

205  
29



**RELACION ENTRE LA PERSISTENCIA DE DOS VACUNAS CEPA R-9 DE Salmonella gallinarum Y LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN AVES REPRODUCTORAS PESADAS ADULTAS.**

**Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario y Zootecnista  
por**

**Judith Elena Sánchez Vázquez**



**Asesor: M.V.Z. Mario Padrón Navarro**

**México, D. F.**

**1987**



## **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 está 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.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESÚMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
MATERIAL Y METODOS .....	5
RESULTADOS .....	9
DISCUSIÓN .....	11
LITERATURA CITADA .....	14
GRÁFICAS .....	16

R E S U M E N

SÁNCHEZ VAZQUEZ JUDITH ELENA. Relación entre la persistencia de dos vacunas cepa R-9 de Salmonella gallinarum y la respuesta de anticuerpos en aves reproductoras pesadas adultas (bajo la dirección de: Mario Padrón Navarro).

Con el objeto de estudiar la persistencia de dos cepas R-9 de S. gallinarum en hígado, bazo, vesícula biliar y folículos ováricos, evaluar la respuesta de anticuerpos detectables por medio de las pruebas de aglutinación en placa con sangre completa y microaglutinación, estudiar la relación entre la presencia de las cepas vacunales en el organismo de las aves y la presencia de anticuerpos en sangre, se realizaron exámenes bacteriológicos y serológicos a la 1ª, 3ª, 5ª y 7ª semanas post-vacunación. Se utilizaron aves reproductoras pesadas adultas que fueron vacunadas con 2 cepas R-9 de S. gallinarum; una de ellas obtenida a partir de una vacuna comercial (grupo I) y la otra aislada de un ave inmunizada con una vacuna distinta a la primera (grupo II). Encontrándose que en el grupo I el máximo número de aislamientos de la cepa R-9 se realizó en la 1ª semana post-vacunación, sin embargo, a la 7ª semana post-vacunación ya no pudo ser aislada. La cepa vacunal fue recuperada con mayor frecuencia a partir de folículos ováricos e hígado durante el experimento. En el grupo II no fue posible el aislamiento de la vacuna durante la prueba. El máximo número de reacciones positivas a la prueba de aglutinación en placa con sangre completa ocurrió en la 1ª y 3ª semana post-vacunación. Sólo se observaron diferencias estadísticas entre ambos grupos a la 3ª semana post-vacunación. En el grupo I ocurrieron algunas reacciones positivas a la prueba de microaglutinación a la 3ª semana post-vacunación. No se encontró relación estadística entre la presencia de la cepa vacunal en el organismo de las aves y la presencia de anticuerpos en sangre.

## INTRODUCCION:

La Tifoidea Aviar es una de las enfermedades que provoca grandes pérdidas a la Avicultura Nacional debido a su elevada presentación en granjas de aves reproductoras pesadas y aves comerciales productoras de huevo café (8).

En México y en varios países de América Latina se ha intentado controlar más que erradicar a esta enfermedad, este control se realiza a través de la utilización ya sea en forma separada o en combinación de la medicación continua en el alimento con nitrofuranos, inyección de antibióticos, empleo de pruebas de aglutinación en forma repetida y eliminación de aves reactoras, implementación de adecuados programas sanitarios y finalmente con el uso de la vacuna cepa R-9 (2,3,4,10,11).

Esta vacuna es un auxiliar en el control de la Tifoidea Aviar ya que produce una buena protección al desafío con cepas patógenas cuando se aplica con títulos de 50-125 x 10<sup>6</sup> bacterias/ml. Se ha reportado que no estimula la producción de anticuerpos detectables por medio de la prueba de aglutinación en placa con sangre completa cuando se ha aplicado en aves de 4-8 semanas de edad eliminando la posibilidad de detectar falsos reactores positivos durante este periodo (10,11).

La vacuna cepa R-9 de Salmonella gallinarum fue desarrollada en Inglaterra por Williams Smith en el año de 1956 a partir de una cepa patógena de S. gallinarum, la cual fue atenuada en medios de cultivo artificiales y por el uso de un bacteriófago (10,11).

Los resultados obtenidos con la vacuna cepa R-9, según la información que se recibe de campo, son variables y resulta difícil lograr una correcta y precisa evaluación de su comportamiento con respecto a

la producción de anticuerpos y su detección por medio de pruebas serológicas (6).

Gordon y Luke en 1959 (1) al utilizar la vacuna en pruebas de campo con aves reproductoras pesadas adultas, reportaron hasta un 6.1% de aves rectoras a la prueba de aglutinación con sangre completa, encontrando que la mayor parte de las aves rectoras presentaron lesiones en ovario probablemente debidas a la cepa vacunal.

Silva y cols. en 1980 (9), encontraron que la cepa R-9 estimuló la producción de anticuerpos, algunas de las aves reaccionaron con la prueba de aglutinación en placa con sangre completa 2-7 semanas después de haber sido vacunadas, por lo que el autor recomendó un intervalo de 7 semanas entre la vacunación y las pruebas de aglutinación y así evitar la presentación de aves rectoras positivas falsas a la prueba debido a la vacuna.

En México se ha intentado el control de Tifoidea Aviar en aves reproductoras pesadas utilizando principalmente la implementación de programas sanitarios y la aplicación de la vacuna R-9 para disminuir la presentación de brotes de la enfermedad, en combinación con la realización de repetidas pruebas de aglutinación para eliminar a las aves portadoras, la detección y eliminación de esas aves es fundamental para lograr reducir la transmisión de la bacteria a través del huevo (7). El título de las vacunas varía, pero se han llegado a utilizar dosis de hasta  $200 \times 10^6$  bacterias/ml. Debido a que la vacuna puede provocar reacciones positivas falsas a la prueba de aglutinación en placa con sangre completa, a nivel de campo se ha tratado de evitar dichas reacciones manejando intervalos de 7-8 semanas entre la vacunación y la aglutinación de las

aves con resultados variables.

En nuestro país existen numerosos laboratorios que se dedican a la producción y venta no autorizada de vacuna cepa R-9 de S. gallinarum ignorándose totalmente el origen de las diferentes cepas utilizadas por estos laboratorios, el título de las vacunas y su comportamiento cuando son aplicadas en aves sexualmente maduras.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1.- Evaluar en aves reproductoras pesadas adultas el comportamiento de 2 cepas R-9 de Salmonella gallinarum, una de ellas obtenida a partir de una vacuna comercial y la otra aislada de un ave inmunizada con una vacuna distinta a la anterior con base en su:
  - a) Persistencia en hígado, bazo, vesícula biliar y folículos ováricos.
  - b) Detectar la producción de anticuerpos por medio de las pruebas de aglutinación en placa con sangre completa y microaglutinación.
- 2.- Estudiar en un periodo de 7 semanas la relación entre la presencia de las cepas vacunales en el organismo de las aves y la presencia de anticuerpos en sangre.

## MATERIAL Y MÉTODOS:

### V a c u n a s :

Se utilizaron 2 cepas R-9 de Salmonella gallinarum ácido nalidixico resistentes (Nal<sup>r</sup>), una de ellas fue identificada como vacuna "A" y se obtuvo de un frasco de vacuna comercial, la segunda fue identificada como vacuna "B" y fue aislada a partir de los folículos ováricos de una gallina reproductora pesada inmunizada con otra vacuna comercial distinta a la primera. Ambas cepas fueron inoculadas en tubos conteniendo 10 ml. de Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC) y se incubaron a 37C durante 24h, posteriormente se inocularon 6 ml de dicho cultivo en botellas de Roux conteniendo 150 ml de Agar Tripticasa Soya (ATS) ajustando el contenido de agar a 3%, las botellas se incubaron 24h a 37C, ambas cepas fueron cosechadas por separado con 20 ml de Solución Buffer de Fosfatos (SBF) y se procedió al conteo viable de ambas vacunas realizando diluciones décuples de los cultivos utilizando SBF e inoculando por triplicado 0.1 ml de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  en cajas de Petri conteniendo 20 ml de Agar McConkey, los inóculos fueron distribuidos homogéneamente con triángulos de cristal e incubadas 24h a 37C para su conteo.

El conteo viable de las vacunas fue ajustado a  $200 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml.

### A v e s :

Se formaron 2 grupos de 25 y un grupo testigo de 10 gallinas reproductoras pesadas Pilch de 60 semanas de edad negativas a la prueba de aglutinación en placa con sangre completa y microaglutinación, cada grupo fue alojado por separado en piso utilizando paja de trigo como material de cama.

La distribución de los grupos fue la siguiente:

GRUPO I .- Se les administró 1 ml de la vacuna "A" conteniendo  $200 \times 10^6$  UFC/ml por vía subcutánea.

GRUPO II .- Se les administró la vacuna "B" a la misma dosis que el grupo I por vía subcutánea.

GRUPO III.- Testigo, se les administró 1 ml de SBF estéril por vía subcutánea.

5 aves de los grupos I y II y 2 aves del grupo III (testigo) fueron seleccionadas al azar a la 1ª, 3ª, 5ª y 7ª semanas después de haber sido vacunadas, realizándose la prueba de aglutinación en placa con sangre completa de acuerdo a los métodos ya descritos utilizando un antígeno K polivalente comercial\* , la interpretación de la prueba se llevó a cabo de la siguiente manera:

Si la reacción ocurrió:

0 - 30 segundos	= + 4	positiva
30 - 60 "	= + 3	"
60 - 90 "	= + 2	"
90 - 120 "	= + 1	sospechosa
120 en adelante	=	negativa

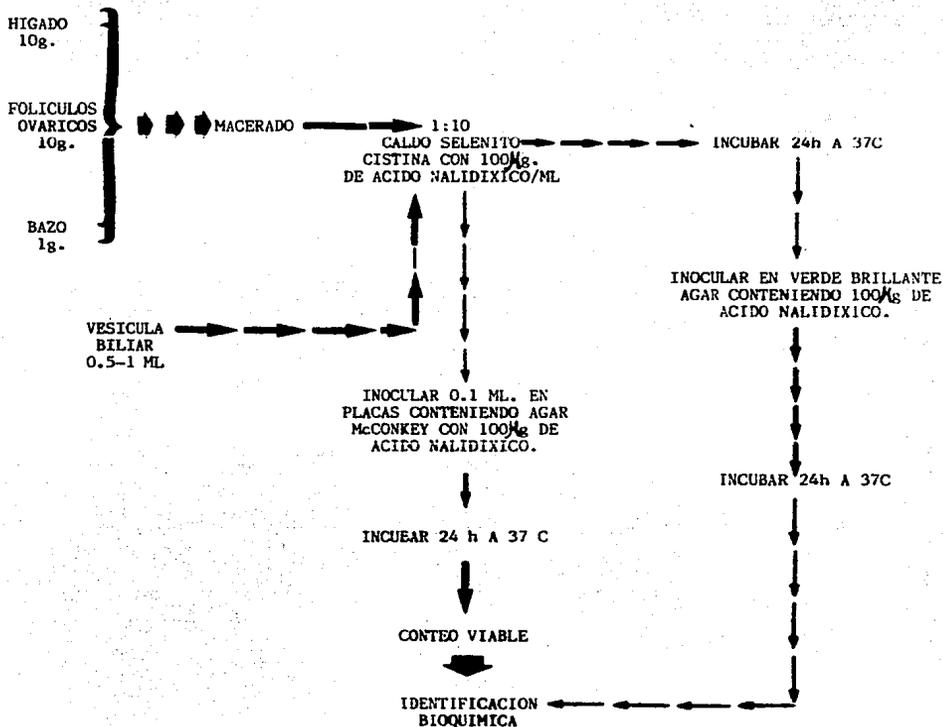
Se tomaron muestras de sangre en forma individual y con el suero se llevaron a cabo pruebas de microaglutinación de acuerdo a los métodos ya descritos (5,12), considerándose una reacción positiva cuando la aglutinación ocurrió en la dilución 1:32 ó superior.

\*Laboratorios SALSBURY Atlacomulco #505 Naucalpan, Edo. de Mex.

Una vez tomadas las muestras de sangre las aves fueron sacrificadas por medio de choque eléctrico y se realizaron exámenes bacteriológicos individuales de acuerdo a los procedimientos descritos en el ESQUEMA No. 1.

ESQUEMA No. 1

PROCEDIMIENTO PARA EL EXAMEN BACTERIOLOGICO DE LAS  
AVES VACUNADAS Y NO VACUNADAS CON LAS DIFERENTES  
CEPAS R-9 DE Salmonella gallinarum.



RESULTADOS:

AISLAMIENTO DE LA CEPA VACUNAL DE DIFERENTES ORGANOS:

En el grupo I, el máximo número de aves positivas al aislamiento de la cepa vacunal a partir de uno o más órganos se alcanzó a la 1ª semana Post-Vacunación (P.V); a la 7ª semana P.V. ya no fue posible la recuperación de la bacteria a partir de ninguna de las aves (FIG. 1)

En el grupo II no fue posible el aislamiento de la cepa vacunal a partir de ninguna de las aves durante el transcurso del experimento.

En el grupo I se recuperó la cepa vacunal en el 100% de las aves a partir de hígado en la 1ª semana P.V. y en menor proporción de bazo y folículos ováricos, sin embargo, a la 5ª semana P.V., la cepa vacunal persistió más en folículos ováricos que en otros órganos (FIG. 2)

En el grupo I, la cepa vacunal se recuperó con mayor frecuencia a partir de: Folículos Ováricos (8/20), Hígado (7/20), Bazo (4/20) y Vesícula Biliar (0/20), durante el transcurso del experimento (FIG. 3).

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE AGLUTINACION  
EN PLACA CON SANGRE COMPLETA:

El máximo número de reacciones positivas a la prueba de Aglutinación en Placa con Sangre Completa (APS) ocurrió a la 1ª y 3ª semana P.V. en el grupo I y a la 1ª semana en el grupo II. A la 7ª semana P.V. ambos grupos tuvieron aún reacciones positivas en 60% y 10% respectivamente (FIG. 4).

Solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < .01$ ) entre ambos grupos a la 3ª semana P.V.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE MICROAGLUTINACION:

En el grupo I ocurrieron algunas reacciones positivas a la prueba de Microaglutinación (MA) en la dilución 1:32 a la 3ª y 5ª semana P.V. (60% y 20%), sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas durante el transcurso de la prueba entre los 2 grupos.

Los promedios geométricos en la prueba de MA de ambos grupos se observan en la FIG. 5 .

Al realizar la prueba de  $X^2$  en el grupo I no se encontró relación entre la presencia de anticuerpos detectables por medio de la prueba APS y el aislamiento de la cepa vacunal en el organismo de las aves.

DISCUSIÓN:

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que en ninguno de los grupos vacunados existió alguna relación entre el aislamiento de las cepas vacunales y la presencia de anticuerpos en sangre detectables por medio de la prueba de APS. Gordon y Luke en 1959 (1), reportaron el aislamiento de la cepa vacunal hasta 11 meses después de la vacunación y relacionaron la persistencia de la bacteria y el desarrollo de lesiones en folículos ováricos con la presencia de anticuerpos en sangre, sin embargo encontraron también algunas aves de las cuales se aisló la cepa vacunal y que no presentaron anticuerpos en sangre.

Es importante mencionar que se observaron diferencias notables entre ambos grupos con respecto al aislamiento de la cepa vacunal y la producción de anticuerpos en sangre, pues la cepa R-9 recuperada a partir de un ave muerta previamente inmunizada (vacuna "B") fue capaz de estimular la producción de anticuerpos similar a la del grupo I sin que fuera posible el aislamiento de la bacteria, lo cual podría indicar que existió un mecanismo diferente de infectividad y multiplicación de la bacteria en el huésped.

La prueba de APS fue más sensible que la prueba de MA en ambos grupos para detectar anticuerpos vacunales, Silva en 1980 (9), encontró que 7 semanas después de la aplicación de la vacuna R-9 a una dosis de  $100 \times 10^6$  UFC/ml las reacciones con la prueba de APS desaparecían, en este trabajo al utilizar una dosis doble ( $200 \times 10^6$  UFC/ml) 7 semanas no fueron suficientes para que desaparecieran dichas reacciones.

Se han observado en México, algunas parvadas de gallinas reproductoras pesadas con un porcentaje elevado de aves rectoras a la prueba

de APS (10%) 20 semanas después de haberse aplicado la vacuna con dosis de  $50 \times 10^6$  UFC/ml, sin que haya sido posible el aislamiento de la cepa vacunal o de una cepa patógena de S. gallinarum\*. Estos resultados pudieron haber sido influenciados por la mayor cantidad de aves que existen en una granja en comparación con el número de aves utilizadas en este experimento, por lo que resultaría importante e interesante el realizar seguimientos serológicos y bacteriológicos durante un periodo de tiempo mayor al utilizado en este trabajo y a nivel de granja.

La prueba de MA es una prueba más específica cuando se utiliza en aves vacunadas con la cepa R-9 que la prueba de APS, en este trabajo, algunas aves reaccionaron positivamente en la dilución 1:32 a la 3ª semana P.V., lo cual coincide con los resultados obtenidos por Silva (9), confirmando que las aves vacunadas con la cepa R-9 raramente alcanzan títulos superiores a 1:32.

#### CONCLUSIONES:

1.- La cepa R-9 obtenida a partir de una vacuna comercial fue aislada con mayor frecuencia de folículos ováricos e hígado durante el transcurso del experimento.

2.- No existió relación estadística entre el aislamiento de las 2 cepas vacunales y la presencia de anticuerpos en sangre detectables por medio de la prueba de APS.

\*Padrón, N.M. Comunicación Personal 1987.

3.- La cepa R-9 que fue aislada a partir de un ave muerta previamente inmunizada (vacuna "B"), se comportó en forma distinta a la cepa R-9 comercial (vacuna "A"), pues fue capaz de estimular la producción de anticuerpos detectables por APS sin que fuera posible aislarla durante el transcurso de la prueba.

LITERATURA CITADA

- 1.- Gordon, W.A.M. and Luke, D.A.: A note on the use of the 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks. Vet. Rec., 71: 926-927 (1959).
- 2.- Hall, W.J., Legenhausen, D.H. and Mac Donald, A.D.: Studies on fowl typhoid II. Control of disease. Poult. Sci., 28: 789-801 (1949).
- 3.- Mosqueda, T.A.: Control de la tifoidea aviaria en reproductoras: Un estudio de campo. Memorias del IX Congreso Latinoamericano de Avicultura, XXI Congreso Nacional de Avicultura, X Convención de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. (ANECA) 281-293 (1985).
- 4.- Padrón, N.M.: Comportamiento de diferentes brotes de tifoidea aviar en reproductoras y su control. Memorias de la XI Convención Anual de la ANECA y 35th Western Poultry Disease Conference. 132-134 (1986).
- 5.- Padrón, N.M.: Infección por Salmonella gallinarum en aves semipesadas. Detección de anticuerpos en sangre y yema por medio de las pruebas de aglutinación en placa con suero y microaglutinación. Memorias del IX Congreso Latinoamericano de Avicultura, XXIV Congreso Nacional de Avicultura, X Convención de la ANECA. 831-840 (1985).
- 6.- Padrón, N.M.: Algunas consideraciones sobre la vacunación contra la tifoidea aviaria con la cepa 9R. AVIRAMA. 3 (32): 4-13 (1982-1983).
- 7.- Padrón, N.M.: Control de la tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas Avicultura Profesional. 5 (1): 7-10 (1987).
- 8.- Ramírez, J.H.: Repercusiones económicas de la tifoidea aviar en reproductoras pesadas. Memorias del curso. Erradicación de tifoidea aviar. Comisión permanente para el control y erradicación de la pulorosis

- y tifoidea aviar. 46-58. (1985).
- 9.- Silva, E.N., Snoeyenbos, G.H., Weinack, O.M. and Smyser, C.F.: Some measurement of behavior of Smith strain vaccine (9R) Salmonella gallinarum in chickens. Memorias de la V Convención de la ANECA (México) y la 29th Western Poultry Conference. 235-237. (1980).
  - 10.- Smith, H.W.: The use of live vaccines in experimental Salmonella gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect. J. Hyg. Camb., 54: 419-432 (1956).
  - 11.- Smith, I.M.: Protection against experimental fowl typhoid by vaccination with strain 9R reconstituted from the freeze dried state. J. Comp. Pathol. 79: 197- 205 (1969).
  - 12.- U.S.D.A.: National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. United States Department of Agriculture, Beltsville, MD, 1984.

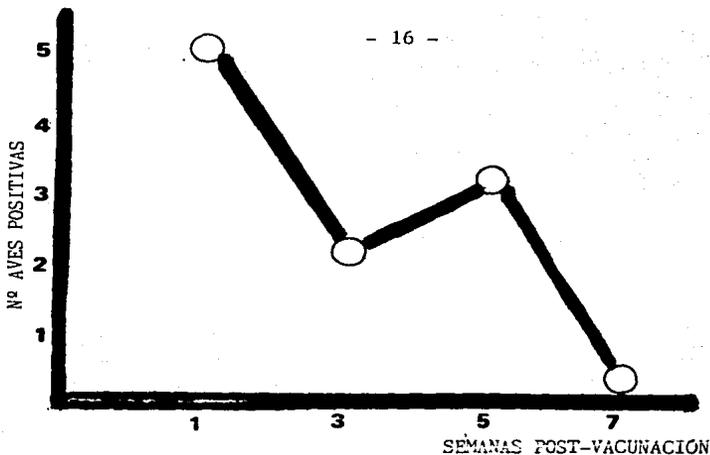


FIG. 1 Nº DE AVES POSITIVAS DEL GRUPO I AL AISLAMIENTO DE LA CEPA R-9 DE *S. gallinarum* DURANTE EL TRANS CURSO DEL EXPERIMENTO.

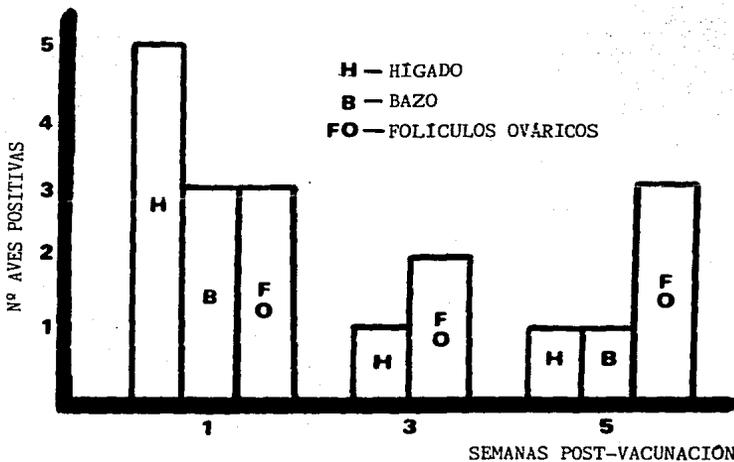


FIG. 2 COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LA CEPA R-9 DE *S. gallinarum* EN EL GRUPO I A PARTIR DE LOS DIFERENTES ORGANOS DURANTE EL TRANS CURSO DEL EXPERIMENTO.

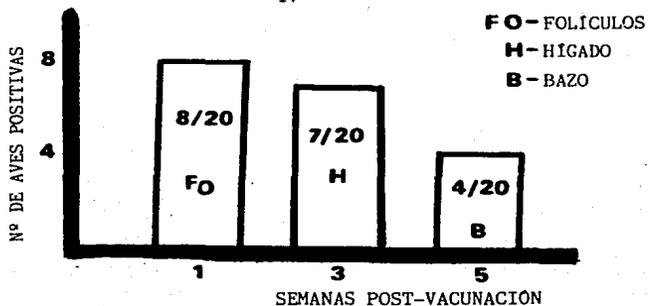


FIG. 3 FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE LA CEPA R-9 DE *S. gallinarum* EN LOS DIFERENTES ORGANOS EN EL GRUPO I DURANTE EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO.

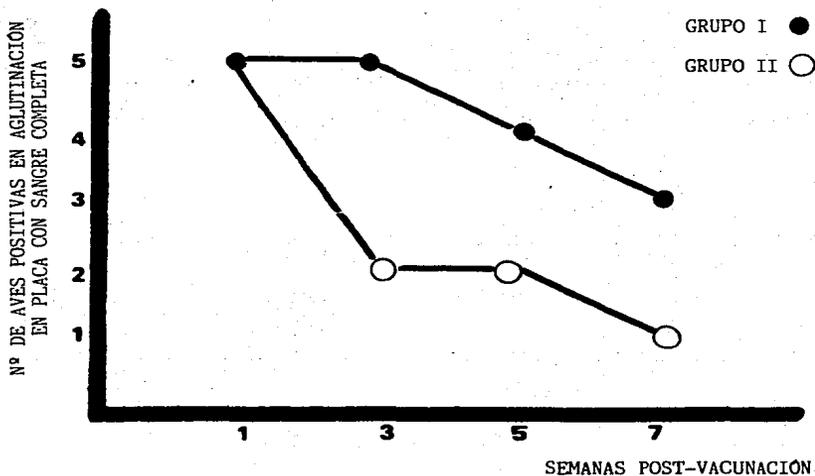


FIG. 4 Nº DE AVES POSITIVAS A LA PRUEBA DE AGLUTINACION EN PLACA CON SANGRE COMPLETA EN LOS GRUPOS I Y II DURANTE EL TRANCURSO DE LA PRUEBA.

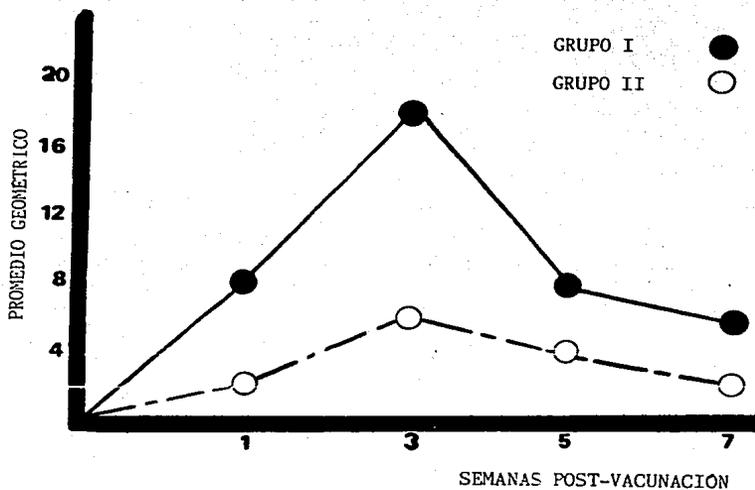


FIG. 5 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PROMEDIOS GEOMÉTRICOS PARA LA PRUEBA DE MICROAGLUTINACIÓN DE LOS GRUPOS I Y II DURANTE EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO.