



64
2es.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**Recuperación de *Salmonella enteritidis* y
Salmonella gallinarum en pollos de engorda previamente
vacunados con R - 9 al día de edad.**

**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 Zootecnista
por:**

Martha Dávila de Icaza

ASESORES

**MVZ MC PhD Guillermo Téllez Isaías
MVZ EPA José A. Quintana López
DVM PhD Billy M. Hargis**

México, D.F.

1995.

FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIA

**.... A DIOS,
POR SER TAN GRANDE Y PERMITIRME LLEGAR HASTA AQUI.**

**.... A MIS PADRES,
RAFAEL A. DAVILA MENDOZA Y LUE No. DE ICASA DE DAVILA, POR
BRINDARME TODO SU APOYO, SU PACIENCIA Y UN GRAN ESFUERZO PARA
DARME UNA EDUCACION Y LOGRAR LO QUE HASTA AHORA SOY.**

**.... A MIS HERMANOS,
ALPONSO, RAMON Y PILAR, POR ESTAR CUANDO LOS NECESITO Y FORMAR
PARTE DE UNA GRAN FAMILIA.**

**.... A MIS AMIGAS,
KARLA Y XIKENA, POR SU GRAN AMISTAD Y APOYO CUANDO LO NECESITE.**

**.... A MIS AMIGOS,
CARLOS, POR SU APOYO EN TODO MOMENTO,
JUAN LUIS Y RAFAEL, POR ESTAR SIEMPRE CON MIGO.**

**.... A ALVARO,
POR ESTAR CON MIGO SIEMPRE, GRACIAS POR TU GRAN APOYO.**

AGRADECIMIENTOS

.... A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,
POR SER LA MAYOR INSTITUCION DE ENSEÑANZA.

.... AL DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL: AVES POR
DARME TODO LO QUE NECESITE PARA ESTE TRABAJO.

.... A LA SECCION DE BACTERIOLOGIA DEL DPA: AVES A
ODETTE Y CECILIA POR SER COMO SON.

.... AL DR. MEMO TELLEZ POR SU GRAN APOYO Y PACIENCIA
PARA REALIZAR ESTE TRABAJO.

.... A TODAS LAS ESPECIES ANIMALES QUE DAN SU VIDA
PARA EL AVANCE DE LA CIENCIA, EN ESPEICAL A LAS AVES DE ESTE
TRABAJO

.... AL GRUPO AGROPECUARIO TEPEXPAN S.A. DE C.V POR
SU COLABORACION PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

.... ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO PARCIALMENTE POR LA
UNIVERSIDAD DE TEXAS A & M Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUNTONOMA
DE MEXICO, MEDIANTE EL CONVENIO DE COLABORACION DENOMINADO:

USAID- UNIVERSITY DEVELOPMENT LINKAJE PROJECT

No. PCE - 5063 - A - 00 - 2045 - 00 .

.... ASESORES Y JURADO, GRACIAS POR BRINDARME SU
TIEMPO.

.... ASESORES

N.V.S. GUILLERMO TELLES ISAIAS
N.V.S. JOSE A. QUINTANA LOPEZ
D.V.M. BILLY MARSHALL MARGIS

.... JURADO

N.V.S CARLOS LOPEZ COELLO
N.V.S. FRANCISCO BASUNTO A.
N.V.S CRISTINA ESCALANTE O.
N.V.S. COSTTE URQUIEA BRAVO.
N.V.S. GUILLERMO TELLES ISAIAS.

MUCHAS GRACIAS.

CONTENIDO

PAGINAS

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
JUSTIFICACION.....	11
HIPOTESIS.....	12
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
MATERIAL Y METODO.....	14
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSION Y CONCLUSION.....	23
FIGURAS.....	28
LITERATURA CITADA.....	32

RESUMEN

Dávila de Icaza Martha. RECUPERACION DE *Salmonella enteritidis* Y *Salmonella gallinarum* EN POLLOS DE ENGORDA PREVIAMENTE VACUNADOS CON R-9 AL DIA DE EDAD. (bajo la asesoría de: NVE MC PhD Guillermo Tellés Isaías, NVE EPA José A. Quintana López, DVM PhD Billy N. Hargis)

Se desarrollaron 2 experimentos; el primero fue para determinar la protección de la vacuna R-9 de SG mediante exclusión competitiva y el segundo fue para evaluar la extensión de la colonización en hígado (H), bazo (B) y tonsilas cecales (TC) en los desafíos simultáneos y consecutivos con *Salmonella enteritidis* (SE) y *Salmonella gallinarum* (SG). Se utilizaron 6 lotes de 20 pollos para el primer experimento y 7 grupos de 20 pollos para el segundo, se les administró agua y alimento comercial *ad libitum*. Las aves fueron aisladas en una unidad del Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ, UNAM. Las aves del experimento 1 se vacunaron al día de edad y se desafiaron con (SE) y (SG) al cuarto día de edad. Al intentar el aislamiento no se recuperó ni la bacteria vacunal, ni la especie de *Salmonella* sp de los grupos de desafío. Las aves del experimento 2, en los desafíos consecutivos donde se administró la primera variedad de *Salmonella*, predominó casi en su totalidad excluyendo a la segunda variedad aplicada. Cuando se administró SE y se desafió a las 24 hrs con SG se recuperó SE de H y B en un 95% y en el 100% de TC; en contraste con SG donde se recuperó el 25% de H y B y el 20% de TC. Al grupo que se administró SG y se desafió a las 24 hrs después con SE, se recuperó un 90% de H y B y el 95% de TC de SG; en este mismo grupo se aisló SE de H y B en un 20% y en 15% de TC. En ambos grupos se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.001$). Cuando se administró simultáneamente al día de edad ambas *Salmonella* el contenido de las TC fue similar al aislamiento de H y B, sin encontrarse diferencias estadísticas

significativas ($P > 0.05$). Estos resultados coinciden con estudios previos que indican que existe una rápida inducción a la resistencia con desafíos simultáneos y consecutivos. Como conclusión en el experimento 1 no se puede aislar la vacuna R-9 de SG y no se recomienda la vacunación contra *Salmonella* en la primera semana de vida. En el experimento 2 se demostró que existe una exclusión competitiva en los desafíos consecutivos, cuando se administró simultáneamente no se observó este fenómeno.

INTRODUCCION

El genero *Salmonella* son bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, emparentadas con *E. coli*, *Proteus* y *Klebsiella*. Son ubicadas en el ambiente aeróbico. Es una bacteria cocobacilar, Gram negativa, no esporulada, no forma indol, siendo un parásito intracelular facultativo. Se han identificado más de 2,200 *Salmonella* pero sólo 50 se encuentran de manera significativa en animales infectados, la mayoría son móviles a excepción de *Salmonella gallinarum* (SG) y *Salmonella pullorum* (SP) (12, 13, 14).

Con base en las diversas variedades serológicas, los serotipos se han clasificado en 2 categorías:

En el primer grupo están las que producen enfermedades exclusivamente en las aves y las principales son SP y SG.

Al segundo grupo pertenecen aquellas que producen enfermedades en aves y que tienen una gran capacidad de causar problemas de origen alimenticio en humanos, como *S. typhimurium* (ST) y SE (14).

Los últimos dos serotipos mencionados tienen la capacidad de traspasar el aparato digestivo de las aves y a través del torrente sanguíneo, invaden los órganos internos. La mayoría de los serotipos no son invasivos y permanecen en el tubo digestivo de las aves, sin producir alteraciones patológicas, su período de incubación es de 4-5 días (14).

En aves jóvenes se presentan signos como deshidratación, diarrea, taponamiento cloacal, depresión, anorexia. En aves adultas la cresta se encuentra pálida, seca. Las lesiones que se observan en pollitos son saco vitelino de consistencia acuosa o caseosa, de color rojizo, verde amarillento y el

hígado se observa de color bronceado (18, 26, 30, 31). Además la salmonelosis aviar causa problemas en la producción, ya que disminuye la fertilidad y la incubabilidad provocando pérdidas económicas (24).

Dentro de los mecanismos de defensa del hospedador ante una infección bacteriana se encuentran la inmunidad celular, la inmunidad humoral, la respuesta inflamatoria y el balance de la flora bacteriana (1).

La flora normal es un mecanismo completo y dinámico, que requiere de un equilibrio entre microorganismos, y de no ser el adecuado se presentan trastornos dentro del organismo (1). Este equilibrio puede ser alterado con la administración de antibióticos como la nitrofurazona y la novobiocina provocando que los microorganismos desarrollen una resistencia o incrementen la susceptibilidad del hospedador hacia una enfermedad (25).

La microflora cecal de aves adultas está compuesta de un conjunto de bacterias donde se incluyen a las coliformes, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus* y anaeróbios no esporulados. En el ciego del pollito recién nacido rara vez se encuentran *Lactobacillus* y anaeróbios no esporulados (1).

Diversos trabajos han demostrado que el pollito recién nacido carece de un mecanismo de protección de microflora normal, el cual se adquiere de microorganismos del ambiente que colonizan el aparato digestivo, especialmente el ciego lo cual impiden que puedan multiplicarse microorganismos patógenos a este nivel. Las prácticas de crianza separada por edad y las óptimas condiciones de higiene, privan a las aves de adquirir esta microflora y su posterior colonización en intestino. Esta carencia, parcial o total, se traduce en una menor resistencia de las aves a infecciones por bacterias enteropatógenas

especialmente hacia *Salmonella* móviles (28, 34, 36).

El pollito al nacer tiene un aparato digestivo casi estéril con un pH entre 5.5 y 6. Estas condiciones son óptimas para la proliferación de muchas especies de patógenos. En estos momentos, el establecimiento de una flora intestinal es inevitable, y dependiendo del ambiente que rodea al ave será el tipo de microorganismo que colonice inicialmente el aparato gastrointestinal (16).

Sin esta protección los pollitos son más susceptibles a las infecciones con *Salmonella* sp especialmente en la primera semana de vida (35, 43).

Una forma del mecanismo de defensa del ave adquirida es conocida como "Exclusión Competitiva" o también llamado "Concepto Nurmi", que consiste en inocular flora bacteriana de pollos adultos sanos a pollitos recién nacidos para proporcionar protección a la infección por *Salmonella* sp (1, 21, 23, 28, 29, 33, 39, 40).

Las características para que este principio se cumplan son las siguientes:

A. Que ocupen el mismo territorio.

B. Si una población A se multiplica un poco más rápidamente que una población B, la población A terminará por desplazar a la población B (15).

La Exclusión Competitiva puede observarse con la administración secuencial de algunas serovariedades de *Salmonella* sp. Algunos estudios han demostrado que al administrar un desafío subsecuente de *Salmonella* sp en ratones (9, 20) o en pollitos, estos quedan protegidos de una segunda administración de *Salmonella* sp (3, 5, 7).

Barrow en 1990 (5) demostró que la colonización del aparato gastrointestinal del pollo con un tipo de *Salmonella* inhibe casi completamente la subsecuente colonización con otro tipo de *Salmonella* (5).

Barrow y Tuckey en 1986 (2), evaluaron 3 cepas de *E. coli* que inhibían la subsecuente colonización por *S. typhisurium* (ST). Soerjadi et al. en 1978 (40) aislaron *Streptococcus faecalis* que protegía contra una invasión por *Salmonella* sp, cuando dosificaba a pollitos recién nacidos con un contenido cecal diluido de aves adultas sanas, que aparentemente protegen al pollito de una invasión subsecuente de alguna *Salmonella* entérica. Kaeffer en 1993 (22), al desafiar por vía intravenosa a ratones inoculándoles *Listeria*, observó un aumento en la resistencia a la infección por ST (22). En las investigaciones realizadas por Nisbet en 1993 (27) han utilizado métodos para el control de la colonización del ciego en pollitos, estos métodos incluyen el uso de microflora de aves de postura que es antagonista de ST (27).

Collins en 1966, realizó investigaciones similares donde demostró que desafíos intravenosos de *S. gallinarum* (SG) causan protección subsecuente al desafío secuencial intravenoso con *Salmonella enteritidis* (SE) (8). Otros estudios, indican que una infección anterior de ST puede proteger a ratones de desafíos intravenosos con otra variedad de *Salmonella* sp (9, 20).

Salmonella gallinarum fue capaz de persistir en los tejidos, protegiendo contra el desafío de SE. Sin embargo, *S. pullorum* (SP), un microorganismo antigénicamente similar a SG, es incapaz de estabilizarse en los tejidos lo cual permite aparentemente que SE colonice (8).

Comparando con algunos otros países, SE es un problema de salud pública relativamente menor en los EU, mientras que la infección por SE concierne a los productores de carne de pollo y de huevo en muchos países como Inglaterra y Canadá (24). Una investigación reciente (1993) (1) estimó que aproximadamente 1 a 2% de la población de los Estados Unidos sufre de salmonelosis cada año (11) enfocándose principalmente a la contaminación de huevo. Los huevos han sido el artículo alimenticio único identificado más comúnmente asociado con brotes de SE. Para que se presente la contaminación, las bacterias llegan al alimento donde deben multiplicarse hasta alcanzar un número que rebase la resistencia de la víctima y produzca la enfermedad. Las investigaciones de alimento contaminado por SE indican que granjas de ponedoras están infectadas con SE (11, 13, 25)

Los datos disponibles sugieren que en raras ocasiones los huevos pueden ciertamente infectarse en la granja, y que los errores de un mal manejo del huevo resultan entonces en la multiplicación de la bacteria hasta niveles peligrosos. Los productores de huevo no pueden hacerse responsables de los errores de manejo después de que los huevos han abandonado la granja. Sin embargo, si pueden reducir el riesgo de contaminación de huevo dentro de la granja (31).

La contaminación del huevo puede ser resultado de la penetración del cascarón, infección del contenido del huevo durante su paso por el oviducto, o infección transovárica verdadera. Dependiendo de la ruta de infección, la *Salmonella* puede localizarse primeramente en las membranas del cascarón del huevo o en la membrana vitelina (31).

Debido a que *Salmonella* es una bacteria prevalente y causante de zoonosis, es necesario reducir al mínimo su

prevalencia mediante prevención, la cual inicia con métodos de detección.

Los esfuerzos para una reducción de Salmonelosis aviar tienen que comenzar en lo alto de la pirámide, es decir desde el pie de cría. Los programas regulatorios generalmente se avocan a las parvadas de producción, ya sean ponedoras o pollo de engorda, que están al final de la línea epizootiológica. El cultivo de órganos de varias aves, es la técnica más común. Una contaminación de nivel bajo por SE puede permanecer sin detección. Por lo tanto, es muy importante que se siga un muestreo confiable y estandarizado para la detección de SE (31).

Salmonella puede transmitirse mediante 2 vías principales: vertical, horizontal, a través del personal, del alimento, otras especies y fomites (14).

Una de las prácticas de prevención es la vacunación; existiendo vacunas vivas como son:

- Doble atenuada, ST autotrófica.
- Cepa R-9 de SG.
- Otras vacunas vivas, incluyendo a las vacunas mutantes sensibles a la temperatura, mutantes dependientes de vitaminas aromáticas (aroA), o cepas libres de plásmidos que han sido reportadas como una protección variable, pero no han sido usadas como vacunas de preparación comercial (32).

Para que una vacuna de *Salmonella* sea siempre efectiva, deberá evitar que el agente patógeno:

- colonice el intestino
- penetre a través del aparato respiratorio o intestinal
- invada y colonice órganos internos,
- evite o reduzca significativamente la

contaminación de huevo

Para lograr estas metas, las vacunas deben estimular la inmunidad mediada por células, la producción de anticuerpos secretorios y séricos. Las vacunas vivas también mejoran la protección al competir por la colonización con cepas virulentas de campo (32).

Para el control y prevención de la Salmonelosis aviar se ha utilizado la vacuna R-9¹ que previene la transmisión transovárica y la contaminación de huevos a través del cascarón. La vacuna R-9 de SG confiere cierta protección a gallinas ponedoras contra SE y también, contra ST (37). Cuando las pollonas se vacunan con intervalos de 2 semanas, además reduce el aislamiento de SE de las aves vacunadas, inclusive de órganos internos como el ovario (6).

En México la única vacuna comercial utilizada es la R-9, en Argentina se tienen 14 años de vacunación con éxito, debido a la frecuencia de la vacunación por vía doble (oral y parenteral) durante la crianza y una tercera vacunación a las 36 semanas en criaderos con apariciones endémicas, además de medidas profilácticas higiénicas como complemento de la vacunación (10).

Barrow en 1991, realizó un trabajo en donde vacunó con intervalos de 2 semanas con la vacuna R-9 a polla de postura de 24 semanas, encontrando que la protección derivada de la vacuna R-9 es mejor que la producida por la cepa rugosa mutante de aroA, derivada de fagotipo 4 de la cepa de SE (6).

Vacuna comercial Bive 9R

La capacidad de la vacuna R-9 para multiplicarse en los pollos se limitó en trabajos hechos por Smith en 1969, además menciona que existe una mayor protección cuando se vacuna a los 3 meses con 500 millones de células vivas (38).

Silva (37) encuentra tres limitantes en el control de la vacunación con R-9 en la tifoidea aviar:

- 1.- Protección contra la alta mortalidad por la susceptibilidad a la exposición de una cepa virulenta de SG.
- 2.- La vacunación con R-9 en aves manifestó la capacidad de transmitirse verticalmente a través del huevo.
- 3.- Algunas vacunas de aves desarrollan anticuerpos que producen reacciones en pruebas serológicas para pulorosis.

En un trabajo realizado por Barrow (1987) (3) se muestra que una vacuna viva atenuada se usa para reducir la excreción fecal en gallinas de postura, es esencial algunos recursos para diferenciar las vacunas y la cepa de campo. Se necesitan más pruebas para la estabilidad de la cepa atenuada. La vacuna de SG R-9 ha sido utilizada por muchos años sin revertir a la virulencia (5).

Las vacunas de *Salmonella* sp viva atenuada confieren una protección subsecuente al desafío contra *Salmonella* sp, dentro de las 4 semanas de vacunación (17, 19). Debido a que SE es un problema de salud pública, es importante comprobar la eficiencia de la vacunación con R-9 para el control y prevención.

JUSTIFICACION

Dada la importancia del control y prevención de la infección de *Salmonella* sp se plantea el principio de la exclusión competitiva como medio de protección con la vacuna R-9 y en los desafío simultáneos y consecutivos

HIPOTESIS

Si la cepa R-9 puede colonizar el ciego, entonces excluye la colonización de SG y SE.

Si las infecciones consecutivas con variedades múltiples de *Salmonella* son posibles, entonces una variedad es capaz de excluir a la segunda variedad después de una administración.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar si la vacuna R-9 administrada al día de edad confiere protección al desafío para observar si existe exclusión competitiva.

Evaluar la colonización por SG y SE en tonsilas cecales, hígado y bazo de pollitos a partir del primer día de edad, en desafiados consecutivos y simultáneos.

MATERIAL Y METODO

CEPAS DE *Salmonella* UTILIZADAS

Se utilizó una cepa de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 obtenida en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (NVSL) en Ames, Iowa, y aprobado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para su uso en el laboratorio del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) U.N.A.M., así mismo, se usó una cepa de campo patógena de *Salmonella gallinarum*; ambas fueron seleccionadas por su resistencia al ácido nalidíxico (NA) y a la novobiocina (NO) siendo mantenidas en caldo nutritivo (41).

El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento de SE y SG fue Agar Verde Brillante (AVB) que contenía 25 $\mu\text{g/ml}$ de NO y 200 $\mu\text{g/ml}$ de NA para evitar el crecimiento de otras bacterias. Para el aislamiento de R-9 se utilizó AVB sin antibiótico.

El inóculo para el desafío se preparó con solución amortiguador de fosfatos (PBS) estéril. Las concentraciones utilizadas fueron de 10^4 UFC/0.25 ml, 10^5 UFC/0.25 ml y 10^6 UFC/0.25 ml, mismas que fueron determinadas mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 450 nm.

VACUNA

Se obtuvo la vacuna comercial Bive 9R la cual es una suspensión liofilizada de SG cepa R-9, elaborada en Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) , 4 frascos de 500 ml de *Salmonella* reg. SARH B-0653-030.

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron 260 pollitos de engorda machos y hembras de la estirpe Arbor Acres X Arbor Acres de un día de edad libres de *Salmonella* sp provenientes de una incubadora comercial.

Se tomaron muestras aleatorias de 5 pollos, cama y alimento para realizar pruebas bacteriológicas y confirmar que estuvieran libres de *Salmonella* sp. A la incubadora se le tomaron muestras de piso, paredes, contenedores para descartar la presencia de *Salmonella* sp.

Las aves se alojaron en una batería eléctrica ubicada en una de las unidades de aislamiento del Departamento de

IGrupo Agropecuario Tepexpan S.A. de C.V

Producción Animal: Aves, de la FMVZ; UNAM. proporcionándoles una ración de alimento balanceado comercial¹ y agua *ad libitum*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO I (CUADRO 1)

Las aves fueron distribuidas aleatoriamente en 6 grupos de 20 pollos cada uno de acuerdo al siguiente diseño:

Grupo A.- El día uno de edad se le inculó la vacuna R-9 con una dosis de 3×10^7 UFC/0.25 ml vía oral, siendo grupo control de vacuna.

Grupos B y C.- fueron controles positivos y se inocularon al día uno de edad con SG y SE respectivamente con una dosis de 10^6 UFC/0.25 ml vía oral.

Grupos D y E.- El día uno de edad se aplicó la vacuna al día uno con una dosis de 3×10^7 UFC/0.25 ml y al cuarto día post-vacunación se les desafió con SG y SE con una dosis de 10^6 UFC/0.25 ml respectivamente.

Grupo F.- control negativo sin vacunar y sin desafiar.

CUADRO 1. DISTRIBUCION DE GRUPOS DE TRABAJO

GRUPO	CARACTERISTICA	INOCULO	DESAFIO
		(1 día)	(4 día)
A	control vacuna	R-9	-
B	control SG	SG	-
C	control SE	SE	-
D	desafío con SG	R-9	SG
E	desafío con SE	R-9	SE
F	control negativo	-	-

Todos los pollos de este experimento se sacrificaron al día séptimo post-desafío.

EXPERIMENTO II (CUADRO 2)

Las aves fueron distribuidas en 7 grupos de 20 pollos cada uno

Los grupos fueron de la siguiente manera:

Grupo 1. Se inoculó SG a una dosis de 10^6 UFC/0.25 ml el día uno y a las 24 hrs siguientes se desafió con SE a una dosis de 10^8 UFC/ 0.25ml.

Grupo 2. Se inculó SE a una dosis de 10^4 UFC/0.25 ml el día uno y a las 24 hrs siguientes se desafió con SG, a una dosis de 10^8 UFC/0.25 ml.

Grupo 3. Se les inculó el día uno SG con una dosis de 10^4 UFC/0.25 ml y SE con una dosis de 10^8 UFC/0.25 ml simultáneamente.

Grupo 4. Se les inculó al día uno SE con dosis de 10^4 UFC/0.25 ml y SG a una dosis de 10^8 UFC/0.25 ml simultáneamente.

Grupo 5. Grupo control positivo de SE.

Grupo 6. Grupo control positivo de SG.

Grupo 7. Grupo control negativo

CUADRO 2. DISTRIBUCION DE GRUPOS DE TRABAJO

GRUPO	CARACTERISTICA	INOCULO	DESAFIO
		(1 día)	(2 día)
1	desafío conse. SG/SE	SG	SE
2	desafío conse. SE/SG	SE	SG
3	desafío simul. SG/SE	SG-SE	-
4	desafío simul. SE/SG	SE-SG	-
5	control SE	SE	-
6	control SG	SG	-
7	control negativo	-	-

Todos los pollos fueron sacrificados al tercer día post-inoculación

En ambos experimentos, el hígado, bazo, y tonsilas cecales fueron colectadas asépticamente, y cultivadas de acuerdo al Plan Nacional de Mejoramiento Avícola (NPPI) ; trabajando hígado y bazo como una sola muestra combinada. Los órganos se cultivaron en caldo tetracionato y se incubaron durante 24 hrs a 37°C (41).

Después de este periodo el caldo fue homogeneizado y sembrado en placas AVB con y sin antibiótico, incubándose por un periodo adicional de 24 horas a 37°C para posteriormente determinar la presencia de colonias lactosa negativas y

resistentes a NA y NO (41)

Una vez obtenidas las colonias sospechosas se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para la identificación del género de *Salmonella sp* (41) , una vez identificada la SG del Experimento I se le realizó la prueba de Acriflavina para confirmar si era una cepa rugosa o lisa y determinar si la SG identificada era una cepa vacunal o una cepa de campo.

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó el análisis de Ji-cuadrada para determinar las diferencias significativas en cuanto a la invasión de órganos por *Salmonella enteritidis* y *Salmonella gallinarum* (42).

RESULTADOS

EXPERIMENTO I

En los resultados obtenidos de la vacunación con R-9 y desafiados consecutivamente con SE y SG no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$), puesto que al trabajar el AVB sin antibiótico, no se pudo controlar el crecimiento de contaminantes que obstaculizaron el crecimiento de las 2 cepas de *Salmonella* experimentales. Se intentó sembrar la vacuna en cajas de AVB con antibiótico pero ésta no creció. Este fenómeno se corroboró al realizar un antibiograma con el que la cepa R-9 fue sensible a la mayoría de los antibióticos probados.

En cuanto a los grupos positivos de SE se recuperaron de 18/20 pollitos correspondiendo al 90% y de SG se recuperó de 19/20 pollitos siendo el 95%.

EXPERIMENTO II

En los desafíos consecutivos con *Salmonella gallinarum* (SG) en pollos de un día de edad desafiados con SE al segundo día se encontró que se recuperó SG de hígado (H) y bazo (B) en 18/20 pollos que corresponde al 90% y 19/20 pollos (95%) de tonsilas cecales (TC). De este mismo grupo SE se recuperó en H

y B en 2/20 pollos (10%) y en TC 3/20 pollos (15%), observándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.001$) (Figura 1).

En los desafíos consecutivos con SE al día de edad y desafiados al segundo día con SG se encontró que se recuperó SE de H y B en 19/20 pollos (95%) en TC se obtuvieron 20/20 pollos (100%). En este mismo grupo se recuperó de H y B en 5/20 pollos (25%), y en TC 4/20 (20%), observándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) (Figura 2).

En los resultados correspondientes a los desafíos simultáneos no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) (Figuras 3 y 4).

DISCUSION Y CONCLUSION

Collins et al. en 1966 (8) postulan que la capacidad protectora de la vacuna viva no tiene un resultado protector al antígeno en la colonización de los tejidos. En este trabajo al intentar el aislamiento no se recuperó ni la bacteria, ni la especie de *Salmonella* sp de los grupos de desafío.

Hoiset en 1981 (17) y Hormaeche en 1991 (19) mencionan que las vacunas de *Salmonella* sp viva atenuada proveen una protección subsecuente al desafío contra *Salmonella* sp en las primeras 4 semanas de vacunación. Gordon menciona que la vacuna R-9 no produce aglutininas, no es letal al día de edad además de que no interviene en la producción de huevo en gallina de postura, cuando se administra a las 8 semanas de edad (16). Las prácticas de vacunación recomendadas, son a partir de las 16 semanas de edad en aves, esto debido a los hallazgos obtenidos de este trabajo a la necropsia en pollos de 7 días de edad, como fueron hepatomegalia de leve a moderada, emplastamiento cloacal, diarreas profusas, depresión.

Barrow en 1990 informó que el número de aislamientos de los desafíos con SE de ovario fueron pocos en la vacunación del pollito con R-9. Esta vacuna tiene una disminución considerable en la recuperación de H y B (4). De acuerdo con los estudios hechos por Barrow, se confirma con este trabajo que no se

puede recuperar fácilmente la vacuna R-9 de SG de los aislamientos hechos a partir de H, B y TC de pollo de engorda de un día de edad.

Nathan y Halina en 1993, reportan que los azúcares tienen una señal de reconocimiento para otras células. Los carbohidratos intervienen en la emigración de las células durante los procesos infecciosos y otros fenómenos.

Como ejemplo se tienen que las células intestinales de los cerdos resistentes a E. coli K88 agente causal de diarreas carece de macrocarbohidratos al que se engancha la bacteria en cerdos adultos y al hombre. Se sabe que E.coli K88 está ausente en cerdos adultos, por cuya razón las bacterias no logran instalarse en el intestino de los cerdos y colonizarlo, en tanto que infecta a los lechones (28).

Este principio puede ser uno de los motivos por el cual no se pudo recuperar la vacuna R-9 de SG, debido a que el pollo de un día de edad no tiene los receptores adecuados o los carbohidratos para una adhesión de la vacuna a tan corta edad, por lo que no se recomienda la vacunación en la primera semana de vida.

Para evaluar los efectos de los desafíos orales consecutivos y simultáneos en el experimento 2 se utilizó SE y

SG. En los experimentos de desafíos consecutivos se confirmó que la primera variedad de *Salmonella* que se administró predominó en la colonización de H y B y la invasividad de TC, excluyendo a la segunda variedad aplicada confirmando la exclusión competitiva que existe en diferentes variedades de *Salmonella*.

De acuerdo con la evidencias de diferentes investigaciones hechas con *Salmonella* se demuestra que provee de una protección a una segunda administración de *Salmonella* como son los trabajos de Howard en 1991 y Collins en 1968 hechos en ratones y los de Barrow en 1987, Berchieri y Barrow en 1990 y de Maedine en 1993 realizadas en pollos.

Maedine observó el efecto en los desafíos al segundo día en pollos donde existe refracción en la infección. Esto es porque la infección ocurre en los desafíos simultáneos, por una posibilidad de que el hospedador no tiene suficiente tiempo para obtener una sensibilización por ciertos antígenos de una sola variedad de *Salmonella* o una sola variedad alternada que no tiene un tiempo para una colonización competitiva (24).

Al administrarse simultáneamente las 2 variedades de SG y SE con una misma concentración al día de edad el contenido de TC fue similar al aislado de H y B demostrando que no existe exclusión competitiva.

El mecanismo de resistencia a los desafíos consecutivos y la razón por la cual los desafío simultáneos dan como resultado infecciones mixtas no se conocen. Obviamente para el segundo día los pollos son más refractarios a la infección posiblemente debido a una resistencia innata. Además existe información que mientras los pollos infectados con *Salmonella* se convierten refractarios a un segundo desafío con una variedad dentro de las siguientes 24 horas, las infecciones consecutivas son posibles si la exposición simultanea ocurre.

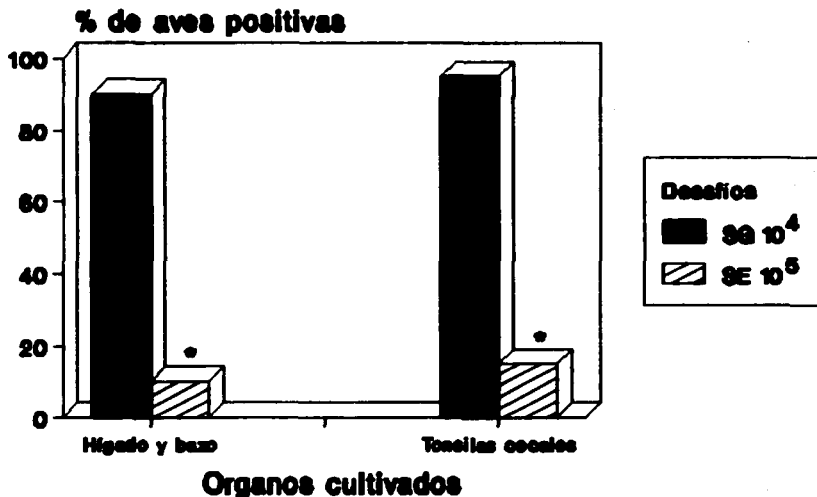
Esta información confirma reportes previos de inducción rápida de resistencia con un desafío consecutivo con *Salmonella*, mientras que se indica que las co-infecciones pueden ocurrir cuando los pollos son desafiados simultáneamente (24).

Concluyendo que en el experimento 1 no se pudo aislar la vacuna R-9 de SG y no se recomienda la vacunación contra *Salmonella* en la primera semana de vida. En el experimento 2, se demostró que existe una exclusión competitiva en los desafíos consecutivos, cuando se administró simultáneamente no se observó este fenómeno.

Después de las observaciones realizadas en este trabajo proponemos que e continúe estudiando la participación de los carbohidrato de membrana y su interrelación con los receptores

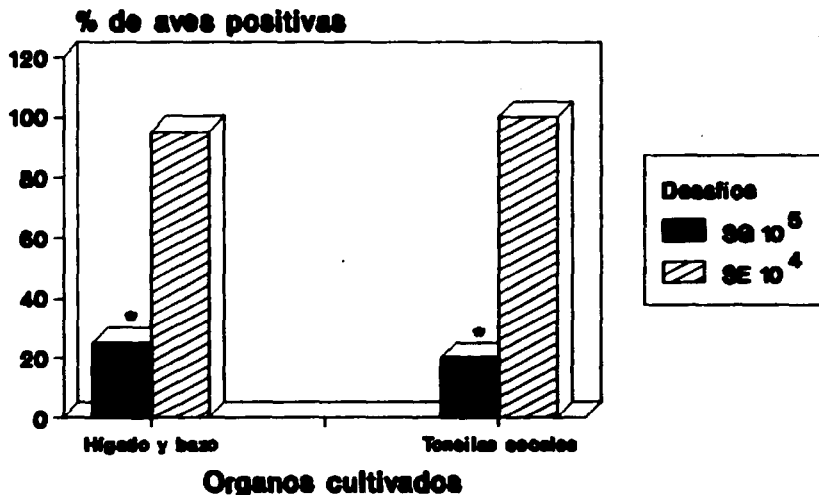
de las bacterias ya que en este trabajo suponemos que la bacteria vacunal carece de esos receptores lo cual impide una buena protección por exclusión competitiva.

Fig. 1 Efecto de desafíos consecutivos con SG al día de edad y 24 horas después con SE



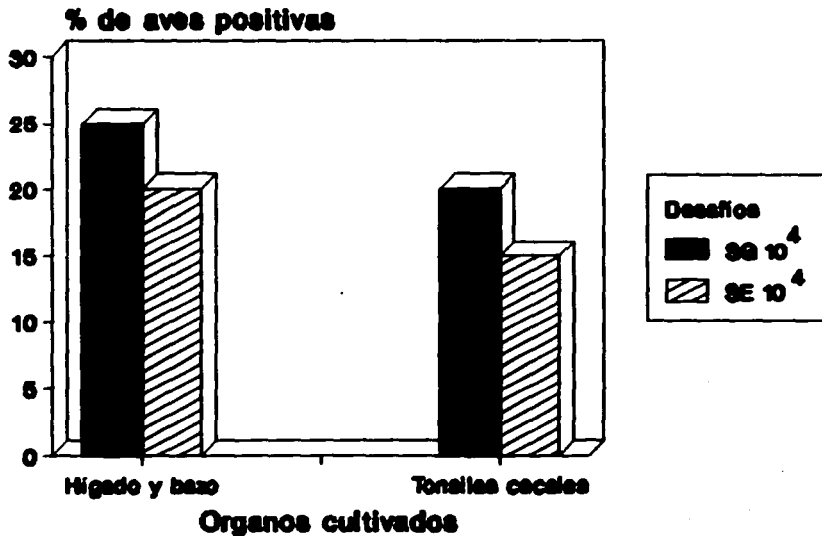
• $P < 0.001$

Fig. 2 Efecto de desafíos consecutivos con SE al día de edad y 24 horas después con SG



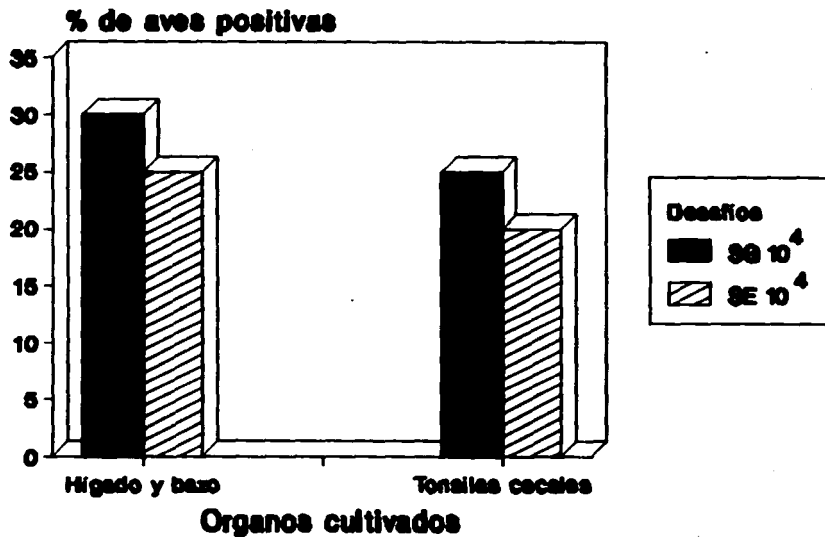
• $P < 0.001$

Fig. 3 Efecto de desafíos simultáneos con SG/SE al día de edad



P > 0.05

Fig. 4 Efecto de desafíos simultáneos con SE/SG al día de edad



P > 0.05

LITERATURA CITADA

1. Barrow, E.M., and Impey, C.S.: Competitive exclusion of *Salmonella* from de newly hatched chick. *Vet. Rec.* 106:61-62 (1980).
2. Barrow, P.A., and Turckey, J.F.: Inhibition of colonization of the chicken caecum with *Salmonella typhimurium* by pre-treatment with strains of *Escherichia coli*. *J Hyg. Camb.* 96: 161-169 (1986).
3. Barrow, P.A., Turckey, J.F., and Simpson, J.M.: Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella typhimurium* gram-negative facultatively anaerobic bacteria. *Epidemiol. Infect.* 98: 311-322 (1987).
4. Barrow, P.A., Lovell, M.A., Berchieri, A.: Immunization of laying hens against *Salmonella enteritidis* with live attenuated vaccines. *Vet. Rec.* 126: 241-242 (1990).
5. Barrow, P.A., Hassan, J.O., and Berchieri Jr, A.: Reduction in faecal excretion of *Salmonella typhimurium* strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S. typhimurium* organisms. *Epidemiol. Infect.* 104: 413-426 (1990).

6. Barrow, P.A., Margaret, A., Berchieri, A.: The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying against *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Avian Path* 20: 81-92 (1991).

7. Berchieri Jr, A., and Barrow, P.A.: Further studies on the inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella typhimurium* by pre-colonization with an avirulent mutant. *Epidemiol. Infect.* 104: 427-441 (1990).

8. Collins, F.M., Mackaness, M.B., and Blanden, R.V.: Infection-immunity in experimental salmonellosis. *J. Exptl. Med.* 124: 601-619 (1966).

9. Collins, F.M: Cross-protection against *Salmonella enteritidis* infection in mice. *J. Bacteriol.* 95: 1343-1349 (1968).

10. Domingo, C.A.: Resultados de catorce años de vacunación contra tifosis aviar utilizando cepa 9R en la Republica Argentina. XII Congreso Latinoamericano de Avicultura. Santo Domingo R.D. del 12-15 de oct. pg. 42-44 (1993).

11. Ebel, E.D., Mason, J., Thomas, L.A.: Occurrence of *Salmonella enteritidis* in unpasteurized liquid egg in the United States. *Avian Dis.* 37: 135-142 (1993)

12. García, M. A.: Determinación de la existencia de *Salmonella enteritidis* serotipo Enteritidis a partir de 95 aislamientos de *Salmonella* sp de brotes de campo en aves domésticas. Tesis de Licenciatura. U. N. A. M. F. N. V. Z. México D.F. 1994.

13. Gast, R.K: Uso de un modelo de infección experimental para evaluar la eficacia de la bacterinas emulsificadas en aceite para proteger a los pollos contra *Salmonella enteritidis*. Memorias del curso de Actualización sobre "Control y prevención de la infección por *Salmonella enteritidis*". México D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. 8-12, (1994).

14. Gillingham, S.: Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis*. *International Poultry Consultants*. Cambridge. Ontario. Canada. 1-8 (1993).

15. Guerrero M.R., Hoyos, G.: Biotecnología aplicada en las aves. Memorias de la Cuarta Jornada Médico Avícola. Depto de Producción: Aves FNVZ 99-104 (1993).

16. Gordon, R.F., Garside, J.S. and Tucker, J.F.: The use of living attenuated vaccines in the control of fowl typhoid. *Vet. Rec.* 71: 300-305 (1956).
17. Hoiseth, S.K., and Stocker, B.A.D.: Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239 (1981).
18. Hofstad, M.S.: Diseases of Poultry. Avian Salmonellosis. 8th. Ed. *American Association of Avian Pathologists*, Iowa State University Press. Cap. 3, pg. 65-72, (1989).
19. Hormaeche, C.E., Joysey, H.S., Desilva, L., Ishar, M., and Stocker, B.A.D.: Immunity conferred by Aro-salmonella live vaccine. *Microbial Pathogen.* 10: 149-158 (1991).
20. Howard, J.G.: Resistance to infection with *Salmonella paratyphi C* in mice parasitized with a relatively avirulent strain of *Salmonella typhimurium*. *Nature* 191: 87-88 (1961).
21. Impey, C.S., and Mead, G.C.: Fate of *Salmonellas* in the alimentary tract of chicks pre-treated with a mature caecal microflora to increase colonization resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 469-475 (1989).

22. Kaeffer, B., Pardon, P., and Marly, J.: Infection with a reduced virulence *Listeria monocytogenes* strain increases resistance to salmonellosis in mice. *Ann. Rech. Vet.* 20: 47-55 (1989).

23. Lloyd, A.B., Cumming, R.B., and Kent, R.D.: Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extract. *Aust. Vet. J.* 53: 82-87 (1977).

24. Maedine R,P., Hargis, M.B.: Recovery of Salmonellae from leghorn chick consecutively or simultaneously challenged with *Salmonella enteritidis* or *Salmonella typhimurium*. Thesis of Master of Science of Texas A&M University (1993).

25. MacIlroy, S.G., McCracken, R.M., Neill, S.D., O'Brien, J.J.: Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks. *Vet. Rec.* 125: 545-548 (1989).

26. Manning, J.G., Hargis, B.M., Hinton, A.Jr., Corrier, D.E., DeLoach, J.R., and Creger, C.R.: Effect of nitrofurazone or novobiocin on *Salmonella enteritidis* cecal colonization and organ invasion in leghorn hens. *Avian Dis.* 36: 334-340 (1992).

27. Merchant, I.A., Packer, R.A.: Bacteriología y Virología Veterinarias. 3a. Ed española, 2a. reimpression. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pg. 115-130, (1980).

28. Nathan S., Halina L.: Carbohidratos en el reconocimiento celular. *Investigacion y Ciencia* 198: 20-27 (1993)

29. Nisbet, D.J., Corrier, D.E., and DeLoach, J.R.: Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture, and dietary lactose in *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* 37: 528-535 (1993).

30. Nurmi, E., and Rantala, M.: New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241: 210-211 (1973).

31. Pivnick, H.B. Blanchefield, and D'Acoust, J.Y.: Prevention of *Salmonella* infection in chicks by treatment with faecal cultures from mature chickens (nurmi cultures). *J. Food Prot.* 44: 909-916 (1981).

32. O'Brien: *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Vet. Rec.* 122: 214, (1988).

33. Opitz, M.H.: Medidas esenciales en un programa efectivo de reducción de riesgo contra *Salmonella enteritidis* en granjas de ponedoras. Memorias del curso de Actualización sobre "Control y prevención de la infección de *Salmonella enteritidis*". México D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícola. 45-54. (1994).

34. Opitz, M.H.: Efectividad de las vacunas contra *Salmonella enteritidis*. Memorias del curso de Actualización sobre "Control y prevención de la infección de *Salmonella enteritidis*". México D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. 55-59 (1994).

35. Rantala, M., and Nurmi, E.: Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. *Br. Poult. Sci.* 14: 627-632 (1973).

36. Rosende, O.S., Fernández, H.M.I.: Exclusión de *Salmonella typhimurium* del tracto digestivo de pollos de un día de edad por acción competitiva de la flora intestinal normal obtenida de cama de gallinas reproductoras. *Avances en Ciencias Veterinarias vol.2 n.2* 116-120 (1987).

37. Sadler, W.W., Brownell, J.R., and Fanelli, M.J.: Influence of age and inoculum level on shed pattern of *Salmonella typhimurium* in chickens. *Avian Dis.* 13: 793-803 (1969).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

38. Seuna, E.: Sensitivity of young chickens to *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* and *S. infantis* infection and preventive effect of cultured intestinal microflora. *Avian Dis* 23: 392-400 (1979).
39. Silva, E.N., Snoeyenbos, G.H.: Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis.* 25: 38-58 (1981).
40. Smith, I.M.: Protection against experimental fowl typhoid by vaccination with strain 9R reconstituted from the freeze-died state. *J. Comp. Path* 79: 197-205 (1969).
41. Snoeyenbos, G.H., Weinach, O.M., and Snyser, C.F.: Further studies on competitive exclusion for controlling salmonellae in chickens. *Avian Dis.* 24: 904-914 (1979).
42. Soerjadi, A.S., Lloyd, A.B., and Cumming, R.B.: *Streptococcus faecalis*, a bacterial isolate which protects young chickens from enteric invasion by salmonellae. *Aust. Vet. J.* 54: 549-550 (1978).
43. United State Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. *National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provision Veterinary Service, Publication A.P.H.I.S. 91-40 U.S. Government Printing Office* (1989).

44. Zar, J.: *Biostatistical analysis 2nd Ed Prentice Hall Inc.*
Englewood Clifts, New Jersey, pp 348-351 (1984).