

145
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EVALUACION DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO DE TIFOIDEA AVIAR EN AVES PESADAS SEMIMADURAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ANA LAURA MIRANDA ROMERO

Asesores: MVZ. Mario Padrón Navarro
MVZ. Carlos Rosales Ortega

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



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 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

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	5
RESULTADOS	8
DISCUSION	10
CONCLUSIONES	13
LITERATURA CITADA	14
CUADROS	19
APENDICE	28

RESUMEN

MIRANDA ROMERO ANA LAURA . Evaluación de los métodos de diagnóstico de Tifoidea Aviar en aves pesadas semimaduras. Bajo la supervisión del M.V.Z Mario Padrón Navarro y el M.P.V.M., M.V.Z. Carlos Rosales Ortega .

Se evaluó la sensibilidad , especificidad y valores predictivo positivo y negativo para las pruebas diagnosticas de aglutinación en placa con sangre completa , microaglutinación con suero , microaglutinación con papel filtro y examen bacteriológico. Se utilizaron 86 pollos de engorda de 12 semanas de edad divididos en dos grupos . El primero fue inoculado con 1 ml de cultivo de S.gallinarum conteniendo 50×10^6 UFC/ml, el segundo permaneció como grupo control no inoculado. El estudio se dividió en dos fases : Aguda que comprendió del día 3-10 posinoculación y fase subaguda del día 14 al 35 posinoculación. El examen bacteriológico y la prueba de aglutinación en placa con sangre completa obtuvieron los valores de sensibilidad, valor predictivo positivo y negativo más altos durante la fase aguda; las pruebas más específicas fueron las del examen bacteriológico , aglutinación en placa con sangre completa y microaglutinación con suero . Durante la fase subaguda las pruebas con mayores valores de sensibilidad y valor predictivo negativo fueron las de microaglutinación con suero y con papel filtro. Las pruebas con mayores valores de especificidad y valor predictivo positivo fueron las de examen bacteriológico y aglutinación en placa con sangre completa . Con los resultados de este estudio se elaboró un ejercicio utilizando alternativas de combinación de 3 pruebas diagnósticas que se presentan en un apéndice.

INTRODUCCION

La Tifoidea Aviar (T.A) causada por Salmonella gallinarum puede presentarse como una enfermedad aguda de caracter septicémico o como una infección crónica, afectando principalmente a los pavos y a la gallina doméstica, de esta última las aves productoras de huevo café son más susceptibles que las productoras de huevo blanco. (10).

En México, la TA es una de las enfermedades que mayor impacto económico ha causado en los últimos años a la avicultura nacional, particularmente en el sector de aves reproductoras semipesadas y pesadas, pues es capaz de producir elevada mortalidad en las aves adultas, acompañado de bajas drásticas en la producción de huevo y debido a que la bacteria puede transmitirse a través del huevo, provoca también elevada mortalidad en la progenie. (7,16,19).

El periodo de incubación de la enfermedad a nivel experimental en aves susceptibles es de 5 a 6 días, sin embargo, a nivel de campo éste es más prolongado, debido principalmente a la variación de patogenicidad de S.gallinarum, grado de exposición y susceptibilidad de las aves. En ocasiones es necesario que sucedan pases continuos de la bacteria de una ave a otra para que la enfermedad se manifieste con los signos y lesiones característicos. (4,5).

Durante la fase aguda de la infección por S.gallinarum, no es siempre posible la detección de anticuerpos por medio de las pruebas serológicas tradicionales, como lo son la microaglutinación (MA) y la aglutinación en placa con sangre completa (AFSC), esto puede ser debido a que durante esta fase, los anticuerpos son principalmente del tipo IgG incompletos (1). Debido a que existe un proceso septicémico, el aislamiento de la bacteria puede lograrse prácticamente a partir de cualquier órgano.

Durante la fase subaguda y crónica de la enfermedad, la cantidad de anticuerpos es lo suficientemente elevada para poder ser detectados por las pruebas de APSC y MA, estos anticuerpos pueden persistir hasta un año, sin embargo, la bacteria puede no persistir en el organismo del ave o encontrarse principalmente como infecciones crónicas localizadas en folículos ováricos. (24).

La APSC es la única prueba posible de realizar directamente en la granja para poder detectar aves portadoras en forma individual, sin embargo, tiene la desventaja de ser solo una prueba cualitativa y que a la vez puede presentar reacciones falsas positivas y negativas (2,6). Se ha observado además tanto a nivel de campo como experimentalmente que algunas aves infectadas reaccionan intermitentemente a la prueba. (24).

La prueba de MA es bastante útil para tratar de cuantificar los anticuerpos en sangre ya que se efectúan diluciones del suero, por esto mismo es una prueba más específica que la APSC. Su desventaja consiste en no ser una prueba capaz de detectar aves infectadas en los primeros días de la infección, no obstante una vez que la infección se ha establecido en el ave, la prueba detecta aves infectadas por largos períodos de tiempo y en forma más constante. (10).

El examen bacteriológico se considera definitivo para confirmar la presencia de la enfermedad en la parvada; sin embargo es bien conocido el hecho que en muchas ocasiones no es posible recuperar la bacteria de aves que presentan anticuerpos en sangre y que realmente se encuentran infectadas. (10).

El diagnóstico oportuno de la TA en aves reproductoras pesadas en ausencia de elevada mortalidad, debe iniciarse con una constante observación clínica de las parvadas, realización frecuente de necropsias y examen bacteriológico de las aves con lesiones sugestivas (7,10,34). Como apoyo importante a un programa integral de detección y control de la enfermedad puede utilizarse también la combinación de las pruebas serológicas y bacteriológicas de las aves reproductoras al inicio de la producción de huevo.

El método de colección y procesamiento de muestras de sangre con papel filtro (3) ha sido evaluado para la detección de anticuerpos en contra de la enfermedad de Newcastle por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinación con buenos resultados. Es un método práctico y sencillo que reduce considerablemente el costo y necesidad de mano de obra especializada y facilita el envío de muestras por correo al laboratorio (2). Reduce los costos de lavado de frascos, permite la obtención de las muestras con mano de obra no calificada y la inversión del equipo solo tiene que ser efectuada por el laboratorio que procese las muestras. (2,3).

Debido a que existe la posibilidad de que las aves se infecten en su etapa de crecimiento y desarrollo y la enfermedad no manifiestarse hasta que las aves se encuentren sexualmente maduras, surge la necesidad de ensayar las posibilidades de un diagnóstico oportuno de la infección en aves pesadas semimaduras, en ausencia de elevada mortalidad. (17).

Ya que se ha demostrado la confiabilidad del método de colección y procesamiento de muestras de sangre con papel filtro en la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle y la facilidad de enviar muestras por correo a grandes distancias se decidió incluirla dentro de las pruebas a ensayar para el diagnóstico oportuno de TA.

Así se evaluó la sensibilidad y especificidad de las pruebas de microaglutinación con soro, microaglutinación con papel filtro, aglutinación en placa con sangre completa junto con el examen bacteriológico en aves semimaduras inoculadas en forma experimental con un cultivo de Salmonella gallinarum en los diferentes estadios de la enfermedad.

Se realizó un apéndice y cuadros que se muestran al final del trabajo para ilustrar los resultados obtenidos.

MATERIAL Y METODOS

Se formaron 2 grupos de 43 pollos de engorda de estirpe Pilch de 12 semanas de edad libres de pullorosis y tifoidea aviar alojados en piso utilizando cascarilla de arroz como material de cama con una densidad de población de 5 aves/m².

Las aves del grupo A fueron inoculadas en forma oral con 1 ml de cultivo patógeno de S.gallinarum ácido nalidixico resistente (Nal^r) conteniendo 50 X 10⁶ UFC/ml.

Las aves del grupo B fueron inoculadas con 1 ml de solución salina fisiológica estéril por vía oral y permanecieron como grupo testigo.

En los días 3 , 6 y 10 posinoculación (PI) correspondientes a la fase aguda y los días 14, 21, 30 y 35 correspondientes a la fase subaguda, se realizó la prueba de AFSC y se obtuvieron dos muestras de sangre, una con papel filtro y la otra para la obtención de suero con las que se llevaron a cabo las pruebas de MAF y MAS respectivamente.

Se tomaron muestras con hisopos cloacales (HC) a todas las aves de los dos grupos. Con la única finalidad de comprobar la infección en las aves inoculadas.

Los días 10, 30 y 35 se seleccionaron al azar 10 aves de cada grupo , las cuales fueron sacrificadas para realizar el examen bacteriológico en forma individual.

Técnica bacteriológica:

Por medio de hisopos estériles se tomaron muestras de : Hígado, hazo, vesícula biliar, páncreas y folículos ováricos e inoculados en 3 ml de Caldo Selenito-Cistina conteniendo Acido Nalidixico a una concentración de 100 µg/ml de medio e incubados a 37 C durante 24 horas.

Posteriormente se tomó una muestra del Caldo Selenito-Cistina y se sembró en Agar Verde Brillante conteniendo Ac.Nalidixico a una concentración de 100µg/ml y se incubó de 24 a 36 horas a 37 C.

Las colonias morfológicamente semejantes a S.gallinarum se aislaron en cultivo puro y se reinocularon en Agar Verde Brillante con Ac.Nalidixico a la concentración antes mencionada. La identificación final se llevo a cabo mediante la realización de pruebas bioquímicas de acuerdo al método descrito.

La sensibilidad, especificidad y valor predictivo de todas las pruebas diagnósticas en la fase aguda y subaguda de la infección fueron evaluadas conforme a los siguientes conceptos :

Sensibilidad : Es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad. Nos describe la habilidad de una prueba para detectar reacciones positivas exactamente. (12,19,22).

Especificidad : Es la probabilidad de que la prueba sea negativa cuando el individuo realmente no tiene la enfermedad. Y nos describe la habilidad de una prueba en detectar reacciones negativas correctamente. (12,19,22).

Valor Predictivo Positivo o Sensibilidad Diagnóstica : Si la prueba es positiva en un individuo, que probabilidad hay de que el individuo realmente tenga el padecimiento. Es la proporción de pruebas positivas, que realmente lo son, está relacionado con la sensibilidad de la prueba y marcadamente influenciado por la prevalencia de la enfermedad y el número de falsos positivos. (12,19,22) .

Valor Predictivo Negativo o Especificidad Diagnóstica : Si la prueba es negativa en un individuo, que probabilidad hay de que el individuo no tenga el padecimiento. (12,19,22).

Los resultados bacteriológicos y serológicos fueron evaluados por medio de la prueba de Mc Nemar.

Prueba de Referencia. (*)

		A	B	Total
Prueba de	+	a	b	a + b
Diagnóstico.	-	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	a + b + c + d.

a = Es el número de casos verdaderos positivos.

b = Es el número de casos falsos positivos.

c = Es el número de casos falsos negativos.

d = Es el número de casos verdaderos negativos.

(*) Se tomo como prueba de referencia el hecho de existir grupos inoculados (A) y no inoculados (B).

$$S = \frac{a}{a + c} = \frac{\text{Aves verdaderamente positivas}}{\text{Total de aves infectadas.}}$$

$$E = \frac{d}{b + d} = \frac{\text{Aves verdaderamente negativas}}{\text{Total de aves no infectadas.}}$$

$$VP(+)= \frac{a}{a + b} = \frac{\text{Aves verdaderamente positivas}}{\text{Total de aves negativas a la prueba de diagnóstico.}}$$

$$VP(-)= \frac{d}{c + d} = \frac{\text{Aves verdaderamente negativas}}{\text{Total de aves negativas a la prueba de diagnóstico.}}$$

La prueba de AFSC se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos marcados por la Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Fulorosis y Tifoidea Aviar en México. (1).

La prueba de MAS y el muestreo por medio de HC se llevó a cabo por medio de las técnicas ya descritas. (9).

La prueba de MAF se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Barbosa y Marcial. (2).

RESULTADOS

Durante el experimento se realizaron periódicamente las pruebas de APSC, MAS y MAF. En el grupo inoculado la prueba de MAF detectó un mayor porcentaje de aves positivas con un 65%, seguida de las pruebas de MAS y APSC con 56% y 45% respectivamente (CUADRO I).

Para el grupo no inoculado los resultados de las pruebas practicadas se muestran en el CUADRO II, donde se observa que la prueba con mayor porcentaje de aves positivas fue la de MAF con 12% seguida de MAS con 7% y APSC con 0%.

En la fase aguda de la enfermedad (DIA 10 PI), las pruebas diagnósticas que manifestaron mayor sensibilidad fueron: ER con 73% y APSC con 55%. Las pruebas de MAS y MAF obtuvieron una sensibilidad del 45%. En lo que respecta a la especificidad, las pruebas de APSC, MAS y ER obtuvieron un valor del 100% (CUADRO III).

El valor predictivo positivo para esta fase fue del 100% para APSC, MAS y ER, siendo del 83% para MAF. Mientras que el valor predictivo negativo fue del 80% en el ER, 71% para APSC y 67% para MAS. La prueba de MAF obtuvo un valor de 65% (CUADRO IV).

En la fase subaguda de la infección (Día 30-35 PI), la prueba de MAS obtuvo una sensibilidad del 100%, seguida por las de MAF, ER y APSC con una sensibilidad del 96%, 76% y 68% respectivamente. Los valores de especificidad para APSC y ER fueron del 100%, del 84% y 64% para MAF y MAS respectivamente (CUADRO V).

En lo que respecta al valor predictivo positivo en esta fase fue del 100% para APSC y ER, mientras que para MAS y MAF fueron del 73% y 66% respectivamente. El valor predictivo negativo para MAS fue del 100%, para MAF del 95% y del 81% y 76% para ER y APSC (CUADRO VI).

En la fase aguda (Día 10 PI), la prueba serológica que obtuvo un mayor porcentaje en reacciones constantes fue MAF con 44%, seguida de APSC con 23% y MAS con 14%. En cuanto a la presentación de reacciones intermitentes, esta fenómeno se observó en un mayor porcentaje en la prueba de MAF con 28%, seguida de MAS y APSC con 7% y 5% respectivamente. La presencia de reacciones tardías fue mayor en la prueba de MAS con 49%, seguida de APSC y MAF con 23% y 7% respectivamente. En las aves donde no hubo reacción, fue mayor APSC con 47%, seguida por MAS y MAF con 30% y 21% respectivamente (CUADRO VII).

En la fase subaguda se encontró que MAS y MAF obtuvieron valores similares en cuanto a reacciones con 60% y 57% respectivamente mientras que APSC obtuvo solamente un 30%. En lo que se refiere a las reacciones intermitentes las diferencias fueron menores con valores de 43%, 37% y 30% en las pruebas de APSC, MAF y MAS respectivamente. En la presentación de reacciones tardías MAF obtuvo un menor porcentaje del 3% y APSC y MAS obtuvieron valores del 10% y 7% respectivamente. En relación a la ausencia de reacción MAS y MAF obtuvieron valores del 0% y 3% respectivamente, mientras que para APSC se obtuvo un valor del 13% (CUADRO VIII).

Los resultados del EB de los órganos colectados se muestran en el CUADRO IX. Como se observa, S.gallinarum se aisló en un mayor porcentaje a partir del hígado y donde se recuperó en menor número de veces fue de la vesícula biliar tanto en la fase aguda como subaguda.

Al realizarse el EB del grupo no inoculado, (Día 10 PI); en 2 aves se aislaron otros microorganismos diferentes a S.gallinarum tales como E.coli de ovario de una de las aves y Protocus mirabilis a partir de hígado, bazo, páncreas y ovario de la otra.

Al día 35 PI del grupo de aves no inoculadas se aisló Citrobacter sp del páncreas de un ave y a partir del hígado y bazo de otra. A su vez fue aislada E.coli del hígado y Pseudomonas aeruginosa del páncreas y ovario de la misma ave.

DISCUSION

En México ,la TA afecta a las aves comerciales productoras de huevo café y a gallinas reproductoras pesadas. En estas últimas, la enfermedad se presenta en forma aguda provocando alta mortalidad en aves adultas, principalmente en aquellas que se encuentran sexualmente maduras produciendo huevo . (13,15,34). Existe la creencia de que algunas parvadas pueden infectarse durante el período de crecimiento y desarrollo y sin embargo, no manifestar la enfermedad ni presentar anticuerpos hasta no haber alcanzado la madurez sexual lo que dificulta su diagnóstico ; sin embargo no existe evidencia científica que respalde lo anterior.*

En este experimento se infectaron aves pesadas de 12 semanas de edad y sexualmente inmaduras .La dosis utilizada como inóculo fue de 50×10^6 UFC /ave de S.gallinarum y fue posible detectar anticuerpos en la sangre mediante la utilización de las pruebas de APSC .MAS y MAF así como el aislamiento de la bacteria a partir de los diferentes órganos utilizando la metodología de examen bacteriológico convencional .No existió mortalidad característica de TA durante el experimento.

El hecho de que la sensibilidad de la prueba bacteriológica para la fase aguda (73%) fuera mayor a la obtenida con las pruebas serológicas ,indican la conveniencia de utilizar el EB en la etapa inicial de la enfermedad. Lo anterior puede deberse a que durante la fase aguda de TA existe un proceso septicémico por lo que la bacteria puede encontrarse en cantidades apreciables en la mayoría de los órganos y a que las aves que se encuentran sufriendo la fase aguda pueden presentar mayor cantidad de anticuerpos del tipo de IgG incompletos , que las pruebas serológicas convencionales no son capaces de detectarlos , por lo que existe un retraso en el tiempo para la aparición de anticuerpos del tipo IgM (35). Estas reacciones tardías pueden ser más evidentes con las pruebas de MAF y MAS en las cuales es necesario diluir el suero y el título de anticuerpos probablemente no sea suficiente para que ocurra la reacción de aglutinación en la dilución de 1/32. (1).

* (Comunicación personal) : M.V.Z. Mario Padrón Navarro.

Además de las limitaciones de las pruebas serológicas para el diagnóstico de TA en aves donde el proceso infeccioso se está incubando, es necesario tomar en cuenta que al realizar la prueba de APSC en estas condiciones en parvadas infectadas pueden precipitar la presentación de un brote agudo de TA, debido principalmente al manejo y estrés a las que son sujetas las aves cuando se realiza la prueba a nivel de campo y con número de aves mayor. (34).

Durante la fase subaguda las pruebas de MAS y MAF fueron más sensibles (100 y 96%) respectivamente que el EB (76%); esto puede ocurrir porque el proceso ha ocasionado un incremento en el título de anticuerpos en la sangre, los cuales pueden persistir por largos periodos de tiempo, sin embargo, la bacteria puede no permanecer en el organismo del ave o puede encontrarse encapsulada en una pequeña lesión en algún órgano y no ser recuperada por medio del examen bacteriológico convencional el cual se realiza por medio de hisopos. (34, 36, 39).

Las pruebas de MAS y MAF también fueron más sensibles (100% y 96%) respectivamente que la prueba de APSC (68%) durante la fase subaguda; esto podría explicarse porque se ha demostrado a nivel experimental y de campo que una vez que una ave infectada con S. gallinarum ha sido positiva a la prueba de MAS, esta continúa reaccionando a muestreo tras muestreo e incluso mostrar incremento en el título de los anticuerpos.

Algunas aves en cambio pueden reaccionar en forma intermitente a la prueba de APSC, esto se demuestra con el tipo de reacción obtenida en la fase subaguda en donde las pruebas de MAS y MAF mostraron valores de 60 y 57% respectivamente en comparación con la prueba de APSC (30%); es decir que las pruebas de MAS y MAF reaccionaron en forma más constante que APSC. (36). Así mismo la prueba de APSC presentó una mayor cantidad de aves con reacción intermitente así como de aves con reacción tardía y más importante todavía aves que no reaccionaron a la prueba de APSC en comparación con las pruebas de MAS y MAF y que puede haber influido para que la prueba de APSC haya obtenido valor más bajo que MAS y MAF.

Estos resultados indican así mismo, que al utilizar una prueba serológica en el diagnóstico de TA se considere además de sus valores de sensibilidad y especificidad, la habilidad de la prueba para que el ave una vez que reacciona con ella, continúe reaccionando y así facilitar la detección de aves portadoras crónicas durante algún periodo de tiempo. (1).

De las 3 pruebas practicadas durante el transcurso del experimento, la MAF fué capaz de detectar el mayor número de aves inoculadas por muestreo con un (65%) seguida de MAS con un 56% y por APSC con un 45%. Estos resultados indican que el sistema de microtitulación ya sea utilizando sangre desecada con papel filtro o suero fresco fue más constante que la prueba tradicional de APSC para la detección de aves infectadas. (13,36).

Al establecer un programa de detección óptima de TA en zonas donde la prevalencia de TA pueda ser alta es muy importante que se piense en utilizar pruebas que sean más sensibles que específicas. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, sería deseable la utilización de las pruebas de MAS y MAF en parvadas en desarrollo en vez de la APSC a pesar de haber obtenido también una mayor cantidad de reacciones que APSC en el grupo control no inoculado durante todo el experimento.

Las pruebas de APSC y EB obtuvieron durante la fase aguda y subaguda del estudio valores predictivos positivos del 100%, seguidas por la prueba de MAS con 100% en la fase aguda y 85% para MAF en la fase subaguda, lo que indica que los resultados positivos a las pruebas serológicas en realidad lo son. (8,32,33).

La prueba de MAS fue la más sensible pero por el momento no es práctico utilizarla como prueba primaria de campo debido al costo y al equipo necesario para su desarrollo. Por otro lado la prueba de APSC fue menos sensible; y es importante reconocer que para programas de control tiene limitaciones por su baja sensibilidad; pero tiene un 100% de valor predictivo positivo lo que da una mayor confiabilidad en su resultado positivo. (7,8,21,24,27,32).

CONCLUSIONES

1.- Mediante la utilización de pruebas serológicas y del examen bacteriológico fue posible la identificación de aves de 12 semanas de edad y sexualmente inmaduras infectadas con S.gallinarum en ausencia de mortalidad característica de TA.

2.- El EB fue más eficaz que las pruebas serológicas para la detección de aves infectadas con S.gallinarum durante la fase aguda, debido principalmente a la naturaleza septicémica característica de esta enfermedad durante esta fase.

3.- La prueba de MAS fue más sensible que las otras pruebas serológicas y que el EB en la detección de las aves infectadas con S.gallinarum durante la fase subaguda.

4.- Las pruebas de MAS y MAF fueron las que detectaron un mayor porcentaje de reacciones en comparación con la prueba de APSC durante el transcurso del experimento; una vez que la infección se establece en el ave, el sistema de microtitulación es capaz de detectarles en forma más constante.

5.- Las pruebas de MAS y MAF fueron las que obtuvieron la mayor cantidad de reacciones en el grupo control no inoculado durante el transcurso del experimento.

LITERATURA CITADA

1. Allan, D.; Duffus, W.P.H.: The immunopathology in Fowls (*Gallus domesticus*) of Acute and Subacute Salmonella gallinarum Infection. Res.Vet.Sci. 140-151 (1971).
2. Barbosa, E.J y Marcial, A.M.: Evaluación del método de recolección, procesamiento y costo de muestras de sangre en papel filtro para la inhibición de la hemaglutinación en microplaca contra la Enfermedad de Newcastle. Memorias de la IX Convención Nacional de la A.N.E.C.A. , 27-37 Mexico (1984).
3. Beard, C.W. and Brugh, Max. :Use of the nobuto blood-sampling paper strip for Newcastle disease serology Avian. Dis. 21 : 630-636 (1977).
4. Bergqvist, E.A., Rosende, S. and Bauer, R. : Factores que pueden alterar una prueba de hemaglutinación en el diagnóstico de pullorosis : Aislamiento e identificación de microorganismos que reaccionan inespecíficamente con el antígeno pullorum. Agric. Tec. 33.: 204-208. (1973).
5. Botts , C.W., Ferguson, L.C., Birkeland, J.M. and Winter, A.R.: The influence of litter on the control of Salmonella infections in chicks. Am. J. Vet. Res. 562-565 (1952).
6. Ruxton, and Davies, J.M. :Studies on immunity and pathogenesis of Salmonellosis. II: Antibody production and accumulation of bacterial polysaccharide in the tissues of chickens infected with S.gallinarum. Immunology. 6: 530-538. (1963).
7. Colusi, D.A. : Tifosis aviaria en la Republica Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias :1-15 Argentina (1978).
8. Galen, S.R.: New Math in the Lab. Predictive Value Theory. Diagnostic Medicine. 31-39 (1979).

9. Garrard E.H; Burton,W.H; Carpenter,J,A and McDermott L.A:Non-specific Pullorum agglutination reactions. Can. J. Comp. Med. 11 :102-106. (1947).
10. Garren,H.W . and Hill,C.H. : Agglutinating antibody titers of young white leghorns and rhode islands redds following inoculation with live and inactivated Salmonella gallinarum . Poult. Sci. 38 :918-922 . (1959).
11. Gonzalez,A.y Rejo,M.: Importancia de las reacciones falso positivas en las pruebas de aglutinación rápida con Salmonella pullorum en aves reproductoras. Rev. Cubana Ciencia Avicola. 10-23 (1983).
12. Grimes,T.M . and Simmons,G.C .: Non-specific reactions to rapid whole blood Salmonella pullorum antigens. Aust.Vet.J. 48 . :609-610. (1972).
13. Gupta,S.C. and Arora,A.K. : Serological monitoring of a flock of chickens infected with Salmonella pullorum Veterinarski.Archiv. 55 : 31-36. (1995).
14. Hall,W.J., Mac Donald ,A.D y Legehausen , D .H.: Studies of Fowl typhoid I. Nature and dissemination .Poult.Sci. 28 : 344-362 (1949).
15. Hall,W.J.;Mac Donald,A.D. and Legehausen,D.H.: Studies on fowl typhoid. II.Control of the disease. Poult. Sci. 28:799-801.(1949).
16. Hernandez, Y. H.: Antecedentes, situación actual y proyección de la Pullorosis y Tifoidea aviar en México. Campaña Nacional contra la Pullorosis y Tifoidea aviar. D.G.S.A - S.A.R.H 7-13 Mexico (1981).
17. Hofstad,M.S.; Calnek,R.W. and Helmbolt,C.F.; Diseases of Poultry. 8th Edition. Iowa State University Press.:70-116.
18. Hurt,H.R. and Mac Cullach,E.C. : The occurrence of a Gram-positive coccus in birds positive to the serum plate test for Pullorum disease. J.A.V.M.A. .:503-506.(1940).

19. Iañ.Tizard.: Serological assay. J. Am. Vet. Med. Assoc., 181,10: 3 315-320 (1982).
20. Jordan,F.T.W.: The Occurrence of Salmonella gallinarum in faeces in Fowl Typhoid. Poult.Sci. 35 :1076-1029. (1956).
21. Menchaca, S.; Fauquet , A.; Rossi , c.: Falsos reaccionantes a la pullorosis . Agente causal : Serratia marcescens. Rev.Med.Vet. (B.Aires). 55:315-318 (1975).
22. Mendez ,R. I. ,Guerrero ,N .D .,Moreno ,L .y Sosa,C.: El Protocolo de la investigación: Lineamientos para su elaboración y analisis, Trillas, México,D.F.171-178 (1986).
23. Mohammadi,H.; Hill,R.; Smith,I.M.: Observations on some changes during acute S.gallinarum infection in chicks. Avian. Pathol. 5 : 71-80 (1976).
24. Moore,E.N.: The Agglutination Test as a means of detecting Fowl Typhoid Infection. Cornell Vet. 37: 21-28 (1947).
25. Mosqueda,T.A.: Control de la Tifoidea aviar en reproductores de huevo café. XI Convención anual de la A.N.E.C.A. y 35th Western Poultry Disease Conference.:124-126. México (1986).
26. Padrón , N .M .: Control de Tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. Avicultura profesional 5 (1): (1987).
27. Padrón,N.M.: Experiencias practicas en la prevención de Tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. VIII Ciclo de Conferencias Internacionales sobre avicultura de A.M.E.N.A. 47-55 México (1987).
28. Padrón,N.M.: Infección por Escherichia gallinarum en aves semipesadas : Detección de anticuerpos en sangre y yema por medio de las pruebas de aglutinación en placa y microaglutinación. Memorias del IX Congreso Nacional de Avicultura y X Convención Nacional de A.N.E.C.A. 829-840. México (1985).

29. Padron, N.M.: Infeccion por Salmonella gallinarum en aves semipesadas: Excrecion de la bacteria por heces y su control por medio de la desinfeccion de cama. IX Congreso Latinoamericano de Avicultura y X Convencion Nacional de la A.N.E.C.A. 826-830 Mexico (1985).
30. Fenner, I.Y.; Stone, H.A. and Nordskog, A.W.: Immune response and disease resistance in chickens. Foult. Sci. 60 :920-926. (1981).
31. Prince, W.F. and Garren, H.W.: An investigation of the resistance of white leghorn chicks to Salmonella gallinarum. Foult. Sci. 45. :1149-1153. (1966).
32. Quintana, J. A.: Aglutinacion de campo para detectar gallinas portadoras de Salmonella gallinarum o Salmonella pullorum. VII Curso sobre Control y erradicacion de la Tifoidea aviar. 59-65 Mexico.
33. Seiler, R.J.: The non-diseased reactor: Considerations on the interpretation of screening test results. Vet. Rec. 9 : 226-228. (1979).
34. Silva, E.N.: The Salmonella gallinarum problem in Central and South America. Fac. Med. Vet. Zoot. (Sao Paulo). :150-156. (1984).
35. Sumrov I., Ivanov P., Vitkov M, Lozeva T.: Differentiation of Salmonella-specific positive reactions during pullorum disease - fowl typhoid testing. Veterinarnomeditsinski Nauki. 12 : 11-18 (1975).
36. Train, J.A. and Blandford, T.E.: A long term serological study of a flock of chickens naturally infected with Salmonella pullorum. Vet. Rec. 109. :136-138 (1981).
37. U.S.D.A.: National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. United States Department of Agriculture. Beltsville, MD (1984).
38. Williams, J.E.: Avian Salmonellosis: Detection and characterization of serological response to major serogroup infections. Am. J. Vet. Res. 36 :591-592. (1975).

39. Williams, J.E. and Whittemore, A.D.: Microtesting for Avian Salmonellosis. Proc. Ann. Meet. U.S. Anim. Health. :607-609. (1973).

CUADRO I

AVES POSITIVAS A LAS PRUEBAS DE APSC, MAS Y MAF EN EL GRUPO INOCULADO DURANTE EL DESARROLLO DEL EXPERIMENTO. (DIA 3 A 35 PI).

Pruebas Serológicas.	Aves positivas/ Aves muestreadas.	Porcentaje (%)
APSC (1)	103/230	45
MAS (2)	129/230	56
MAF (3)	150/230	65

- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
 (2) : Microaglutinación con suero .
 (3) : Microaglutinación con papel filtro .

CUADRO II

AVES POSITIVAS A LAS PRUEBAS DE APSC, MAS Y MAF EN EL GRUPO NO INOCULADO DURANTE EL DESARROLLO DEL EXPERIMENTO. (DIA 3 A 35 PI).

Pruebas Serológicas.	Aves positivas/ Aves muestreadas..	Porcentaje (%)
APSC (1)	0/228	0
MAS (2)	17/228	7
MAF (3)	28/228	12

- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
 (2) : Microaglutinación con suero .
 (3) : Microaglutinación con papel filtro .

CUADRO III

VALORES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS DE APSC, MAS, MAF Y EB A LOS 10 DIAS PI. (FASE AGUDA.).

Pruebas Diagnosticas.	SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD	
	Aves positivas/ Aves inoculadas: (%)		Aves negativas/ Aves no inoculadas (%)	
APSC (1)	6/11	55	12/12	100
MAS (2)	5/11	45	12/12	100
MAF (3)	5/11	45	11/12	92
EB. (4)	8/11	73	12/12	100

- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
 (2) : Microaglutinación con suero .
 (3) : Microaglutinación con papel filtro .
 (4) : Examen bacteriológico .

CUADRO IV

VALORES PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO DE LAS PRUEBAS DE APSC, MAS, MAF Y EB A LOS 10 DIAS PI. (FASE AGUDA.).

	VALOR PREDICTIVO (+)	VALOR PREDICTIVO (-)
Pruebas	Aves positivas/ Aves probadas (%)	Aves negativas/ Aves probadas (%)
Diagnosticas.		
APSC (1)	6/6 100	12/17 71
MAS (2)	5/5 100	12/18 67
MAF (3)	5/6 83	11/17 65
EB. (4)	8/8 100	12/15 80

- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
 (2) : Microaglutinación con suero .
 (3) : Microaglutinación con papel filtro .
 (4) : Examen bacteriológico .

CUADRO V

VALORES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS DE APSC, MAS, MAF Y EB A LOS 30-35 DIAS PI. (FASE SUBAGUDA.).

Pruebas Diagnosticas.	SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD	
	Aves positivas/ Aves inoculadas	(%)	Aves negativas/ Aves no inoculadas	(%)
APSC (1)	17/25	68	25/25	100
MAS (2)	25/25	100	16/25	64
MAF (3)	24/25	96	21/25	84
EB. (4)	19/25	76	25/25	100

- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
 (2) : Microaglutinación con suero .
 (3) : Microaglutinación con papel filtro .
 (4) : Examen bacteriológico .

CUADRO VI

VALORES PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO DE LAS PRUEBAS DE APSC, MAS, MAF Y EB A LOS 30-35 DIAS PI. (FASE SUBAGUDA.).

Pruebas	VALOR PREDICTIVO (+)		VALOR PREDICTIVO (-)	
	Aves positivas/ Aves probadas	(%)	Aves negativas/ Aves probadas	(%)
APSC (1)	25/25	100	25/33	76
MAS (2)	16/25	73	16/16	100
MAF (3)	21/25	86	21/22	95
EB. (4)	25/25	100	25/31	81

- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
 (2) : Microaglutinación con suero .
 (3) : Microaglutinación con papel filtro .
 (4) : Examen bacteriológico .

CUADRO VII

TIPO DE REACCION OBTENIDA MEDIANTE EL USO DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE APSC ,MAS Y MAF EN LA FASE AGUDA DE LA INFECCION (DIA 10 PI).

	APSC (1) (%)	MAS (2) (%)	MAF (3) (%)
a) Reacción Constante :	23	14	44
b) Reacción Intermitente :	5	7	28
c) Reacción Tardía :	23	49	7
d) No reacción :	47	30	21

- a) Porcentaje de aves que una vez siendo positivas, continuaron reaccionando hasta su sacrificio .
- b) Porcentaje de aves que una vez siendo positivas, fallaron a reaccionar una o más veces .
- c) Porcentaje de aves que reaccionaron unicamente al día 10 PI.
- d) Porcentaje de aves que no reaccionaron en ninguno de los muestreos.
- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
- (2) : Microaglutinación con suero .
- (3) : Microaglutinación con papel filtro .

CUADRO VIII

TIPO DE REACCION OBTENIDA MEDIANTE EL USO DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE APSC, MAS Y MAF EN LA FASE SUBAGUDA DE LA INFECCION (DIA 30-35 PI).

	APSC (1) (%)	MAS (2) (%)	MAF (3) (%)
a) Reacción Constante :	30	60	57
b) Reacción Intermitente :	43	30	37
c) Reacción Tardía :	10	7	3
d) No reacción :	13	0	3

- a) Porcentaje de aves que una vez siendo positivas, continuaron reaccionando hasta su sacrificio .
- b) Porcentaje de aves que una vez siendo positivas, fallaron a reaccionar una o más veces .
- c) Porcentaje de aves que reaccionaron unicamente al día 10 PI.
- d) Porcentaje de aves que no reaccionaron en ninguno de los muestreos.
- (1) : Aglutinación en placa con sangre completa .
- (2) : Microaglutinación con suero .
- (3) : Microaglutinación con papel filtro .

CUADRO IX

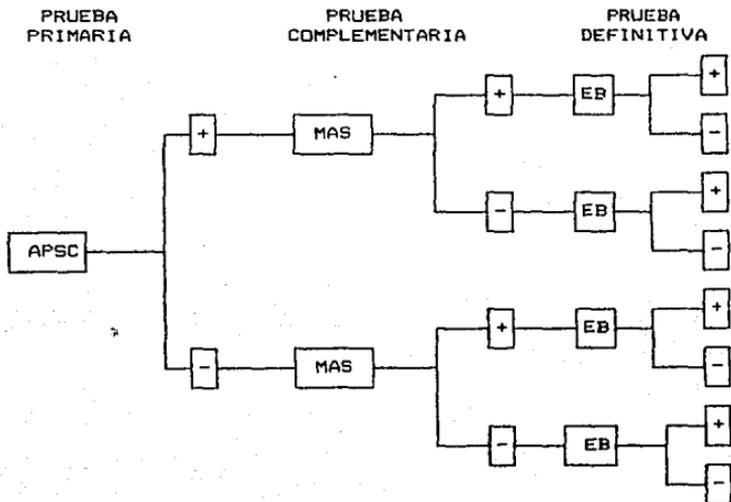
AISLAMIENTO DE S. GALLINARUM EN EL EB DE ORGANOS EN LA FASE AGUDA Y SUBAGUDA DE TA CAUSADA EXPERIMENTALMENTE.

ORGANOS MUESTREADOS	FASE AGUDA	(%)	FASE SUBAGUDA -	(%)
HIGADO	8/23	35	19/50	38
BAZO	6/23	26	14/50	28
VESICULA BILIAR	3/23	13	7/50	14
PANCREAS	5/23	22	10/50	20
OVARIO	4/23	17	12/50	24

AFENDICE

Con el objeto de ensayar las posibilidades diagnósticas utilizando la combinación de las pruebas de APSC, MAS y EB con los datos obtenidos en este estudio, se procedió a realizar un ejercicio como modelo de lo que ocurriría aplicando como prueba primaria la de APSC por ser una prueba fácil de realizar en la granja, para posteriormente complementarse con la prueba de MAS, por ser una prueba supuestamente más específica y finalmente la corroboración del diagnóstico definitivo mediante el aislamiento bacteriológico (EB). El ejercicio se desarrolló siguiendo la secuencia que se muestra en el diagrama:

DIAGRAMA



ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

29

APSC : Aglutinación en placa con sangre completa .
 MAS : Microaglutinación con suero .
 EB : Examen bacteriológico .
 + : Resultado positivo .
 - : Resultado negativo .
 _____ : Procedimiento lógico rutinario .
 _ _ _ _ : Procedimiento hipotético, que normalmente no se utiliza en forma rutinaria .

El ejercicio se desarrolló siguiendo la secuencia que se muestra en el diagrama, utilizándose por separado los datos obtenidos durante la fase aguda del experimento (DIA 10 PI) y de la fase subaguda (DIA 30-35 PI) obteniéndose así 2 modelos .

FASE AGUDA:

Durante esta fase se contaron con 23 aves de las cuales 11 pertenecían al grupo inoculado con S.gallinarum y 12 al grupo control no inoculado .Al aplicar la prueba primaria de APSC se obtuvieron los siguientes resultados :

	INOC	ND INOC	TOTAL
APSC +	6	0	6
APSC -	5	12	17
TOTAL	11	12	23

S = 55 %

E = 100 %

VP(+) = 100 %

VP(-) = 71 %

Como se observa la prueba de APSC, fué capaz de detectar 6/11 aves inoculadas (55%) y no dió resultados falsos positivos dentro del grupo no inoculado, por lo que el valor predictivo positivo de la prueba es del 100 %. Sin embargo, esta prueba no detectó 5 aves inoculadas, razón por la cual su valor predictivo negativo fué del 71%.

El hecho de que hayan existido 5 aves falsas negativas indica las limitaciones de una prueba con estas características en un programa de diagnóstico durante el inicio de la infección por S.gallinarum.

Las 6 aves positivas a esta prueba fueron más tarde sometidas a la prueba de MAS, teniendo los siguientes resultados :

		INOC
MAS	+	4
	-	2
TOTAL		6

S = 67%

Con esta segunda prueba fueron detectadas 4 de las 6 aves que habían sido positivas a APSC, por lo que se estima una sensibilidad del 67%.

Estas 4 aves positivas a MAS fueron finalmente sacrificadas y examinadas bacteriológicamente, lográndose aislar S.gallinarum de 4/4 aves por lo que el EB tuvo una sensibilidad del 100%, tratándose de aves que antes habían sido positivas a APSC.

Siguiendo el procedimiento señalado en el diagrama, las 2 aves que resultaron positivas a APSC pero que en la prueba complementaria de MAS fueron negativas, también fueron sacrificadas y analizadas bacteriológicamente. Se logró el aislamiento de S.gallinarum a partir de las 2 aves por lo que se trata de 2 casos falsos negativos a la prueba de MAS, lo que indica que durante la fase aguda de IA aún empleando la prueba complementaria, existe la posibilidad de que no sean detectadas aves infectadas, lo cual es importante de considerar en el control de la enfermedad.

Con el objeto de demostrar lo que ocurriría con las 17 aves que habían resultado negativas a la prueba de APSC, se procedió a practicarles la prueba de MAS y se observó lo siguiente :

	INOC	NO INOC	TOTAL
MAS +	2	0	2
MAS -	3	12	15
TOTAL	5	12	17

S = 40 %

E = 100 %

VP(+) = 100 %

VP(-) = 80 %

La prueba de MAS, detectó 2/5 aves que habían resultado negativas por la prueba de APSC, debido a que estas aves pertenecían al grupo de las aves inoculadas, la sensibilidad de la prueba es 40%. A este respecto es importante hacer notar que existieron 3 aves que estando inoculadas, resultaron negativas a la prueba de MAS, y que ya antes habían sido negativas a APSC. De estas 3 aves negativas a ambas pruebas serológicas 2 aves no excretaron S.gallinarum en heces en ninguna ocasión, por lo que se puede tratar de una falla en el procedimiento de inoculación o bien que la bacteria no se haya establecido en el organismo. En lo que se refiere a la especificidad, esta fué del 100% al dar como negativas 12 de las 12 aves no inoculadas.

Continuando con el procedimiento, las 2 aves positivas a MAS fueron finalmente sometidas al EB, teniendo este una sensibilidad del 50%, ya que se logró el aislamiento de S.gallinarum en 1 de 2 aves positivas a MAS. El ave de la cual se logró aislar la bacteria es un caso falso negativo para la prueba de APSC; el ave negativa al EB podría tratarse de un falso positivo a MAS, sin embargo, esta excretó la bacteria a través de heces los días 3 y 6 PI y presentó títulos de 1/128 a la prueba de MAS por lo que existe la posibilidad de que la bacteria estimuló la producción de anticuerpos y sin embargo, no logró persistir en el organismo del ave.

Las 3 aves negativas a la prueba de MAS y APSC también fueron sometidas al EB, donde se logró el aislamiento de S.gallinarum en 1/3 aves, siendo esta un caso falso negativo para las pruebas de APSC y MAS. Debido a que las 2 aves que resultaron negativas al EB eran inoculadas, estas deben considerarse también como falsas negativas al EB.

De la realización de este ejercicio se obtuvieron las siguientes conclusiones :

1.- La prueba de APSC presenta limitaciones para ser utilizada como prueba diagnóstica primaria aplicada en aves sufriendo la fase aguda de TA (DIA 10 PI) pues solamente detectó al 55% de las aves positivas al aislamiento de S.gallinarum .

2.- La prueba de MAS utilizada como prueba confirmativa de APSC también presentó limitaciones pues solamente detectó un 67% de las aves positivas a APSC y positivas al aislamiento de S.gallinarum .

3.- Durante la fase aguda de la enfermedad, las pruebas serológicas presentaron más casos de aves falsas negativas que falsas positivas .

4.- El EB presentó casos falsos negativos, aunque en menor proporción debido a que esas aves también fueron negativas a las pruebas serológicas, existió la posibilidad de que las aves a pesar de haber sido inoculadas no sufrieran la infección .

FASE SUBAGUDA :

En esta fase se contó con 50 aves, de las cuales la mitad pertenecían al grupo inoculado y las otras al grupo control no inoculado. Al aplicar la prueba primaria de APSC se obtuvieron los siguientes resultados :

	INOC	NO INOC	TOTAL
APSC +	17	0	17
APSC -	8	25	33
TOTAL	25	25	50

S = 68 %

E = 100 %

VP(+) = 100 %

VP(-) = 76 %

La prueba de APSC fué capaz de detectar 17/25 aves inoculadas teniendo una sensibilidad del 68% y debido a que no existieron reacciones positivas en las aves no inoculadas, el valor predictivo positivo de la prueba es del 100%. Sin embargo, la prueba de APSC no fué capaz de detectar 8/25 aves inoculadas (32%), por lo que el valor predictivo negativo se reduce a un 76%.

Siguiendo el procedimiento indicado anteriormente, las 17 aves positivas a la prueba de APSC pertenecientes al grupo inoculado fueron examinadas con la prueba complementaria de MAS, en la cual, las 17 aves resultan nuevamente positivas, obteniendo una sensibilidad del 100%.

Las 17 aves positivas a APSC y MAS fueron entonces examinadas bacteriológicamente, encontrando que :

		INOC
EB	+	13
	-	4
	TOTAL	17

S = 76 %

Solamente 13/17 aves, (76%) aves positivas a las pruebas de APSC y MAS resultaron positivas también al examen bacteriológico convencional.

En relación a las 4 aves pertenecientes al grupo inoculado en donde no fué posible aislar S.gallinarum, pudo haberse debido a que las aves se infectan, produzcan anticuerpos detectables por las pruebas de APSC y MAS y sin embargo, la bacteria no persistió en el organismo del ave o simplemente debido a una falla en la realización de la técnica del EB, porque esas aves excretan S.gallinarum a través de heces por lo menos en tres ocasiones, siendo positivas por última vez los días 10 y 14 PI.

Las 33 aves que resultaron negativas a la prueba de APSC también fueron llevadas a la prueba de MAS, en donde se encontró que :

	INOC	NO INOC	TOTAL
MAS			
+	8	9	17
-	0	16	16
TOTAL	8	25	33

S = 100 %

E = 64 %

VP(+) = 47 %

VP(-) = 100 %

La prueba de MAS detectó 8/8 aves positivas que anteriormente habían sido negativas a la prueba de APSC. Sin embargo, se obtienen 9 aves positivas en el grupo no inoculado, razón por la cual la prueba tiene baja especificidad. (64%).

Las 17 aves positivas detectadas por la prueba de MAS, fueron sometidas al EB teniendo que :

	INOC	NO INOC	TOTAL
EB			
+	6	0	6
-	2	9	11
TOTAL	8	9	17

S = 75 %

Se logró el aislamiento de 6/17 aves positivas a MAS , confirmando que en realidad se trataba de aves infectadas que no fueron detectadas desde un principio por la prueba de APSC. También se puede observar que de las 9 aves que fueron positivas a la prueba de MAS y pertenecientes al grupo no inoculado ,no fué posible el aislamiento de S.gallinarum, tratándose entonces de casos falsos positivos para la prueba de MAS .

De las 16 aves con resultados negativos a las pruebas de APSC y MAS pertenecientes al grupo no inoculado no fué posible aislar S.gallinarum .

Conclusiones :

- 1.- A pesar de que el valor de sensibilidad de la prueba de APSC (68%) mejoró un 13% con respecto al valor obtenido en la fase aguda (55%) sigue presentando limitaciones para ser utilizada como una prueba primaria diagnóstica para la detección de TA durante la fase subaguda .
- 2.- La prueba de MAS mejoró notablemente al ser utilizada como una prueba complementaria a la de APSC pues logró detectar el 100% de las aves positivas a APSC .
- 3.- La prueba de APSC nuevamente presentó casos falsos negativos y no falsos positivos , en cambio, la prueba de MAS presentó una mayor cantidad de aves falsas positivas que falsas negativas
- 4.- El EB nuevamente presentó casos falsos negativos en aves inoculadas negativas a las pruebas de APSC y MAS. Nuevamente, existe la posibilidad de que esas aves no se hayan infectado a pesar de haberse inoculado.