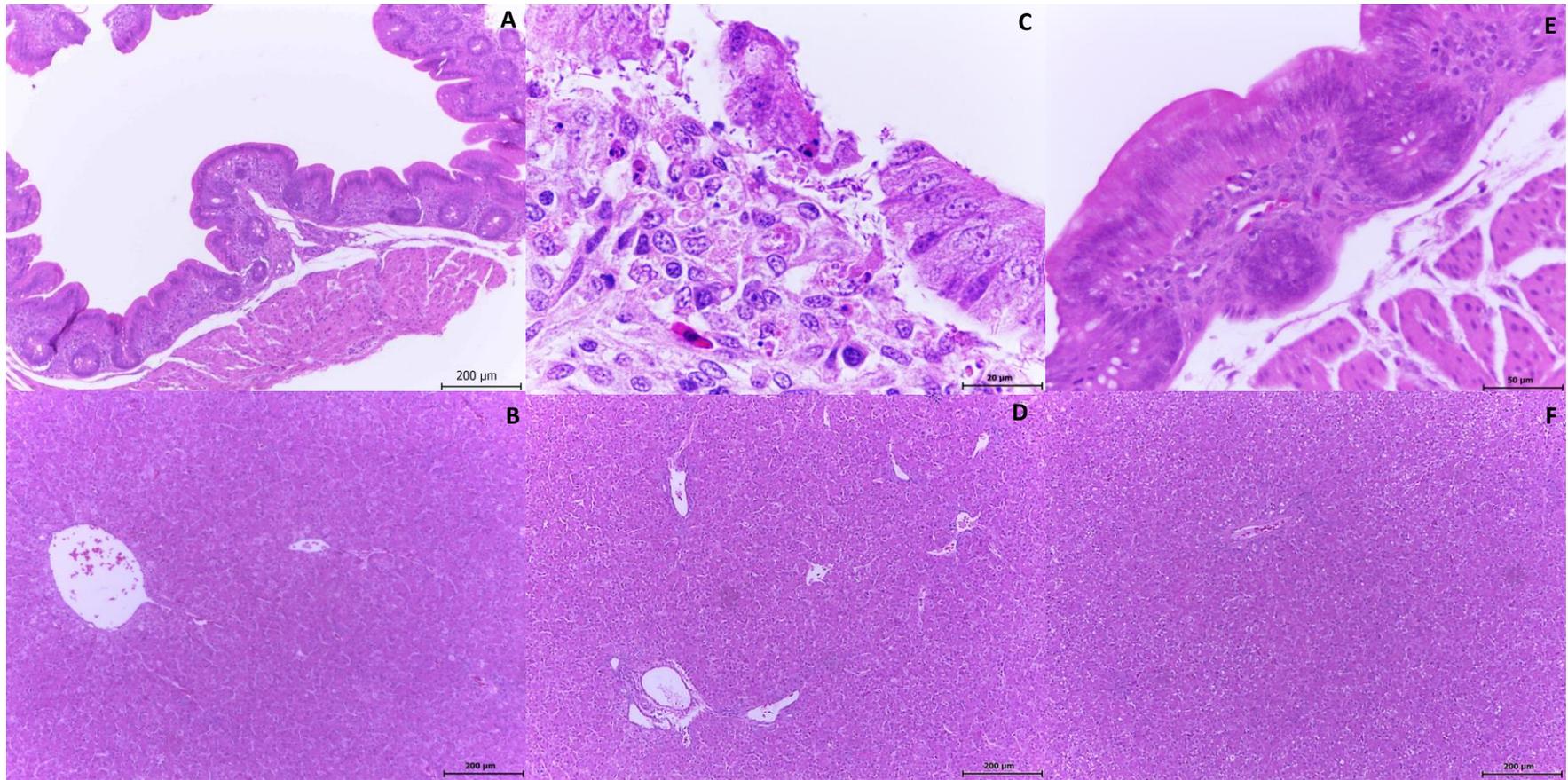


Figura 11. Histopatología de pollos de 1 semana de edad inoculados con las cepas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2. El ciego (A) y los hígados (B) de las aves inoculadas con la cepa Δ SPI-1 carecen de lesiones. (C) Los ciegos de aves que fueron infectadas con la cepa Δ SPI-2 exhibían pérdida de la continuidad del epitelio, incremento en el conteo de cuerpos apoptóticos y todas las lesiones se encontraron asociadas con la presencia de bacterias intralesionales e infiltrado mononuclear. (D) Los hígados de las aves infectadas con la mutante Δ SPI-2 no mostraron alteraciones. (E y F) Ciego e hígado de aves del grupo control, respectivamente.

Localización de *Salmonella* Typhimurium WT y las mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2 durante una infección

Con el fin de comprobar que los bacilos Gram negativos observados en las lesiones identificadas en el análisis histopatológico correspondían con *S. Typhimurium* y determinar más específicamente su localización en los tejidos, detectamos a la bacteria mediante IHQ. En esta se emplearon los mismos bloques analizados en histopatología y un anticuerpo policlonal anti-*Salmonella* Typhimurium.

En los órganos de los pollos que fueron inoculados con la cepa WT, a las 24 hpi tanto en los pollos de un día de edad como en los pollos de una semana de edad, esta cepa se pudo localizar en el contenido cecal (Fig. 12A) y adherida al epitelio (Fig. 12B) y asociada a zonas de degeneración epitelial.

En los pollos de 1 día de edad, conforme la infección avanzó fue posible detectar a la cepa WT dentro de los enterocitos y en la luz de las criptas (Fig. 12C). En la lámina propia de los pollos de 1 día de edad, a las 72 hpi reportamos presencia de vacuolas que contenían bacilos Gram negativos, en la lámina propia. La IHQ permitió evidenciar que estas bacterias contenidas en las vacuolas eran *S. Typhimurium* (Fig. 12D). Además, en las lesiones con aspecto de volcán que describimos en el análisis histopatológico se logra ver que hay inmunopositividad contra *S. Typhimurium*, al igual que dentro de macrófagos (Fig. 12E). De acuerdo con el análisis histopatológico en el hígado no se observó positividad para *S. Typhimurium*.

En los ciegos de pollos de 1 día y 1 semana de edad, inoculados con la cepa Δ SPI-1, se logró detectar *S. Typhimurium* únicamente dentro de las criptas (Fig. 13A y 13D), en contraste a lo observado con la cepa WT. Además, la presencia de la bacteria en este lugar no estuvo asociada con la producción de lesiones. A diferencia de la cepa WT, en el hígado de estas aves no se detectó la mutante Δ SPI-1 (Fig. 13B). En los ciegos e hígados de los pollos de 1 día de edad inoculados con la mutante Δ SPI-2, no fue posible detectar a *S. Typhimurium* (Fig. 13C y 13D).

En contraste, en el contenido cecal de los pollos de 1 semana de edad, infectados con la cepa Δ SPI-2 se detectó leve inmunoreactividad (Fig. 14E), mientras que en las áreas de úlcera la bacteria fue detectada en mayor cantidad. Igual que la Δ SPI-1, y en contraste con la cepa WT, la mutante Δ SPI-2 no fue detectada en los hígados de estos pollos.

En pollos de 1 semana de edad inoculados con la cepa WT, en las zonas de úlceras observadas en el análisis histopatológico a los 3 y 7 dpi, *S. Typhimurium* fue detectada extracelularmente (Fig. 14A) y dentro de enterocitos necróticos, así como dentro de las criptas adyacentes. A los 7 dpi, *S. Typhimurium* también fue localizada multifocalmente en la lámina propia y dentro de algunos macrófagos (Fig. 14B). En las secciones histológicas de hígado se logró observar marca positiva multifocal en el parénquima; esta positividad se encontraba entre los sinusoides hepáticos, así como en el citoplasma de algunos hepatocitos (Fig. 14C).

En todos los casos, se extrajo el DNA de los bloques de parafina que contenían los órganos empleados en la IHQ y este se empleó para realizar PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican a *hilA* o *ssrB*, genes de SPI-1 y SPI-2 respectivamente. Esto con el fin de comprobar la presencia o ausencia de *S. Typhimurium* y corroborar los hallazgos encontrados en las IHQ.

En conjunto, estos resultados evidencian que la ausencia de los genes de SPI-1 y SPI-2 afectó directamente la capacidad de *S. Typhimurium* para colonizar el ciego y diseminarse al hígado en pollos de 1 día y 1 semana de edad.

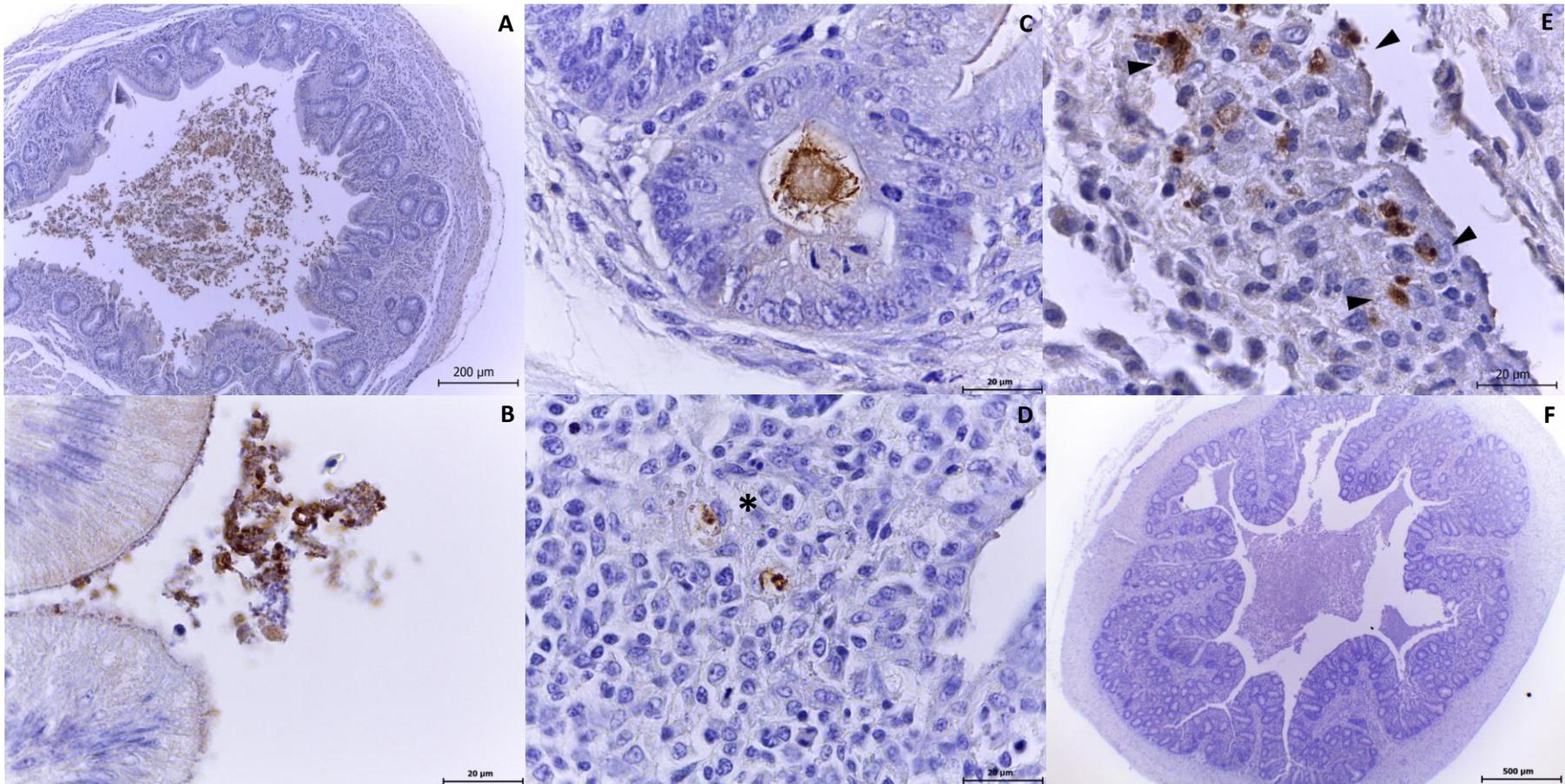


Figura 12. Inmunohistoquímica de los pollos de 1 día de edad inoculados con la cepa WT. (A) Inmunodetección de *Salmonella* Typhimurium en el lumen cecal, (B) adheridas al epitelio e intraluminales, (C) dentro de las criptas intestinales y (D) En la lámina propia del ciego en la cual las bacterias se encuentran dentro de vacuolas (asterisco). (E) En las secciones donde se observaron restos necróticos, se logra observar intensa inmunoposividad intrahistocítica (punta de flecha). (F) Control negativo.

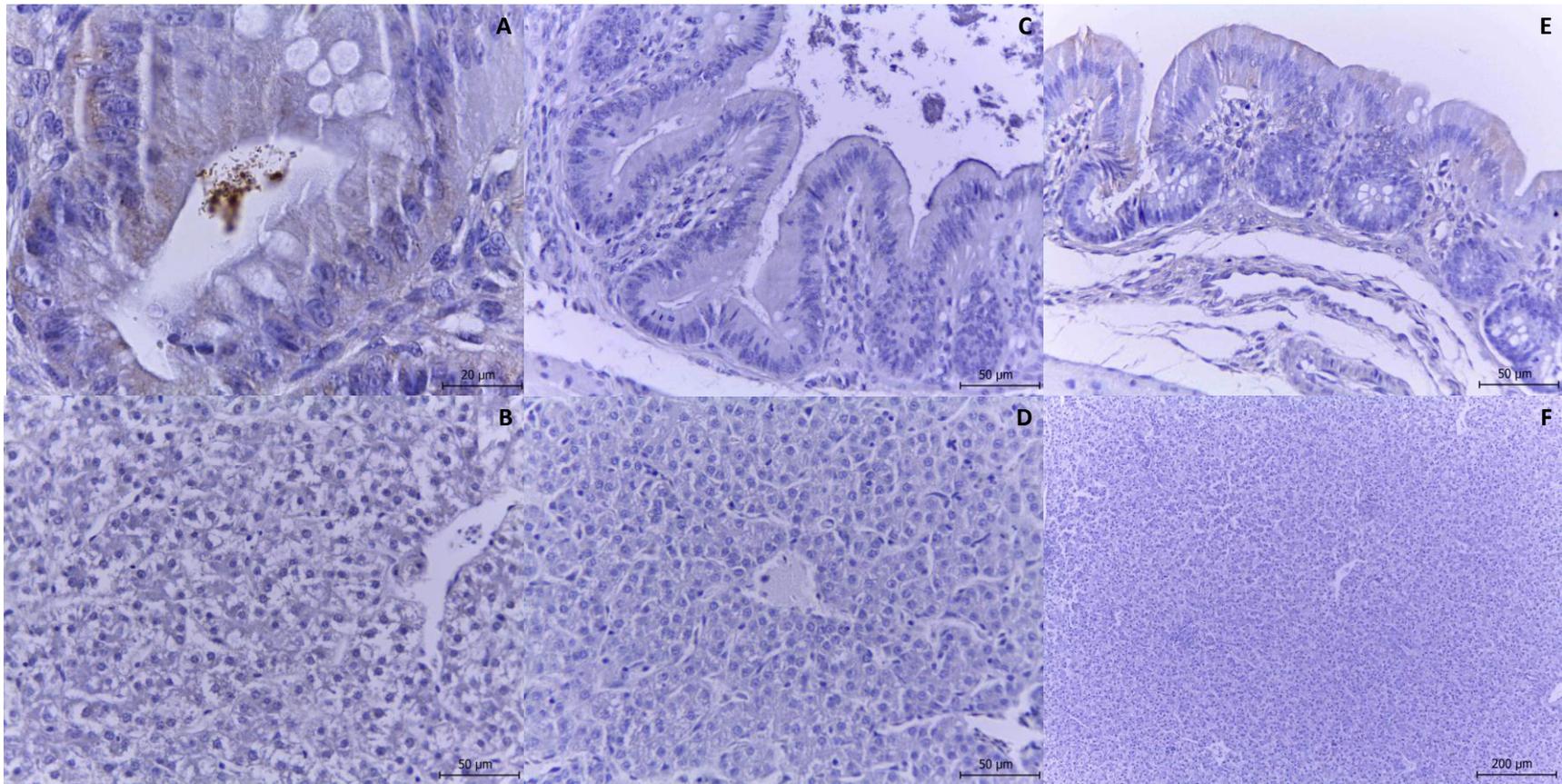


Figura 13. Inmunohistoquímica de los pollos de 1 día de edad inoculados con las cepas mutantes Δ SPI-1 y Δ SPI-2 de *Salmonella* Typhimurium. (A) En los ciegos de pollos inoculados con la mutante Δ SPI-1 es posible detectar *S. Typhimurium* intracriptales, mientras que en el hígado no se apreció inmunomarcaje (B). En los ciegos (C) e hígados (D) de pollos infectados con la mutante SPI-2 no se inmunodetectaron bacterias. Ciego (E) e hígado (F), controles negativos.

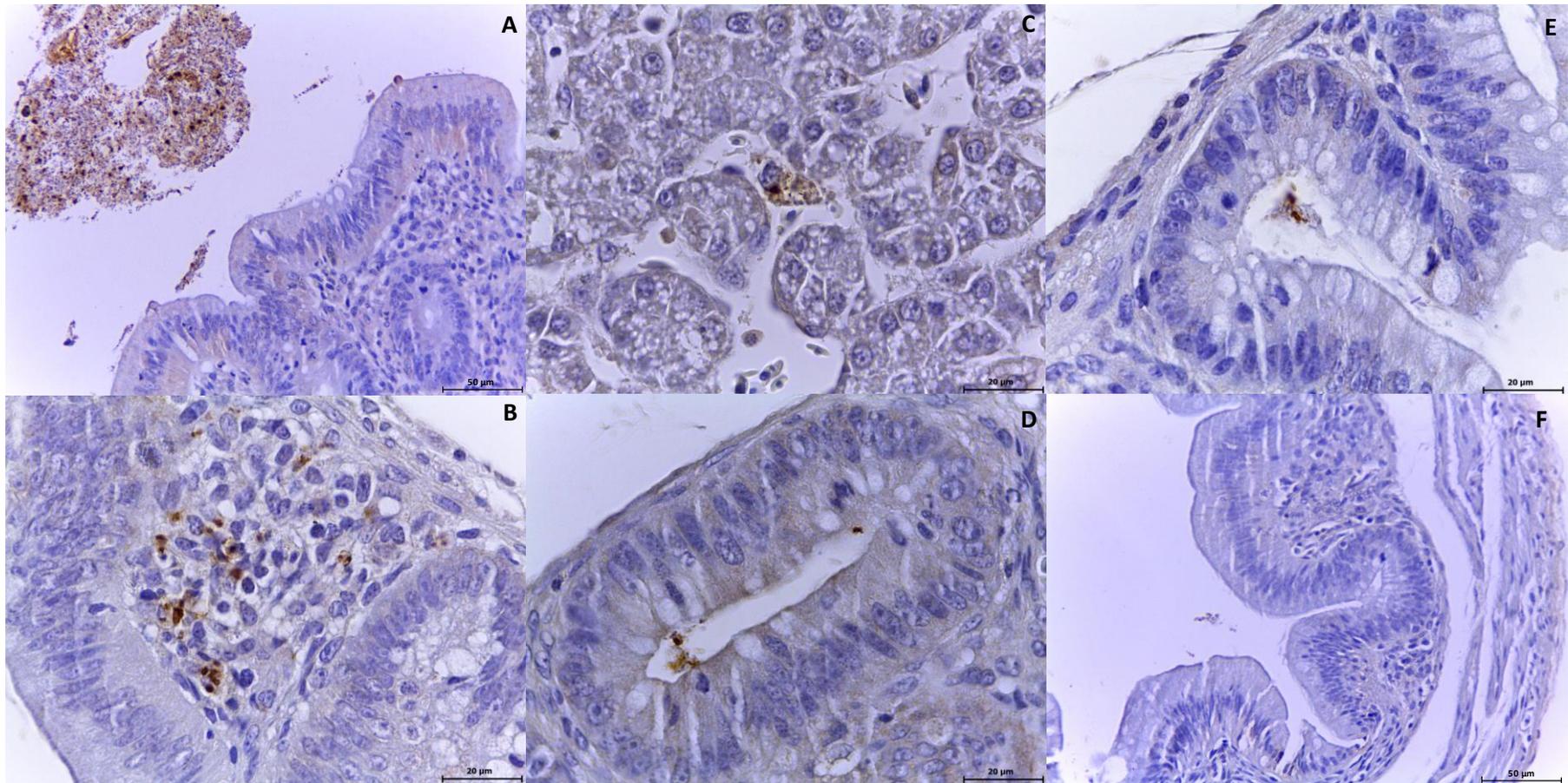


Figura 14. Inmunohistoquímica de los pollos de 1 semana de edad inoculados con las cepas WT, Δ SPI-1 y Δ SPI-2. (A) Ciego de pollo inoculado con cepa WT, en el cual se puede observar la inmunodetección de *S. Typhimurium* en el contenido cecal. (B) Lámina propia de ciego del ave anterior, en la que es posible detectar a *S. Typhimurium* en el interior de histiocitos. (C) En secciones de hígado es posible detectar a *S. Typhimurium* en el citoplasma de algunos hepatocitos. (D) Ciego de pollo inoculado con la cepa Δ SPI-1, en el que se observa inmunopositividad para *S. Typhimurium* en la luz de algunas criptas; sin embargo no se asociaron con lesiones. (E) Ciego de pollo infectado con cepa Δ SPI-2, las criptas intestinales muestran marcaje positivo contra *S. Typhimurium*. (F) Ciego del grupo control.

Discusión

Salmonella es un patógeno de gran importancia a nivel mundial, que afecta tanto a personas como a animales. Las islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella* (SPI-1 y SPI-2) son dos de las islas más estudiadas en esta bacteria debido a que tienen un papel importante en el desarrollo de las dos entidades clínicas que se presentan en la salmonelosis, la enteritis y la enfermedad sistémica (Jones *et al.*, 2007). SPI-1 es requerida para la invasión al intestino (LaRock *et al.*, 2015) y por tanto se asocia principalmente al desarrollo de enfermedad intestinal, mientras que SPI-2 contiene genes que permiten que la bacteria sobreviva y se replique intracelularmente, permitiéndole así diseminarse a otros órganos sistémicamente (Jennings *et al.*, 2017), aunque también se ha visto que esta isla se requiere para que se desarrolle la enfermedad intestinal completa en ratones que han sido tratados con estreptomicina (Coburn *et al.*, 2005).

El conocimiento de la patogenia de la salmonelosis, así como el encontrar alternativas de modelos animales para su estudio, son cruciales. Algunos que se han empleado para su estudio son los bovinos y los ratones, sin embargo, estos modelos tienen limitantes tales como su costo, requerimiento de instalaciones, manejo, personal capacitado y tratamientos, y además no siempre desarrollan de manera natural ambas presentaciones clínicas, pues los bovinos únicamente desarrollan enfermedad intestinal y los ratones solo presentan la enfermedad sistémica (Ahmer *et al.*, 1999). Se ha reportado que los pollos pueden desarrollar ambas presentaciones, dependiendo de su edad, pues los pollos de 1 día desarrollan enfermedad sistémica y en los pollos de 1 semana de edad, hay colonización intestinal y enteritis (Jones *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio fue evaluar el papel de SPI-1 y SPI-2 en el desarrollo de lesiones histológicas empleando al pollo como modelo animal. Para ello realizamos infecciones vía oral en pollos de un día y una semana de edad, con la cepa silvestre

de *Salmonella* Typhimurium y mutantes derivadas de esta, carentes de SPI-1 o SPI-2.

En pollos de un día de edad, la cepa WT fue capaz de crecer y replicarse en cantidades similares tanto en intestino como en hígado (Fig. 1A y 1B); sin embargo, en pollos de una semana de edad, este crecimiento fue progresivo a lo largo de una semana (Fig. 1C y 1D) y este conteo fue menor en comparación con los pollos de un día. Esto puede deberse a que el sistema inmune de las aves de un día no se ha desarrollado por completo por lo que la bacteria tendría menor resistencia para replicarse y diseminarse, por tanto, en pollos de una semana los valores menores podrían sugerir que el sistema inmune fue capaz de controlar de mejor manera esta infección. Esto mismo puede observarse en la severidad de las lesiones intestinales y hepáticas en ambos grupos. Los pollos de un día de edad en general mostraron lesiones más severas (tiflitis heterofílica y linfocitocítica y necrosis hepatocelular) en comparación con los pollos de una semana. De manera interesante, al observar las secciones histológicas de ciego, los pollos de una semana de edad parecían tener mayor cantidad de bacterias; sin embargo, al no haber inflamación asociada o daño tisular se consideró que estas bacterias no correspondían a *Salmonella*, hecho comprobado mediante PCR (Fig. 7).

Las aves que fueron infectadas con la cepa Δ SPI-1 mostraron una marcada disminución en los conteos de UFC's, siendo más evidente en los pollos de un día en los que únicamente se recuperaron colonias al inicio de la infección (Fig. 1A). Además, en estos no se observó evidencia de lesiones asociadas con *Salmonella* (Fig. 7); esto significa que, a pesar de tener un sistema inmune inmaduro, la cepa Δ SPI-1 no pudo tomar ventaja de eso tal como hizo la cepa WT, para replicarse en estos órganos. Esto resalta la importancia de SPI-1 en la colonización intestinal y por tanto en su posterior diseminación a otros órganos.

En los pollos de una semana, la SPI-1 se recuperó en cantidades similares a la WT 1 dpi, pero esta cantidad disminuyó progresiva y significativamente hacia los 7 dpi y en el hígado únicamente se recuperaron al día 7 pi pero no se encontraron lesiones histológicas. Aunque la ausencia de SPI-1 repercutió en el crecimiento de

la bacteria, esta afectación no fue tan drástica como la que se observó en los pollos de un día, pese a que los pollos de una semana tienen el sistema inmune maduro, el cual podría contender con mayor eficacia la infección por *Salmonella*. Esto podría sugerir que las diferencias entre el ambiente intestinal entre pollos de un día o una semana podrían favorecer en éstos la replicación bacteriana; sin embargo, no fueron capaces de producir lesiones lo que confirma el papel esencial de la SPI-1 en el desarrollo de enfermedad intestinal.

En los pollos de un día que fueron inoculados con la cepa Δ SPI-2, las bacterias mostraron una afectación severa en el crecimiento, ya que no se recuperaron bacterias en ningún órgano. En cambio, en el análisis histopatológico se encontró un ligero aumento en el infiltrado inflamatorio de tipo linfocítico, mismo que puede estar presente ya que esta cepa tiene la SPI-1 y sus efectoras estimulan la respuesta inflamatoria, pero al carecer de la SPI-2 este no fue un proceso inflamatorio evidente como se observó en pollos inoculados con la cepa WT.

En contraste, en los pollos de una semana de edad, la mutante Δ SPI-2 estuvo severamente afectada en cuanto crecimiento en ciego e hígado comparada con la cepa WT; sin embargo, este efecto no fue tan drástico como el que observamos en esta cepa en los pollos de un día de edad. Este resultado podría explicarse porque en estos pollos se desarrolla la enfermedad intestinal y en los de un día la enfermedad sistémica, por lo que la eliminación de SPI-2 tendría un efecto más drástico en éstos. Coburn *et al* reportaron que, en ratones tratados con estreptomicina, mutantes que carecen del SST3 funcional de SPI-2, disminuyen la expresión de moléculas de adhesión intercelular y el reclutamiento de neutrófilos, por lo que sugieren que en ese modelo murino la SPI-2 es necesaria para producir enterocolitis (Coburn *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que a diferencia de los pollos infectados con la cepa Δ SPI-1, en los pollos inoculados con la cepa Δ SPI-2 sí observamos lesiones, aunque eran menos severas en comparación con la cepa WT. Esto refuerza el papel de la SPI-2 para el desarrollo de una enfermedad intestinal completa tal y como lo reportó Coburn *et al* (Coburn *et al.*, 2005)

Jones *et al.* realizaron un estudio similar para evaluar el papel de SPI-1 y SPI-2 en pollos de un día y una semana de edad; sin embargo, ellos inocularon a los pollos con mutantes que únicamente carecían de una proteína del SST3 de SPI-1 ($\Delta spaS$) o SPI-2 ($\Delta ssaU$) de *S. Typhimurium* (Jones *et al.*, 2007). En pollos de un día de edad, recuperaron cantidades similares de las tres cepas a partir de ciego a las 24, 48 y 72 hpi, mientras que, en el hígado, solamente la recuperación de bacterias fue menor a las 48 hpi lo cual contrasta con nuestros resultados pues nuestras mutantes, sí se observaron afectadas en el crecimiento. Esto puede deberse a que al retirarle únicamente el SST3 la bacteria aún puede tener elementos que le permite replicarse, en cambio al retirarle toda la isla, este efecto es más severo. Además, que el sistema inmune es inmaduro y aunado a que únicamente se les retiró una proteína del SST3, esto permitió que siguiera creciendo de manera similar. Esto puede indicar que a lo largo del genoma de *Salmonella* existen otros elementos o islas de patogenicidad que estén involucradas en la replicación.

En otro estudio Coombes *et al.* (Coombes *et al.*, 2005) reportan que evaluaron el rol del SST3 en la infección por *Salmonella* empleando asas intestinales de bovino y ratones previamente tratados con estreptomycinina para favorecer la infección por *Salmonella*, mismos que fueron infectados con una cepa WT (SL1344) o mutantes afectadas en SPI-1 (*invA*) o SPI-2 (*ssaR*). Ellos vieron que en las asas intestinales y los ratones inoculados con una mutante SPI-2 o una doble mutante SPI-1/SPI-2, a los 5 días se observan lesiones leves en el ciego o reducción de la respuesta secretora, pero las asas intestinales o los ratones que fueron inoculados únicamente con la mutante SPI-1 muestran severos cambios patológicos. Sus resultados muestran que aunque la SPI-1 es importante para la inducción de enteritis, SPI-2 tiene un papel más importante en la patogénesis de la enteritis pues es requerida sin importar la presencia de SPI-1. A diferencia de este estudio, en nuestras infecciones observamos que la mutante SPI-1 (que tendría presentes los genes de la SPI-2) estuvo significativamente atenuada en la producción de lesiones en comparación con la cepa WT, lo cual parece subestimar el papel de los genes de SPI-2. Esta diferencia con el estudio de Coombes puede ser atribuida al hecho de que ellos emplearon ratones, una especie en la cual no es común el desarrollo de

enfermedad intestinal por *Salmonella*, pero al ser tratados previamente con estreptomycin, el desarrollo de lesiones intestinales podría ser más evidente pues son más susceptibles a la infección y por tanto resalta el papel de los genes de SPI-2. Otra diferencia importante entre nuestro estudio y el suyo son las mutantes que emplearon, pues, aunque ellos mencionan que emplearon mutantes SPI-1 y SPI-2, estas solo pierden un gen de SPI-1 o de SPI-2, respectivamente, y no carecen de toda la isla 1 o 2, como nuestras mutantes. Por tanto, en su caso, la presencia de otros factores de virulencia contenidos en la SPI-1 podría ser la causa de que esa mutante aún produzca severas lesiones y respuesta inflamatoria intestinal tanto en las asas como en los ratones.

En nuestras infecciones, la cepa WT de *S. Typhimurium* causó lesiones menos severas que las reportadas en pollos que son afectados por otros serotipos, tales como *S. Enteritidis* o *S. Gallinarum*. Berndt *et al* observaron diferencias en la capacidad de invasividad entre los distintos serotipos de *Salmonella*; mientras que *S. Enteritidis* tiene el más alto grado de invasividad, *S. Typhimurium* presenta un grado moderado de invasión a la lámina propia del ciego lo cual se relaciona con una moderada intensidad de la respuesta inmune por parte del pollo. Estas diferencias entre la invasividad y la intensidad del desarrollo de la respuesta inmune entre serovariedades de *Salmonella*, podría también reflejarse en las lesiones que pueden observarse en los diferentes modelos. Singh y colaboradores evaluaron también la capacidad de invasividad entre cepas de *S. Gallinarum* y *S. Typhimurium*. Observaron que *S. Typhimurium* tiene efecto invasivo moderado, pero invade mejor que *S. Gallinarum*. Sin embargo, *S. Gallinarum* tiene un efecto más citotóxico, lo que provoca lesiones más evidentes en el intestino (Singh *et al.*, 2021). Las diferencias en invasividad entre los diferentes serotipos se ha atribuido grandemente a la especificidad de antígenos como las fimbrias entre hospederos y serovares (Berndt *et al.*, 2007).

Nuestros resultados muestran que los pollos de una semana de edad mostraron una respuesta inflamatoria predominantemente histiocítica; sin embargo, no existe mucha información actualizada sobre la respuesta inmune en pollos mayores a 1

día de edad infectados con *Salmonella*; esto abriría la oportunidad de estudios posteriores que permitieran conocer los mecanismos que gobiernan estas respuestas diferentes. En el caso de *Salmonella*, sería interesante identificar si existen determinantes de virulencia específicos que induzcan esa transición en la respuesta inflamatoria en las aves de diferentes edades.

Por otro lado, en pollos de un día de edad, encontramos que *S. Typhimurium* induce una respuesta inflamatoria principalmente linfocítica. A este respecto, se ha visto que la expansión de células T CD4+ específicas para *Salmonella* se inicia rápidamente en el tejido linfoide asociado a mucosas (GALT por sus siglas en inglés, *Gut associated lymphoid tissue*) en el modelo murino al poco tiempo de ser infectados (Wang Y *et al.*, 2020), además de que existe la posibilidad de que algunas células dendríticas fagociten a *Salmonella*, procesen sus antígenos y los presenten a linfocitos T. Este podría ser el caso de la flagelina, la cual sería excretada en el líquido linfático subepitelial para así tener contacto con zonas ricas en células T sin necesidad de haber transporte celular o diseminación bacteriana. La flagelina es el antígeno blanco identificado de manera más consistente en células T CD4+ específicas de *Salmonella* (McSorley *et al.*, 2000; Strindellius *et al.*, 2002). Aunado a esto, Singh y colaboradores observaron que *S. Typhimurium* estimula una mayor proliferación y diferenciación de células T específicas (Singh *et al.*, 2022).

Entre los principales factores que pueden influir en la respuesta de los pollos que infectamos ante la infección por *Salmonella* se encuentran la madurez de su sistema inmune, la edad, y la microbiota presente en cada población. En la vida neonatal, tanto en mamíferos como en múltiples especies de aves, el sistema inmune tarda más en desarrollarse, por lo que, al nacer, presentan respuestas inmunes deficientes. La dieta puede modificar la microbiota y favorecer la resistencia a la colonización, pues algunas bacterias pueden producir péptidos u otros elementos con actividad bactericida y así limitar el crecimiento de microorganismos patógenos, además de ocupar espacios que mantengan alejados a los patógenos de la superficie epitelial. Los pollos de 1 semana de edad tienen una microbiota más especializada en comparación con los pollos de 1 día de edad, pues en los pollos

recién nacidos, la microbiota que coloniza el tracto gastrointestinal es la que se encuentra presente en el ambiente. Generalmente es colonizado por especies bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, posteriormente reemplazadas por representantes de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Bacteroides* (Videnska *et al.*, 2014, Varmuzova *et al.*, 2016, Clavijo-Vivez Flores, 2018). Sin embargo, se ha observado que esta población puede llegar a variar en gran medida gracias a la composición de los alimentos proporcionados a los pollos, pues muchas veces estos contienen diferentes poblaciones microbianas añadidas (Polansky *et al.*, 2015). Otro factor a considerar en la composición de la microbiota intestinal es la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que se producen como resultado de la actividad metabólica de los microorganismos. La concentración de estos AGCC varía a través del tracto gastrointestinal. Se ha reportado que el acetato y el formato, presentes en bajas concentraciones en el intestino delgado (30 mM), favorecen la invasión de *S. Typhimurium*, mientras que el propionato y el butirato, presentes en grandes cantidades (200 mM) en el ciego y el colon, tienen el efecto opuesto (Durant *et al.*, 2000; Lawhon *et al.*, 2002; Gantois *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Jacobson *et al.*, 2018). Esto ha sido observado tanto en cultivos celulares como en ratones y asas intestinales de bovinos (Lawhon *et al.*, 2002). Sería interesante conocer las concentraciones de estos AGCC en el tracto intestinal de los pollos, y determinar si esto influye también en la invasividad. Podríamos inferir que para este modelo animal algo similar podría estar sucediendo, pues como ya se mencionó, en los pollos de 1 semana de edad, géneros como *Bacteroides* predominan en la microbiota y en ratones se ha reportado que este género produce butirato (Jacobson *et al.*, 2018). Por tanto, en los pollos la presencia de microorganismos como *Bacteroides* podría estar también favoreciendo la presencia de propionato, lo que produciría que en los pollos de 1 semana de edad exista un microambiente intestinal que limite la invasión de *S. Typhimurium* y por tanto esto explicaría por qué en nuestro estudio, encontramos menor cantidad de UFCs y lesiones en los pollos infectados de esta edad.

Finalmente, con el objetivo de detectar la localización y corroborar la patogenicidad de *Salmonella Typhimurium* durante la infección, se optó por realizar

inmunohistoquímica. Esto permitió observar a la bacteria en diferentes zonas, en diferentes tiempos. Tanto en pollos de 1 día como de 1 semana de edad, encontramos a la *S. Typhimurium* WT en el contenido cecal, adherida al epitelio, dentro de los enterocitos o macrófagos, en la luz de criptas intestinales y en dentro de los hepatocitos, pero en cada uno de estos sitios la cantidad fue diferente dependiendo del tiempo post infección. Esto significa que a las 24 hpi (en pollos de 1 día o de 1 semana de edad), la cantidad de bacterias en el lumen intestinal y adheridas al epitelio era mayor y muy pocas se hallaron intracelularmente, pero conforme aumentó el tiempo, a los 3 a 7 dpi, las bacterias se hallaron principalmente dentro de enterocitos, macrófagos, hepatocitos y de manera abundante en los sitios de lesión, tales como úlceras y áreas de necrosis. En el caso de la cepa Δ SPI-1, los tiempos en los que la fuimos detectando en los diferentes sitios fueron más retrasados en comparación con la cepa WT, ya que la hallamos adherida al epitelio hasta las 48 hpi. Así mismo, la cantidad de bacterias que detectamos era menor y estas bacterias inmunodetectadas estaban en sitios en los que no había lesiones o infiltrado inflamatorio asociado. Además, esta cepa ya no fue detectada en hepatocitos. Estos resultados muestran que esta cepa estuvo afectada en su capacidad de invadir y por tanto diseminarse, y sugieren que al carecer de los genes de SPI-1 y no producir las proteínas efectoras, no fue capaz de generar lesiones e inducir la respuesta inflamatoria asociada. La cepa Δ SPI-2 fue detectada desde las 24 hpi en los pollos de 1 día de edad, aunque en cantidades menores que la WT en el contenido cecal, adheridas al epitelio y en la luz de las criptas, especialmente en las regiones donde habíamos observado discreto infiltrado inflamatorio, mientras que en los pollos de 1 semana de edad, también la detectamos a las 24 h pero en este caso, sí se detectó asociada a regiones con lesiones como úlceras, necrosis, en la luz de las criptas y dentro de algunos macrófagos. Además, igual que la cepa Δ SPI-1, esta cepa no se detectó en el hígado. Estos hallazgos indican que al tener la SPI-1, la cepa Δ SPI-2 es capaz de producir efectoras que estén involucradas en la invasión y el proceso inflamatorio inicial, pero al carecer de la SPI-2 la infección no es completa ya que la gravedad de lesiones fue menor en comparación con la cepa WT, lo que corrobora nuestros resultados de histopatología y el papel de SPI-

2 para producir una enfermedad intestinal completa reportado por Coburn *et al* (Coburn *et al.*, 2005). Además, esta mutante Δ SPI-2 no se logró detectar en el hígado ya que al no tener las efectoras de las SPI-2, no tiene la capacidad de replicarse y sobrevivir intracelularmente.

Pocos son los estudios reportados en los que se ha detectado a *Salmonella* mediante IHQ. Uno de estos es el reporte de Bellido-Carreras *et al.*, en el que detectaron a *S. Typhimurium* a lo largo del tracto gastrointestinal y órganos linfoides en cerdos. Al igual que lo que vimos en pollos, ellos reportan la presencia de la bacteria desde 1 dpi en el contenido luminal del intestino grueso, así como adherida al epitelio y dentro de enterocitos. Sin embargo, en los cerdos, a partir del día 7 pi, se observó regeneración epitelial, así como disminución del infiltrado inflamatorio, cosa que nosotros no observamos en los pollos de cualquier edad a lo largo de toda la infección. Estos resultados evidencian la presencia de factores inherentes a las distintas especies o modelos animales, que dirigen el curso, distribución y gravedad de la infección por *S. Typhimurium*. La comprensión de dichos factores servirá para desarrollar estrategias que permitan el control de esta enfermedad en las distintas especies que son afectadas por *S. Typhimurium*.

Conclusiones

El modelo aviar (pollos), permite el estudio del desarrollo de las lesiones causadas durante una infección con *S. Typhimurium*.

S. Typhimurium induce tiflitis linfocítica en pollos de 1 día de edad, mientras en que pollos de 1 semana de edad induce tiflitis linfocítica e histiocítica y en ocasiones ulcerativa, así como necrosis hepatocelular en pollos de ambas edades.

Los genes de SPI-1 son importantes para la invasión celular y la inducción de respuesta inflamatoria por parte del hospedador, para posteriormente facilitar la diseminación al hígado.

Los genes de SPI-2 son indispensables para la replicación bacteriana y la diseminación al hígado, pero también se requieren para el desarrollo de una enfermedad intestinal completa.

Durante una infección, *S. Typhimurium* se adhiere a los enterocitos y una vez dentro del intestino, puede localizarse dentro de enterocitos y macrófagos y dicha localización es similar tanto entre pollos de 1 día como de 1 semana de edad, pero en los pollos de 1 semana de edad la cantidad de bacterias es menor, lo que evidencia la capacidad de esos animales para contender mejor con una infección por *Salmonella*, cosa que podría estar relacionada con las diferencias que existen en el sistema inmune y el desarrollo de la microbiota. Futuros estudios en los que se evalúen estos dos factores, serán de utilidad para confirmar su papel dentro de la patogenia de *S. Typhimurium*.

Referencias

1. Addwebi TM, Call DR, Shah DH. Contribution of *Salmonella* Enteritidis virulence factors to intestinal colonization and systemic dissemination in 1-day-old chickens. *Poult Sci.* 2014 Apr;93(4):871-81. doi: 10.3382/ps.2013-03710. PMID: 24706964.
2. Andrews-Polymenis HL, Bäumler AJ, McCormick BA, Fang FC. Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. *Infect Immun.* 2010 Jun;78(6):2356-69. doi: 10.1128/IAI.00096-10. Epub 2010 Apr 12. PMID: 20385760; PMCID: PMC2876576.
3. Barrow PA, Methner *Salmonella* in domestic animals, 2nd ed UK London, CAB International 2013.
4. Bellido-Carreras, N., Argüello, H., Zaldívar-López, S., Jiménez-Marín, Á., Martins, R. P., Arce, C., Morera, L., Carvajal, A., & Garrido, J. J. (2019). *Salmonella Typhimurium* Infection Along the Porcine Gastrointestinal Tract and Associated Lymphoid Tissues. *Veterinary pathology*, 56(5), 681–690. <https://doi.org/10.1177/0300985819843682>
5. Berndt, A., Wilhelm, A., Jugert, C., Pieper, J., Sachse, K., & Methner, U. (2007). Chicken cecum immune response to *Salmonella* enterica serovars of different levels of invasiveness. *Infection and immunity*, 75(12), 5993–6007. <https://doi.org/10.1128/IAI.00695-07>
6. Bijlsma JJ, Groisman EA. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella* enterica. *Mol Microbiol.* 2005 Jul;57(1):85-96. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04668. x. PMID: 15948951.
7. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2013 Nov;13(11):790-801. doi: 10.1038/nri3535. Epub 2013 Oct 7. PMID: 24096337; PMCID: PMC4194195.
8. Bustamante VH, Martínez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 23;105(38):14591-6. doi: 10.1073/pnas.0801205105. Epub 2008 Sep 17. PMID: 18799744; PMCID: PMC2567235.

9. Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B. A., & Finlay, B. B. (2005). *Salmonella* enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infection and immunity*, 73(6), 3219–3227. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3219-3227.2005>
10. Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Mar 15;128(1-3):53-9. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.295. Epub 2008 Oct 17. PMID: 19070366.
11. Chuammitri P, Redmond SB, Kimura K, Andreasen CB, Lamont SJ, Palić D. Heterophil functional responses to dietary immunomodulators vary in genetically distinct chicken lines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011 Aug 15;142(3-4):219-27. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.05.019. Epub 2011 May 19. PMID: 21645931.
12. Clavijo V, Flórez MJV. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poult Sci*. 2018;97(3):1006-1021. doi:10.3382/ps/pex359
13. Collier-Hyams LS, Zeng H, Sun J, Tomlinson AD, Bao ZQ, Chen H, Madara JL, Orth K, Neish AS. Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):2846-50. doi: 10.4049/jimmunol.169.6.2846. PMID: 12218096.
14. Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., & Castro-del Campo, N. (2019). Los últimos 50 años de *Salmonella* en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista bio ciencias*, 6(spe), e540. Epub 14 de noviembre de 2019. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e540>
15. Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhur K, Li Y, Finlay BB. Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7161-9. doi: 10.1128/IAI.73.11.7161-7169.2005. PMID: 16239510; PMCID: PMC1273848.
16. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun

- 6;97(12):6640-5. doi: 10.1073/pnas.120163297. PMID: 10829079; PMCID: PMC18686.
17. Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R, Steele-Mortimer O (2006) The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* 7:39–51.
 18. Dumont A, Boucrot E, Drevensek S, Daire V, Gorvel JP, Poüs C, Holden DW, Méresse S. SKIP, the host target of the *Salmonella* virulence factor SifA, promotes kinesin-1-dependent vacuolar membrane exchanges. *Traffic*. 2010 Jul 1;11(7):899-911. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01069.x. Epub 2010 Apr 6. PMID: 20406420.
 19. Durant, J. A., Corrier, D. E., & Ricke, S. C. (2000). Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of food protection*, 63(5), 573–578. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.5.573>
 20. Feng X, Oropeza R, Kenney LJ (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 48:1131–1143.
 21. Figueira R, Holden DW. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology (Reading)*. 2012 May;158(Pt 5):1147-1161. doi: 10.1099/mic.0.058115-0. Epub 2012 Mar 15. PMID: 22422755.
 22. Fleming SE, Fitch MD, DeVries S, Liu ML, Kight C. Nutrient utilization by cells isolated from rat jejunum, cecum and colon. *J Nutr*. 1991 Jun;121(6):869-78. doi: 10.1093/jn/121.6.869. PMID: 1903440.
 23. Gallois A, Klein JR, Allen LA, Jones BD, Nauseef WM. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *J Immunol*. 2001 May 1;166(9):5741-8. doi: 10.4049/jimmunol.166.9.5741. PMID: 11313417.
 24. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, et al. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(1):946-949. doi:10.1128/AEM.72.1.946-949.2006
 25. Genovese KJ, He H, Swaggerty CL, Kogut MH. The avian heterophil. *Dev Comp Immunol*. 2013 Nov;41(3):334-40. doi: 10.1016/j.dci.2013.03.021. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23583524.

26. Genovese LL. Longevity of augmented phagocytic activity of heterophils in neonatal chickens following administration of *Salmonella* enteritidis-immune lymphokines to chickens. *Avian Pathol.* 2000 Apr;29(2):117-22. doi: 10.1080/03079450094144. PMID: 19184797.
27. Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* 2001 Jun;3(7):549-59. doi: 10.1016/s1286-4579(01)01411-3. PMID: 11418329.
28. Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1), 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
29. Hoiseth SK, Stocker BA (1981) Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238–239.
30. Howlader DR, Sinha R, Nag D, Majumder N, Mukherjee P, Bhaumik U, Maiti S, Withey JH, Koley H. Zebrafish as a novel model for non-typhoidal *Salmonella* pathogenesis, transmission and vaccine efficacy. *Vaccine.* 2016 Sep 30;34(42):5099-5106. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.08.077. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27614779.
31. Jacobson A, Lam L, Rajendram M, et al. A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to *Salmonella* Infection. *Cell Host Microbe.* 2018;24(2):296-307.e7. doi: 10.1016/j.chom.2018.07.002
32. Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms and Physiological Consequences. *Cell Host Microbe.* 2017 Aug 9;22(2):217-231. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.009. PMID: 28799907.
33. Jesenberger V, Procyk KJ, Yuan J, Reipert S, Baccarini M. *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med.* 2000;192(7):1035-1046. doi:10.1084/jem.192.7.1035.
34. Jones, M. A., Hulme, S. D., Barrow, P. A., & Wigley, P. (2007). The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian*

- pathology*: journal of the W.V.P.A, 36(3), 199–203.
<https://doi.org/10.1080/03079450701264118>
35. Knodler LA, *et al.* (2003) *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol Microbiol* 49:685–704.
 36. Knuff K, Finlay BB. What the SIF Is Happening-The Role of Intracellular *Salmonella*-Induced Filaments. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:335. Published 2017 Jul 25. doi:10.3389/fcimb.2017.00335
 37. Kogut MH, Iqbal M, He H, Philbin V, Kaiser P, Smith A. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Dev Comp Immunol.* 2005;29(9):791-807. doi: 10.1016/j.dci.2005.02.002. Epub 2005 Mar 16. PMID: 15936435.
 38. Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, *et al.* Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella* Typhimurium pathogenesis. *J Exp Med.* 2006;203(6):1407-1412. doi:10.1084/jem.20060206.
 39. LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Apr;13(4):191-205. doi: 10.1038/nrmicro3420. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25749450; PMCID: PMC5074537.
 40. Layton AN, Galyov EE. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med.* 2007 Jul 2;9(18):1-17. doi: 10.1017/S1462399407000373. PMID: 17605831.
 41. Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., & Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol*, 46(5), 1451–1464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03268.x>
 42. Lee AK, Detweiler CS, Falkow S (2000) OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 182:771–781.
 43. Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Jul 31; 9:270. doi: 10.3389/fcimb.2019.00270. PMID: 31428589; PMCID: PMC6689963.

44. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM, International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. *Clin Infect Dis*. 2010 Mar 15; 50(6):882-9.
45. Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, Bustamante VH. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol*. 2011 Jun;80(6):1637-56. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x. Epub 2011 May 12. PMID: 21518393; PMCID: PMC3116662.
46. Martínez LC, Banda MM, Fernández-Mora M, Santana FJ, Bustamante VH. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J Bacteriol*. 2014 Nov;196(21):3746-55. doi: 10.1128/JB.01799-14. Epub 2014 Aug 18. PMID: 25135218; PMCID: PMC4248803.
47. McSorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella* Typhimurium. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):986-93. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.986. PMID: 10623848.
48. Palmer AD, Slauch JM. Mechanisms of *Salmonella* pathogenesis in animal models. *Hum Ecol Risk Assess*. 2017;23(8):1877-1892. doi: 10.1080/10807039.2017.1353903. Epub 2017 Aug 24. PMID: 31031557; PMCID: PMC6484827.
49. Panda A, Tatarov I, Masek BJ, Hardick J, Crusan A, Wakefield T, Carroll K, Yang S, Hsieh YH, Lipsky MM, McLeod CG, Levine MM, Rothman RE, Gaydos CA, DeTolla LJ. A rabbit model of non-typhoidal *Salmonella* bacteremia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2014 Sep;37(4):211-20. doi: 10.1016/j.cimid.2014.05.004. Epub 2014 Jul 3. PMID: 25033732; PMCID: PMC4167468.
50. Polansky O, Sekelova Z, Faldynova M, Sebkova A, Sisak F, Rychlik I. Important Metabolic Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Dec 28;82(5):1569-76. doi: 10.1128/AEM.03473-15. PMID: 26712550; PMCID: PMC4771310.

51. PRESCOTT JF, THOEN CO editors. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals 4th ed Hoboken, NJ:Wiley Blackwell 2010 (SF780.3 P37)
52. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol Cell Probes*. 1992 Aug;6(4):271-9. doi: 10.1016/0890-8508(92)90002-f. PMID: 1528198.
53. Rehman T, Yin L, Latif MB, Chen J, Wang K, Geng Y, Huang X, Abaidullah M, Guo H, Ouyang P. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microb Pathog*. 2019 Dec; 137:103748. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103748. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31521802.
54. Rychlik I, Elsheimer-Matulova M, Kyrova K. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. *Vet Res*. 2014;45(1):119. Published 2014 Dec 5. doi:10.1186/s13567-014-0119-2
55. Sana, T.G., Flaugnatti, N., Lugo, K.A., Lam, L.H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E., and Monack, D.M. (2016). *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, E5044–E5051.
56. Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Bäumler AJ. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect*. 2001 nov-Dec;3(14-15):1335-44. doi: 10.1016/s1286-4579(01)01495-2. PMID: 11755423.
57. Santos RL, Tsolis RM, Bäumler AJ, Adams LG. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Jan;36(1):3-12. doi: 10.1590/s0100-879x2003000100002. PMID: 12532221.
58. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):7-15. doi:10.3201/eid1701.p11101
59. Singh, Y., Saxena, A., Kumar, R., Kumar Saxena, M. Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. In: Mascellino, M. T., editor. *Salmonella - A Re-emerging Pathogen* [Internet]. London:

IntechOpen; 2018 [cited 2022 Mar 04]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/61671> doi: 10.5772/intechopen.77210

60. Singh D, Singh M, Chander V, et al. Differential responses of chicken monocyte-derived dendritic cells infected with *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Typhimurium. *Sci Rep.* 2021;11(1):17214. Published 2021 Aug 26. doi:10.1038/s41598-021-96527-w
61. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Apr;11(4):227-38. doi: 10.1038/nrmicro2974. Epub 2013 Feb 25. PMID: 23435359.
62. Strindelius L, Degling Wikingsson L, Sjöholm I. Extracellular antigens from *Salmonella* Enteritidis induce effective immune response in mice after oral vaccination. *Infect Immun.* 2002 Mar;70(3):1434-42. doi: 10.1128/iai.70.3.1434-1442.2002. PMID: 11854230; PMCID: PMC127788.
63. Swaggerty CL, Kaiser P, Rothwell L, Pevzner IY, Kogut MH. Heterophil cytokine mRNA profiles from genetically distinct lines of chickens with differential heterophil-mediated innate immune responses. *Avian Pathol.* 2006 Apr;35(2):102-8. doi: 10.1080/03079450600597535. PMID: 16595301.
64. Swayne, David E. et al., Diseases of Poultry. 14 ed. Ames, Iowa. John Wiley & Sons, Incorporated, 2020.
65. Varmuzova K, Kubasova T, Davidova-Gerzova L, et al. Composition of Gut Microbiota Influences Resistance of Newly Hatched Chickens to *Salmonella* Enteritidis Infection. *Front Microbiol.* 2016; 7:957. Published 2016 Jun 17. doi:10.3389/fmicb.2016.00957
66. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumlér AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature.* 1999 Oct 21;401(6755):804-8. doi: 10.1038/44593. PMID: 10548107.
67. Videnska P, Sedlar K, Lukac M, Faldynova M, Gerzova L, Cejkova D, Sisak F, Rychlik I. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. *PLoS One.* 2014 Dec 12;9(12): e115142. doi: 10.1371/journal.pone.0115142. PMID: 25501990; PMCID: PMC4264878.

68. Wagner S, Grin I, Malmshaimer S, Singh N, Torres-Vargas CE, Westerhausen S. Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(19):fny201. doi:10.1093/femsle/fny201
69. Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol.* 2000 Jun;36(5):997-1005. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01892.x. PMID: 10844685.
70. Wang M, Qazi IH, Wang L, Zhou G, Han H. *Salmonella* Virulence and Immune Escape. *Microorganisms.* 2020;8(3):407. Published 2020 Mar 13. doi:10.3390/microorganisms8030407
71. Wang Y, Miao X, Li H, et al. The correlated expression of immune and energy metabolism related genes in the response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis inoculation in chicken. *BMC Vet Res.* 2020;16(1):257. Published 2020 Jul 25. doi:10.1186/s12917-020-02474-5
72. Wemyss MA, Pearson JS. Host Cell Death Responses to Non-typhoidal *Salmonella* Infection. *Front Immunol.* 2019 Jul 26; 10:1758. doi: 10.3389/fimmu.2019.01758. PMID: 31402916; PMCID: PMC6676415.
73. Wotzka SY, Nguyen BD, Hardt WD. *Salmonella* Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. *Cell Host Microbe.* 2017 Apr 12;21(4):443-454. doi: 10.1016/j.chom.2017.03.009. PMID: 28407482.

Apéndice

Preparación de medio de cultivo Luria Bertani

Para la preparación de 1 litro de medio LB se requiere lo siguiente

1. Se disuelven 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 950 ml de agua destilada, después se agregan 15 g/L de agar.
2. Se ajusta el pH del medio a 7.0 agregando NaOH 1N y se ajusta para obtener el litro
3. Se esteriliza mediante autoclave 20 minutos a 25 psi
4. Una vez enfriada la solución a 55°C se le agregan los antibióticos necesarios (kn y St) 9 µl de kanamicina y 40 µl de estreptomicina, después se vacían en cajas de petri a una dosis de 9 µg de kanamicina para las mutantes y 40 µg de estreptomicina para la cepa WT.
5. Las cajas se conservan en refrigeración a 4°C.

Preparación de medio de cultivo Verde Brillante

1. Suspender 29,05 gramos en 500 ml de agua purificada/destilada.
2. Calentar hasta hervir Para disolver totalmente el medio.
3. Esterilizar mediante autoclave a 15 lbs de presión a 121°C por 15 minutos
4. Agregar el medio previamente atemperado en placas de Petri.

Buffer TAE 1x

1. Colocar 20 ml de TAE 50x en una probeta
2. Agregarle 980 ml de agua destilada
3. Se vacía en frascos ámbar y se identifica.

Gel de agarosa al 1%

1. Se pesan 1 gramo de agarosa y se disuelve en buffer TAE 1x
2. Calentar en el horno hasta que se disuelva la agarosa en su totalidad. Nota: Se debe monitorear constantemente para evitar que se derrame, para evitarlo se deben realizar pausas mientras se disuelve completamente
3. Se agregan 20 μ l de Sybr safe para después vaciar la mezcla en la charola con el peine previamente colocado
4. Una vez polimerizada la mezcla se retira el peine, se agrega TAE 1x en la cámara hasta cubrir totalmente

PBS 10x

1. En 800 ml de agua destilada disolver:
2. 80 g de cloruro de sodio NaCl
3. 2 g de cloruro de potasio KCl
4. 14.4 g de fosfato de sodio monobásico Na_2HPO_4
5. 2.4 g de fosfato monopotásico KH_2PO_4