

6
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EL ESCARABAJO *Alphitobius diaperinus*
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) COMO POSIBLE
VECTOR DE *Salmonella enteritidis* EN AVES
DOMESTICAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ARMANDO ALCALA IBARRA

ASESORES: MVZ, MC, ODETTE UROQUIZA BRAVO
MVZ, MARTHA DAVILA DE IGAZA
MVZ, MC, Ph.D. GUILLERMO TELLEZ ISAJAS



MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por formarme como profesionalista

Al Departamento de Producción Animal: Aves, por brindarme la oportunidad de pertenecer a él.

A Laboratorios Bayer de México, S. A. de C. V., por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

A Odette Urquiza:

Porque además de ser mi maestra y asesora ha sido la amiga que siempre me apoyado y tendido su mano. Gracias.

Al Dr. Angel Mosqueda:

Por la confianza y paciencia que ha depositado en mí.

A mis asesores de tesis, por su confianza y tiempo invertido en mí.

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios:

Por estar siempre conmigo y por permitirme llegar hasta aquí.

A mi padre ' :

Por todos los momentos felices que me dió y porque gran parte de lo que soy se lo debo a él.

A mi madre:

Quien con su amor y confianza me ha alentado y apoyado en todos mis proyectos y por ser el pilar de la unidad familiar.

A mis hermanos: Luis Eduardo, Roberto, Juan Carlos y Alma Della

Por la confianza que siempre han tenido en mí y por la unidad que nos mantiene juntos.

A Nathaly:

Por su amistad que me ha brindado y por todos los momentos felices que hemos pasado.

A Barbara:

Por la amistad que hemos mantenido a través de los años,

A mis amigos: José Luis, Benjamin, Francisco (El Coruco), Martín, Luis, Laureano, Efrain, Julio, Miriam, Leticia (La Güera), Elsa, Jyazmin; con los cuales compartí momentos inolvidables, esperando que a pesar de los años nuestra amistad no termine.

A Angélica:

Por ser compañera del mismo dolor.

A todos mis compañeros del Departamento de Aves: Oscar, Julio, Cecilia, Blanca, María Luisa, Judith, Lillia, Felipa, José, Rosy, que sin duda la amistad que ha surgido se mantendrá al transcurrir los años.

A Ana Paola:

Porque me cae bien.

CONTENIDO

	página
Resumen.....	1
<p>El escarabajo <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) como posible vector en la transmisión de <i>Salmonella enteritidis</i> en aves domésticas.</p>	
Introducción.....	3
Objetivos.....	9
CAPÍTULO I	
Determinación cuantitativa de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A en <i>Alphitobius diaperinus</i> adultos infectados durante 10 semanas.	
Introducción.....	10
Material y métodos.....	10
Resultados.....	12
Cuadro 1-Resultados de los muestreos semanales de <i>Alphitobius diaperinus</i> y alimento del grupo experimental inoculados con <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-a durante 10 semanas (concentración en UFC/ml) (Lote 1)	
	14
Cuadro 2-Resultados de los muestreos semanales de <i>Alphitobius diaperinus</i> y alimento del grupo experimental inoculados con <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A durante 10 semanas (concentración en UFC/ml) (Lote 2)	
	15
Figura 1-Concentración de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A (UFC/ml) a partir de <i>Alphitobius diaperinus</i> durante 10 semanas (Lote 1).....	16
Figura 2-Concentración de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A (UFC/ml) a partir de <i>Alphitobius diaperinus</i> durante 10 semanas (Lote 2 réplica).....	17
Figura 3-Concentración de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A a partir de alimento contaminado por escarabajos (Lote 1).....	18
Figura 4-Concentración de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A a partir de alimento contaminado por escarabajos (Lote 2 réplica).....	19
Discusión.....	20

Capítulo II

Infección experimental en pollitos de 2 días de edad por medio de la ingestión de *Alphitobius diaperinus* adultos infectados con *Salmonella enteritidis* PT 13-A durante 10 semanas.

Introducción.....	22
Material y métodos.....	22
Resultados.....	24
Discusión.....	24

CAPÍTULO III

Determinación del escarabajo *Alphitobius diaperinus* como vector mecánico y biológico en la infección con *Salmonella enteritidis* PT 13-A en pollitos de 2 días de edad.

Introducción.....	25
Material y métodos.....	25
Resultados.....	27
Cuadro 3-Concentración de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A (UFC/ml) en los diferentes grupos de escarabajos y alimento contaminado.....	29
Cuadro 4- Aislamiento de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A de pollitos inoculados al 2º día de edad con los escarabajos desinfectados externamente.....	30
Cuadro 5-Aislamiento de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A de pollitos inoculados al 2º día de edad con escarabajos no desinfectados externamente.....	31
Cuadro 6-Aislamiento de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A de pollitos inoculados al 2º día de edad con alimento contaminado.....	32
Cuadro 7-Concentración de <i>Salmonella enteritidis</i> PT 13-A (UFC/ml) a partir de la cama de los diferentes grupos de pollitos infectados con diferentes grupos de escarabajos y alimento contaminado.....	33
Discusión.....	34
Diagrama 1-Desinfección de escarabajos por medio de la técnica de De las Casas <i>et al.</i>	36

Diagrama 2- Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp a a partir de alimento y cama contaminada.....	37
Capítulo IV	
Conclusiones.....	38
Literatura citada.....	39

RESUMEN

ALCALÁ IBARRA ARMANDO. El escarabajo *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) como posible vector de *Salmonella enteritidis* en aves domésticas. (Bajo la dirección de MC. MVZ. Odette Urquiza Bravo., MVZ. Martha Dávila de Icaza., PhD. MC. MVZ. Guillermo Téllez Isaías.).

Se estudió el posible papel que desempeña el escarabajo *Alphitobius diaperinus* como vector en la transmisión de bacterias del género *Salmonella*. El objetivo de este trabajo fue observar la permanencia de *Salmonella enteritidis* durante 10 semanas en escarabajos infectados experimentalmente y demostrar la infección de pollitos de 2 días de edad al ingerir éstos al finalizar las 10 semanas. Se realizaron tres estudios. Estudio 1: Se formaron dos grupos de 800 escarabajos experimentalmente cada uno, ambos con su réplica, los cuales se alojaron en recipientes de plástico con un alimento comercial previamente esterilizado para pollo de engorda. Al Grupo 1 se le administró un inóculo de una copa de *S. enteritidis* PT 13-A a una concentración de 1×10^6 UFC/ml (grupo experimental) y al Grupo 2 se le administró una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril (grupo testigo negativo), posteriormente éstos fueron cambiados a otros recipientes con alimento previamente esterilizado y se inocularon en Caldo Tetracionato, incubándose a 37°C durante 24 horas para realizar diluciones decuples seriadas y sembrarse en Agar Verde Brillante, McConkey y Agar Tripticaseína Soya para determinar su concentración. El mismo procedimiento fue realizado para evaluar la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A en el alimento de ambos grupos. Los resultados obtenidos indican la persistencia de *S. enteritidis* PT 13-A durante 10 semanas en uno de los grupos de escarabajos experimentales con una concentración final de 1.18×10^6 UFC/ml de *S. enteritidis* PT 13-A. Estudio 2: Se formaron dos grupos de 10 pollitos cada uno de 2 días de edad, ambos con su réplica, al Grupo 1 se le proporcionó en el alimento un macerado de 6 escarabajos infectados por medio del alimento con *S. enteritidis* PT 13-A durante 10 semanas por pollito, al Grupo 2 se le proporcionó en el alimento un macerado de 6 escarabajos sin infectar por pollito. Ambos grupos recibieron alimento sin macerado de escarabajos del 3er al 8º día. Al 8º día se sacrificaron ambos grupos de pollos resultando negativos al aislamiento de *S.*

enteritidis PT 13-A. Estudio 3: De dos grupos de escarabajos, uno infectado con un inóculo de *S. enteritidis* PT 13-A con una concentración de 1×10^6 UFC/ml y otro negativo a *S. enteritidis* PT 13-A, se formaron tres grupos: El grupo 1 para determinar la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A en escarabajos desinfectados externamente, el Grupo 2 para escarabajos sin desinfectar y el Grupo 3 como testigo negativo. Con los escarabajos de los grupos 1, 2 y 3 se formaron 4 grupos de pollitos que ingirieron éstos grupos de escarabajos y el Grupo 4 de pollitos fue alimentado con el alimento previamente inoculado con *S. enteritidis* PT 13-A. Los resultados obtenidos indicaron la infección en el 60% de los pollitos con escarabajos desinfectados, 50% con los no desinfectados, el 100% con el alimento inoculado y negativo para el grupo testigo negativo. De igual manera se evaluó la cama de los diferentes grupos de pollitos para determinar el grado de contaminación que resulta de la infección con *S. enteritidis* PT 13-A, existiendo una concentración de 10^3 a 10^4 UFC/g de cama. Con estos estudios no se puede concluir que el escarabajo *Alphitobius diaperinus* sea un portador de *S. enteritidis* por largos periodos de tiempo, al igual que sea un vector mecánico y biológico de infecciones por bacterias *Salmonella* en las aves domésticas. Es necesario la realización de mas repeticiones para afirmar que el escarabajo *Alphitobius diaperinus* mantiene un ambiente contaminado con *Salmonella enteritidis*.

**EL ESCARABAJO *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)
COMO POSIBLE VECTOR EN LA TRANSMISIÓN DE *Salmonella enteritidis*
PT 13-A EN AVES DOMÉSTICAS.**

INTRODUCCIÓN

Entre la fauna que se localiza en la cama de las explotaciones avícolas se encuentran los artrópodos, entre ellos unos de los de mayor importancia son los insectos pertenecientes al orden Coleoptera, conocidos como escarabajos. Este orden abarca más de 270,000 especies (25, 33, 37), se asocian como plagas en almacenes y plantas de alimento. Uno de los escarabajos mas comunes y de mayor importancia es *Alphitobius diaperinus*, también llamado "escarabajo negro", que constituye una plaga ignorada a pesar de sus efectos destructivos a instalaciones y como vector potencial de enfermedades. (19, 37).

Alphitobius diaperinus es un insecto asociado con los nidos y excremento de varias especies silvestres de aves. Son originarios de África del Este pero se han expandido mundialmente gracias al comercio. En sus inicios era reconocido como una plaga menor de productos perecederos, pero en los años cincuentas, cuando hubo un cambio en las técnicas de producción, comenzó a encontrarse en forma abundante en las camas de granjas de pollo de engorda, gallinas de postura, reproductoras y pavos (4, 37, 39), llegándose a encontrar hasta 1000 individuos por metro cuadrado (37, 40). *A. diaperinus* es omnívoro, larvas y adultos se alimentan de cereales, estiércol, aves muertas y moribundas, así como de otros insectos (13, 19, 24, 27, 34).

BIOLOGÍA E IMPORTANCIA

La temperatura ideal que necesita el adulto para su desarrollo es de 32° C y una humedad relativa (HR) del 15%. El tiempo de desarrollo de huevo a adulto va de 46 a 89 días dependiendo de la humedad y temperatura, pudiendo llegar a 338 días a 15° C con 70% de HR (31, 42) y a temperaturas de 10° C ó menos , los huevos y larvas de primer estadio no se desarrollan (41). Asimismo, la temperatura ideal para la oviposición es de 32° C y con temperaturas menores de 15° C se inhibe la oviposición (42).

Las hembras producen en promedio 3.5 huevos viables por día y su promedio de vida es de 400 días, produciendo alrededor de 1400 huevos durante la vida de cada hembra (26, 31, 42). La incubación del huevo dura de 4 a 10 días, miden 1.3 mm de largo por 0.7 mm de ancho, en el huevo recién puesto el córion es translúcido, delgado y muy delicado, al final de la incubación los ojos son evidentes y se presenta una pigmentación (42). En el período de larva puede haber de 6 a 11 mudas dependiendo de la temperatura ambiente, pero para fines prácticos se dividen en tres estadios larvarios: el primer estadio es de un color blanco perlado y mide aproximadamente 1.5 mm, su desarrollo requiere de 2 a 3 días (42). El segundo estadio tiene un color dorado, mide aproximadamente 2.5 mm. Presentan un comportamiento de escarbar túneles que persistirá durante todo su estadio larvario, teniendo como finalidad madurar y posteriormente mudar al estadio de pupa, su período de desarrollo es de 11 a 19 días según la temperatura ambiente (42). El tercer estadio muda dentro de los túneles, su color es café amarillento con manchas rojizas en su dorso que aparecen en el transcurso de su desarrollo. Las larvas miden 6 mm y su período de desarrollo es de 22 a 61 días (42).

Hay un estadio de prepupa en el cual asume una posición ligeramente encorvada y su período de desarrollo dura de 3 a 10 días (42).

La pupa es de un color blanco, la cual se pigmenta conforme su desarrollo avanza, cambiando a un color café oscuro al final del mismo. El período de pupa tiene una duración de 4 días (42).

Los adultos de *Alphitobius diaperinus* tienen un cuerpo suave café rojizo a negro y miden de 5.1 a 6.1 mm. La relación macho-hembra es de 1:2.25 y el apareamiento ocurre después de 5 días de haber completado su muda y el período de pre-oviposición llega a durar 13 días (26, 42).

Debido al comportamiento larvario de *Alphitobius diaperinus* de escarbar túneles, éstos ejercen un efecto destructivo en las instalaciones avícolas al perforar materiales aislantes como el poliuretano, poliestireno y fibra de vidrio, ocasionando grandes pérdidas económicas (36, 37, 39). En ciertas áreas los escarabajos ocasionan grandes problemas y molestias a propietarios de hogares o predios cercanos a explotaciones avícolas, cuando éstos los invaden debido al manejo que se le da a la pollinaza y la gallinaza al juntarla y secarla al sol para su comercialización. (19, 36).

Alphitobius diaperinus tiene también importancia como vector potencial de algunos microorganismos, aislándose de ellos diferentes bacterias como *Streptococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* sp. y hongos como *Aspergillus flavus*, diferentes especies de *Penicillium* sp. y *Candida* sp. (11). Se ha demostrado la infección con el virus de Marek al alimentar pollos con macerados de estos insectos (16). Asimismo, se ha demostrado que el escarabajo adulto se comporta como reservorio del virus de la Infección de la bolsa de Fabricio (30), y se llegó a comprobar la existencia del virus de la Viruela Aviar sin lograr la infección a través de éste (12). Se ha comprobado la supervivencia de rotavirus y enterovirus del pavo en las larvas de los escarabajos, los cuales provocan enteritis en pavos, ocasionando una mortalidad temprana en pavos expuestos (14). También el escarabajo es en ocasiones huésped intermediario de *Choanotenia infundibulum* (17). La micotoxina F-2 de *Fusarium roseum* se ha aislado de los escarabajos aún después de su metamorfosis y muerte (18).

Alphitobius diaperinus puede alimentarse de huevos y larvas de la polilla *Corcyria cephalonica* (34). Además se alimentan de huevos y larvas de la mosca doméstica (*Musca domestica*) (13) y del ácaro *Dermanyssus gallinae* en todas sus fases evolutivas (27). Se ha mencionado una asociación con algunos vertebrados como la rata noruega (*Rattus norvegicus*) al ser transportados en el escroto de éstas (7).

De igual forma se han aislado diferentes especies del género *Salmonella*: *S. heidelberg*, *S. worthington*, *S. saintpaul*, *S. typhimurium*, *S. chester* y serotipos de *Escherichia coli* que pueden llegar a ser patógenos para el hombre y los animales (8, 9, 22, 23).

-EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS AVIAR

Las enfermedades provocadas por bacterias del género *Salmonella* tienen importancia a nivel mundial, siendo los animales los principales reservorios. La infección de los animales con varias especies de *Salmonella* a veces resultan en una enfermedad seria y siempre se constituyen como reservorios de la enfermedad para los humanos (1, 32). El género *Salmonella* comprende más de 2100 serotipos definidos antigénicamente y que actualmente se consideran como especies (1).

En los últimos años se tiene una nueva nomenclatura propuesta por Le Minor y Popoff en 1987, que Gyles (1993) (5), utiliza como nomenclatura actual, ésta establece que el género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. bongori* y *S. enterica* con seis subespecies: 1) *enterica*, 2) *salamae*, 3) *arizonae*, 4) *diarizonae*, 5) *indica*, 6) *hautena*. La mayoría de las salmonelas pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica*, las cuales se denominan con el nombre del lugar donde fueron aisladas por primera vez. Otras solo son nombradas solo por la subespecie, seguida de su fórmula antigénica. La nueva nomenclatura indica que una serovariedad de *S. enterica* subsp. *enterica* debería ser nombrada por el género, la especie, subespecie y la serovariedad. (ej: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *enteritidis*). En este trabajo se usará la fórmula común y simplificada que nombrará únicamente el género seguido de la serovariedad. (5).

Epidemiológicamente los serotipos se dividen en tres: el primer grupo comprende a *Salmonella typhi* y *S. paratyphi* "A" y "C" respectivamente, que infectan al hombre y se propagan en forma directa o indirecta por medio de alimentos o agua contaminada (6). El segundo grupo incluye serovariedades adaptadas al huésped en especies particulares de vertebrados, por ejemplo. *S. enteritidis* ser. *gallinarum* y *S. enteritidis* ser. *pullorum* en aves, *S. enteritidis* ser. *dublin* en ganado vacuno y *S. cholera-suis* en cerdos (5). El tercer grupo está formado por la mayoría de las demás serovariedades de *Salmonella*, sin tener ninguna preferencia particular por el huésped que infectan, ya sea al hombre y a los animales (5).

La producción avícola al constituir el reservorio más grande de *Salmonella* que existe en la naturaleza ha clasificado los serotipos en dos categorías: la primera comprende los serotipos que producen una enfermedad sistémica en las aves, tales serotipos incluyen a *S. enteritidis* ser. *pullorum* y *S. enteritidis* ser. *gallinarum* que producen diarrea blanca bacilar o Púlorosis en aves jóvenes y Tifoidea Aviar en aves de todas las edades respectivamente (21). La segunda comprende los serotipos que producen enfermedades en las aves y que tienen una gran capacidad de causar problemas de origen alimenticio en humanos, principalmente de productos de origen avícola, dentro de los cuales están los serotipos de *S. enteritidis* y *S. typhimurium* (21).

La salmonelosis aviar es un problema que concierne a todas las fases de la producción avícola, desde la producción hasta el mercado, siendo la transmisión

vertical la vía más importante, tanto para la industria avícola como para los humanos, asimismo, por la vía horizontal a través de fomites, roedores, aves silvestres, agua contaminada, humanos, materiales de cama y artrópodos pueden ser posibles fuentes de contaminación (1, 32). El control de insectos como, moscas y escarabajos es importante, debido a que éstas plagas pueden proporcionar un medio de sobrevivencia a las salmonelas y otros patógenos para las aves en el ambiente (32).

PREVENCIÓN Y CONTROL

Es necesario tener en cuenta lo antes citado para tomar las medidas preventivas y de control para poder combatir a este escarabajo. Es importante el manejo del medio físico en las casetas aprovechando la sensibilidad que tienen a las bajas temperaturas, especialmente los huevos y las larvas, dejando circular libremente el viento en época de invierno cuando las casetas estén desocupadas (36).

Como medida preventiva se hace necesario el muestreo de las casetas a través de trampas, siendo la trampa "Tubular de Arends" el método más eficaz, la cual consiste en un rodillo de cartulina corrugada insertada en un tubo de cloruro de polivinil (PVC), necesitándose de 10 a 13 trampas para casetas de 1200 a 1400 m² colocadas en áreas estratégicas como debajo de comederos y bebederos para medir semanalmente la densidad, teniendo en cuenta una densidad baja con menos de 100 escarabajos (larvas y adultos) promedio por trampa, una densidad media de 100 a 400 escarabajos y una densidad alta con más de 400 escarabajos promedio por trampa (35).

Para el control se han usado hasta 1986 diferentes insecticidas organofosforados como el Dimethoato, Tetraclorvinphos y Malatión; carbamatos como el Carbaryl y Propuxur con buenos resultados, pero con las desventajas de tener una alta toxicidad, degradación lenta y por provocar corrosión en las instalaciones (37, 40).

Recientemente se han probado con mucho éxito insecticidas piretroides como Permetrina, Ciflutrina y Betaciflutrina; insecticidas derivados de hongos como ivermectina, siendo muy seguros para su uso y con buenos resultados principalmente sobre los escarabajos adultos (31, 40).

Otros compuestos que se han utilizado recientemente son los larvicidas conocidos como Reguladores del Crecimiento de Insectos (RCI), entre los que se encuentran los compuestos miméticos de Hormona Juvenil como el Metopreno y el Fenoxicarb, éstos compuestos actúan sobre las larvas evitando la formación y muda a insectos adultos (15). Otros RCI son los compuestos inhibidores de quitina como el Diflubenzuron, Penflurano y Triflumuron, todos de la familia de las benzofenilureas, siéndo atóxicos para plantas y animales, reportándose que luego de 8 semanas de su aplicación no se encuentran larvas (28, 31). Es importante tomar en cuenta la aplicación de insecticidas tanto para larvas como para adultos.

Con lo antes expuesto, se hace necesario el estudio de *Alphitobius diaperinus* para esclarecer el papel que desempeñan en la transmisión de infecciones con *Salmonella* en granjas avícolas y buscar las medidas de control adecuadas.

Para cumplir con los objetivos planeados fue necesario la división del trabajo en 4 capítulos:

I-Determinación cuantitativa de *Salmonella enteritidis* PT 13-A en *Alphitobius diaperinus* adultos infectados durante 10 semanas.

II-Infección experimental en pollitos de 2 días de edad por medio de la ingestión de *Alphitobius diaperinus* adultos infectados con *Salmonella enteritidis* PT 13-A durante 10 semanas.

III-Determinación del escarabajo *Alphitobius diaperinus* como vector mecánico y biológico en la infección con *Salmonella enteritidis* PT 13-A en pollitos de 2 días de edad.

IV-Conclusiones

OBJETIVOS

1-Determinar la persistencia de *Salmonella enteritidis* durante 10 semanas en escarabajos infectados con *S. enteritidis*.

2-Demostrar como posible vector al escarabajo *Alphitobius diaperinus* en la transmisión de *S. enteritidis* al finalizar las 10 semanas, siendo capaz de transmitirla e infectar a pollos de 1 día de edad

CAPITULO I

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE *Salmonella enteritidis* PT 13-A EN
Alphitobius diaperinus ADULTOS INFECTADOS DURANTE 10 SEMANAS

INTRODUCCIÓN

Existen evidencias de que la transmisión de bacterias del género *Salmonella* por *Alphitobius diaperinus* se puede realizar en varios estadios de su desarrollo, Geissley y Kösters (1972), al alimentar larvas y adultos con *S. thompson* observaron la infección por 15 días en escarabajos adultos y en escarabajos adultos que se infectaron desde larvas (20). McAllister *et al* (1994) observaron en escarabajos alimentados por 24 horas con alimento contaminado con *S. typhimurium* la eliminación de la misma en el excremento durante 28 días (29). Asimismo, De las Casas *et al* (1969), reportaron que escarabajos adultos que fueron alimentados con un alimento inoculado con *S. typhimurium*, la eliminación de la bacteria por arriba de 24 días (10). Baggesen *et al* (1992), observaron que la erradicación de *S. typhimurium* en casetas avícolas no pudo llevarse a cabo hasta la erradicación de *A. diaperinus*, aún con la remodelación de las construcciones, limpieza y desinfección extrema, persistiendo el escarabajo por 5 generaciones (3).

Con lo antes citado resulta necesario el estudio de éstos escarabajos como reservorio de *S. enteritidis* por largos periodos de tiempo, así como la determinación cuantitativa de la misma para observar su comportamiento a través de 10 semanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LOS ESCARABAJOS

Adultos de *Alphitobius diaperinus* libres de *Salmonella* spp se obtuvieron de una granja comercial de pollo de engorda localizada en Guadalajara, Jalisco.

Los escarabajos se llevaron al Laboratorio de Bacteriología y Micología del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de

México (UNAM), donde se tomaron 40 escarabajos semanalmente, los cuales se desinfectaron externamente (10), se maceraron en mortero estéril, se inocularon en Caldo Tetrionato (CT)¹ durante 24 horas y se sembraron en Agar Verde Brillante (VB)² y Agar McConkey (McC)³ para comprobar la ausencia de *Salmonella* spp. (2).

CEPA DE SALMONELLA

Se utilizó una cepa de *Salmonella enteritidis* ser. *enteritidis* fagotipo 13-A (*S. enteritidis* PT 13-A) resistente al ácido nalidixico (AN) y novobiocina (NO) obtenida en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (NVSL), Ames, Iowa. Aprobada para su uso por Servicios de Inspección en Salud Animal y Agrícola de E.U.A. Importada por el DPA: Aves de la FMVZ de la UNAM (37).

Se utilizó como medio de cultivo para el aislamiento de *S. enteritidis* PT 13-A, Agar Verde Brillante (VB), Agar de Soya Trypticaseína (TSA)⁴ y Agar McConkey (McC) todos adicionados con 25 µg/ml de NO y 200 µg/ml de AN para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes (2).

El inoculo para el desafío, se preparó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril, a una concentración de 1×10^6 UFC/ml, la cual se determinó mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 450 nm (2).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formaron dos grupos de escarabajos con 800 ejemplares cada uno, teniendo ambos una réplica, los cuales se albergaron en recipientes de plástico que contenían 300 g de alimento iniciador para pollo de engorda esterilizado durante 30 min a 120° C y 15 lb de presión, muestrándose antes y después de esterilizarlo para comprobar la ausencia de *Salmonella* sp y su esterilidad. Los escarabajos se mantuvieron a una

1-Difco Laboratories, Detroit MI
 2-Merck- Naucalpan de Juárez, México
 3-Merck- Darmstadt RF, Alemania
 4-Bloxon- Becton Dickinson de México

temperatura de 30° C.

Al grupo 1 (experimental) se le administró un inóculo de 1×10^8 UFC/ml de la cepa de *S. enteritidis* PT 13-A a razón de 10 ml por cada 35 g de alimento durante 6 días

Al grupo 2 (testigo negativo) se le administró PBS estéril a razón de 10 ml por cada 35 g de alimento durante 6 días.

Al día 7 ambos grupos se cambiaron a recipientes de plástico con 300 g de alimento esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 120° C y 15 lb de presión. También se mantuvieron a 30° C.

Durante 10 semanas se tomaron 40 escarabajos de cada grupo (1 g aproximadamente) semanalmente en forma aleatoria, se sacrificaron por exposición a -20° C durante 15 minutos y se desinfectaron superficialmente utilizando varias soluciones según De las Casas *et al* (9). El primer lavado se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 2% y 300 µl TWEEN 80 ® como emulsificador agitándolos por 2 minutos en frascos herméticos, el segundo lavado se realizó con alcohol etílico al 50% durante 20 segundos, seguido de 3 ó 4 lavados en agua estéril (9), posteriormente se maceraron en mortero estéril y se inocularon en CT a razón de 1:10 (9 ml de CT + 1 g de escarabajos) durante 24 horas a 37° C. Posteriormente se hicieron diluciones decuples seriadas de 10^1 a 10^6 en PBS estéril y se sembró 0.1 ml en cajas de VB, TSA y McC adicionados con AN y NO incubándose durante 24 horas a 37° C, para realizar el conteo de colonias. (Diagrama 1)

De igual manera se tomó semanalmente 1 g. de alimento de los escarabajos contaminados para inocularlo en 9 ml de Caldo Tetraciónato durante 24 horas a 37° C para posteriormente realizar diluciones decuples seriadas de 10^1 a 10^6 en PBS estéril, sembrando 0.1 ml en cajas de VB, TSA y McC para realizar el conteo de colonias a las 24 horas de incubación a 37° C.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante los muestreos realizados durante las 10 semanas para determinar la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A en ambos grupos de escarabajos, pueden observarse en los cuadros 1 y 2.

En la Figura 1 se puede observar el comportamiento semanal de las concentraciones de *S. enteritidis* PT 13-A en los escarabajos del grupo 1, notándose en general un comportamiento similar en los tres medios de cultivo utilizados, siendo ligeramente mayores en TSA, observándose una disminución drástica en la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A durante las primeras 4 semanas y una disminución brusca en la de la 1ª a la 2ª semana. Posteriormente, de la 4ª a la 10ª semana se tuvo un comportamiento irregular, finalizando a la 10ª semana con una concentración arriba de 1.3×10^6 UFC/ml.

Mientras tanto el comportamiento semanal de la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A de los escarabajos del 2º grupo (réplica) se puede observar en la Figura 2, notándose al igual que el primer grupo un comportamiento similar en los medios de cultivo utilizados. Aquí las concentraciones de *S. enteritidis* PT 13-A tuvieron un comportamiento irregular hasta la 8ª semana, en la cual a partir de ésta se dejó de presentar crecimiento bacteriano, así como en las semanas 5 y 6. Asimismo, se presentó una concentración de *S. enteritidis* PT 13-A mucho menor que la presentada en el 1º grupo durante las 10 semanas de muestreos.

Los muestreos realizados al alimento de los escarabajos inoculados se pueden observar en los Cuadros 1 y 2.

En las Figuras 3 y 4 se presenta el comportamiento semanal en la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A del alimento en los grupos 1 y 2 respectivamente. En el grupo 1 se observa una concentración solamente en las 2 primeras semanas, con una disminución de la 1ª a la 2ª semana. En la figura 4 se observan concentraciones elevadas y en general constantes durante las 10 semanas, alcanzando una concentración mínima de 4.6×10^6 UFC/ml en la 4ª semana y una concentración máxima de 3×10^7 UFC/ml en la primera semana.

En los grupos controles negativos no se presentó crecimiento durante las 10 semanas de muestreo.

Cuadro 1

Resultados de los muestreos semanales de *Alphitobius diaperinus* y alimento del grupo experimental inoculados con *Salmonella enteritidis* PT 13-A durante 10 semanas (concentración en UFC/ml)

Lote 1

Semanas	Grupos	Conteo TSA	Conteo McC	Conteo VB
1	Experimental*	1.21 X 10 ⁷	1.18 X 10 ⁷	1.12 X 10 ⁷
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.**	6.1 X 10 ⁷	5.1 X 10 ⁷	5.6 X 10 ⁷
2	Experimental	1.83 X 10 ⁶	1.59 X 10 ⁶	1.15 X 10 ⁶
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	1.83 X 10 ⁶	3.8 X 10 ⁵	7.2 X 10 ⁵
3	Experimental	5.6 X 10 ⁵	3.7 X 10 ⁵	6.1 X 10 ⁵
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-
4	Experimental	4.2 X 10 ⁴	3.6 X 10 ⁴	4.8 X 10 ⁴
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-
5	Experimental	1.52 X 10 ⁵	1.51 X 10 ⁵	1.26 X 10 ⁵
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-
6	Experimental	4.80 X 10 ⁵	4.4 X 10 ⁵	7.2 X 10 ⁵
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-
7	Experimental	2.44 X 10 ⁶	1.66 X 10 ⁶	2.44 X 10 ⁶
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-
8	Experimental	6.1 X 10 ⁵	4.6 X 10 ⁵	8.3 X 10 ⁵
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-
9	Experimental	4.7 X 10 ⁵	3.5 X 10 ⁵	3.8 X 10 ⁵
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-
10	Experimental	1.18 X 10 ⁶	1.3 X 10 ⁶	1.4 X 10 ⁶
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	-	-	-

* Concentración de *S. enteritidis* de 40 escarabajos adultos

** Concentración de *S. enteritidis* de 1 g de alimento

Cuadro 2

Resultados de los muestreos semanales de *Alphitobius diaperinus* y alimento del grupo experimental inoculados con *Salmonella enteritidis* PT 13-A durante 10 semanas (concentración en UFC/ml)

Lote 2 (réplica)

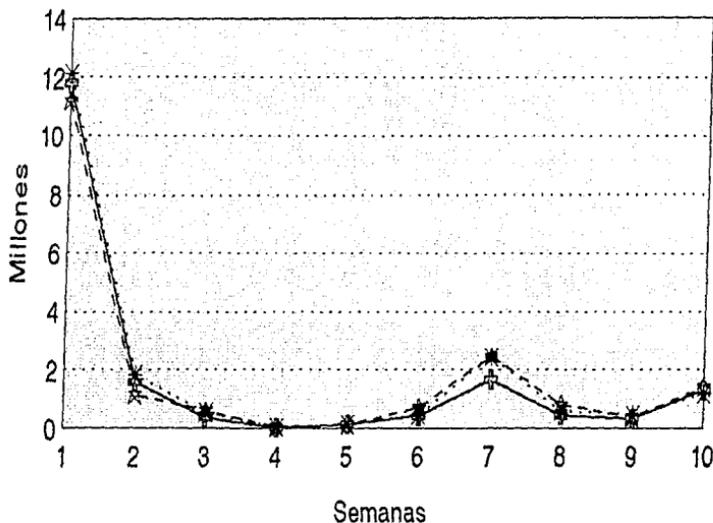
Semanas	Grupos	Conteo TSA	Conteo McC	Conteo VB
1	Experimental*	1.5×10^4	1×10^4	1.6×10^4
	Testigo (-)*	-	-	-
	Alimento exp.**	5.1×10^7	$3. \times 10^7$	4.1×10^7
	Experimental	5.1×10^4	3.3×10^4	3.5×10^4
2	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	1.7×10^7	1.58×10^7	1.3×10^7
3	Experimental	5.8×10^2	4.7×10^2	6.1×10^2
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	1.71×10^7	1.58×10^7	2.32×10^7
	Experimental	1.4×10^4	1.23×10^4	1.19×10^4
4	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	6.2×10^6	5.7×10^6	4.6×10^6
5	Experimental	-	-	-
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	8×10^6	1.04×10^7	1.27×10^7
	Experimental	-	-	-
6	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	2.74×10^7	2.58×10^7	2.64×10^7
7	Experimental	2×10^4	1.3×10^4	2.1×10^4
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	1.25×10^7	8.2×10^6	8.5×10^6
	Experimental	-	-	-
8	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	5.2×10^6	4.8×10^6	5.2×10^6
9	Experimental	-	-	-
	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	1.6×10^7	1.1×10^7	4.2×10^6
	Experimental	-	-	-
10	Testigo (-)	-	-	-
	Alimento exp.	2.42×10^7	1.01×10^7	3.44×10^7

* Concentración de *S. enteritidis* de 40 escarabajos muestreados

** Concentración de *S. enteritidis* de 1 g de alimento

Figura 1.- Concentración de *Salmonella enteritidis* PT-13-A (UFC/ml) a partir de *Alphitobius diaperinus* durante 10 semanas

Lote 1

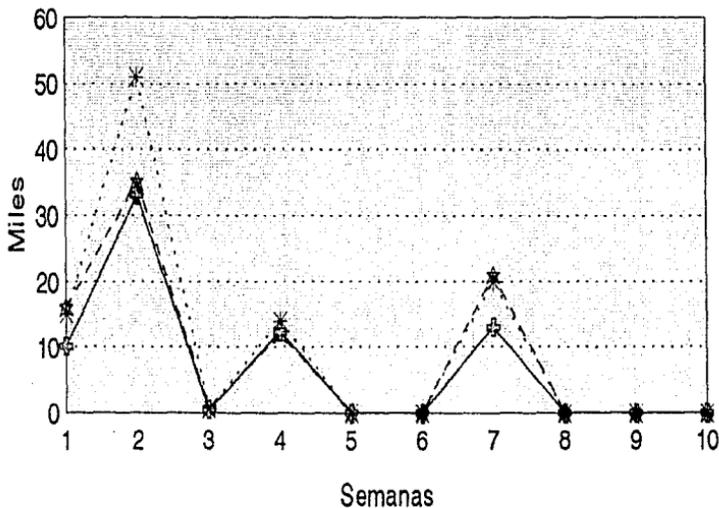


* TSA ◻ McC ◻ VB

(UFC/ml)

Figura 2.- Concentración de *Salmonella enteritidis* PT 13-A a partir de *Alphitobius diaperinus* durante 10 semanas

Lote 2 (réplica)

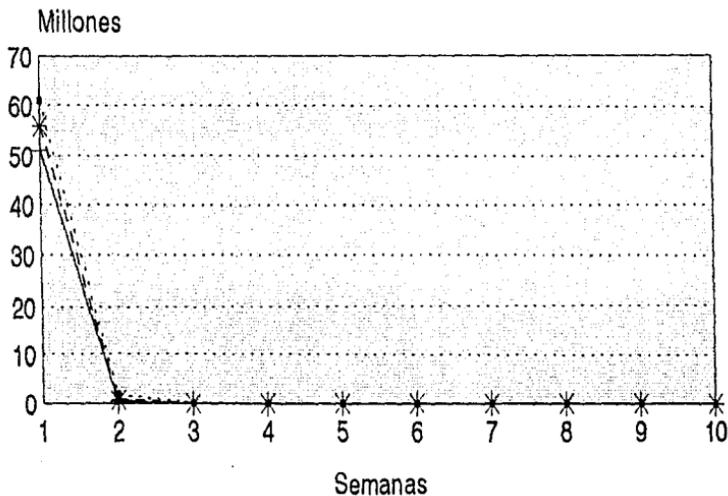


17

* TSA □ McC ☆ VB

(UFC/ml)

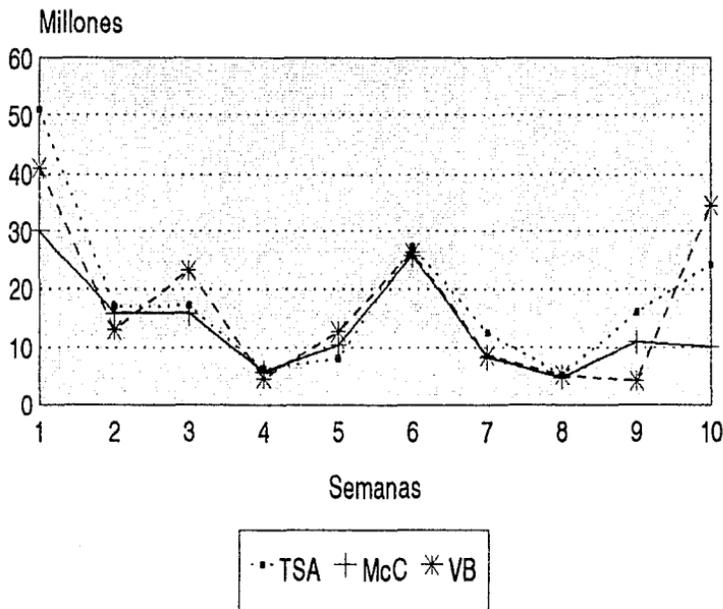
Figura 3-Concentración de *Salmonella enteritidis* PT 13-A
a partir del alimento contaminado por escarabajos
Lote 1



· · TSA + McC * VB

(UFC/ml)

Figura 4-Concentración de *Salmonella enteritidis* PT 13-A
a partir de alimento contaminado por escarabajos
Lote 2 (rèplica)



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el escarabajo *Alphitobius diaperinus* puede ser un portador de *Salmonella enteritidis* PT 13-A por largos periodos de tiempo.

Las variaciones tan grandes en las concentraciones de los escarabajos infectados durante las 10 semanas en ambos grupos, son parecidas a las obtenidas por De las Casas *et al* (1969), quien al contaminar alimento y escarabajos a una concentración de 5 a 6 X10⁶ UFC/ml con una cepa de *Salmonella typhimurium* por 4 días y al realizar diluciones seriadas de escarabajos macerados individualmente a los 4, 13 y 24 días, obtuvo variaciones significativas en ambos periodos de tiempo, principalmente a los 24 días, encontrando concentraciones con *S. typhimurium* de 1 X 10⁵ hasta escarabajos sin crecimiento de *S. typhimurium* (10).

En la misma forma las concentraciones de *S. enteritidis* PT 13-A encontradas en el alimento que contaminaron los escarabajos fueron semejantes a las encontradas por De las Casas *et al* (1969), al encontrar una disminución en la concentración de *S. typhimurium* del 50% entre el 4º al 13º día, semejándose a los obtenidos en el grupo 2 (réplica) y siendo igualmente variables al transcurrir las semanas. El crecimiento negativo obtenido en el grupo 1 a partir de la tercera semana, pudo deberse a una fermentación del alimento provocada por un exceso de humedad.(29, 34).

Por otro lado se debe pensar en el escarabajo *Alphitobius diaperinus* como vector mecánico, ya que en este trabajo se determinó la capacidad de contaminar un alimento estéril, al ser cambiados de un ambiente contaminado a otro completamente estéril. Las concentraciones de *S. enteritidis* PT 13-A fueron mas elevadas que la contaminación original, provocando de esta manera un ambiente permanentemente contaminado y explicando las observaciones de Baggesen *et al* (3), quien observó que la erradicación de *S. typhimurium* en dos granjas avícolas no se pudo llevar a cabo hasta la completa erradicación de *A. diaperinus*.

El tiempo real que *Alphitobius diaperinus* puede acarrear internamente y eliminar a bacterias del género *Salmonella* es variable según varios autores. McAllister *et al* (1994), al infectar escarabajos adultos por 24 horas con un alimento inoculado con *S. typhimurium* a una concentración de 3 X 10⁸,

observaron la eliminación de la bacteria en las heces de los escarabajos por 28 días en un 13% de la población muestreada, no muestreando más allá de estos días (30). Por otra parte Geissley y Kösters (1972), observaron que la eliminación de *S. thompson* en escarabajos adultos que se infectaron en un medio con una concentración de 10^8 se llevaba a cabo en 15 días (20).

De este modo, el presente trabajo nos indica que se debe tratar de realizar más réplicas en investigaciones posteriores, para asegurar con mas certeza la frecuencia en que se realiza el comportamiento de *S. enteritidis* PT 13-A en varios grupos de escarabajos.

CAPITULO II

INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN POLLITOS DE 2 DÍAS DE EDAD POR MEDIO DE
LA INGESTIÓN DE *Alphitobius diaperinus* ADULTOS INFECTADOS CON
Salmonella enteritidis PT 13-A DURANTE 10 SEMANAS

INTRODUCCIÓN

La transmisión de bacterias del género *Salmonella* ha sido estudiado por varios investigadores. McAllister *et al* (1994) bajo condiciones de laboratorio demostró la infección de pollitos de 1 día de edad al alimentarlos con un escarabajo adulto o una larva contaminada con *S. typhimurium* (30). Asimismo, Baggesen *et al* (1992) observaron la importancia del escarabajo al no poder eliminar una cepa de *S. typhimurium* en casetas avícolas hasta la erradicación de *A. diaperinus* aún con limpieza, desinfección extrema y con la remodelación de las construcciones (3).

Con lo antes citado, se hace necesario el estudio de la infección en pollitos alimentados con escarabajos infectados previamente con *S. enteritidis* PT 13-A para comprobar que *Alphitobius diaperinus*, es un reservorio capaz de mantener latentes bacterias del género *Salmonella* durante 10 semanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LOS ESCARABAJOS

Adultos de *Alphitobius diaperinus* libres de *Salmonella* sp se obtuvieron de una granja comercial de pollo de engorda localizada en Guadalajara, Jalisco.

Los escarabajos se llevaron al Laboratorio de Bacteriología y Micología del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde se muestrearon para comprobar la ausencia de *Salmonella* sp siguiendo la misma metodología utilizada en el capítulo I.

CEPA DE SALMONELLA

Se utilizó una cepa de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13-A (*S. enteritidis* PT 13-A) resistente al ácido nalidixico (AN) y Novobiocina (NO).

Se utilizaron como medios de cultivo Agar Verde Brillante (VB), Agar McConkey (McC) y Agar Trypticaseína Soya (TSA) adicionados con ácido nalidixico (AN) y novobiocina (NO)

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 50 pollitos de 1 día de edad libres de *Salmonella* spp adquiridos de una incubadora comercial localizada en Cuautla , Morelos.

Se realizó un muestreo aleatorio de 10 pollitos, sacrificándolos y tomando muestras de hígado, bazo, vesícula biliar y tonsilas cecales, los cuales se inocularon en Caldo Tetratonato se incubaron durante 24 horas a 37° C para resembrarlos en agar VB y agar McC durante 24 horas a 37°C para comprobar la ausencia de bacterias del género *Salmonella*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formaron dos grupos de 100 escarabajos cada uno. El grupo A (experimental) fue infectado por medio de la administración de un inóculo de 1×10^6 UF/ml de la cepa de *S. enteritidis* PT 13-A a razón de 10 ml por cada 35 g de alimento durante 6 días.

El grupo B (testigo negativo) se le administró PBS estéril a razón de 10 ml por cada 35 g de alimento durante 6 días.

Al día 7 ambos grupos se cambiaron a recipientes de plástico con 300 g de alimento esterilizado, manteniéndose durante 10 semanas a 30° C.

Se formaron dos grupos de pollitos con 10 pollitos cada uno, ambos con una réplica, a los cuales no se les proporcionó alimento por 24 horas, pero si se les proporcionó agua *ad libitum*.

Al grupo 1 (experimental) se le administró con 180 g de alimento comercial iniciador para pollo de engorda (18 g por pollo/día) con un macerado de 60 escarabajos infectados (6 escarabajos por pollo) durante el primer día. Del 2° al 7° día se les proporcionó 180 g de alimento al día sin macerado de escarabajos.

Al grupo 2 (testigo) se le administró con 180 g de alimento comercial iniciador para pollo de engorda (18 g por pollo/día) con un macerado de 60 escarabajos no infectados (6 escarabajos por pollo) durante el primer día. Del 2° al 7° día se les proporcionó 180 g de alimento al día sin macerado de escarabajos.

Al 8° día se sacrificaron ambos grupos de aves y se tomaron muestras de hígado, bazo y tonsilas cecales, inoculándose 1 g de órgano en 9 ml de CT durante 24 horas a 37° C, para posteriormente sembrarlos en cajas de VB, TSA y

McC adicionados con AN y NO para realizar el aislamiento e identificación bacteriana.

RESULTADOS

No se logró el aislamiento de *S. enteritidis* PT 13-A en ambos grupos de pollitos que fueron inoculados con escarabajos portadores de *S. enteritidis* PT 13-A sacrificados al 8o día de edad, tanto para los grupos experimentales; como para los grupos testigos.

DISCUSIÓN

El papel que desempeña el escarabajo *Alphitobius diaperinus* en su capacidad para transmitir *S. enteritidis* PT 13-A después de 10 semanas de haberse infectado experimentalmente a pollitos de 2 días de edad es cuestionable. Los pollitos que resultaron negativos al aislamiento de *S. enteritidis* PT-13-A-cuando fueron inoculados con escarabajos infectados durante 10 semanas, pudo deberse a que la concentración de bacterias que contenían los escarabajos a las diez semanas fue de 1.1 a 1.4×10^8 UFC/ml según el último muestreo realizado (Cuadro 1). McAllister *et al* produjo la enfermedad a pollitos de 1 día de edad cuando les administró un escarabajo o una larva infectada con *S. typhimurium* a una concentración de 3×10^8 UFC/ml (30).

La concentración utilizada por McAllister *et al* es muy alta e irreal en granjas avícolas según Davis and Wray, quienes mencionan que la cantidad promedio de bacterias del género *Salmonella* en granjas con problemas de salmonelosis es de 10^3 a 10^4 UFC/g de cama, asimismo ellos al muestrear escarabajos provenientes de dos granjas con problemas de *S. enteritidis* no pudieron aislar la bacteria de 500 escarabajos muestreados individualmente (8).

CAPITULO III

DETERMINACIÓN DEL ESCARABAJO *Alphitobius diaperinus* COMO VECTOR MECÁNICO Y BIOLÓGICO EN LA INFECCION CON *Salmonella enteritidis* PT 13-A EN POLLITOS DE 2 DÍAS DE EDAD

INTRODUCCIÓN

Entre las evidencias que existen en relación con el escarabajo *Alphitobius diaperinus* como vector mecánico o biológico y las infecciones de aves domésticas con bacterias del género *Salmonella* aún se desconocen.

Baggesen *et al* (1992) observaron que la erradicación de *S. typhimurium* en granjas infectadas se llevaba a cabo hasta la erradicación del escarabajo *Alphitobius diaperinus*, a pesar de limpieza y desinfecciones extremas (3). McAllister *et al* demostraron la infección de pollitos con *S. typhimurium* al ingerir larvas o adultos contaminados con un inoculo de 3×10^8 UFC/g (29).

Teniendo en cuenta lo antes citado se hace necesario determinar si el escarabajo *A. diaperinus* es capaz de infectar con *S. enteritidis* a pollitos de 2 días de edad, ya sea como vector mecánico y biológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LOS ESCARABAJOS

Adultos de *Alphitobius diaperinus* libres de *Salmonella* sp se obtuvieron de una granja comercial de pollo de engorda localizada en Guadalajara, Jalisco., los cuales se muestrearon para comprobar la ausencia de *Salmonella* sp siguiendo la metodología utilizada en los capítulos I y II.

CEPA DE SALMONELLA

Se utilizó una cepa de *Salmonella enteritidis* ser. *enteritidis* fagotipo 13-A (*S. enteritidis* PT 13-A) resistente al ácido nalidixico (AN) y novobiocina (NO) (36).

Se utilizaron como medios de cultivo para el aislamiento de *S. enteritidis* PT 13-A Agar Verde Brillante (VB), Agar McConkey (McC) y Agar Trypticaseina Soya (TSA), adicionados con 25 µg/ml de NO y 200 µg de AN. (2).

POLLITOS

Se utilizaron 40 pollitos obtenidos de una incubadora comercial libre de *Salmonella* sp, localizada en Cuautla, Morelos

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formaron dos grupos de escarabajos: el experimental con 300 ejemplares y el testigo negativo con 200 ejemplares, los cuales se albergaron en recipientes de plástico que contenían 300 g de alimento iniciador para pollo de engorda esterilizado durante 30 minutos a 120° C y 15 lb de presión, muestreándose antes y después de esterilizarlo para comprobar la ausencia de *Salmonella* spp.

Grupo A: (Grupo experimental)- Se le administró un inoculo de 1 X 10⁶ UFC/ml de la cepa de *S. enteritidis* PT 13-A a razón de 10 ml por cada 35 g de alimento durante 6 días.

Grupo B (Grupo testigo negativo)- Se le administró PBS estéril a razón de 10 ml por cada 35 g de alimento.

A los 7 días se formaron 3 grupos de escarabajos quedando de la siguiente manera:

Grupo 1 (testigo negativo)- Se tomaron 40 escarabajos del Grupo B, los cuales se muestrearon para determinar la ausencia de *S. enteritidis* PT 13-A.

Grupo 2 (escarabajos desinfectados externamente) Se tomaron 40 escarabajos del Grupo A, los cuales se muestrearon previamente para determinar la concentración (UFC/ml) de *S. enteritidis* PT 13-A (Diagrama 1).

Grupo 3 (escarabajos no desinfectados externamente)- Se tomaron 40 escarabajos del Grupo A, los cuales no fueron desinfectados externamente y se determinó la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A.

Al alimento contaminado se le determinó la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A como se describe en el Diagrama 2.

Al día 7 se formaron 4 grupos de pollitos de 1 día de edad con 10 pollitos cada grupo, a los cuales no se les proporcionó alimento durante 24 horas, pero si se les proporcionó agua *ad libitum*.

Grupo 1 (testigo negativo): Se les administró 180 g de alimento iniciador para pollo de engorda (18 g por pollo/día) con un macerado de 60 escarabajos no

infectados (6 escarabajos por pollito/día) durante el segundo día. Del 3° al 7° día se le proporcionó 180 g de alimento al día sin macerado de escarabajos y agua *ad libitum*.

Grupo 2 (Pollos alimentados con escarabajos desinfectados externamente): Se les administró 180 g de alimento iniciador para pollo de engorda con un macerado de 60 escarabajos infectados y desinfectados externamente durante el 2° día según la técnica de De las Casas *et al* (10) (Diagrama 1). Del 3er al 7° día se les administró alimento comercial sin macerado de escarabajos y agua *ad libitum*.

Grupo 3 (Pollos alimentados con escarabajos no desinfectados externamente): Se les administró 180 g de alimento iniciador para pollo de engorda con un macerado de 60 escarabajos infectados durante el 2° día. Dichos escarabajos no fueron desinfectados externamente. Del 3° al 7° día se les administró alimento comercial sin macerado de escarabajos y agua *ad libitum*.

Grupo 4 (pollitos con alimento contaminado): Se les administró durante el 2° día 180 g de alimento iniciador para pollo de engorda previamente inoculado con *S. enteritidis* PT 13-A de los escarabajos del Grupo A. Del 3° al 7° día se les administró alimento comercial estéril.

Al 8° día se sacrificaron todos los grupos de aves y se tomaron muestras de hígado, bazo y tonsilas cecales, sembrándose 1 g de cada órgano en 9 ml de CT durante 24 horas a 37° C, para posteriormente sembrarlos en cajas de VB, TSA y McC adicionados con AN y NO para realizar el aislamiento e identificación bacteriana.

Asimismo al 8° día se tomó 1 g de cama de cada grupo de pollitos, a la cual se le determinó la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A.

RESULTADOS

Los resultados de los muestreos realizados a los diferentes grupos de escarabajos y del alimento inoculado para determinar la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A se muestran en el Cuadro 3, observándose en general una mayor concentración de *S. enteritidis* PT 13-A en TSA, seguido por VB y McC, además de una concentración de *S. enteritidis* PT 13-A que se duplicó en los escarabajos que no se desinfectaron externamente.

En el cuadro 4 se pueden observar los aislamientos de *S. enteritidis* PT 13-A en los pollitos que se alimentaron con los escarabajos que se desinfectaron superficialmente, registrándose infección en el 60% de los pollitos y de éstos se aisló la bacteria en un 100 % de tonsilas cecales, seguido de hígado (20%) y 10 % de bazo.

En el cuadro 5 se observa el aislamiento de *S. enteritidis* PT 13-A en los pollitos que se alimentaron con los escarabajos que no fueron desinfectados superficialmente, infectándose el 50% de los pollitos y de éstos se aisló la bacteria en un 100 % de tonsilas cecales.

En el cuadro 6 se observan los aislamientos de *S. enteritidis* PT 13-A realizados en los pollitos que se alimentaron con alimento contaminado al 2º de día de edad, observándose un 100% de aislamiento de *S. enteritidis* PT 13-A, principalmente de tonsilas cecales (100 %), hígado (60%) y bazo (10 %).

No se obtuvo crecimiento bacteriano a partir del grupo testigo negativo.

La determinación de la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A a partir de la cama de los diferentes grupos muestreados al 8º día de edad se muestran en el cuadro 7. Se puede observar una contaminación de la cama con *S. enteritidis* PT 13-A en ambos grupos de pollitos que fueron alimentados con escarabajos al 2º día de edad con una concentración de 10^4 UFC/g, siendo ligeramente mayores en la cama de los pollitos inoculados con escarabajos que no fueron desinfectados superficialmente.

Cuadro 3
Concentración de *Salmonella enteritidis* PT 13 A (UFC/ml) en los diferentes grupos de escarabajos y alimento contaminados

Grupo	Medios utilizados		
	TSA	McC	VB
Testigo negativo	-	-	-
Escarabajos desinfectados externamente	1.34×10^6	8.6×10^5	1.44×10^6
Escarabajos no desinfectados externamente	3.56×10^6	4.7×10^5	7.2×10^5
Alimento experimental	8.4×10^7	5.7×10^7	6.3×10^7

Cuadro 4

Aislamiento de *Salmonella enteritidis* PT 13-A de pollitos inoculados al 2° día de edad con los escarabajos desinfectados externamente

Pollitos	Órganos	Medios utilizados		
		TSA	McC	VB
1	H ¹	-	-	-
	B ²	-	-	-
	TC ³	+	+	+
2	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
3	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
4	H	+	+	+
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
5	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
6	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
7	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
8	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
9	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
10	H	+	+	+
	B	+	+	-
	TC	+	+	+

1-Higado

2-Bazo

3-Tonsilas cecales

Cuadro 5

Aislamiento de *Salmonella enteritidis* PT 13-A de pollitos inoculados al 2° día de edad con escarabajos no desinfectados externamente

Pollitos	Órganos	Medios utilizados		
		TSA	McC	VB
1	H ¹	-	-	-
	B ²	-	-	-
	TC ³	+	+	+
2	H	+	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
3	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
4	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
5	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
6	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
7	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
8	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
9	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	-	-	-
10	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+

1-Hígado

2-Bazo

3-Tonsilas cecales

Cuadro 6

Aislamiento de *Salmonella enteritidis* PT 13-A a partir de pollitos inoculados al 2° día de edad con alimento contaminado

Pollitos	Organos	Medios utilizados		
		TSA	McC	VB
1	H ¹	+	+	+
	B ²	-	-	-
	TC ³	+	+	+
2	H	+	+	+
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
3	H	+	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
4	H	+	+	+
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
5	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
6	H	+	+	+
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
7	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
8	H	-	-	-
	B	+	+	+
	TC	+	+	+
9	H	-	-	-
	B	-	-	-
	TC	+	+	+
10	H	+	+	+
	B	-	-	-
	TC	+	+	+

1-Higado

2-Bazo

3-Tonsilas cecales

Cuadro 7

Concentración de *Salmonella enteritidis* PT 13 A (UFC/ml) a partir de la cama de los diferentes grupos de pollitos infectados con diferentes grupos de escarabajos y alimento contaminados

Grupos	Medios utilizados		
	TSA	McC	VB
Testigo negativo	-	-	-
Escarabajos desinfectados externamente	8.3×10^3	3.1×10^3	4.6×10^3
Escarabajos no desinfectados externamente	3.1×10^4	1.4×10^4	2.7×10^4
Alimento contaminado	7.8×10^5	5.2×10^5	1.010×10^6

DISCUSIÓN

En los muestreos realizados, para determinar la concentración de *S. enteritidis* PT 13-A, de los diferentes grupos de escarabajos utilizados para inocular a los grupos de pollitos de 2 días de edad, tuvieron como resultado una concentración de *S. enteritidis* PT 13-A que prácticamente se duplicó en los escarabajos que no se desinfectaron externamente con respecto a los que se les realizó la técnica descrita por De las Casas *et al* para la desinfección externa (9).

Asimismo *Alphitobius diaperinus* como portador mecánico de *S. typhimurium* fue investigado por McAllister *et al* (1994), al muestrear durante 16 días a escarabajos adultos lavados externamente y que fueron expuestos a un alimento contaminado, aislaron la bacteria de su superficie por 16 días a en un 77% de escarabajos muestreados (27).

Después de haber alimentado a los pollitos de 2 días de edad durante 24, horas con los escarabajos infectados con 1×10^8 UFC/ml de *S. enteritidis* PT 13-A durante 7 días, fue posible el aislamiento de *S. enteritidis* PT 13-A a los 7 días post-infección en los pollitos. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en el estudio 2 de este trabajo, donde no se logró la recuperación de *Salmonella* aún alimentando a los pollitos de la misma forma pero con escarabajos infectados de 10 semanas

Por otro lado, las concentraciones de *S. enteritidis* obtenidas de los muestreos realizados a la cama de los pollitos tratados con los diferentes grupos de escarabajos infectados, coinciden con los valores observados por Davis and Wray (7), sobre la concentración de bacterias del género *Salmonella* que se encuentran normalmente en el ambiente de las casetas avícolas (10^3 a 10^4 UFC/g).

La razón por la cual la recuperación de *S. enteritidis* PT 13-A en pollitos alimentados con escarabajos infectados previamente y desinfectados externamente fue mayor (60%) en comparación con los pollitos alimentados con escarabajos sin desinfección externa (50%) se desconoce. Se sugiere realizar más estudios con más repeticiones para determinar si los escarabajos que mantienen en su interior a *S. enteritidis* PT 13-A tienen mayor posibilidad de infectar a pollitos de 2 días de edad y también donde se pudiera obtener la recuperación de *Salmonella* en pollitos alimentados con escarabajos infectados

de diferentes semanas, con el objeto de conocer el momento óptimo para que los pollitos puedan enfermar y a su vez evitar este momento para un mejor control contra la infección de *Salmonella*.

DIAGRAMA 1

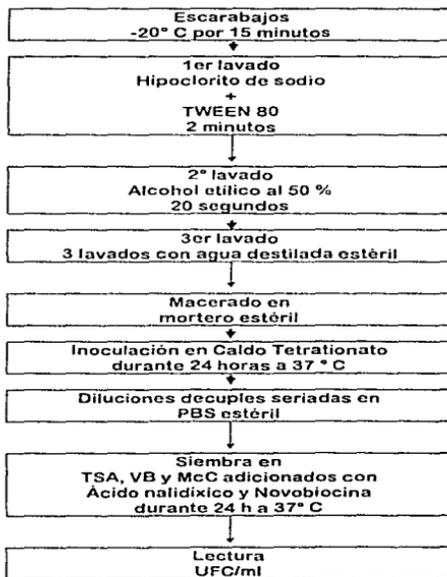
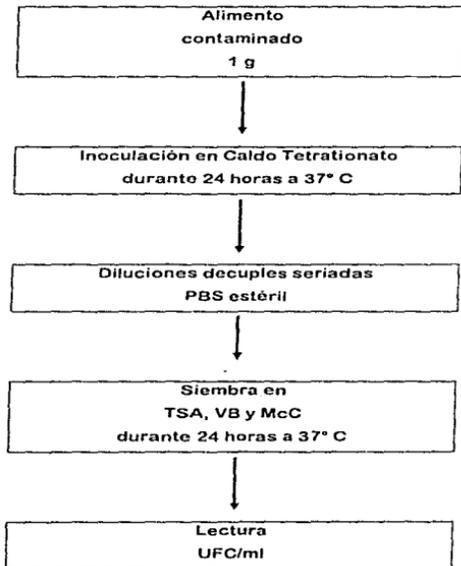
DESINFECCIÓN DE ESCARABAJOS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE
DE LAS CASAS *et al*

DIAGRAMA 2

**AISLAMIENTO DE *Salmonella* sp A PARTIR DE ALIMENTO Y CAMA
CONTAMINADO**



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en estos estudios indican que el escarabajo *Alphitobius diaperinus* es un portador de *Salmonella enteritidis* PT-13-A por largos periodos de tiempo, llegándose a recuperar la bacteria hasta las 10 semanas.

El escarabajo *Alphitobius diaperinus* se comporta como un vector mecánico, ya que es capaz de contaminar un alimento estéril aún con concentraciones mayores a la inoculada al alimento original, manteniendo un ambiente permanentemente contaminado.

Alphitobius diaperinus es capaz de portar externamente una cantidad de bacterias igual o mayores a la que portan internamente.

Con este trabajo fue posible infectar con *S. enteritidis* PT 13-A a pollitos de 2 días de edad cuando fueron alimentados con escarabajos infectados durante 6 días por esta bacteria sugiriéndose realizar mas repeticiones para confirmarlo.

En este trabajo el escarabajo *Alphitobius diaperinus* fue capaz de mantener un ambiente contaminado con la presencia de *S. enteritidis* PT 13-A, siendo necesario realizar mas repeticiones para asegurarlo.

LITERATURA CITADA

- 1-Acha, P. N. y Szyfres, P.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2ª ed. *Organización Panamericana de la Salud*, Washington 1992.
- 2-Andrews, H. W., Poelma, P. L., Wilson, C.R. and Romero.: Bacteriological analytical manual, 5th. De. *Association of Official Analytical Chemistry*, Washington, D. C. 1978.
- 3-Baggesen, D. L., Olsen, J. E. and Bisgaard, M.: Plasmid profiles and phage types of *Salmonella typhimurium* isolated from successive flocks of chicken on three parent stock farms. *Avian Pathol.*, **21**: 569-579 (1992).
- 4-Buck, F. D.: Tenebrionid Coleoptera from birds nests in Southern Sudan. *Entomol. Mon. Mag.* **92**: 12 (1956).
- 5-Clarke, R. C. and Gyles, C. L.: Salmonella. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Edited by: Gyles, C. L. and Thoen, C. O., 133-153. *University Press*, Ames, Iowa, 1993.
- 6-Comité de expertos de la OMS. Control de la salmonelosis: Importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal: *Organización Mundial de la Salud*, Serie de informes técnicos 744, Ginebra, Suiza. 9-11 (1988).
- 7-Crook, P. G., Novak, J. A. and Spilman, T. J.: The lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*, in the scrotum of *Rattus norvegicus*, with notes on other vertebrate association (Coleoptera, Tenebrionidae; Rodentia, Muridae). *Colleopt. Bull.*, **34**: 393-396 (1980)
- 8-Davies, R. H. and Wray, C.: Contribution of the lesser mealworm beetle (*Alphitobius diaperinus*) to carriage of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Vet. Rec.*, **137**:407-408 (1995).
- 9-Dávila, M., Rebollo, M. y Téllez, G.: Escarabajo *Alphitobius diaperinus* en la cama de las aves como vector de *Salmonella* spp y *Escherichia coli*, en explotaciones avícolas de la República Mexicana. Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Cancún, México; 1996: 291-293. ANECA México, D.F. (1996)

- 10-De las Casas, E., Pomeroy, B. S. and Harein, P. K.: Infection and quantitative recovery of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* from within the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poult. Sci.*, 47: 1871-1875 (1968).
- 11-De las Casas, E., Harein, P. K. and Pomeroy, B. S.: Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder houses. *Environ. Entomol.*, 1: 27-30 (1972).
- 12-De las Casas, E., Harein, P. K., Deshmukh, D. R. and Pomeroy, B. S.: Relationship between the lesser mealworm, fowl pox, and Newcastle disease virus in poultry. *J. Econ. Entomol.*, 69: 775-779 (1976).
- 13-Despins, J.I., Vaughan, J.A. and Turner, E.C.: Role of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), as a predator of the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), in poultry houses. *Colleopt. Bull.*, 42: 211-216 (1988).
- 14-Despins, Axtell, Rives, Guy and Ficken.: Transmission of enteric pathogens of turkeys by darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*). *J. Appl. Poultry Res.*, 3: 123-128, (1994)
- 15-Edwards, J. P. and Abraham, L.: Laboratory evaluation of two insect juvenile hormone analogues against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. stored Prod. Res.*, 21: 189-194 (1985).
- 16-Eidson, C. S., Schmittle, S. C., Goode, R. B. and Lal, J. B.: Induction of leukosis tumors with the beetle *Alphitobius diaperinus*. *Amer. J. Vet. Res.*, 27: 1053-1057 (1969).
- 17-Elowni, E. E. and Elbihari, S.: Natural and experimental infection of the beetle, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) with *Chaenotenia infundibulum* and other chicken tapeworms. *Vet. Sci. Comm.*, 3: 171-173 (1979).
- 18-Eugenio, C., De las Casas, E., Harein, P. K. and Mirocha, C. J.: Detection of the micotoxin F-2 in the confused flour beetle and the lesser mealworm. *J. Econ. Entomol.*, 63: 412-415 (1970).
- 19-Gall, A.: Are lesser mealworms worth the trouble they may cause?. *Poult. Dig.*, 22: 76-77 (1980).
- 20-Geissler, V. H. and Kösters, J.: Die hygienische bedeutung des getreidschimmelkoters (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) in der geflügelmost. *Dtsch. tierorztl. Wschr.*, 79: 177-204 (1972).

- 21-Gillingham, S.: Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis*. Memorias de la XVII Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta, México; 1992: 100-108. ANECA, México, D.F. (1992).
- 22-Harein, P. K., De las Casas, E., Pomeroy, B. S. and York, M. D.: *Salmonella* spp and serotypes of *Escherichia coli* isolated from the lesser mealworm collected in poultry brooder houses. *J. Econ. Entomol.*, **63**: 80-82 (1970).
- 23-Harein, P. K., De las Casas, E., Larsen, C. T. and Pomeroy, B. S.: Microbial relationship between the lesser mealworm and its associated environment in a turkey brooder houses. *Environ. Entomol.*, **1**: 189-194 (1972).
- 24-Harris, F.: Observations on the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer)., *J. Ga. Entomol. Soc.*, **1**: 17-18 (1966).
- 25-Harwood, R. F. y James, M. T.: Entomología Médica y Veterinaria. 1ª ed. Limusa: 131-134. México 1987.
- 26- Hopkins, J. D., Steelman, C. D. and Carlton, C. E.: Anatomy of the adult female lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) reproductive system. *J. Kansas Entomol. Soc.*, **65**: 299-307 (1992).
- 27-Koslov, V. I. Chernoteka *Alphitobius diaperinus* Panz. kak khishchnik kurinogo kleshca *Dermanyssus gallinae*. *Redi. Parazitologiya.*, **4**: 363-368 (1970).
- 28-Knowles, C. O.: Miscellaneous Pesticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology. Edited by: Hayes, W. J, Jr. and Laws, E. R, Jr. 1417-1516. *Academic Press Inc.*, San Diego, California, 1991.
- 29-Malone, G. W., Gedamu, N., Odon, E. M. and Saylor, W. W.: Yeast fermentation of poultry carcasses. Temperature carbohydrate and pathogen laboratory studies. *Poult. Sci Supp.*, **72**: 77 (1993).
- 30-McAllister, C. J., Steelman, C. D. and Skeeles, J. K.: Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Salmonella typhimurium* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.*, **31**: 369-372 (1994).
- 31-McAllister, J. C., Steelman, C. D., Newbwriry, L. A. and Skeeles, J. K.: Isolation of infection bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poult. Sci.*, **74**: 45-49 (1995).
- 32-Miller, R. W. and Reffern, R. E.: Feed aditives for control of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) in poultry broiler houses. *J. Econ. Entomol.*, **81**: 1137-1139 (1988).

- 33- Nagaraja, K. V., Pomeroy, B. S. y Williams, J. E.: Infecciones paratifoideas. En: Enfermedades de las aves. 9ª ed. Editado por: Calnek, B. W. 99-129. *El Manual Moderno*. México 1995.
- 34-Platz, S.: Survival of pathogenic bacteria and protozoa after short-time composting of poultry manure. Proceedings of a symposium held by the E. E. C. On animal and human health hazards associated with the utilization of animal effluents. Great Britain. 209-219 (1993).
- 35- Quintero, M. T.: Microfauna de insectos aislados de gallinaza en México. Memorias de la XIX Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta, México, 1994: 239-241. ANECA México, D. F. (1994).
- 36-Ram, D., Navarajan, A. V. and Agarwal, R. A.: Feeding potential and biology of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panz) (Col., Tenebrionidae) preying on *Corcyra cephalonica* St. (Lep., Pyralidae). *Z. Ang. Ent.*, 98: 444-447 (1984).
- 37-Safrit, R. D. and Axtell, R. C.: Evaluations of sampling methods for darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) in the litter of turkey and broiler houses. *Poult. Sci.*, 63: 2368-2375 (1984).
- 38-Smith, R.: Darkling beetle causes damage, nuisance complaint. *Feedstuffs*. June 1: 13 (1981).
- 39-Turner Jr., E. C.: Structural and litter pests. *Poult. Sci.*, 65: 644-648 (1986).
- 40-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).
- 41- Vaughan, J. A. and Turner Jr., E. C.: Infestation and damage of poultry house insulation by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poult. Sci.*, 63: 1094-1100 (1984).
- 42-Vaughan, J. A. and Turner Jr., E. C.: Residual and topical toxicity of various insecticides to the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.*, 77: 216-220 (1984).
- 43-Weaver, J. E. and Kondo, V. A.: Laboratory evaluation of insect growth regulators in producing lesser mealworm mortality and egg infertility. *J. Agric. Entomol.*, 4(39): 233-245. (1987)

44- Wilson, T. H. and Miner, F. D.: Influence of temperature on development of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, 42: 294-303 (1969).