

01672



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL: AVES**

**EVALUACION DE UNA VACUNA SUBUNITARIA  
(Nobilis E. coli™) CONTRA *Escherichia coli* EN LA  
INMUNIZACION DE GALLINAS REPRODUCTORAS  
PESADAS Y LA PROTECCION CONFERIDA  
A SU PROGENIE**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS  
A V E S**

**P R E S E N T A D A P O R**

**MVZ RUBEN MERINO GUZMAN**

**DIRECTOR DE TESIS: MVZ Ph D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS  
MVZ EPA JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ**



**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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL: AVES

EVALUACIÓN DE UNA VACUNA SUBUNITARIA (Nobilis E. coli™) CONTRA *Escherichia coli* EN  
LA INMUNIZACIÓN DE GALLINAS REPRODUCTORAS PESADAS Y LA PROTECCIÓN  
CONFERIDA  
A SU PROGENIE

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS: AVES  
PRESENTADA POR  
MVZ RUBÉN MERINO GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS:

MVZ Ph D GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS  
MVZ EPA JOSÉ ANTONIO QUINTANA LÓPEZ

MÉXICO, D. F.

1997

El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, en conjunción con las empresas

Reproductoras del Valle de México, S. A. de C.V.

Productora y Comercializadora Propollo, S. A. de C. V.

e

Intervet México, S. A. de C.V.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Antonio Quintana López, por su interés en mi superación personal y académica.

Al Departamento de Aves de la FMVZ, UNAM, especialmente al Dr. Guillermo Téllez I., por el apoyo recibido durante el transcurso de la maestría.

A los Dres. Alejandro Rojas, Felizardo León, Rafael Cázares, Rutilio Ruiz, y Martín Silva, por las facilidades prestadas para la realización del trabajo.

A los Dres. Rogelio Flores, Maritza Tamayo y Ricardo Salado por su confianza en mí para llevar a cabo el proyecto.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres:

**Juan Merino B. y Nohemí Guzmán M.**

mis hermanos

**Oscar y Elvira,**

y mis sobrinos

**Omar y Amauri**

por impulsarme a seguir siempre adelante.

A todas las personas que de una u otra forma han estado en los momentos importantes de mi vida.

DECLARACIÓN

El autor concede el derecho a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que disponga de esta tesis cuando se requiera cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

ATENTAMENTE



---

MVZ RUBÉN MERINO GUZMÁN

## RESUMEN

**Merino Guzmán, Rubén: Evaluación de una vacuna subunitaria contra *Escherichia coli* en la inmunización de gallinas reproductoras pesadas y la protección conferida a su progenie. (Bajo la dirección de MVZ PhD Guillermo Téllez Isaías y MVZ EPA José Antonio Quintana López)**

La vacunación es una medida de prevención y control de la colibacilosis tanto en aves reproductoras como en el pollo de engorda. Se evaluó una vacuna que contiene los antígenos F11 y FT de *Escherichia coli*, en 6,000 gallinas reproductoras Avian Farm vacunadas a las 12 y 18 semanas de edad, contra un grupo testigo de 4,000 gallinas sin vacunar. A las 26, 36, 46 y 56 semanas de edad se realizaron análisis bacteriológicos de muestras de huevo, y pruebas ELISA en muestras de suero. Al mismo tiempo de los muestreos, se incubaron huevos de ambos grupos, al nacer, 1500 pollos de cada grupo se alojaron en una caseta experimental; en pollos de cada grupo se realizaron estudios de bacteriología y serología al primero y séptimo días de edad; también se hicieron pruebas de desafío, bajo condiciones de laboratorio, con una cepa de *E. coli* en pollos de un día de edad, por vía intranasal e intraperitoneal. Se evaluaron los parámetros productivos de las gallinas y del pollo de engorda. El análisis bacteriológico del huevo resultó negativo en ambos grupos. En las gallinas experimentales se encontraron altos títulos de anticuerpos de las 26 a las 56 semanas, más huevos por gallina encasetada y mayor porcentaje de nacimientos de pollos de primera calidad ( $p < 0.05$ ). En el pollo de engorda experimental de la granja se aisló *E. coli* en menor porcentaje y se encontraron mayores títulos de anticuerpos ( $p < 0.05$ ); no hubo diferencias en los parámetros productivos ( $p > 0.05$ ). En los pollos desafiados intraperitonealmente se eliminó mejor la bacteria inoculada ( $p < 0.05$ ). La vacuna produjo títulos de anticuerpos altos y consistentes en las gallinas, que se transfirieron a su progenie. Se justifica el uso de la vacuna en gallinas reproductoras por la mayor cantidad de huevos por gallina encasetada y más nacimientos de pollos de primera calidad.

Palabras clave: *E. coli*, vacunación, reproductoras pesadas, pollos, ELISA, anticuerpos FT y F11.



## SUMMARY

**Merino Guzmán, Rubén: Evaluation of a subunitary *Escherichia coli* vaccine on heavy breeder hens immunization and the protection conferred to their progeny.** (Directed by PhD MVZ Guillermo Téllez Isaías and EPA MVZ José Antonio Quintana López)

Vaccination is a measurement of colibacillosis prevention and control in heavy breeders and in broiler chickens. A subunitary vaccine that contains the F11 and FT *Escherichia coli* antigens was evaluated: 6,000 Avian Farm breeder hens were immunized at 12 and 18 weeks old, a control group of 4,000 hens was left without vaccination. At 26, 36, 46 and 56 weeks old, bacteriological and serologic (ELISA) tests on eggs and serum samples, respectively, were carried out. On the same dates, eggs of both groups were incubated, in the beginning, 1500, 1 day old chicks of each group were raised in an experimental house; bacteriological and serological studies were performed in chickens from each group on day 1 and day 7; challenge tests, under laboratory conditions, were carried out with a *E. coli* strain in one day old chicks, both intranasal and intraperitoneal routes. The productive performance of breeder hens and broiler chickens were evaluated. The bacteriological egg analysis was negative in both groups. High antibody titers were seen from 26 to 56 weeks old, with more eggs per housed hen and a higher percentage of first quality chicks births ( $p < 0.05$ ), in the experimental group. In experimental broiler chickens from the farm, *E. coli* was isolated in a minor percentage, and had higher antibodies titers ( $p < 0.05$ ); there were no differences in the productive performance between the groups ( $p > 0.05$ ). In the intraperitoneally challenged chickens the inoculated bacteria was better eliminated ( $p < 0.05$ ) than in the control group. The vaccine produced high and consistent antibodies titers in breeder hens, and were transferred to their progeny. Vaccinating breeder hens is justified by the greater quantity of eggs per housed hen and more first quality broiler chicks births.

Keywords: *E. coli*, vaccination, breeder hens, broilers, ELISA, FT and F11 antibodies.

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	I
<b>SUMMARY</b>	II
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 La industria del pollo de engorda	1
1.2 Colibacilosis	2
1.2.1 Definición	2
1.2.2 Etiología	3
1.2.3 Factores de patogenicidad asociados a la colisepticemia	3
1.2.3.1 Adherencia	4
1.2.3.2 Cápsula	5
1.2.3.3 Sideróforos	5
1.2.3.4 Endotoxinas	6
1.2.3.5 Exotoxinas	6
1.2.3.6 Colicina V	6
1.2.3.7 Otros factores de Patogenicidad	7
1.2.4 Signos y lesiones	7
1.2.5 Diagnóstico	9
1.2.5.1 Prueba ELISA para evaluar la inmunidad humoral	9
1.2.6 Prevención y control	10
1.2.7 Vacunación	11
1.3 JUSTIFICACIÓN	14
1.4 HIPÓTESIS	15
1.5 OBJETIVOS GENERALES	15
1.6 OBJETIVOS PARTICULARES	15

<b>CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
2.1 Vacuna utilizada	17
2.2 Aves	17
2.3 Prueba serológica	18
2.4 Prueba microbiológica	18
2.5 Pruebas de desafío	18
2.6 Cepa bacteriana	18
2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	18
2.7.1 Gallinas reproductoras	18
2.7.1.1 Selección, alojamiento y vacunación de las gallinas reproductoras	18
2.7.1.2 Evaluación bacteriológica en la granja de las gallinas reproductoras a partir de huevos colectados directamente del nido inmediatamente después de la ovoposición	20
2.7.1.3 Evaluación serológica de las gallinas reproductoras, mediante el empleo de la prueba ELISA.	20
2.7.1.4 Evaluación de los parámetros productivos de las gallinas reproductoras	21
2.7.1.5 Análisis estadístico	21
2.7.2 Pollos de engorda	22
2.7.2.1 Selección y alojamiento de pollos progenie de las gallinas vacunadas y sin vacunar	22
2.7.2.2 Evaluación bacteriológica en la granja del pollo de engorda al primero y séptimo día de edad	23
2.7.2.3 Evaluación serológica del pollo de engorda, mediante el empleo de la prueba ELISA, al primero y séptimo día de edad.	24
2.7.2.4 Pruebas de desafío con una cepa patógena de <i>E. coli</i> , en pollos de un día de edad	24
2.7.2.5 Evaluación de los parámetros productivos	27
2.7.2.6 Análisis estadístico	27

<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS</b>	28
3.1 Gallinas reproductoras	28
3.1.1 Análisis bacteriológico	28
3.1.2 Análisis serológico	28
3.1.3 Parámetros productivos	30
3.2 Pollo de engorda	30
3.2.1 Análisis bacteriológico	30
3.2.1 Análisis serológico	31
3.2.3 Pruebas de desafío	33
3.2.4 Parámetros productivos	33
<b>CAPÍTULO 4. DISCUSION</b>	35
4.1 Gallinas reproductoras	35
4.2 Pollos de engorda	38
<b>LITERATURA CITADA</b>	44
<b>APÉNDICE</b>	51
<b>1. Técnicas</b>	51
1.1 Técnica de Gentry para el conteo de coliformes en cascarón de huevo.	51
1.2 Técnica de williams para determinar la penetración de gérmenes a través del cascarón.	51
1.3 Pruebas bioquímicas que caracterizan a <i>E. coli</i> .	52
<b>2. Cuadros y figuras</b>	53
Cuadro A Prueba preliminar para constatación y elección del aislamiento de campo de <i>E. coli</i> que se utilizó en las pruebas de desafío.	53

Cuadro B	Escala de lesiones en las aves desafiadas.	54
Cuadro 1	Títulos de anticuerpos anti FT (Log2) en sueros de gallinas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	55
Cuadro 2	Títulos de anticuerpos anti F11 (Log2) en sueros de gallinas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	56
Figura 1	Títulos de anticuerpos anti FT en gallinas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	57
Figura 2	Títulos de anticuerpos anti F11 en gallinas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	58
Figura 3	Porcentaje de producción de huevo de gallinas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	59
Cuadro 3	Parámetros productivos a las 61 semanas de edad en gallinas reproductoras pesadas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	60
Cuadro 4	Porcentaje promedio de aislamiento de <i>E. coli</i> en pollos de engorda al primer y séptimo día de edad a partir de órganos internos.	61
Cuadro 5	Títulos de anticuerpos contra los antígenos FT y F11 de <i>E. coli</i> en pollos progenie de madres vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	62
Figura 4	Títulos de anticuerpos anti FT en pollos de un día de edad nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i>	63
Figura 5	Títulos de anticuerpos anti F11 en pollos de un día de edad nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i>	64
Figura 6	Títulos de anticuerpos anti FT en pollos de 7 días de edad nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i>	65
Figura 7	Títulos de anticuerpos anti F11 en pollos de 7 días de edad nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i>	66
Figura 8	Títulos de anticuerpos anti FT en gallinas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> , transferencia de éstos a su progenie y medición de los mismos a los siete días de edad de los pollos.	67

Figura 9	Títulos de anticuerpos anti F11 en gallinas vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> , transferencia de éstos a su progenie y medición de los mismos a los siete días de edad de los pollos.	68
Cuadro 6	Porcentaje de mortalidad en pollos de engorda desafiados con <i>E. coli</i> al día de edad por diferentes rutas.	69
Cuadro 7	Porcentaje de recuperación de la <i>E. coli</i> de desafío a partir de órganos de pollos sobrevivientes 14 días postinoculación.	70
Cuadro 8	Resumen de los parámetros productivos de pollos de engorda nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra <i>E. coli</i> .	71

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 La industria del pollo de engorda

La avicultura en México es la actividad pecuaria más tecnificada y la que proporciona proteína de origen animal más económica al consumidor. Esta avicultura se conforma por explotaciones con diversos grados de tecnología, ya que existen empresas con estrictos programas sanitarios para la prevención y control de enfermedades y también hay granjas cuyos niveles sanitarios son mínimos, provocando que algunas enfermedades se difunda ampliamente (Le Lurier, 1990).

En la operación comercial de pollo de engorda interactúan factores que afectan el costo final de la producción de carne. Dichos factores varían desde el costo y calidad de ingredientes alimenticios, hasta la salud de las aves, así como los objetivos de producción en la granja, edad al salir al mercado, y en el rastreo, porcentajes de merma y decomiso. Entre los factores que contribuyen a la variación normal en una operación de pollo de engorda, se encuentran la edad de las reproductoras y la incidencia de la contaminación con *Pseudomonas* y coliformes, que aumenta conforme avanza la edad de la gallina (Padrón, 1992; Robey, 1995). Por lo anterior, algunos autores como Dekich (1992) y Quintana (1991), sugieren que el primer requisito para lograr un manejo exitoso de pollitos durante la crianza (tres primeras semanas de vida) es la buena calidad de los pollitos, con inmunidad materna adecuada.

Los problemas comúnmente asociados con la mortalidad durante la primera semana de vida son la infección del saco vitelino y deshidratación, y se consideran consecuencias únicas de un pollito de mala calidad. Problemas menos

obvios que no causan mortalidad en la primera semana, causan problemas en la producción que pueden ser más costosos que las pérdidas durante el período mencionado. En términos generales, los problemas de calidad del pollito son: Infección del saco vitelino, deshidratación, aspergilosis, traumatismos, deformaciones, y cicatrización inadecuada de ombligos por problemas en la temperatura de incubación (Hill, 1995).

Los pollitos que no nacen son recursos y oportunidades desperdiciadas que no producen utilidades. Los métodos para reducir las pérdidas están encaminados a mejorar el manejo del huevo, la carga y transferencia de éstos, y la ventilación de la incubadora y nacedora; ya que cuesta igual producir, manejar e incubar un huevo que no es viable como un huevo que produce un pollito sano (Mauldin, 1991; Taylor, 1995). Por otro lado, la producción de huevo incubable libre de contaminaciones que asegure la obtención de pollito recién nacido de buena calidad, es una preocupación y objetivo constante en la industria avícola. La introducción de huevos ya contaminados en su interior a las máquinas incubadoras, representa pérdidas por mortalidad embrionaria y posteriormente por mortalidad del pollito en los primeros días de vida y un marcado retraso en el crecimiento. También se considera que *Escherichia coli* puede ser causa de aerosaculitis y colisepticemia en pollitos que se han infectado en la nacedora (Padrón, 1992).

## **1.2 COLIBACILOSIS**

### **1.2.1 Definición**

La colibacilosis de las aves es una infección sistémica causada por *Escherichia coli* (*E. coli*). La enfermedad tiene importancia económica en la avicultura de todo el mundo. Otros nombres para la enfermedad son colisepticemia e infección por *E. coli*. Con frecuencia la colibacilosis ocurre como



una septicemia aguda o aerোসaculitis y poliserositis en pollos de engorda jóvenes y pollitas de reemplazo. Por lo general se requiere de factores ambientales adversos u otros agentes infecciosos para que las infecciones por *E. coli* se vuelvan clínicamente aparentes (Avellaneda, 1994; Gross, 1990 y 1991).

### **1.2.2 Etiología**

La *E. coli* se conoce desde 1885, cuando Escherich describió las propiedades de un microorganismo, al que llamó *Bacterium coli commune*, que identificó en heces de recién nacido. Luego se conoció como *Bacterium coli* y después como *E. coli*. Pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, y de las siete tribus de ésta, la *E. coli* pertenece a la tribu 1: *Escherichiae* (Rodríguez, 1990).

La *E. coli* es un bacilo Gram negativo, no ácido resistente, de tinción uniforme, no esporulado, generalmente de 2 -3 x 0.6 µm. El organismo puede variar de tamaño y forma, y muchas cepas son móviles, con flagelos peritricos. Las colonias crecen bien en medios ordinarios dentro de un amplio rango de temperaturas. Los aislamientos patogénicos no pueden ser diferenciados fácilmente por medio de pruebas bioquímicas de los no patógenos. Se ha clasificado un gran número de serotipos de *E. coli* con base en sus antígenos O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares). Por muchos años los serotipos más comunes en las aves han sido O1, O2, O35 y O78. Muchos otros serotipos no han sido encontrados con la misma frecuencia (Allan, 1993) y algunos que son patógenos y han sido aislados, no pertenecen a ningún serotipo conocido o no son tipificables.

### **1.2.3 Factores de patogenicidad asociados a la colisepticemia**

Aún existe una falta de conocimiento referente a los factores esenciales de virulencia en la patogénesis de la colibacilosis en las aves (Frommer, 1990; Salyers, 1994), además de que la reproducción experimental de la colibacilosis

necesita de factores desencadenantes (virus, micoplasmas) para permitir la producción de las lesiones típicas de la enfermedad y la mortalidad en los pollos (Bree, 1989). Se han identificado algunos factores de virulencia, dentro de ellos: fimbrias de tipo 1, responsables de la adhesión al epitelio respiratorio; el sistema aerobactina de captación de hierro, permite la multiplicación dentro de los líquidos fisiológicos; los antígenos de superficie, como el antígeno K1, que interfiere con las defensas inmunes del hospedador; la presencia de otras fimbrias (tipo P), y diversas toxinas cuyo papel está por aclararse (Dho-Moulin, 1990 y 1993).

#### **1.2.3.1 Adherencia**

Hay reportes sobre la existencia de fimbrias en cepas de *E. coli* aisladas de pollos (Dho-Moulin, 1990; Dozois, 1993; Hacker, 1990; Van Den Bosch, 1993). La adhesión por medio de la fimbria a las células epiteliales respiratorias es el primer paso en la infección septicémica (Frommer, 1990). Esta adherencia se ha caracterizado en los serotipos O1 y O78 por poseer fimbria tipo 1 como adhesina que se expresa al cultivar *E. coli* a temperaturas mayores de 30°C, y por la demostración de que D-manosa actúa como receptor endógeno celular (Suwanichkul, 1986). Hay dos formas de la fimbria tipo 1 MS (Mannose sensitive): una sólo exhibe la ya conocida actividad MS semejante a la lectina, que requiere un sustrato de glicoproteínas con manosa; la otra forma exhibe, además de la actividad mencionada, la unión a las regiones no glicosiladas de las proteínas en una forma MS (Sokurenko, 1992).

Por ahora, las llamadas fuerzas de Van Der Waals son la principal fuente de atracción que participa en el acercamiento bacteria-célula. La adherencia específica permite superar los mecanismos fisiológicos de defensa del hospedador, con ello, colonizarlo, multiplicarse y alcanzar tejidos más profundos (González, 1992).

Existe una gran diversidad de fimbrias, pero su relación con la virulencia es aún incierta, aunque se han asociado algunas secuencias de ADN de los sistemas fimbriales con la septicemia y la letalidad en pollos y pavos (Dozois, 1992). Al hacer estudios sobre los factores de adherencia, como la presencia de pili, en la patogenicidad de *E. coli*, ninguno de estos factores se ha podido correlacionar absolutamente con la patogenicidad pos-colonización (Frommerr, 1990). Cada uno de los serotipos O1, O2 y O78 expresa sólo un tipo de pili (microvellosidad), con una pequeña diferencia en los pesos moleculares de las subunidades que los conforman. Los pili del serotipo O78 son del tipo 1, no así los de los serotipos O1 y O2. Los del serotipo O2 tienen reacción cruzada con suero anti tipo 1, esto sugiere la presencia de epítopes antigénicos comunes entre estas vellosidades (Suwanichkul, 1986).

#### **1.2.3.2 Cápsula**

Las cápsulas polisacáridas K confieren resistencia a la fagocitosis por interferencia mecánica e incremento en la resistencia al suero al inhibir la adsorción de opsoninas séricas. Como consecuencia, *E. coli* atraviesa el epitelio y se disemina a través de la sangre (González, 1992). El antígeno de la cápsula de las cepas del serogrupo O2, es capaz de interrumpir la cascada del complemento (Cross, 1990).

#### **1.2.3.3 Sideróforos**

Existen dos sistemas de alta afinidad de *E. coli* al hierro que compiten con las transferrinas, lactoferrinas y ovotransferrinas séricas que lo transportan en la sangre. Uno es el sistema enteroquelina que es codificado por cromosomas y es menos hábil que las transferrinas; y el sistema aerobactina que es codificado por plásmidos o cromosomas y es más eficiente in vivo que las transferrinas por el hierro, con ello, facilita la multiplicación de la bacteria en sangre y tejidos (González, 1992).

La resistencia al suero y el transporte de hierro mediados por la aerobactina fueron la característica prevalente en un estudio realizado en 115 cepas de *E. coli*, de aquí que se piense, al menos para la cepa S20, que éstos son los factores de virulencia más importantes en estas cepas (Ike, 1992).

#### **1.2.3.4 Endotoxinas**

La endotoxina y la hemolisina de *E. coli* están asociadas con la habilidad de producir enfermedad, al considerarse responsables por los cambios bioquímicos y la producción de exudados que son típicos en la colibacilosis (Goren, 1991).

#### **1.2.3.5 Exotoxinas**

Se ha obtenido una toxina bacteriana que es letal para pollos de dos semanas de edad, denominada CLT (Chick Lethal Toxin). Ésta es termolábil, antigénica, de peso molecular de 80 a 120 kDa, inactivada por enzimas proteolíticas, codificada por el plásmido Vir (González, 1992).

Es posible que la elaboración de toxinas durante la colonización cause enterotoxicidad o daño a la mucosa intestinal y permite a *E. coli* penetrar y crear la condición colisepticémica subsecuente. Estas toxinas pueden ser una termolábil citotóxica para las células Vero y Y1 en cultivo, y una verotoxina (activa sólo contra las células Vero) (Emery, 1992).

#### **1.2.3.6 Colicina V**

Las colicinas son sustancias antibióticas producidas por algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y que tienen acción letal contra las cepas sensibles relacionadas filogenéticamente. Entre las colicinas más estudiadas están la V, A, B, Ia, Ib, K, N y Ei. El plásmido ColV que codifica la colicina V se encontró primeramente en bacterias entéricas virulentas y ha demostrado que codifica varias propiedades relacionadas con la virulencia. En la colisepticemia se

considera a la colicina V sólo como un marcador de la presencia del plásmido ColV. Éste a su vez, puede acarrear genes que codifican un sideróforo parecido a Aerobactina, resistencia a los factores bactericidas del suero, un factor de colonización para el epitelio intestinal del ratón y propiedades hidrofóbicas que hacen a la bacteria autoaglutinable y por lo tanto, resistente a la fagocitosis. La frecuencia del plásmido ColV en la colisepticemia aviar se ha obtenido en 62% de los casos (Vidotto, 1990).

#### **1.2.3.7 Otros factores de Patogenicidad**

Se mencionan también como factores de virulencia: la invasión para células HeLa y a fibroblastos de embrión de pollo, aunque esta invasión en algunos casos no está relacionada con la patogenicidad. La resistencia al suero puede deberse a la presencia de plásmidos conjugables que expresan la proteína de membrana externa TraT, responsable del fenómeno de exclusión de superficie y que habilita a la bacteria que la posee a resistir la actividad bactericida del suero. La resistencia al suero parece ser un determinante importante de la virulencia de *E. coli*, sin embargo, el requerimiento de otros factores de virulencia, además de la resistencia al suero, se sugirió por el hallazgo de algunas cepas resistentes al suero que fueron avirulentas en pavos (Ellis, 1988).

Se ha demostrado también que algunas cepas de *E. coli* que son apatógenas o presentan dosis letales 50% muy altas ( $DL_{50}$ ), no expresan dos subunidades proteicas principales de 40.7 kDa y 28.8 kDa, por lo tanto se piensa que estas proteínas pueden participar en el proceso patogénico de cepas de *E. coli* septicémicas en las aves (Dozois, 1993, Fantinatti, 1994).

#### **1.2.4 Signos y lesiones**

Clínicamente se pueden distinguir dos estadios de la enfermedad. En el primero se observan signos como conjuntivitis, rinitis y sonidos respiratorios

anormales. En el segundo, dominan signos de la enfermedad general, tales como: depresión y mal emplume. En todos los casos se puede encontrar aerosaculitis, que a menudo se acompaña de pericarditis y perihepatitis. Una vez inhaladas, las bacterias pueden adherirse a la mucosa del tracto respiratorio, invadirlo y causar bacteremia. Las toxinas que *E. coli* produce (endotoxinas y hemolisinas) son las responsables por los cambios bioquímicos y la producción de exudados que son típicos en la colibacilosis (Goren, 1991).

Las infecciones por *E. coli* en pollos de engorda incluyen: infección del saco vitelino, enfermedad respiratoria crónica complicada, colisepticemia, salpingitis, peritonitis, neumonía, onfalitis, enteritis, aerosaculitis, infecciones articulares, sinovitis, osteomielitis, panoftalmítis, encefalitis, otitis, y todas aquellas condiciones patológicas causadas entera o parcialmente por *E. coli* (Baliarsingh, 1993; Rodríguez, 1990). Estas infecciones pueden tener como consecuencia un incremento en la mortalidad embrionaria y a edad temprana del pollito, reducción en la ganancia de peso, disparidad en el crecimiento, incremento en la mortalidad total, baja en la calidad de la canal y aumento en las tasas de decomiso. La corrección de las condiciones causadas por *E. coli* es responsable de importantes pérdidas económicas, así como el uso intensivo e indiscriminado de antimicrobianos en la industria avícola.

Muchos factores pueden contribuir a la incidencia de infecciones por *E. coli*, por lo cual son consideradas como infecciones secundarias, como es el caso del Síndrome de la Cabeza Hinchada, en el cual se ha reportado que las cepas de *E. coli* que se asocian, son genéticamente diferentes a las cepas que producen colibacilosis (White, 1990 y 1993).

### **1.2.5 Diagnóstico**

De un caso clínico sospechoso de colibacilosis es suficiente un aislamiento característico de colonias lactosa positivas de *E. coli* en los medios McConkey o EMB, a partir de los órganos implicados, y se requieren algunas pruebas bioquímicas para emitir el diagnóstico, como son: reacción en TSI, producción de indoi, y negativo a la urea y el citrato. Este diagnóstico depende de la distinción de las cepas patógenas de *E. coli* de las cepas no patógenas (contaminantes). El sitio de colección de la muestra, condición del cadáver, y naturaleza de la lesión son utilizados para decidir hasta dónde el aislamiento de *E. coli* es relevante. Aunque las cepas patógenas aisladas de aves ocurren comúnmente a partir de serotipos del antígeno somático O78, O2, O1, O35 y O36, un gran número de otros serotipos pueden ser altamente patógenos. Los serotipos O78:K80 y O2:K1 de *E. coli* son particularmente capaces de ser patógenos. La serotipificación rutinaria de *E. coli* usualmente es impráctica, pero puede ser de utilidad para estudios epidemiológicos. La colibacilosis debe distinguirse de otros patógenos bacterianos capaces de causar septicemia fatal o inflamación fibrinopurulenta de los sacos aéreos, pericardio, articulaciones y otras vísceras. Las enfermedades a considerarse en el diagnóstico diferencial incluyen: micoplasmosis, salmonelosis, pastereiosis, pseudotuberculosis, erisipela, clamidiosis, y estafilococosis. La colibacilosis es una complicación común de infecciones entéricas o respiratorias concurrentes (Arp, 1989).

#### **1.2.5.1 Prueba de ELISA para evaluar la inmunidad humoral**

La prueba ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) se ha utilizado como técnica serológica para determinar la seroconversión en aves vacunadas, mediante la detección de anticuerpos contra *E. coli*. La ELISA ha demostrado ser un ensayo más sensible y reproducible que la prueba de hemaglutinación indirecta, la cual es un método usado para detectar anticuerpos contra *E. coli*. En aves inmunizadas con *E. coli* inactivada se han encontrado altos niveles de

correlación entre los anticuerpos detectados por ELISA y la sobrevivencia después del desafío. Por otra parte, la ELISA es una de las pruebas de elección para la detección de anticuerpos en parvadas sospechosas de haber sido infectadas con *E. coli* (Leitner, 1990).

También se desarrolló una prueba ELISA para la detección y cuantificación de anticuerpos anti FT y anti F11 en muestras de suero de ave (Intervet International, SOP 5613.018.01 y SOP 5613.016.01, 1993).

#### **1.2.6 Prevención y control**

La prevención de la colibacilosis se basa principalmente en las medidas para disminuir la intensidad de la infección, optimizar el clima de las casetas y la condición general de los animales. La higiene y la alimentación ayudan a mejorar las medidas de prevención y reducen la transmisión horizontal; otras prácticas favorables son la crianza de aves libres de *Mycoplasma*, reducción de la exposición de las aves a virus que causen enfermedades respiratorias, reducción de amoníaco y polvo en el aire de las casetas, eliminación de factores de estrés y la adopción de un sistema "todo dentro - todo fuera".

A pesar de estas medidas, la colibacilosis continúa siendo una enfermedad importante en la industria de pollos de engorda. Por esto, aún es necesaria la aplicación extensiva de antimicrobianos. Los altos costos y el desarrollo de resistencia son los puntos desfavorables de este sistema. Aunado al aumento en la resistencia a los antimicrobianos, se han incrementado los problemas de *E. coli*. Los antibacterianos más antiguos, en la actualidad, son de poca utilidad en la mayoría de los casos. Por otro lado, se ha notado un aumento en la selección de cepas resistentes a drogas nuevas, tales como las quinolonas de segunda y tercera generación. Ha aumentado la resistencia de *E. coli* a antimicrobianos como la Sulfa -Trimetoprim, Apramicina, Danofloxacin, Fosfomicina,



Enrofloxacin, y Tetraciclina (Aleson, 1996; Botero, 1996; Goren, 1991; Márquez, 1997; Urquiza, 1997).

A nivel experimental, y como consecuencia de la preocupación por los aspectos relacionados con los residuos de drogas en los productos de origen animal, se estudia el uso de estimuladores del aparato inmunocompetente, que son entidades químicas que activan o sensibilizan al aparato inmune celular que, cuando aumenta su respuesta, puede dar como resultado la prevención o la reducción de las enfermedades causadas por los microorganismos infecciosos. Por ejemplo, la activación de los macrófagos puede generar una mayor respuesta del sistema inmune y la eliminación de los patógenos invasores. En el caso de la colibacilosis se ha utilizado el lipopolisacárido (LPS), que es un componente de la pared celular de las bacterias gram negativas, como inmunoestimulante que reduce la mortalidad y lesiones en aves desafiadas con *E. coli* (McGruder, 1996). Se han utilizado también el *Aloe vera* y el Yatrén-caseína como inmunoestimuladores para aumentar la respuesta inmune tanto humoral como celular contra *Salmonella enteritidis* y el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio (Balcázar, 1996). También se ha estudiado la prevención de la colonización e invasión cecal de *E. coli* a través de la exclusión competitiva (Nisbet, 1997).

### **1.2.7 Vacunación**

La vacunación es una de las medidas para proteger a los pollos contra las influencias negativas de las infecciones con *E. coli* (Chait, 1997; Frommer, 1994; Ikemori, 1993; Wang, 1994; Yokoyama 1992) . Se utilizan bacterinas de *E. coli* (Estrada, 1997; Panigrahy, 1984; Sánchez, 1991), pero producen reacciones secundarias muy serias y su actividad es limitada, ya que generalmente sólo actúa contra los serotipos incluidos en la misma bacterina. La inmunización con una bacteria inactivada en aves de menos de dos semanas de edad ha sido

inadecuada para proteger contra el desafío, pero la vacunación de la madres resulta en la protección de su progenie por anticuerpos maternos durante las dos primeras semanas después del nacimiento (Frommer, 1994).

Las cepas O2 y O78 se han usado frecuentemente en experimentos de laboratorio para el desarrollo de vacunas (Kapur, 1992). En la mayoría de los casos se ha preferido la bacteria viva para la protección de los animales contra la infección natural al permanecer el patógeno atenuado por más tiempo en el animal y, en la mayoría de los casos, produce buena inmunidad humoral y celular (Frommer, 1994).

Las vacunas subunitarias (compuestas sólo de fracciones antigénicas del agente) son una opción que es cada vez más utilizada, detectándose, en el caso de *E. coli*, antígenos específicos que son compartidos por la mayoría de las cepas patógenas, tal es el caso de las fimbrias F11 y otras, que han sido aisladas a partir de cepas de *E. coli* con septicemia o colibacilosis. El análisis de un gran número de cepas mostró que el 78% de las cepas de *E. coli* aviares expresaron la fimbria F11. Al parecer la prevalencia de la expresión fimbrial F11 es independiente del país de origen del aislamiento, excepto para los Estados Unidos de América, donde la prevalencia ha sido mayor (Van Den Bosch, 1993).

Van Den Bosch en varios trabajos demostró que el uso de vacunas subunitarias en gallinas reproductoras resulta en la protección de su progenie ante desafíos de laboratorio aún a las tres semanas de edad del pollo, debido a la transferencia de anticuerpos que permiten a los pollos eliminar eficientemente a la bacteria. El mismo autor demostró la eficiencia de los anticuerpos para disminuir la severidad de la infección por *E. coli* al realizar inmunizaciones pasivas por vía intravenosa con antisueros elaborados contra la fimbria F11 y la toxina

filamentosa FT, encontrando que esta inmunización pasiva fue capaz de proteger a los pollos contra varios serotipos de *E. coli*.

Van Aarle en 1993 demostró también que una vacuna subunitaria contra *E. coli* conteniendo únicamente los antígenos FT y F11 produce una respuesta inmune homogénea y prolongada en gallinas reproductoras mantenidas tanto en condiciones de laboratorio como en granjas comerciales, y que estas gallinas son capaces de transferir un alto porcentaje de estos anticuerpos a su progenie.

La vacunación con base en fimbria, así como la inmunoglobulina A secretoria han logrado inhibir la adherencia de *E. coli* al tracto respiratorio. En pollita de reemplazo se obtuvo protección contra *E. coli*, al inmunizar a las 4 y 6 semanas de edad con una vacuna oleosa a base de pili de *E. coli* del serotipo O1 o multivalente de pili, y desafiar a las 8 semanas de edad, porque, a diferencia de los testigos sin vacunar, a) la mortalidad fue muy baja o nula, b) se observaron lesiones macroscópicas leves en los órganos que se afectan primariamente en la colibacilosis, y, c) las aves vacunadas eliminaron de los tejidos más eficientemente a la bacteria (Gyimah, 1985 y 1986).

La vacunación a base de fimbria sólo proporciona protección homóloga. Se ha demostrado que la IgA aglutina a *E. coli* por poseer D-manosa en su estructura molecular. Si se inhiben los monosacáridos en los receptores celulares del huésped, con D-manosa y el metil-alfa-D-manopiranosido, se inhibe la adhesión de los serotipos O1 y O78, pero no del serotipo O2 (Gyimah, 1988, Wold, 1988).

De igual forma se ha utilizado una vacuna subunitaria elaborada con proteínas de la membrana externa reguladas por el hierro reduciéndose parcialmente la frecuencia de bacteremia a las 96 horas posdesafío, así como la

frecuencia de recuperación de *E. coli* de los sacos aéreos y la severidad de las lesiones macroscópicas (Bolin, 1987).

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

Debido a las grandes pérdidas económicas que produce la infección con *E. coli*, es necesario encontrar un método apropiado para prevenir estas infecciones o reducir los efectos adversos en las aves una vez que el agente se ha establecido en el organismo. El uso de antimicrobianos en muchos casos es indiscriminado, y tiene la desventaja de que la bacteria adquiere resistencia a muchos de ellos; se ha estudiado la prevención de la colonización del ciego con *E. coli* a través del uso de la exclusión competitiva y también se han usado lipopolisacáridos (LPS) como inmunoestimulantes, pero su utilización aún no es rutinaria. La inmunización ha sido evaluada en diferentes trabajos y se ha reportado que varias vacunas contra *E. coli* son capaces de producir anticuerpos que tienen la habilidad de proteger contra el desafío de una cepa virulenta de *E. coli*., sin embargo, se ha observado que existen bacterinas para pollos de engorda que tiene como desventajas, la reacción inflamatoria severa, debido a que los LPS bacterianos son muy estables y no se destruyen por el calor, el formaldehído, la sonicación ni la radiación; estos LPS producen cambios en los conteos leucocitarios, fiebre, inflamación y necrosis en los puntos de inyección. Por esta razón se han elaborado inmunizantes menos agresivos, como las vacunas subunitarias y las bacterinas elaboradas con cepas mutantes de *E. coli*. Se han observado los mejores resultados al vacunar a las aves con las que contienen en su formulación sólo las estructuras antigénicas más importantes del microorganismo (razón por la cual se denominan subunitarias). Otras desventajas de algunos inmunógenos son la edad para la inmunización y el número de dosis que deben aplicarse, que aumentan el costo de producción, tanto por el valor del inmunógeno como por la mano de obra empleada en el proceso. Es por estas

razones que se ha orientado la obtención de inmunidad humoral temprana en los pollos por medio de la transferencia de anticuerpos por parte de las madres. De los resultados que se obtengan en este experimento, se pretende determinar el valor del uso rutinario de esta vacuna para disminuir los problemas clínicos y económicos derivados de las infecciones por *E. coli*, tanto en las gallinas a las que se aplica la vacuna, como en su descendencia.

#### **1.4 HIPÓTESIS**

El uso de una vacuna subunitaria contra *Escherichia coli* para inmunizar gallinas reproductoras pesadas mejorará los parámetros productivos de éstas y de su progenie al producir una respuesta inmunológica que les permita resistir un desafío de campo con el agente etiológico.

#### **1.5 OBJETIVOS GENERALES**

**1.5.1** Determinar el valor de inmunizar a gallinas reproductoras pesadas con una vacuna subunitaria emulsionada de *E. coli* sobre sus parámetros productivos y los de su progenie, comparando los resultados con los de los grupos testigos.

**1.5.2** Usar la prueba ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la detección de anticuerpos contra *E. coli*, con el fin de cuantificar la respuesta inmune estimulada por la vacuna, en un periodo corto de tiempo y manejando un número grande de muestras en cada ensayo.

#### **1.6 OBJETIVOS PARTICULARES**

**1.6.1** Inmunizar a una parvada de gallinas reproductoras pesadas contra *E. coli* para que éstas transmitan anticuerpos a su progenie.

**1.6.2** Realizar análisis microbiológico en huevo incubable de las reproductoras y en órganos de pollitos recién nacidos para buscar contaminación por *E. coli*.

**1.6.3** Usar la prueba ELISA para detección de anticuerpos contra *E. coli* tanto en las gallinas como en su descendencia.

**1.6.4** Realizar pruebas de desafío en los pollos progenie para evaluar la inmunidad transmitida por las madres.

**1.6.5** Analizar los parámetros productivos de las gallinas reproductoras vacunadas y su progenie, asociándolos con el uso de la vacuna contra *E. coli*.

## CAPÍTULO 2

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 Vacuna utilizada:**

Se utilizó una vacuna subunitaria (Nobilis *E. coli*:™, Intervet) en presentación emulsionada con adyuvante agua en aceite, contra la colibacilosis en pollo de engorda. Contiene antígeno fimbrial (F11) y toxina flagelar (FT), ambos aislados de cepas virulentas de *E. coli*.

#### **2.2 Aves:**

a) Se trabajó con una parvada de 10,000 gallinas reproductoras pesadas comerciales de la estirpe Avian Farm, se vacunaron 6000 gallinas a las 12 y 18 semanas de edad, y se dejaron las 4000 restantes sin vacunar como grupo testigo. Ambos grupos se mantuvieron bajo el mismo sistema de alojamiento, manejo y vacunación. Los datos de producción también se mantuvieron por separado.

b) Se criaron cuatro parvadas de pollo de engorda Peterson x Avian Farm, con su testigo correspondiente, obtenidas cada 10 semanas de la parvada de reproductoras vacunadas y sin vacunar. Los pollos fueron criados bajo las mismas condiciones de manejo, alojamiento, alimentación, y sistema de vacunación; la progenie de las aves vacunadas, así como de las no vacunadas se tuvieron por separado y sus datos de producción se anotaron en forma independiente.

### **2.3 Prueba serológica:**

Se empleó la prueba ELISA<sup>1</sup> para la detección de anticuerpos contra *E. coli* en muestras de suero de gallinas reproductoras y pollos de engorda.

### **2.4 Prueba microbiológica:**

Se realizó el aislamiento bacteriano y cuantificación de unidades formadoras de colonias, a partir de huevos y órganos (saco vitelino, hígado, pulmón y pericardio) en medios de cultivo bacteriano selectivos y diferenciales. Se hicieron pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana.

### **2.5 Pruebas de desafío:**

Se realizaron 4 pruebas de desafío en pollos de engorda de un día de edad, en unidades de aislamiento del DPA: Aves de la FMVZ, UNAM.

### **2.6 Cepa bacteriana:**

Se utilizó una cepa patógena de *E. coli* aislada de pollos con colisepticemia en el Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

**2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL:** El experimento se dividió en dos partes:

#### **2.7.1 Gallinas reproductoras**

##### **2.7.1.1 Selección, alojamiento y vacunación de las gallinas reproductoras**

Las gallinas reproductoras pesadas que se utilizaron en el experimento fueron escogidas al azar para cada grupo asignado (vacunado y testigo).

---

<sup>1</sup> La prueba ELISA se llevó a cabo en el R&D SERVICE LAB, Intervet International B.V., Wim de Korverstraat 35, NL - 5831 AN Boxtmeer, Netherland.



Tratamiento: Aplicación de la vacuna subunitaria Nobilis™- *E. coli* (Intervet) al grupo vacunado: 0.5 ml de la vacuna por vía intramuscular en la región de la quilla. La vacuna se conservó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Calendario de vacunación: se hizo una aplicación a las 12 semanas de edad y se revacunó a las 18 semanas de edad. Se inmunizaron en total 6,000 reproductoras pesadas (tres réplicas de 2,000 gallinas cada una) con la vacuna subunitaria, identificándolas como grupo vacunado, de acuerdo a los lineamientos establecidos anteriormente y se dejaron 4,000 gallinas sin vacunar como grupo testigo (dos réplicas de 2,000 gallinas cada una). Después de vacunadas, y una vez que iniciaron la producción de huevo, se registraron los siguientes parámetros productivos de ambos grupos: mortalidad y selección total, producción total de huevo y porcentaje de huevo incubable. Para posteriormente obtener el porcentaje de huevo comercial (destinado a la venta para consumo), porcentaje de incubabilidad y pollos de primera, cuyas características son plumón seco y amarillo uniforme, sin deformaciones, ojos brillantes, vivacidad, ombligo completamente cerrado y seco, con peso mínimo de 40 g; pollos de segunda calidad, estos pollos fueron aquéllos que no entraron en la clasificación de primera calidad.

Las aves se alojaron en una granja comercial de gallinas reproductoras pesadas, localizada en el municipio de Amecameca, Estado de México, a 2504 msnm. Esta granja posee 5 casetas de ambiente natural con capacidad para 2,000 gallinas cada una, de las cuales tres se destinaron a alojar a las repeticiones del grupo vacunado y dos alojaron a las repeticiones del grupo testigo; el sistema de explotación que utiliza es el denominado "todo dentro - todo fuera".

### **2.7.1.2 Evaluación bacteriológica en la granja de las gallinas reproductoras a partir de huevos colectados directamente del nido inmediatamente después de la ovoposición.**

Se llevaron a cabo evaluaciones bacteriológicas rutinarias para determinar la presencia de *E. coli* en la parvada vacunada, la parvada testigo y la descendencia de ambas. Se realizaron cada 10 semanas, siendo la primera toma de muestras ocho semanas después de la segunda vacunación (a las 26, 36, 46 y 56 semanas de edad de las reproductoras). Para determinar la presencia de *E. coli* en las granjas de reproductoras se colectaron al azar 25 muestras de huevo limpio del nido en cada ocasión y de cada grupo, sin ser sometidas a ningún tipo de desinfección, para tener un total de 100 huevos recolectados de cada grupo durante el experimento. Las muestras colectadas fueron remitidas al Laboratorio de Patología Aviar del DPA: Aves de la FMVZ, UNAM, para ser sometidas al análisis correspondiente en forma individual.

La bacteriología cuantitativa de huevo, se realizó según las técnicas descritas por Gentry, en 1972 y Williams, en 1967, técnicas 1 y 2 del apéndice, respectivamente. La identificación de las colonias que crecieron se hizo con base en las pruebas bioquímicas que se muestran en la técnica 3 del apéndice.

### **2.7.1.3 Evaluación serológica de las gallinas reproductoras, mediante el empleo de la prueba ELISA.**

Durante el ciclo productivo de las gallinas reproductoras, se hicieron evaluaciones serológicas periódicas de la respuesta inmune humoral estimulada por la vacunación, iniciando al momento de la primera vacunación (12 semanas de edad), después a las 8 semanas después de la segunda vacunación (26 semanas de edad) y posteriormente cada 10 semanas. (36, 46 y 56 semanas de edad), cuantificando los niveles de anticuerpos contra *E. coli* usando la prueba ELISA para detectar anticuerpos dirigidos específicamente contra los antígenos

FT y F11 contenidos en la vacuna. Se tomaron 30 muestras en cada ocasión en cada uno de los grupos, haciendo un total de 150 muestras de suero para cada grupo.

Esta ELISA es utilizada para la determinación de títulos de anticuerpos en suero de pollo contra fimbria F11 y Toxina Flagelar FT de *E. coli*. Las placas de microtitulación fueron cubiertas con los antígenos e incubadas con diluciones seriadas de sueros de pollo. Subsecuentemente los anticuerpos de unión se cuantificaron utilizando un conjugado de peroxidasa IgG de conejo antipollo y substrato TMB. Los títulos de anticuerpos se calcularon con base al control negativo.

#### **2.7.1.4 Evaluación de los parámetros productivos de las gallinas reproductoras.**

Al término del ciclo productivo de ambos grupos de reproductoras (vacunadas y no vacunadas), se compararon la mortalidad total y desechos (selección), producción de huevo, porcentajes de incubabilidad, fertilidad, número de huevos por gallina encasetada y porcentaje de pollos clasificados como de primera y segunda clase.

#### **2.7.1.5 Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba t de Student para determinar la diferencia estadística entre los grupos de gallinas vacunadas y no vacunadas en cuanto al número de huevos por gallina encasetada.

Para la mortalidad y selección, así como el porcentaje de nacimientos se utilizó la prueba de t, previa aproximación de la distribución de las variables a la distribución normal, según el método descrito por Steel y Torrie en 1960, en este

método se obtiene el Arco-seno de la raíz cuadrada del porcentaje de mortalidad o nacimientos, y se somete al análisis estadístico correspondiente.

En los porcentajes de huevo incubable e incubabilidad, huevo comercial, pollos de primera y pollos de segunda se utilizó la prueba de diferencia estadística mínima.

El modelo estadístico que se planteo para el análisis de la varianza fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \xi_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Valor de la observación

$\mu$  = media poblacional

$\tau_i$  = efecto del tratamiento

$\xi_{ij}$  = error experimental

Las pruebas se corrieron con los programas SAS<sup>2</sup> y STATGRAPHICS PLUS<sup>3</sup>

## **2.7.2 Pollos de engorda**

### **2.7.2.1 Selección y alojamiento de pollos progenie de las gallinas vacunadas y sin vacunar.**

Se observó la progenie de las reproductoras cada 10 semanas, iniciando cuando la gallinas tenían 26 semanas de edad, para evaluar en ellas el comportamiento productivo, llevando registros de los siguientes parámetros: mortalidad en la primera semana, peso a los 56 días de edad, ganancia diaria de peso, conversión alimenticia e Índice de productividad, finalmente se compararon

---

<sup>2</sup> Statistical Analysis System

<sup>3</sup> Statistical Graphics Corporation, Manugistics, Inc. 2115 East Jefferson Street. Rockville, Maryland, 20852, USA.

los resultados de la progenie de las reproductoras vacunadas con los de la progenie de las no vacunadas.

La selección de la progenie fue cada 10 semanas debido a que ésta se alojó en una granja experimental (ubicada también en Amecameca, Estado de México) durante su ciclo productivo de ocho semanas. A este tiempo debió agregarse un período de dos semanas para maniobras de limpieza y desinfección.

El huevo proveniente de cada parvada se incubó en una planta incubadora comercial ubicada en Cuautla, Morelos, México. Cada progenie constó de 375 pollos (tres réplicas con 125 pollos cada una). En total se evaluaron 1,500 pollos en el grupo vacunado, y 1,500 pollos en el grupo testigo.

#### **2.7.2.2 Evaluación bacteriológica en la granja del pollo de engorda al primero y séptimo día de edad.**

En la planta incubadora se tomó una muestra de 25 pollitos clasificados como de segunda calidad, y en las granjas de pollo de engorda se analizaron 25 pollos de una semana de vida del pollito, en cada progenie proveniente de gallinas reproductoras de 26, 36, 46 y 56 semanas de edad. La toma de muestras se hizo en forma estéril con la ayuda de una asa bacteriológica de los órganos: pulmón, hígado, pericardio y saco vitelino.

**Siembra:** Se sembró por estrías en medios de enriquecimiento y selectivos (gelosa sangre y agar McConkey) y se incubó por 24-48 horas a 37°C. Para el cultivo puro se tomaron las colonias sospechosas, se les realizó la tinción de Gram y se sembraron en medios de enriquecimiento, selectivos y diferenciales; se incubaron 24-48 hrs a 37°C. La identificación de las colonias que crecieron se

hizo con base en las pruebas bioquímicas que se muestran en la técnica 3 del apéndice.

#### **2.7.2.3 Evaluación serológica del pollo de engorda, mediante el empleo de la prueba ELISA, al primero y séptimo día de edad.**

Se evaluó la transferencia de anticuerpos maternos a la progenie, tomando muestras de suero de pollos, seleccionados al azar al primero y séptimo días de edad. Se colectaron 30 muestras de suero por cada grupo en cada progenie evaluada, en total se colectaron 120 muestras de suero de cada grupo. La prueba se llevó a cabo en la forma descrita en la sección de gallinas reproductoras.

#### **2.7.2.4 Pruebas de desafío con una cepa patógena de *E. coli*, en pollos de un día de edad.**

Bajo condiciones controladas se desafiaron pollos de engorda con una cepa de campo patógena de *E. coli* en una unidad de aislamiento del DPA: Aves.

#### **EQUIPO E INSTRUMENTOS:**

Unidad de aislamiento

Batería de crianza con fuente de calor a base de electricidad, comederos y bebederos (Petersime brood unit; Gettysburg, Ohio, USA)

Medios de cultivo bacteriológico: Caldo infusión cerebro - corazón, McConkey, Gelosa Sangre, TSI, SIM, Urea, Citrato de Simmons, LIA.

Pipetas de precisión de 1000 µl (PIPETMAN, Gilson Medical Electronics S. A., France) y puntas.

Espectrofotómetro (Spectronic 20D, Milton Roy Company, USA)

Centrifuga refrigerada (Centra - 7R, International Equipment Company, USA)

Tubos de ensayo y tubos para centrifuga

Cajas de Petri y Triángulos de vidrio

Agitador tipo vortex (super mixer 1290, Lab-Line Instruments Inc., USA)

## MÉTODO

Después de un período de incubación a 37°C por 24 horas, se obtuvo un caldo de cultivo (caldo infusión cerebro - corazón) de *E. coli* conteniendo 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonia (UFC) / 1 ml. La dosis individual fue de 10<sup>8</sup> UFC / 0.1 ml. Las UFC se determinaron usando un cultivo de la bacteria en caldo nutritivo. Se hicieron diluciones décuples seriadas en caldo nutritivo para después inocular tres cajas de conteo de placas por cada dilución. La densidad óptica de cada dilución (DO) se determinó utilizando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

### Prueba preliminar

Con el fin de elegir y corroborar la patogenicidad de la cepa bacteriana a usar en el experimento, se desafiaron 100 pollitos de un día de edad, en una prueba piloto, en una unidad de aislamiento del DPA: Aves. Los pollitos se transportaron de la planta incubadora al DPA: Aves, se dejaron descansar durante toda la noche y se inocularon al día siguiente por la mañana. Se usaron dos aislamientos de *E. coli* colisepticémica y una vacuna triple (triple - vac <sup>TM</sup>, Intervet), que contiene los serotipos *Massachusetts* y *Connecticut* del virus de la bronquitis infecciosa y la cepa B1 del virus de Newcastle, para aumentar la susceptibilidad de los pollos a la infección por *E. coli*. Se dividieron los pollos en once grupos, con nueve pollos en cada grupo, y se inocularon de la manera en que se muestra en el cuadro A. Dosis de inoculación: 1 x 10<sup>8</sup> UFC/0.1 ml, y una gota de la vacuna triple en el ojo.

Una vez inoculados los pollos, se mantuvieron bajo observación por 14 días, haciéndose las observaciones a intervalos de doce horas (8:00 a.m. y 8:00 p.m.). Después del tiempo establecido, se sacrificaron los pollos sobrevivientes y se les realizó la necropsia para la observación de lesiones y la toma de muestras para aislamiento bacteriano.

Concluida la prueba piloto se decidió trabajar con la cepa que produjo la mayor mortalidad en los pollos desafiados.

**Desafíos:**

Se hicieron pruebas de desafío en un total de 400 pollos de engorda de un día de edad (nacidos tanto de reproductoras vacunadas, como del grupo control no vacunado). Se realizó cada 10 semanas una prueba de desafío (cuatro desafíos en total), enfrentando 50 aves (cada desafío se consideró como una repetición) de cada grupo con una cepa de campo patógena de *E. coli* a una concentración de  $10^9$  UFC/ml que se inoculó a una dosis de 0.1 ml por vía intranasal en 25 pollos y por vía intraperitoneal en los 25 restantes. La inoculación se realizó simultáneamente con la aplicación de la vacuna Triple - vac (Mass - Conn - B1, Intervet). Después de un periodo de observación de 14 días, durante los cuales se anotaron diariamente la signología clínica y mortalidad, fueron sacrificadas las aves sobrevivientes. Todas las aves fueron sometidas a un análisis de necropsia, anotándose las lesiones observadas.

Mortalidad y lesiones: El número de aves muertas se anotó diariamente y el porcentaje de mortalidad para cada grupo se calculó al final del experimento. Las lesiones macroscópicas de aerosaculitis se consideraron como consecuencia de la multiplicación e invasión de la *E. coli* inoculada, éstas fueron desde la carencia de lesiones macroscópicas, hasta la presencia de aerosaculitis acompañada de pericarditis y perihepatitis y / o muerte del ave (cuadro B). Se sembró en medios bacteriológicos a partir de pulmón, hígado y pericardio, para recuperar la *E. coli*, y determinar diferencias entre las progenies de gallinas vacunadas y no vacunadas en cuanto a la adherencia e invasión a los órganos ya mencionados.



#### **2.7.2.5 Evaluación de los parámetros productivos.**

Al igual que en las reproductoras, los resultados finales de las parvadas de pollos de engorda descendientes de las gallinas vacunadas se compararon con las parvadas hijas de las no vacunadas. Los parámetros evaluados fueron: mortalidad en la primera semana, peso al sacrificio, ganancia diaria de peso, conversión alimenticia, e Índice de productividad.

#### **Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba de Ji cuadrada ( $X^2$ ) para determinar diferencias estadísticas en los aislamientos bacteriológicos de muestras de progenie de aves vacunadas contra las de progenes de aves no vacunadas, y en la recuperación de *E. coli* a partir de órganos de los pollos desafiados.

Para determinar las diferencias estadísticas en la mortalidad durante el desafío experimental y durante la primera semana de vida de los pollos criados en la granja, se utilizó la prueba de t, previa aproximación de la distribución de las observaciones a la distribución normal, como se describió en la sección de las gallinas reproductoras.

En los pollos de engorda se utilizó el análisis de Scheffe para comparar entre las progenes descendientes de aves vacunadas y sin vacunar: peso a los 56 días, ganancia diaria de peso, conversión alimenticia e índice de productividad.

El modelo estadístico planteado fue el mismo utilizado en las reproductoras.

Las pruebas se realizaron usando los paquetes estadísticos SAS y STATGRAPHICS PLUS.

## CAPÍTULO 3

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Gallinas reproductoras**

##### **3.1.1 Análisis bacteriológico**

Todas las pruebas (100%) de Gentry (cascarón) y Williams (análisis interno) realizadas en huevos de ambos grupos resultaron negativas o de muy baja contaminación con *E. coli*, de acuerdo a los grados de contaminación en el cascarón que se muestran en la técnica 1 del apéndice.

##### **3.1.2. Análisis serológico**

Los resultados de las pruebas ELISA FT y F11 realizados en las gallinas se muestran en los cuadros 1 y 2, el primer muestreo se realizó a las 12 semanas de edad de las aves, en el día en que se vacunó por primera vez al grupo tratado, los muestreos subsecuentes se realizaron a las 26, 36, 46 y 56 semanas de edad, tomándose 30 muestras de suero en cada ocasión para cada grupo de gallinas. La medición de anticuerpos se realizó con la prueba ELISA específica para detectar inmunoglobulinas contra el antígeno FT y el antígeno F11 contenidos en la vacuna. La concentración de anticuerpos mínima para considerar positiva una muestra fue de 8.2 (Log<sub>2</sub>), muestra con "títulos" inferiores a este valor se consideraron negativas.

En las figuras 1 y 2 se muestra la curva de los títulos de anticuerpos anti FT y anti F11 respectivamente, durante los 5 muestreos. Las gráficas muestran los títulos máximo, mínimo y promedio observados en cada grupo y en cada muestreo.

A las doce semanas de edad se observó un título promedio de anticuerpos anti - FT de 0.27 y 0.27 (Log2) en los grupos vacunado y testigo, respectivamente, con sólo una muestra positiva (8.2 Log2) en cada grupo; los anticuerpos anti - F11 observados a esta edad fueron 4.64 y 3.82 (Log2) en los mismos grupos con 17 y 14 muestras con título de 8.2 (Log2), grupos vacunado y testigo respectivamente.

El muestreo de las 26 semanas de edad mostró diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) en los títulos anti - FT y anti - F11 promedio. No se observaron muestras negativas en el grupo vacunado para ninguno de los antígenos, mientras que en el grupo testigo se detectaron algunas muestras positivas para ambos antígenos.

La medición de anticuerpos a las 36 semanas de edad se observó similar a la anterior, con una ligera disminución en los títulos promedio de anticuerpos para ambos antígenos, pero conservando la diferencia estadística significativa. En el grupo vacunado se observó un suero anti-F11 negativo, mientras que nuevamente se observaron muestras positivas a ambos antígenos en el grupo testigo.

La prueba ELISA realizada a las 46 semanas de edad arrojó resultados similares al muestreo anterior, observándose nuevamente diferencia significativa en los títulos de anticuerpos,  $p < 0.05$ , en esta ocasión no hubo sueros negativos en el grupo vacunado, mientras que nuevamente se detectaron muestras positivas en el grupo testigo.

Finalmente a las 56 semanas sólo se observó un ligero descenso en los títulos promedio del grupo vacunado para ambos antígenos, mientras que en el grupo testigo el título promedio anti - FT se considera positivo, sigue existiendo diferencia estadística significativa entre los grupos vacunado y testigo,  $p < 0.05$ .

No se presentaron muestras negativas en el grupo vacunado, mientras que las muestras anti - FT positivas aumentaron en el grupo testigo.

El coeficiente de variación disminuyó con el aumento en la concentración de anticuerpos en las muestras, siendo menor en todos los casos en el grupo vacunado que en el testigo, excepto a las doce semanas de edad, donde fue el mismo para ambos antígenos.

### **3.1.3. Parámetros productivos**

La gráfica de producción de huevo de los grupos de gallinas reproductoras se muestra en la figura 3, se observa un mayor porcentaje de producción de huevo en el grupo vacunado a lo largo de todo el ciclo productivo.

Las gallinas se mantuvieron en producción por 37 semanas (de las 24 a las 61 semanas de vida ), los resultados de productividad se muestran en el cuadro 3, no se observaron diferencias estadísticas significativas en los porcentajes de mortalidad, selección, huevo incubable y huevo comercial,  $p > 0.05$ , el número de huevos por gallina encasetada, así como el porcentaje de nacimientos de pollos de primera calidad, fueron significativamente mayores en el grupo vacunado que en el testigo,  $p < 0.05$ .

En los porcentajes de fertilidad y de nacimientos de pollos de segunda calidad, no se observaron diferencias estadísticas significativas,  $p > 0.05$ .

## **3.2 Pollo de engorda**

### **3.2.1. Análisis bacteriológico**

En el cuadro 4 se muestra el resumen del aislamiento bacteriológico de cuatro muestras de pollos de engorda de uno y siete días de edad, cada muestra

se tomó en diferente edad de las reproductoras (26, 36 , 46 y 56 semanas de edad) y se consideró como una repetición, al primer día de edad se aisló *E. coli* en menor porcentaje del grupo de madres vacunadas que del testigo, a partir de pulmón hígado y saco vitelino ( $p < 0.05$ ), mientras que al séptimo día de edad, hubo menor aislamiento de *E. coli* ( $p < 0.05$ ) en el grupo de madres vacunadas sólo a partir del hígado, no encontrándose diferencias significativas en el aislamiento bacteriano a partir de pulmón y pericardio ( $p > 0.05$ ).

### 3.2.2 Análisis serológico

Se utilizó la prueba ELISA en sueros de pollos de engorda de uno y siete días de edad, cuyos resultados son mostrados en el cuadro 5. Estos pollos nacieron del huevo que se incubó cuando las gallinas tenían 26, 36, 46 y 56 semanas de edad.

En las figuras 4 y 5 se muestran los títulos de anticuerpos máximo, mínimo y promedio, anti FT y anti 11, respectivamente, al primer día de edad. Las figuras 6 y 7 muestran los títulos de anticuerpos de las mismas aves a los 7 días de edad.

Los pollos del primer muestreo (26 semanas de las reproductoras) tuvieron un título Log<sub>2</sub> de anticuerpos anti FT promedio de 11.98 y 6.34 al primer día de edad, y en promedio 4.56 y 3.90 a los siete días, grupos de madres vacunadas y testigo, respectivamente. Los títulos anti - F11 fueron 6.91 y 3.97 al primer día, y 2.56 y 2.18 a los siete días, grupos de madres vacunadas y testigo, respectivamente. Se observó diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de madres vacunadas y testigo de la misma edad para ambos antígenos.

En el análisis de las 36 semanas los sueros del grupo de madres vacunadas presentaron títulos Log<sub>2</sub> promedio para los antígenos FT y F11 de 11.02 y 6.66 respectivamente, los cuales fueron estadísticamente diferentes de

los títulos del grupo de madres vacunadas ( $p < 0.05$ ) al primer día de edad. Disminuyeron las concentraciones de anticuerpos a los 7 días en todos los casos, excepto para el antígeno FT en el grupo de madres vacunadas, en el cual no se encontró diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) con respecto al título de anticuerpos del primer día de edad.

A las 46 semanas se repitieron las observaciones anteriores para el primer día de edad, siendo nuevamente mayor la cantidad de anticuerpos en el grupo de madres vacunadas ( $p < 0.05$ ). A los siete días disminuyó la concentración de anticuerpos contra ambos antígenos, al grado de no encontrar diferencias estadísticas entre los grupos, exceptuando los anti - FT del grupo testigo, que tuvieron un incremento considerable con respecto a los del primer día ( $p > 0.05$ ).

En la evaluación de la cuarta progenie hubo diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en los títulos de anticuerpos contra ambos antígenos al primer día de edad. A los siete días no se detectó disminución ( $p > 0.05$ ) en los títulos de anticuerpos del grupo de madres vacunadas, en el grupo testigo sí hubo disminución de títulos.

Los títulos de anticuerpos contra el antígeno FT al primer día de edad fueron consistentemente más altos que aquellos contra el antígeno F11 ( $p < 0.05$ ) en el grupo de madres vacunadas, a diferencia del grupo testigo, en el cual no se observaron estas diferencias. A los siete días los títulos de anticuerpos anti - FT siempre fueron mayores ( $p < 0.05$ ) que los anti - F11 en el grupo de madres vacunadas, mientras que esta diferencia sólo se observó en la primera y tercera progenie del grupo testigo.

Se observó una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) del título promedio de anticuerpos contra ambos antígenos del primero al séptimo día de edad, excepto en la segunda progenie del grupo de madres vacunadas a los 7 días en el caso de

anticuerpos anti - FT y en la cuarta progenie del mismo grupo en ambos antígenos.

En las figuras 8 y 9 se muestran los títulos promedio de anticuerpos anti - FT y anti - F11, respectivamente, obtenidos en las reproductoras, la transferencia de estos anticuerpos a la progenie, y el catabolismo de los mismos durante la primera semana de vida de los pollos.

### **3.2.3 Pruebas de desafío**

El resumen de las pruebas de desafío se presenta en los cuadros 6 y 7, La mortalidad durante el período de observación fue de 67 y 70 % en la vía de inoculación intraperitoneal, grupos de madres vacunadas y testigo, respectivamente. No se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ). Por la ruta de desafío intranasal los porcentajes de mortalidad fueron 7 y 5%, grupos de madres vacunadas testigo, respectivamente, tampoco se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de mortalidad entre las rutas de desafío fue significativamente mayor para la ruta intraperitoneal ( $p < 0.05$ ).

El grado de lesiones macroscópicas en los pollos muertos durante el desafío correspondió al nivel cuatro, ya que se realizó la bacteria de desafío en cantidad abundante. Las observaciones de órganos en los pollos sobrevivientes sacrificados a los 14 días postinoculación se clasificaron en el nivel 0, por que no se encontraron lesiones macroscópicas. No existieron diferencias significativas en los grados de lesiones en pollos de los diferentes grupos,  $p > 0.05$ .

### **3.2.4. Parámetros productivos**

De la progenie de las gallinas reproductoras, se eligieron 4 nacimientos a diferentes edades de las mismas, iniciando a las 26 semanas de edad, los siguientes cada 10 semanas, es decir, a las 36, 46 y 56 semanas de edad. Se

consideró a la progenie de las madres vacunadas contra *E. coli* como el grupo de madres vacunadas, y la progenie de las madres sin vacunar como grupo testigo. En el cuadro 8 se exhibe el resumen de los parámetros productivos de las cuatro parvadas. No se observó diferencia estadística significativa en ninguno de los parámetros evaluados,  $p > 0.05$ .



## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

#### 4.1 Gallinas reproductoras

El análisis bacteriológico realizado en este trabajo en el cascarón y en la yema de los huevos provenientes de los grupos vacunado y testigo resultó negativo a la presencia de *E. coli*, o con una contaminación lo suficientemente baja para ser considerada negativa, de acuerdo con los lineamientos descritos por Gentry (1972) y Williams (1967), respectivamente. Este resultado microbiológico concuerda con lo descrito por Padrón (1992), dado que la limpieza que se da a los nidos en forma rutinaria en la granja es de buen nivel y por lo tanto se reduce en buena medida la contaminación fecal dentro del material de cama. Si a este factor se suma el hecho de que los huevos fueron colectados pocos minutos después de la ovoposición, y se transportaron al laboratorio el mismo día (sin haber sido expuestos a ningún método de fumigación o desinfección), donde se realizaron inmediatamente las técnicas mencionadas con anterioridad, el resultado de los análisis es lógico, ya que no se permitió a las bacterias existentes en los nidos multiplicarse en cantidades considerables, resultado que era de esperarse, de acuerdo con Mauldin (1991), quien sugiere como lograr un buen programa de sanidad en la incubadora.

El estudio inmunológico exhibe la capacidad inmunogénica de la vacuna subunitaria, hallazgo que coincide con lo descrito por Van Aarle en 1993, ya que al realizar la prueba ELISA con antígenos homólogos se detectan anticuerpos contra los antígenos FT y F11 en todos los muestreos del grupo experimental. Este trabajo demuestra evidencia serológica de la presencia en el campo de alguna cepa de *E. coli* que presenta la toxina flagelar FT y la fimbria F11 como marcadores antigénicos, los cuales son considerados factores de patogenicidad,

además de que se puede pensar que estas cepas de campo pertenecen a alguno de los serotipos O1:K1, O2:K1, O78:K80 u O35, de acuerdo con las investigaciones realizadas por Van Den Bosch (1993a), quién encontró que estos serotipos tienen una prevalencia del 96% de expresión de la fimbria F11.

La inmunidad humoral que estimula la vacunación se considera duradera y homogénea, ya que se detectaron altos niveles de anticuerpos con bajos coeficientes de variación en las gallinas vacunadas aún en el último muestreo (56 semanas de edad), observación que es semejante a la realizada por Aarle en 1993. Este hecho tiene gran relevancia, ya que la reproductoras podrían transferir inmunidad pasiva a los pollos que les permitiría resistir los desafíos de campo, por lo menos durante la primera semana de vida, de acuerdo con los resultados obtenidos por Frommer en 1994. Además podrían reducirse las pérdidas por mortalidad y selección de gallinas en producción, que tienen como consecuencia aumento en los costos de producción y menor número de huevos por gallina encasetada.

La vacunación con base en fimbria, así como la inmunoglobulina A secretoria han demostrado que inhiben la adherencia de *E. coli* al tracto respiratorio, según los trabajos realizados por Gyimah, en 1985 y 1986; y por Wold en 1988. La reducción en la presentación de lesiones de ooforitis y salpingitis cuando se evalúa la mortalidad normal dentro de las casetas, se explicaría por la elevada concentración de anticuerpos anti F11, esto en concordancia con la teoría de Van Den Bosch, 1993a, quien sugiere que en el caso de la fimbria F11, su presencia no está correlacionada con la adherencia al epitelio traqueal o faríngeo, sin embargo, es posible que esta fimbria esté especialmente equipada para adherirse a los sacos aéreos y otras membranas serosas, ya que la colibacilosis empieza con aerosaculitis y progresa a pericarditis y perihepatitis, con posible diseminación a otros órganos por contacto, como el

ovario y el oviducto, afectando principalmente a las membranas antes de llegar a ser septicémica.

Los resultados serológicos también muestran que la toxina flagelar FT es más inmunogénica que la fimbria F11, ya que se detectaron mayores concentraciones de anticuerpos contra esta toxina durante todo el experimento, resultados semejantes fueron encontrados por Van Aarle en 1993.

Aún cuando la vacunación contra *E. coli* en gallinas reproductoras ha sido encaminada a dar Inmunidad a las progenies durante sus primeros días de vida, los resultados de este trabajo exhiben que esta vacunación puede también mejorar la productividad de las reproductoras, básicamente en la cantidad de huevos obtenidos por gallina encasetada y en el porcentaje de nacimientos de pollos de primera calidad, principalmente porque se reducen los problemas de enfermedades respiratorias, salpingitis y peritonitis, resultados compatibles con lo descrito por Taylor en 1995. Como consecuencia del mayor número de huevos por gallina, se aumenta el número de huevos que se incuban, y los pollos de primera calidad que nacen y se crían

El porcentaje de fertilidad no se ve afectado, ya que no se encontró una relación entre el uso de alguna vacuna y el aumento o disminución en la fertilidad. Tampoco se observó una reducción significativa en el porcentaje de nacimientos de pollos de segunda calidad en el grupo de aves descendientes de las madres vacunadas contra *E. coli*, aún cuando se pensaba que al haber elevadas concentraciones de anticuerpos en el saco vitelino que son capaces de neutralizar a la *E. coli*, de acuerdo con las investigaciones de Ikemori en 1993 y Yokoyama en 1992, podría reducirse la infección de los embriones por bacterias que pudieran contaminar el huevo en la granja o durante la incubación; sin embargo

está contaminación no fue de consideración quizás debido a los estrictos programas sanitarios con los que cuentan en la planta incubadora.

#### **4.2 Pollos de engorda**

Al realizar estudios microbiológicos en pollos de un día de edad clasificados como de segunda calidad, provenientes de madres que fueron vacunadas contra *E. coli* y madres que no fueron vacunadas, se encontró menor frecuencia y porcentaje de aislamiento de *E. coli* en el grupo experimental a partir de todos los órganos evaluados, este hallazgo sugiere la neutralización de la bacteria por parte de los anticuerpos contenidos en el saco vitelino, teoría que se basa en las investigaciones hechas al respecto por Yokoyama en 1992 e Ikemori en 1993. No se hicieron estudios de patogenicidad ni serotipificación de los aislamientos, pero se consideraron potencialmente patógenos y por lo tanto determinaron un menor riesgo de sufrir una infección clínica o subclínica que tuviera repercusiones económicas en las aves provenientes de madres vacunadas, de acuerdo con Van den Bosch y los resultados del trabajo que realizó en 1993b.

A los siete días de edad se realizaron los mismos estudios bacteriológicos, encontrándose en este caso menor porcentaje de aislamientos en el grupo experimental únicamente a partir del hígado, el elevado porcentaje de aislamientos a partir de pulmón demuestra un fuerte desafío de campo con cepas de *E. coli* que se consideran potencialmente patógenas y que pueden provocar pérdidas económicas en la parvada por concepto de tratamiento o por baja en la productividad. Este riesgo se considera menor en el grupo experimental en concordancia con los resultados de Van Den Bosch en 1993c.

El título promedio de anticuerpos anti FT y F11 en el grupo experimental al primer día de edad fue mayor que el del grupo testigo, lo que indica transferencia de anticuerpos maternos de la madre al pollo, estos resultados son semejantes a

los que describió Van Aarle en 1993. Los anticuerpos detectados en el grupo vacunado se consideraron consecuencia de la inmunización y, en el grupo testigo, consecuencia del desafío de campo al que estuvieron sometidas las gallinas. El porcentaje de transferencia de anticuerpos de las gallinas reproductoras al pollo de engorda fue de 76% para los anticuerpos anti FT y un 48% en los anti F11.

El descenso en los títulos de anticuerpos a los siete días de edad se atribuye al catabolismo normal de los mismos, así como a la neutralización y eliminación de bacterias de campo que invaden el tracto respiratorio de los pollos, resultados semejantes fueron descritos por Van den Boch en 1993b. Este desafío de campo se puso de manifiesto con los aislamientos bacterianos realizados en los pollos.

En las cuatro progenies que se evaluaron, los títulos de anticuerpos tienen un comportamiento similar, con las excepciones de los anticuerpos anti FT de la segunda progenie experimental que no tuvo una reducción significativa del primero al séptimo día de edad de los pollos, y tampoco hubo reducción en los anticuerpos contra ambos antígenos en la cuarta progenie del grupo experimental. No se encontró explicación para este fenómeno.

En las cuatro pruebas de desafío realizadas durante el experimento, la mortalidad registrada en las aves desafiadas por vía intranasal se considera mínima, tomando en cuenta la dosis de desafío utilizada, este hallazgo concuerda con lo descrito por Gross (1990 y 1991), tomando como referencia que por lo general se requiere de factores ambientales adversos u otros agentes infecciosos para que las infecciones por *E. coli* se vuelvan clínicamente aparentes; los resultados de este estudio concuerdan con los de Nakamura, quien encontró en 1992 que al hacer desafíos mixtos y por separado con *E. coli* y el virus de la Bronquitis Infecciosa no hay aumento significativo en la mortalidad de las aves ni

en el número de bacterias reaisladas o el grado de lesiones en el tracto respiratorio de las aves que fueron desafiadas únicamente con *E. coli*. Del mismo modo existe concordancia con otras investigaciones que han demostrado que la septicemia causada por *E. coli* no tiene demasiado impacto *per se* sobre la parvada, a menos que se complique con factores estresantes como elevados niveles de amoníaco o bronquitis infecciosa concurrente (anónimo, 1996).

En este experimento los desafíos se realizaron bajo condiciones de laboratorio controladas, y, aunque se vacunó a los pollos con una vacuna triple por vía ocular al mismo tiempo que se inoculó la bacteria, con el fin de predisponer a los pollos a reacciones pos vacunales severas que permitieran el desarrollo del cuadro clínico y lesiones características de la colibacilosis, no se logró este objetivo por las condiciones de temperatura y alimentación que fueron favorables para la resistencia al desafío, además de que se careció de la carga bacteriana ambiental normal de una caseta y de las condiciones de estrés que deprimen los mecanismos de protección del pollo, como el polvo y el amoníaco, que disminuyen la actividad mucociliar del tracto respiratorio superior.

El desafío intraperitoneal produjo una mortalidad elevada y sobreaguda en la mayoría de los casos en los pollos de ambos grupos. Este gran porcentaje de mortalidad en ambos grupos se explica porque la septicemia se produce por haberse utilizado una vía no natural de infección, en este caso a través del peritoneo, con este hecho se evitó la barrera de defensa que constituye el tracto respiratorio superior, especialmente la tráquea, así como la IgA secretoria presente en él, observaciones que concuerdan con las realizadas por Gyimah en 1988 y Nakamura en 1992.

Con la dosis de desafío se sobrepasó el nivel de protección que brindan los anticuerpos del grupo experimental, de acuerdo a la teoría descrita por Panigrahy

en 1984; así mismo la respuesta inflamatoria que se presenta a nivel local, heterófilos, macrófagos residentes y algunos agentes inmunoregulatorios, cuya actividad aún no es bien estudiada, son insuficientes para evitar la presentación de la septicemia y la consecuente muerte de las aves, de acuerdo a los estudios realizados por McGruder en 1996b.

Las aves del grupo experimental sobrevivientes al desafío intraperitoneal eliminaron con mayor eficacia a la bacteria de desafío de los órganos evaluados, hecho que coincide con los hallazgos de Gyimah y colaboradores en 1985 y 1986, y el trabajo realizado por Van Den Bosch en 1994. Esta observación es de gran importancia, ya que demuestra que la inmunidad humoral pasiva de los pollos, aunque fue superada en un gran porcentaje, sí tiene efectos sobre la resistencia a desafíos de campo que los pollos enfrentan.

El grado de lesiones macroscópicas de los pollos muertos se colocó en el nivel cuatro, para todas las aves muertas de ambos grupos en el desafío intraperitoneal, ya que en todas se realsó la bacteria de desafío en cantidad abundante, de acuerdo a los lineamientos descritos por Van Den Bosch en 1994. Las aves sobrevivientes al desafío y que fueron sacrificadas para registrar el grado de lesiones que desarrollaron, fueron todas ubicadas en el grado cero, ya que no se encontraron lesiones macroscópicas aparentes en los órganos evaluados. Esta ausencia de lesiones se atribuye a la falta de factores infecciosos o de tensión que favorecieran el desarrollo de lesiones aparentes en los órganos sometidos a la inspección.

Frommer y colaboradores en 1994 observaron que al criar aves descendientes de madres que fueron vacunadas contra *E. coli*, esta progenie fue capaz de resistir el desafío de campo con cepas patógenas de *E. coli*, esta resistencia se reflejó en la disminución en la mortalidad de los pollos durante la

primera semana de edad. En este trabajo no se observó diferencia estadística significativa entre los grupos experimental y testigo en la mortalidad durante la primera semana de edad de los pollos que fueron mantenidos en la caseta experimental hasta el fin del ciclo productivo de 56 días. En ningún experimento de este tipo se ha demostrado que la vacunación contra *E. coli* tenga efectos adversos sobre los parámetros productivos de las aves, mucho menos sobre la capacidad productiva de la progenie.

El Índice de productividad es uno de los parámetros más importantes a considerar en la evaluación económica de una parvada de pollo de engorda, de acuerdo con Quintana (1992). El bajo Índice de productividad promedio que se registró de las cuatro parvadas del grupo experimental se debió en gran parte a que la primera progenie sufrió un brote de Enfermedad de Newcastle que elevó la mortalidad considerablemente después de la tercera semana de edad, afectando en consecuencia este parámetro productivo. Panigrahy atribuye la reducción en los parámetros productivos del grupo experimental, a que las aves de este grupo, por razones desconocidas, tuvieron un desafío de campo o factores de tensión mayores que el grupo testigo, lo que provoca que la inmunidad sea parcialmente sobrepasada y las manifestaciones de la infección se exacerben.

#### COMENTARIOS FINALES

En este trabajo se observó que: La vacuna subunitaria Nobilis - *E. coli*™ es inmunogénica y estimuló la producción de anticuerpos anti FT y anti F11 en las gallinas reproductoras pesadas en concentraciones elevadas y por un largo período de tiempo (37 semanas), principalmente anticuerpos anti FT.



La prueba ELISA permitió poner de manifiesto que las gallinas del grupo testigo estuvieron expuestas a cepas de campo que contienen dentro de su estructura antigénica a los epítopes de la toxina flagelar FT y la fimbria F11.

Las gallinas vacunadas mejoraron su productividad al ser menos susceptibles a las infecciones clínicas y subclínicas por *E. coli*, obteniendo así un mayor número de huevos por gallina encasetada. Además la menor incidencia de ooforitis y salpingitis observada a nivel de campo en las casetas de las gallinas vacunadas sugiere que se puede lograr una disminución en los costos de producción por concepto de tratamiento de infecciones colisepticémicas.

Las gallinas vacunadas son capaces de transferir anticuerpos a su progenie en un promedio del 76 % en el caso de los anticuerpos FT y un 48.15% en el caso de los anticuerpos anti F11. La transferencia de anticuerpos a los pollos de engorda les permite eliminar con mayor eficiencia a las cepas de *E. coli* a las que están expuestos en las granjas, de acuerdo con los resultados de las pruebas de desafío.

Los anticuerpos en los pollos de engorda pueden prevenir o reducir manifestaciones subclínicas crónicas de la colibacilosis, así como el porcentaje de decomisos en el rastro por lesiones de poliserositis, y con la posibilidad también de reducir los costos por conceptos de tratamientos con antimicrobianos, ya sean preventivos o terapéuticos contra las infecciones por *E. coli*.

El uso de la vacuna subunitaria se justifica por el mayor número de huevos por gallina encasetada y muy probablemente por la reducción en el uso de antimicrobianos durante el ciclo productivo de las gallinas.

## LITERATURA CITADA

- Anónimo: *E. coli* - the ever present pathogen. *International Health Review* 1996; **3**: 13 - 15
- Aleson S., R. y Aleson S., M. J.: Sensibilidad de *Escherichia coli* a los antibióticos: evolución 1984 - 1995. Memorias de la XXI Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, A. C. - Proceedings of the Forty-Fifth Western Poultry Disease Conference, 1996 mayo 1-5; Cancún, Quintana Roo, México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC: 379-381.
- Allan, B., Hurk, J., and Potter, A.: Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can. J. Vet. Res.* 1993; **57**:146-151.
- Arp, L.: Colibacillosis. In: American Association of Avian Pathologists: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. *Kendal/Hunt Publishing Co.* 3th edition, 1989, pp12-13.
- Avellaneda, G., Villegas, P., Jackwood, M., and King, D.: *In vivo* evaluation of the pathogenicity of field isolates on Infectious Bronchitis virus. *Avian Dis.* 1994; **38**:589-597.
- Balcázar Q. J.; Quintana, J.A; Casaubon H., T., Le Lorier, A. y Télles, I. G.: Medición de los anticuerpos contra la IBF en reproductoras pesadas vacunadas contra IBF y Acemannan como inmunoestimulante y la protección de la descendencia contra *Salmonella enteritidis*. Memorias de la XXI Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, A. C. - Proceedings of the Forty-Fifth Western Poultry Disease Conference, 1996 mayo 1-5; Cancún, Quintana Roo, México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC:152-154.
- Baliarsingh, S., Rao, A., and Mishra, P.: Pathology of experimental colibacillosis in chicks. *Indian Vet. J.* 1993; **70**: 808-812.
- Bolin, C. A., and Jensen, A. E.: Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protect turkeys from *Escherichia coli* septicemia. *Inf. Imm.* 1987; **55**:1239-1242.
- Botero, L. A.: Evaluación de la sensibilidad y resistencia de los principales antibacterianos utilizados en avicultura frente a cepas respiratorias de *Escherichia coli*. Memorias de la XXI Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, A. C. - Proceedings of the Forty-Fifth Western Poultry Disease Conference, 1996

- mayo 1-5; Cancún, Quintana Roo, México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC: 224-227.
- Bree, A., Dho, M., and Lafont, J. P.: Comparative infectivity for axenic and specific pathogen free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with and without virulence factors. *Avian Dis.* 1989; **33**: 134-139.
- Chait A., S., Páez G., L., y Aguirre E., J.;; Evaluación de una bacterina experimental cepa LR2 contra la *Escherichia coli* en pollo de engorda. Memorias de la XXII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México. 1997 mayo 7-10, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México. México DF: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A. C.:134-140.
- Cross, A. S.: The biological significance of bacterial encapsulation. *Curr. Top. Microb. Imm.* 1990; **150**: 87.
- Dekich, M. A.: Influencia del manejo de los pollitos sobre el estado de salud y la mortalidad. *Avic. Prof.* 1992; **9**: 187 - 194.
- Dho-Moulin, M., Bosch, J., Girardeau, J., Brée, A., Barat, T., and Lafont, J.: Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Inf. Imm.* 1990; **58**:740-745.
- Dho-Moulin, M.: Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. *Ann. Méd. Vét.* 1993; **137**: 353-357.
- Dozois, C., Fairbrother, J., Harei, J., and Bossé, M.: *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Inf. Imm.* 1992; **60**:2648-2656.
- Dozois, C. M., Chanteloup, N. K., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., and Fairbrother, J. M.: Bacterial colonization and in vivo expression of type 1 fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microb.* 1993; **34**: 19-34.
- Ellis, M. G., Arp, L. H., and LaMont, S. J.: Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from Turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 1988; **49**: 2034-2037.
- Emery, D. A., Nagaraja, K. V., Shaw, D. P., Newman, J. A., and White D. G.: Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.* 1992; **36**: 504-511.

- Estrada T., L., Páez G., L., y Chait A., S.: Mejora de los parámetros productivos en pollo de engorda mediante la aplicación de una bacterina experimental cepa LR2 contra *E. coli*. Memorias de la XXII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México. 1997 mayo 7-10, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México. México DF: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A. C.:141-145.
- Fantinatti, F., Silveira W. D., and Castro, F. A.: Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microb.* 1994; **41**: 75-86.
- Frommer, A., Freidlin, P., Heller, D., Bock, R., Drabkin, N., and Samberg, Y.: Adherence-associated characteristics and pathogenicity of *Escherichia coli* from avian colibacillosis. *Avian Path.* 1990; **19**:547-554.
- Frommer, A., Freidlin, P., Bock, R., Leitner, G., Chaffer, M., and Heller, E.: Experimental vaccination of young chickens with a live, non-pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Avian Path.* 1994; **23**:425-433.
- Gentry, R. F., and Quarles, C. L.: The measurement of bacterial contamination on egg shells. *Poult. Sci.* 1972; **51**:930-933.
- González, A. C.: Factores de patogenicidad asociados a colisepticemia aviar. Memorias de la III Jornada Médico Avícola. 1992 agosto 12-14; México DF. FMVZ, UNAM:81 - 83.
- Goren, E.: Colibacillosis: etiology, pathogenesis, prevention and therapy. Memorias de la XVI Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, A. C. - Proceedings of the Fourtyth Western Poultry Disease Conference, 1991 abril 24-27; Acapulco, Guerrero, México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, AC: 109-111.
- Gross, W. B.: Factors affecting the development of respiratory disease complex in chickens. *Avian Dis.* 1990; **34**:607-610.
- Gross, W. B.: Colibacillosis, In: *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Ninth edition, 1991, pp 138 -144.
- Gyimah, J. E., and Panigrahy, B.: Immunogenicity of an *Escherichia coli* (serotype O1) pili vaccine in chickens. *Avian Dis.* 1985; **29**: 1078-1083.
- Gyimah, J. E., Panigrahy, B., and Williams, J. D.: Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. *Avian Dis.* 1986; **30**: 687-689.

- Gyimah, J. E., and Panigrahy, B.: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Dis.* 1988; **32**: 74-78.
- Hacker, J.: Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microb. Imm.* 1990; **151**:1.
- Hill, D.: Impacto de la incubadora sobre la cicatrización adecuada del ombligo. *Avic. Prof.* 1995; **12**:185-188 ().
- Intervet International. ELISA for determination *E. coli* F11 antibody titre in chicken serum. *Registration file.* SOP 5613.016.01. pp 567-574 (1993).
- Intervet International. ELISA for determination *E. coli* FT antibody titre in chicken serum. *Registration file.* SOP 5613.018.01. pp 575-582 (1993).
- Ike, K., Kawahara, K., Danbara, H., and Kume, K.: Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J. Vet. Med. Sci.* 1992; **54**: 1091.
- Ikemori, Y., Peralta, R., Kurori, M., Yokoyama, H., and Kodama Y.: Avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Poult. Sci.* 1993; **72**:2361-2365.
- Kapur, V., White, D., Wilson, R., and Whittam, T.: Outer membrane proteins patterns mark clones of *Escherichia coli* O2 and O78 strains that cause avian septicemia. *Inf. Imm.* 1992; **60**:1687-1691.
- Le Lorier, A.: Enfermedad respiratoria crónica complicada. Memorias de la Primera Jornada Médico Avícola. 1990 julio 23-27. Ciudad Universitaria, México DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia - Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C., D. F.:91-97.
- Leitner, G., Melamed, D., Drabkin, N., and Heller, D.: An Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Escherichia coli*: Association between indirect hemagglutination test and survival. *Avian Dis.* 1990; **34**:58-62.
- Márquez V., M. A., Lucio D., E., y Ríos C., J. F.: Evaluación de la sensibilidad in vitro de *E. coli* aisladas de casos clínicos durante septiembre de 1995 a febrero de 1997 frente a diferentes quimioterapéuticos. Memorias de la XXII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México. 1997 mayo 7-10, Ixtapa Zihuatanejo,

- Guerrero, México. México DF: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A. C.:127-130.
- Mauldin, J.M.: Doce componentes de un buen programa de sanidad en la incubadora.: *Avic. Prof.* 1991; 9: 64 - 66.
- McGruder, E. D.:Efecto de un lipopolisacárido sobre la inmunoprofilaxis contra la aerosaculitis inducida por *Escherichia coli* en pollos de engorda. Memorias del curso de actualización Avances en Inmunología Aviar. 1996 marzo 15. México, DF: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas AC:13-21.
- McGruder E., D.: Evaluation of an experimental *E. coli* airsacculitis model in broiler chicks. Memorias de la XXI Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, A. C. - Proceedings of the Forty-Fifth Western Poultry Disease Conference, 1996 mayo 1-5; Cancún, Quintana Roo, México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, AC:128-130.
- Nakamura, K., Cook, J., Frazier, J., and Narita, M.: *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with Infectious Bronchitis virus and / or *E. coli*. *Avian Dis.* 1992; 36:881-890.
- Nisbet D., J., Corrier D., E., Hume, M. E., Byrd, J. A., and Stanker, L. H.: Effect of CF3™ on cecal colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in broiler chicks. *Abstracts of papers presented at the eighteenth annual meeting of the Southern Poultry Science Society and the 38th annual meeting of the Southern Conference on Avian Diseases.* 1997 January 20-21; World Congress Center, Atlanta, Georgia, United States of America. Abstract S30.
- Padrón, M.: Calidad microbiológica del huevo incubable. *Avic. Prof.* 1992; 9: 173 - 178.
- Panigrahy, B., Gymah, J., Hall, C., and Williams, J.: Immunogenic potency of an oil-emulsified *Escherichia coli* bacterin. *Avian Dis.* 1984; 28:475-481.
- Quintana, J. A. Avitecnia. 2a ed. Trillas. México, D. F. 1991.
- Quintana, J.A.: Perspectivas de la producción de pollo de engorda. Memorias de la III Jornada Médico Avícola. 1992 agosto 12-14; México DF. FMVZ, UNAM: 172-175.
- Robey, W., Gasperoni, G., y Harlow, H.: Modelos: una herramienta para evaluar el crecimiento y la variación en el pollo de engorda. *Tec. Avip.* 1995; Año 8, No 91, 21-24.

- Rodríguez, L. M.: Colibacilosis en pollo de engorda. Memorias de la Primera Jornada Médico Avícola, 1990 julio 23-27; Ciudad Universitaria, México DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica - Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC: 98-113.
- Salyers, A., and Whitt, D.: Bacterial pathogenesis, a molecular approach. *Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois, USA, 1994*, pp 190-204.
- Sánchez, L.: Evaluación en campo de la vacuna de *Escherichia coli* adyuvada con glucano, optimización de la dosis. *Rev. Salud Animal* 1991: 13-16.
- Sokurenko, E. V., Courtney, H. S., Abraham, S. N., Klemm, P., and Hasty, D.: Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Inf. Imm.* 1992; **60**: 4709-4719.
- Steel, R. G. D. and Torrier, J. H. Principles and procedures of Statistics. A biometrical approach. 2nd ed. Singapore: *McGraw-Hill*, 1960, pp 448-449.
- Suwanichkul, A., and Panygrahy, B.: Biological and immunological characterization of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2 and O78 pathogenic to poultry. *Avian Dis.* 1986; **30**: 781-787.
- Taylor, G.: Tres formas comprobadas para mejorar los nacimientos, reducir los costos por pollito y mejorar las utilidades. *Tecnología Avipecuaria* 1995; Año 8 No 89, 19-21.
- Urquiza B., O., Bautista C., B., y Rosario C., C.: Susceptibilidad in vitro de 67 cepas de campo de *Escherichia coli* aisladas de aves domésticas contra una fluoroquinolona experimental. Memorias de la XXII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México. 1997 mayo 7-10, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México. México DF: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A. C.:131-133.
- Van Aarie: Antibody titers against F11 and FT in breeders and in day old chickens. *Registration file*, Intervet International, pp 73-75 (1993).
- Van Den Bosch, J., Hendriks, J., Gladigau, Y., Willems, H., Storm, P., and Graaf, F.: Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. *Inf. Imm.* 1993a; **61**:800-806.
- Van Den Bosch, J. F.: Passive immunization of chickens with antisera raised against F11 fimbriae and filamentous toxin (FT). *Registration file 92R/0094*. Intervet International. pp 410-420 (1993b)

- Van Den Bosch J. F.: Efficacy testing in broilers after vaccination of broiler breeders with various vaccines. *Registration file*. Intervet International. pp 421-442 (1993c)
- Van Den Bosch, J. F., Gladigau, Y., Willems, H., and Storm, P. K.: Vaccination with F11 fimbriae induces protection against chicken *E. coli* septicemia. Abstracts from the Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens International Symposium. 1994 June 6-8; Iowa State University, Ames, Iowa, Abstract 11.
- Vidotto, M., Müller, E., de Freitas, J., Alfieri, A., Guimarães, I., and Santos, D.: Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 1990; **34**:531 - 538.
- Wang, H., Zhang, Z., and Gan, M.: Studies on the immunogenicity of a pili vaccine prepared from *Escherichia coli* (serotype O78) pathogenic to chickens. Abstract. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 1994; **25**:174-179.
- White, D., Wilson, R., San Gabriel, A., Saco, M., and Whittam, T.: Genetic relationships among strains of avian *Escherichia coli* associated with swollen-head syndrome. *Inf. Imm.* 1990; **58**:3613-3620.
- White, D. J., Dho-Moulin, M., Wilson, R. A., and Whittam, T. S.: Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb. Pathogenesis* 1993; **14**:399-409.
- Williams, J. E. and Whittermore, A. D.: A method for studying microbial penetration through the outer structures of the avian egg. *Av. Dis.* 1967; **11**:467-490.
- Wold, A., Mestecky, J., and Suanbor, C.: Agglutination of *Escherichia coli* by secretory IgA a result of interaction between bacterial mannose-specific adhesins and immunoglobulin carbohydrate?. *Monograhly Allergy* 1988; **24**: 307-309.
- Yokoyama, H., Peralta, R., Diaz, R., Sando, S., Ikemori, Y., and Kodama, Y.: Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Inf. Imm.* 1992; **60**:998-1007.



## **APÉNDICE**

### **1. TÉCNICAS**

#### **1.1 Técnica de Gentry para el conteo de coliformos en cascarón de huevo.**

1. - Lavar el huevo con 9 ml de PBS en una bolsa.
2. - Hacer diluciones décuples individualmente ( 1 ml + 9 ml de PBS).
3. - De cada dilución se toman 10 ó 20  $\mu$ l y se siembran en McConkey
4. - Dividir las cajas en tres áreas para las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000, poner 3 gotas de cada dilución en cada espacio.
5. - Poner a incubar los medios por 24 a 48 horas a 37°C
6. - Se realiza el conteo ( con crecimiento lógico) .

Interpretación de la Cuenta Total de Coliformes:

Conteo de coliformes	Interpretación
0 - 5000	Baja contaminación o no contaminado.
5000 o más	Muy contaminado.

#### **1.2 Técnica de Williams para determinar la penetración de gérmenes a través del cascarón.**

1. - Evaluación de la penetración sólo a través del cascarón: El cascarón se separa de la membrana externa aplicando una ligera presión de aire contra la superficie externa de la membrana externa. Se toma la muestra de la superficie interna del cascarón con un hisopo estéril.

- superficie externa de la membrana externa. Se toma la muestra de la superficie interna del cascarón con un hisopo estéril.
2. - Evaluación de la penetración a través del cascarón y de la membrana externa: Se hace una abertura en el cascarón por la cámara de aire, para tomar la muestra del área entre las membranas externa e interna es necesario aplicar una ligera presión de aire contra la membrana interna para separar las dos. La muestra se toma con un hisopo estéril de la superficie interna de la membrana externa.
  3. - Evaluación de la penetración a través del cascarón y de las membranas externa e interna: Se hace una abertura en el cascarón por la cámara de aire, y se vacía el contenido del huevo. La toma de la muestra se realiza con un hisopo estéril.
  4. -Después de que se han tomado las muestras, los hisopos se colocan dentro de tubos que contengan los medios de cultivo adecuados, e incubados a las temperaturas requeridas, después de la incubación el contenido puede someterse a los análisis necesarios para la demostración e identificación del microorganismo que se busca.

### 1.3 Pruebas bioquímicas que caracterizan a *E. coli*:

Pruebas bioquímicas	Reacción
1.- TSI :	Reacciones 1, 3, o 4.
3.- Lactosa	(+)
4.- Indol	(+)
5.- H <sub>2</sub> S	(-)
6.- Urea	(-)
7.- Citrato	(-)
8.- Movilidad	(Variable)
9.- LIA	(+)

## 2. CUADROS

Cuadro A. Prueba preliminar para constatación y elección del aislamiento de campo de <i>E. coli</i> que se utilizó en las pruebas de desafío.							
Grupo	Aislamiento 1			Aislamiento 2			
	Vacuna	IP <sup>1</sup>	IN <sup>2</sup>	Grupo	Vacuna	IP	IN
Testigo	-	-	-				
1	-	+	-	1	-	+	-
2	-	-	+	2	-	-	+
3	+	-	-	3	+	-	-
4	+	+	-	4	+	+	-
5	+	-	+	5	+	-	+

<sup>1</sup> IP = Intraperitoneal, <sup>2</sup> IN = Intranasal

Nota: se usó el mismo grupo testigo para probar ambas cepas.

<b>Cuadro B. Escala de lesiones en las aves desafiadas. *</b>	
<b>Escala de lesión</b>	<b>Descripción</b>
<b>0</b>	<b>Sin lesiones</b>
<b>1</b>	<b>Saco aéreo opaco</b>
<b>2</b>	<b>Aerosaculitis fibrinosa</b>
<b>3</b>	<b>Aerosaculitis + pericarditis</b>
<b>4</b>	<b>Aerosaculitis + pericarditis + perihepatitis / Muerte <sup>1</sup></b>

\* J. F. Van Den Bosch y col. 1994.  
<sup>1</sup> Las aves muertas obtuvieron el grado cuatro sólo cuando se realizó la bacteria de desafío a partir de órganos.

**Cuadro 1. Títulos de anticuerpos anti FT (Log<sub>2</sub>) en sueros de gallinas vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**

Edad sem	Promedio		Máximo		Mínimo		Coeficiente de Variación	
	Vac.	Test.	Vac.	Test.	Vac.	Test.	Vac.	Test.
12	0.27	0.27	8.2	8.2	0	0	547.23	547.23
26	16.47*	5.02	17.7	9.8	14.6	0	8.33	83.41
36	14.33*	4.20	16.2	9.8	9.8	0	8.33	102.13
46	14.23*	6.22	16.2	10	11.4	0	9.49	72.91
56	13.64*	9.73	16.2	16.2	11.4	0	10.93	36.11

El resultado que se exhibe es el promedio aritmético de 30 muestras de suero analizadas en cada grupo.

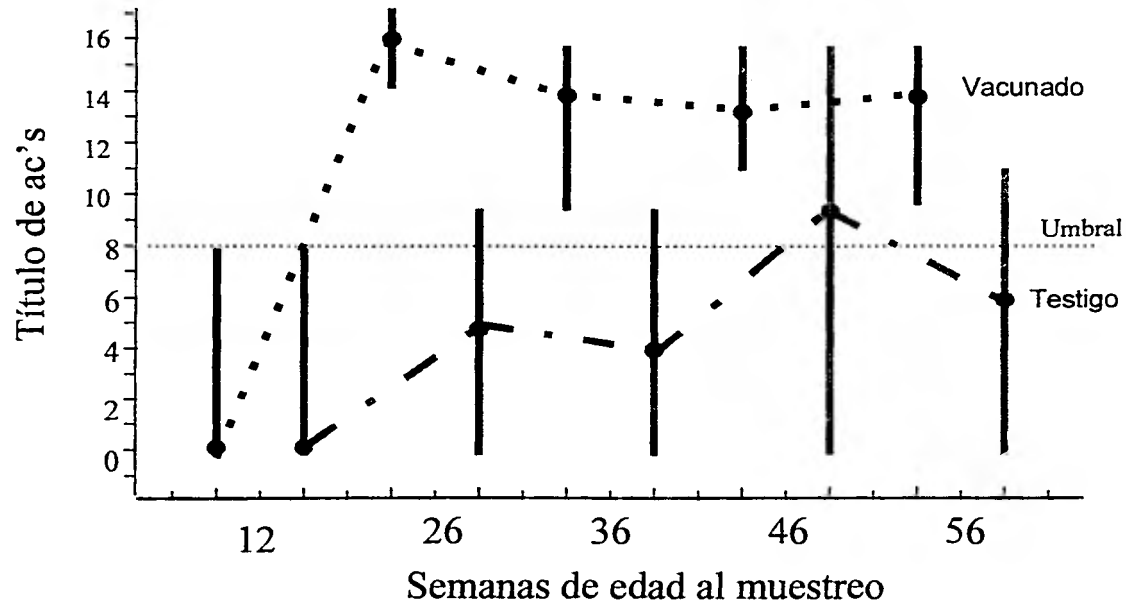
\* p < 0.05

**Cuadro 2. Títulos de anticuerpos anti F11 (Log<sub>2</sub>) en sueros de gallinas vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**

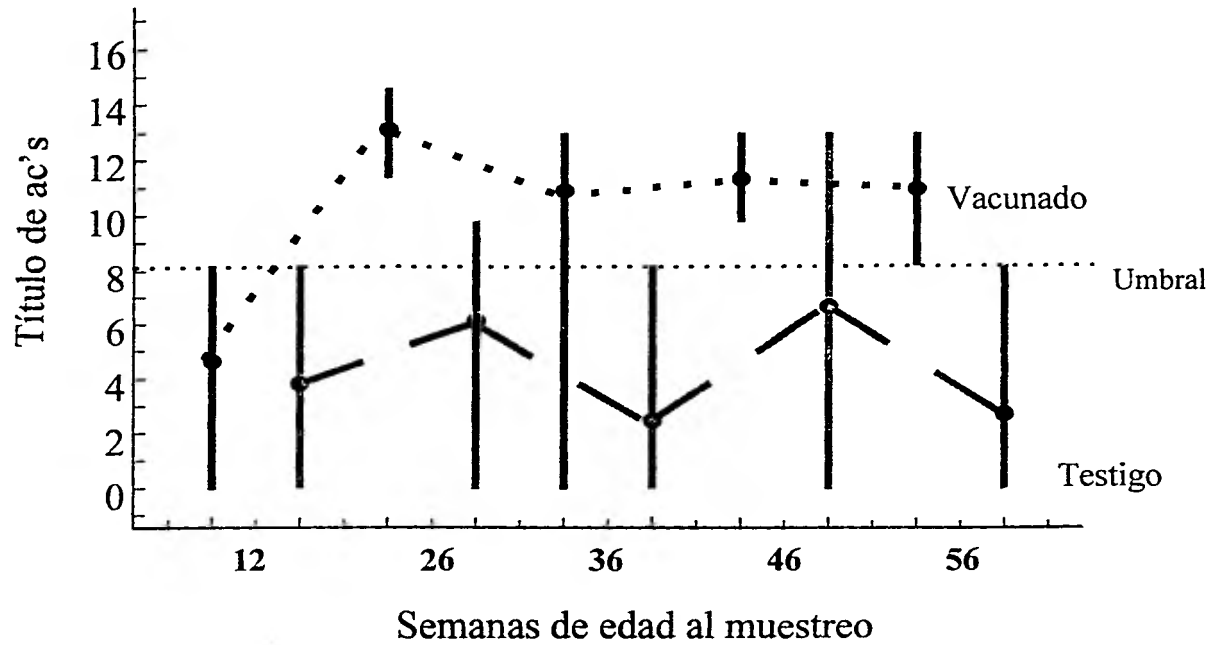
Edad sem	Promedio		Máximo		Mínimo		C. V.	
	Vac.	Testigo	Vac.	Testigo	Vac.	Testigo	Vac.	Testigo
12	4.64	3.82	8.2	8.2	0	0	88.94	108.73
26	13.16*	6.12	14.6	9.8	11.4	0	5.84	61.68
36	10.91*	2.46	13	8.2	0	0	21.08	155.36
46	10.97*	2.73	13	8.2	8.2	0	10.08	143.83
56	11.34*	6.65	13	13	9.8	0	7.84	64.41

El resultado que se exhibe es el promedio aritmético de 30 muestras de suero analizadas en cada grupo.

\* p < 0.05

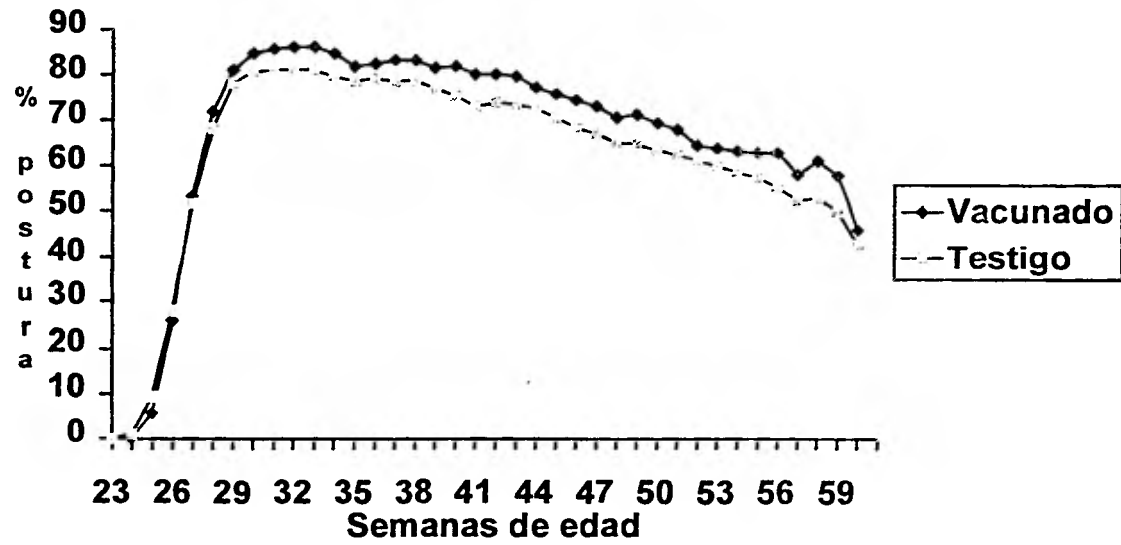


**Figura 1. Títulos de anticuerpos anti FT en gallinas vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**



**Figura 2. Títulos de anticuerpos anti F11 en gallinas reproductoras vacunadas y sin vacunar contra *E. coli***





**Figura 3. Porcentaje de producción de huevo de gallinas vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**

**Cuadro 3. Parámetros productivos a las 61 semanas de edad en gallinas reproductoras pesadas vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.<sup>1</sup>**

Grupo	% mort. y selec.	% huevo incub.	% huevo comerc.	% fert.	% pollo 1 <sup>a</sup>	% pollo 2 <sup>a</sup>	Huevos / GE
Vacunado	13.79	92.76	7.24	88.82	79.12 *	0.62	153.6 **
Testigo	13.48	91.90	8.10	88.34	76.93	0.83	143.4

<sup>1</sup> Los valores exhibidos corresponden al promedio de tres repeticiones del grupo experimental y dos repeticiones del grupo testigo.  
 \* p < 0.10, \*\* p < 0.05

**Cuadro 4. Porcentaje promedio de aislamiento de *E. coli* en pollos de engorda al primer y séptimo día de edad a partir de órganos internos.<sup>1</sup>**

Grupo	Edad: un día				Edad: 7 días			
	Muestras	Pulmón	Higado	Vitelo	Muestras	Pulmón	Higado	Pericardio
Tratado	23	12.75*	4.25*	3.25*	20	27.25	6.00*	4.00
Testigo	23	26.25	15.5	7.00	21	31.75	16.75	6.00

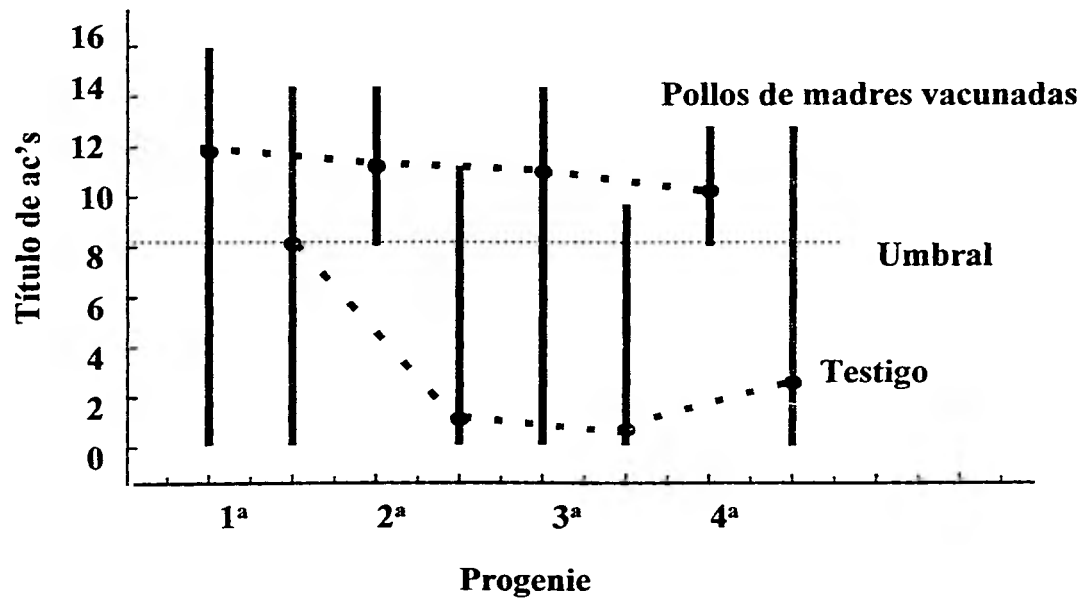
<sup>1</sup> Los valores exhibidos corresponden al promedio de cuatro muestras de órganos tomados de pollos en diferentes puntos del ciclo productivo de las reproductoras.  
\* p < 0.05

**Cuadro 5. Títulos de anticuerpos contra los antígenos FT y F11 de *E. coli* en pollos progenie de madres vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**

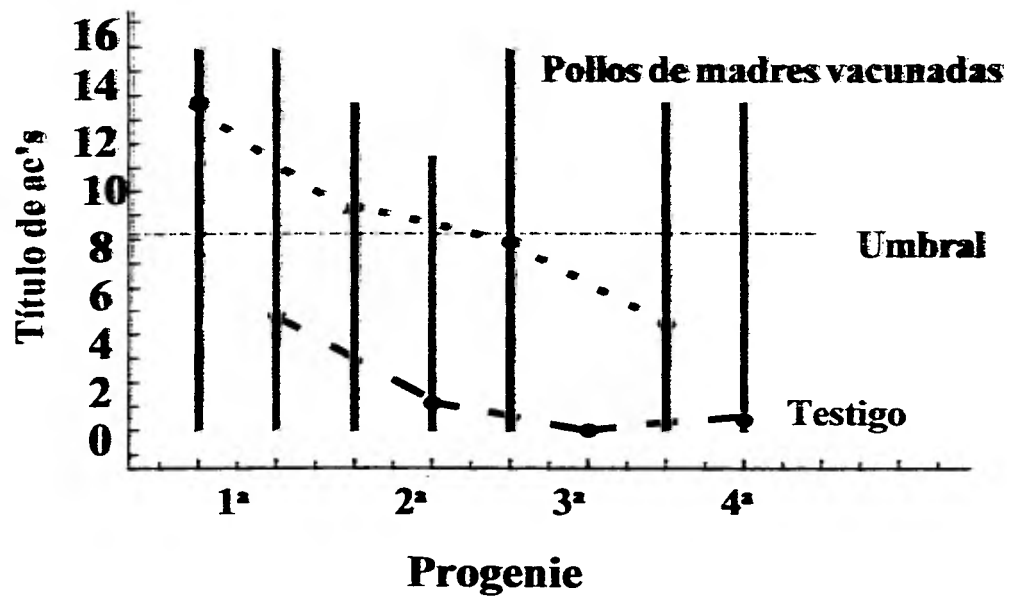
Progenie <sup>1</sup>	<u>FT, 1 día</u>		<u>FT, 7 días</u>		<u>F11, 1 día</u>		<u>F11, 7 días</u>	
	Tratado	Test.	Tratado	Test.	Tratado	Test.	Tratado	Test.
Primera	11.98*	6.34	4.56	7.80	6.91*	3.97	2.56	2.18
Segunda	11.02*	1.03	8.5*	0.32	6.66*	0.82	1.09	0.0
Tercera	11.17*	0.60	5.11	6.36	5.62*	0.0	1.74	0.54
Cuarta	10.38*	2.56	10.06*	1.36	3.16*	0.32	3.82*	0.54

<sup>1</sup> El resultado que se exhibe es el promedio aritmético de 30 muestras de suero analizadas en cada grupo.

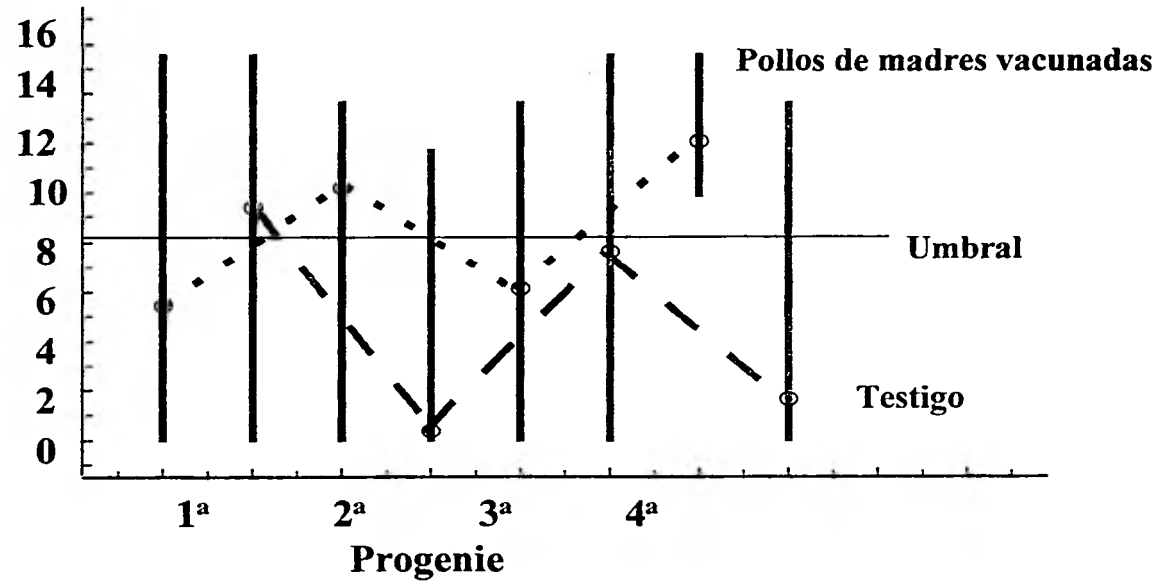
\* p < 0.05



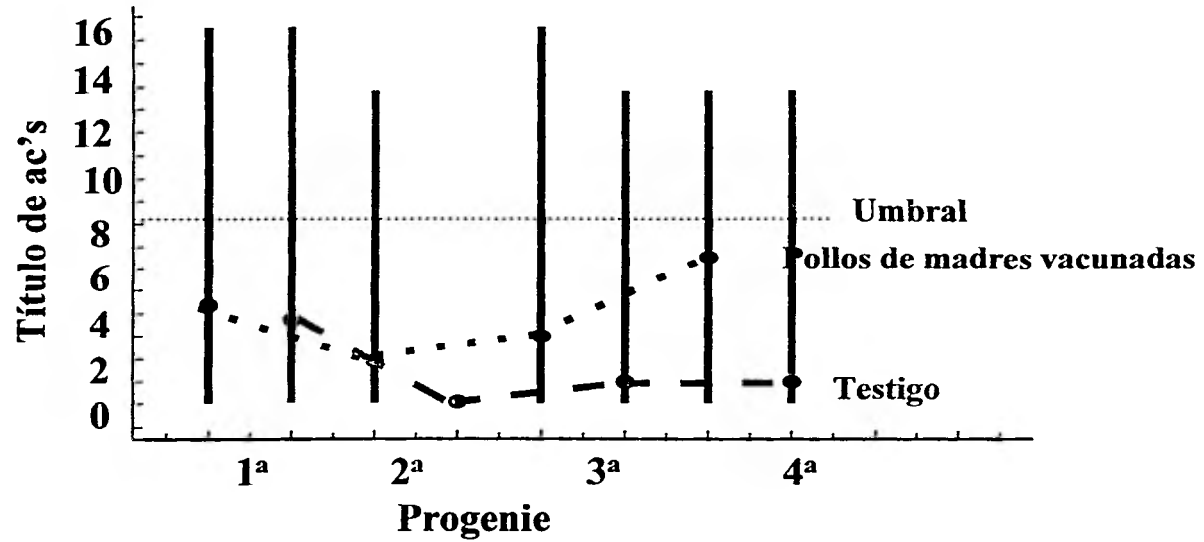
**Figura 4. Títulos de anticuerpos anti FT en pollos de 1 día de edad nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**



**Figura 5. Título de anticorpos ant F11 em pollos de um dia de idade nascidos de mães vacunadas e sem vacunar contra *E. coli*.**

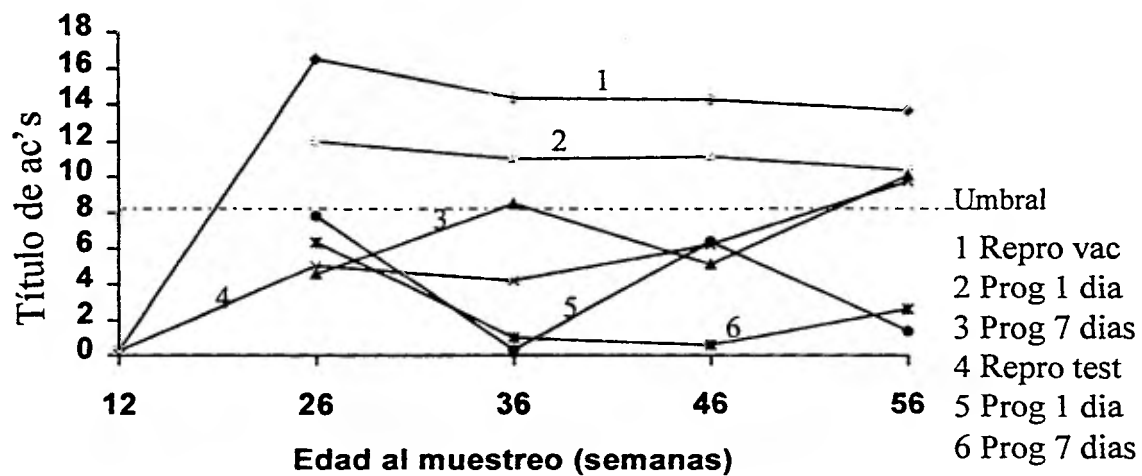


**Figura 6. Título de anticuerpos anti FT en pollos de 7 días de edad nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**

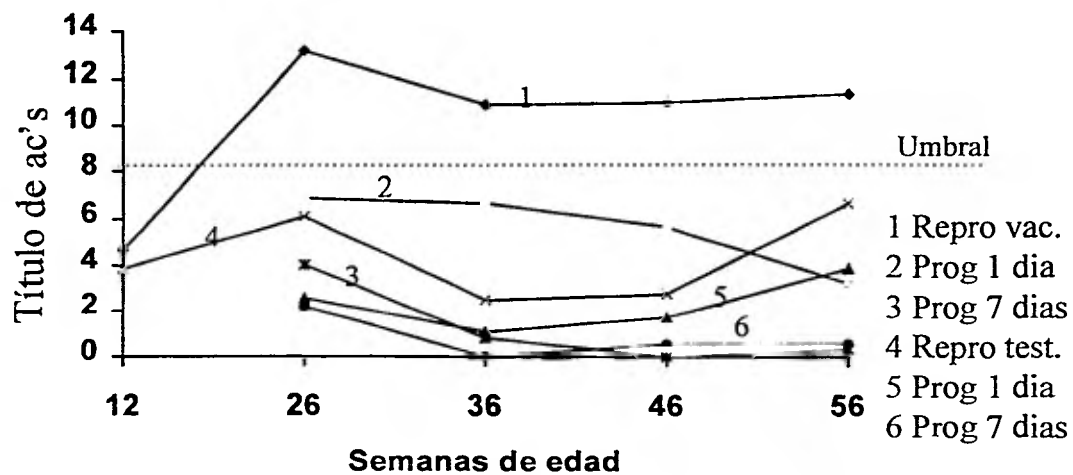


**Figura 7. Título de anticuerpos anti F11 en pollos de 7 días de edad nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.**





**Figura 8. Títulos de anticuerpos anti FT en gallinas vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*, transferencia de estos a su progenie y medición de los mismos a los siete días de edad de los pollos.**



**Figura 9. Títulos de anticuerpos anti F11 en gallinas vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*, transferencia de estos a su progenie y medición de los mismos a los siete días de edad de los pollos.**

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad en pollos de engorda desafiados con *E. coli* al día de edad por diferentes rutas. <sup>1</sup>**

Grupo	Aves desafiadas		% mortalidad	
	IP <sup>2</sup>	IN <sup>3</sup>	IP	IN
Tratado	25	25	67*	7
Testigo	25	25	70*	5

<sup>1</sup> Los datos exhibidos corresponden al promedio de cuatro pruebas de desafío.  
<sup>2</sup> IP = Intraperitoneal, <sup>3</sup> IN = Intranasal  
\* p < 0.05

**Cuadro 7. Porcentaje de recuperación de la cepa de *E. coli* de desafío a partir de órganos de pollos sobrevivientes 14 días postinoculación <sup>1</sup>.**

Grupo	Desafío Intraperitoneal			Desafío Intranasal		
	Pulmón	Hígado	Pericardio	Pulmón	Hígado	Pericardio
Tratado	25 *	6.25 *	3.03 *	21.74	6.52	2.17 *
Testigo	50	23.33	20	22.34	7.44	9.57

<sup>1</sup> Los datos exhibidos corresponden al promedio de cuatro pruebas de desafío realizadas.

\* p < 0.05

**Cuadro 8. Resumen de los parámetros productivos de pollos de engorda nacidos de madres vacunadas y sin vacunar contra *E. coli*.<sup>1</sup>**

Grupo	# de aves	Mortalidad a la 1ª sem %	Ganancia Diaria de Peso (g)	Peso Final (kg)	Consumo de Alimento (Kg)	Índice de Conversión	Índice Product
Tratado	375	1.25	45.25	2.55	5.71	2.37	168
Testigo	375	1.17	45.47	2.58	5.64	2.42	167

<sup>1</sup> Los valores mostrados son el promedio de cuatro progenies de cada grupo de reproductoras, mantenidas en una caseta experimental hasta los 56 días de edad.  
p > 0.05.