

7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE LA INOCUIDAD, POSIBLE
RESPUESTA ANTIGENICA Y TRANSMISION
OVARICA DE *Salmonella enteritidis* VARIEDAD
17 F-4 EN GALLINAS DE POSTURA LIBRES DE
PATOGENOS ESPECIFICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

LAURA TRINIDAD AVIÑA GUERRERO

ASESORES: MVZ M.C. DR. ODETTE URQUIZA BRAVO
MVZ M.C. PhD GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
MVZ M.C. JUAN CARLOS VALLADARES DE LA CRUZ



300702



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.

EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD, POSIBLE RESPUESTA ANTIGENICA Y TRANSMISIÓN
OVÁRICA DE *Salmonella enteritidis* VARIEDAD 17 F-4 EN GALLINAS DE
POSTURA LIBRES DE PATÓGENOS ESPECIFICOS

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

LAURA TRINIDAD AVIÑA GUERRERO

ASESORES MVZ M C Dr. ODETTI JROQUITA BRAVO
MVZ M C. PhD GUILLERMO ALBERTO ISAIAS
MVZ M C JUAN CARLOS VILLALBA VARELA DE LA CRUZ

México, D.F. 2001

DEDICATORIA

Enteramente a ti madre, pues esto es resultado del gran esfuerzo que has hecho y que ha rendido sus primeros frutos... .. no te defraudaré.

Gracias por estar a mi lado en todo momento y por soportar mi mal carácter. Eres lo más importante en mi vida y te quiero, te admiro y te respeto mucho.

Laura

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar con salud a esta bella etapa
A mis hermanos, Cristóbal y Andrés, por soportarme, orientarme, apoyarme para el término de mis estudios, y sobre todo quererme

A mis asesores y sinodales Dres. Guillermo Téllez I., Ma. Teresa Casaubon H., Fernando Constantino C., Reynaldo Moreno, José A. Quintana L., Juan Carlos Valladares de la C y Odette Urquiza B por su paciencia y apoyo para dar término a este trabajo

A mis amigos y apoyo en todo momento: Daniel Hernández Méndez, Mario Alfaro Cruz, Aniria Rangel Martínez, Mónica Castillo Quintanar, Griselda Badillo Meneses (Clarita) y Patricia González Salinas, por quererme, soportarme, apoyarme y enseñarme el valor y significado de la palabra amistad

A Laura Santos, Lourdes Hernández, Aneleika García y Gabriela Bañuelos por apoyar y hacer felices a quienes me han apoyado y me han hecho saber y sentir que cuento con alguien

A LVC por ese corto pero grandioso tiempo y por tu felicidad

A José A. y Félix Josafath Gallegos Antúnez por brindarme su hermosa amistad, apoyo incondicional y hermosos instantes de infinito buen humor

A J. Alberto Téllez Javier por apoyar a mi familia en momentos difíciles y por ser un gran amigo

A Cecilia Rosario, Donaji García, Rubén Merino, Jesús Cabriales, Gerardo Nava y Pilar Castañeda por darme un espacio, apoyarme, orientarme y por su espontaneidad que tanto me alegra y divierte ¡Siempre unidas PC's!

A mis ciber-amigos Ing. Alberto Paxtlan O., Ing. Saúl Sánchez, Ing. Rafael Mejía, Ing. Alfredo Toledo, C.P. Pablo Morales y Dr. Carlos Soria por sus sabios consejos y por alegrarme con sus reflexivos y entusiastas e-mails.

A mis compañeros de generación Eva, Fredy, Hugo, Héctor, Diana, Poncho, Toño (Dr. Gazapo), Gabriela, Julio, Benjamín, Juan Carlos, Fabiola, Javier y Berenice, por su grata compañía durante esos hermosos años de licenciatura

A la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México por darme el espacio necesario para la continuidad de este trabajo y por el apoyo de sus integrantes, especialmente de la Dra. Maritza Tamayo Salmorán, por creer en mí y brindarme excelentes oportunidades para mi desarrollo profesional

Al Depto. de Producción Animal: Aves, por brindarme la oportunidad de trabajar con su maravillosa gente a quien agradezco su infinita paciencia y su invaluable ayuda, en especial a los T. L. Rosa Saldívar y José Hernández

A mi queridísima Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por todas sus enseñanzas y por darme los mejores y más felices momentos de mi vida, pero sobre todo por prepararme para un futuro profesional exitoso

A mi siempre respetada y muy querida U.N.A.M., mi alma mater, por todos los años de enseñanza y por ser labradora de grandes sueños que con esfuerzo y dedicación se realizan

Triunfador no es el que vence a los demás, sino el que se conquista a sí mismo, frenando sus vicios y superando sus límites.

C. Torres Pastorino

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	20
LITERATURA CITADA	32
CUADROS	38

RESUMEN

AVIÑA GUERRERO LAURA TRINIDAD. Evaluación de la inocuidad, posible respuesta antigénica y transmisión ovárica de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 en gallinas de postura Libres de Patógenos Específicos (SPF) (bajo la dirección de MVZ MC Dr Odette Urquiza Bravo, MVZ MC PhD Guillermo Téllez Isaías y MVZ MC Juan Carlos Valladares de la Cruz)

En el presente estudio se evaluó la inocuidad de la cepa *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 en 36 aves SPF de 22 semanas de edad mediante su administración oral. Se inocularon 18 aves con un ml de *S. enteritidis* var 17 F-4 a una concentración de 3×10^9 UFC/ml. Las 18 aves restantes fungieron como grupo testigo negativo. Las aves fueron alojadas en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Diariamente se observó su comportamiento y se tomaron muestras de heces durante 29 días así como recolección de huevos a partir del cuarto día post-inoculación para llevar a cabo las pruebas de aislamiento bacteriológico convencional. También se tomaron muestras de suero antes y después de la inoculación y luego cada 7 días para la realización de la prueba de Aglutinación Rápida en Placa (ARP) con antígeno K polivalente comercial. A los 29 días post-inoculación las aves fueron sacrificadas en busca de lesiones sugestivas a salmonelosis. Se tomaron muestras de corazón, bazo, hígado, tonsilas cecales, ciego, médula ósea, ovario y oviducto para llevar a cabo las pruebas de aislamiento bacteriológico convencional para el aislamiento e identificación de *S. enteritidis*. Durante el periodo de prueba no se apreció alteración alguna en la conducta de las aves, los resultados del análisis bacteriológico de heces fueron negativos al aislamiento de la *Salmonella* en experimentación al igual que el análisis del muestreo interno y externo de los huevos. Sin embargo, algunas de las muestras de suero fueron positivas a *Salmonella* spp. en la prueba de Aglutinación Rápida en Placa coincidiendo que con estas mismas aves se obtuvo un crecimiento de *Proteus* sp a partir de ciegos, lo que pudiera indicar una reacción cruzada. No se presentaron cambios patológicos aparentes en los órganos internos de las aves y no se obtuvo aislamiento positivo a *Salmonella* spp en ningún órgano.

Palabras Clave: *Salmonella enteritidis* var 17 F-4, *Proteus* sp, reacción cruzada

INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* es parte de la familia de bacterias Gram negativas denominada *Enterobacteriaceae*. Este género es amplio, está dividido en 65 subgrupos y se han descrito más de 2,400 serotipos con base en el análisis antigénico de los componentes de la membrana bacteriana y esta lista continúa creciendo a medida que se aíslan nuevos microorganismos. Las salmonelas se diferencian entre sí por la expresión de múltiples antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) distintos y por sus diferentes patrones de reactividad bioquímica (1, 2, 3, 4, 5). Se trata de bacilos anaerobios facultativos que no forman esporas, de longitud variable de 0.6 a 0.7 por 2 a 3 μm . La mayoría son móviles pero existen dos excepciones importantes en las cepas adaptadas a las aves *S. pullorum* y *S. gallinarum*. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* son patógenas e infectan a una gran cantidad de animales tanto domésticos como silvestres y a los humanos también. Se les encuentra en todos los mamíferos y aves domésticas, así como en una amplia variedad de reptiles. Algunas de ellas, están sumamente adaptadas a sus hospedadores; por ejemplo, *S. typhi* que afecta a los humanos provocando la fiebre tifoidea y no se conoce ningún otro reservorio. *S. pullorum* y *S. gallinarum* que afectan a las aves y rara vez producen enfermedades significativas en otras especies; *S. choleraesuis*, con una sola serovariedad, la cual afecta primariamente a los cerdos y ocasionalmente causa infecciones sistémicas en humanos y por último *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, que son patógenas para una gran cantidad de especies animales, entre las que se incluye a los humanos, provocando infecciones diarreicas (5, 6, 7, 8, 9)

La salmonelosis es una enfermedad que afecta principalmente a los animales muy jóvenes, viejos o muy débiles. Los adultos mueren de la infección cuando su resistencia se encuentra disminuida por estrés, enfermedades virales, dietas inadecuadas o condiciones insalubres extremas (5, 8).

La importancia de estos organismos no es sólo por su capacidad de provocar enfermedad en los animales sino que también provoca grandes pérdidas económicas, debido a que los animales quedan como portadores asintomáticos contribuyendo así a la contaminación de los alimentos para los humanos lo que ha provocado que se considere un problema de serias proporciones en todo el mundo (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Gast (1990 y 1992) demostró en infecciones experimentales y observaciones de campo, que la exposición de gallinas a *Salmonella enteritidis* puede provocar una colonización intestinal de persistencia variable, una diseminación a órganos internos incluyendo los ovarios, incremento de anticuerpos séricos específicos en niveles detectables, y producción de huevos conteniendo *Salmonella enteritidis* (11, 12, 13, 14).

Se ha observado que la infección por *Salmonella* en aves, continúa siendo de gran interés debido a que más de 99% de las 2,400 o más cepas de *Salmonella* identificadas hasta el momento, causan infecciones subclínicas en pollos, por lo que en salud pública, este organismo sigue siendo el más importante (15).

La carne de ave, huevos y otros alimentos contaminados con *S. enteritidis* pueden aparentemente no mostrar ninguna anomalía o indicio de contaminación y sin embargo, causan enteritis en humanos, cuya sintomatología es diarrea, fiebre, dolores abdominales, vómito y en casos severos, septicemia y muerte (16).

St. Louis *et al.* (1988) informaron de la asociación existente entre huevos y las infecciones por *S. enteritidis* debido a que muchos casos han involucrado a grupos de personas en instituciones, reuniones sociales y restaurantes, enfatizando el gran potencial que tiene el mal manejo de los alimentos cuando se preparan y/o almacenan en gran cantidad (16, 17).

El incremento regional de brotes de salmonelosis humana asociados al huevo debidas a *Salmonella enteritidis* en el noreste de los Estados Unidos de América, ha propiciado las investigaciones para determinar con precisión las causas potenciales. Las prácticas defectuosas de manejo de alimento, tales como el almacenaje de huevo a temperatura ambiente por varias horas, la higiene deficiente y el cocimiento inadecuado de los huevos, están involucrados en la mayoría de los brotes. Sin embargo, se sospecha la contaminación primaria de huevos a nivel granja como resultado de la infección transovárica o la penetración de *Salmonella* a través del cascarón. Las parvadas también son capaces de ampliar el problema por pase de la infección a su progenie y de aquí producir una fuente potencial de alimento contaminado para humanos (15, 16, 17, 18, 19, 20)

Las infecciones por *S. enteritidis* en pollos jóvenes se manifiestan en forma diferente a lo que ocurre en los humanos. Los pollos se muestran somnolientos con una diarrea profusa seguida de deshidratación; puede haber alta morbilidad y mortalidad, sin embargo, las aves adultas no muestran signología clínica, aunque se puede apreciar depresión, retardo en el crecimiento, poca ganancia de peso, un incremento en la mortalidad y una disminución en la producción de huevos. A la necropsia se pueden observar esplenomegalia con focos necróticos, en hígado focos necróticos y congestión, en ciegos exudado

caseoso y focos necróticos, en corazón adherencias pericárdicas, pericarditis, focos necróticos, en ovarios hemorragias en los tejidos y en las yemas que se encuentran en regresión en pollitos y peritonitis por presencia de retención de saco vitelino. La naturaleza invasiva de *S. enteritidis* y su aparente predilección por el tejido reproductivo implica problemas especiales por lo que puede estar presente en el contenido de huevos limpios intactos (4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

La persistencia de *Salmonella* se debe a la imposibilidad, que por higiene y desinfección, se da para eliminarla de las casetas avícolas en el momento de la despoblación. El muestreo y la experiencia han mostrado que hay mayor frecuencia de la infección con ciertas cepas de *Salmonella* en los reproductores del pollo de engorda, de las cuales las más importantes son *S. enteritidis* y *S. typhimurium* (13, 14, 15, 16, 17, 20).

Durante muchos años se creyó que el alimento de aves comerciales era el principal contribuyente en el problema de salmonelosis aviar. Se pensaba que si *Salmonella* era eliminada del alimento, se resolvería el problema, sin embargo, debido a que existen numerosas fuentes de *Salmonella* en las operaciones integradas de pollo comercial, algunas de ellas parecen estar contribuyendo mayormente a la contaminación final del pollo procesado que el alimento, como el que otros animales se infecten y se continúe así ciclando la infección por *Salmonella* spp (ratas, ratones, perros, gatos y aves silvestres, además del hombre). En la producción de alimentos para animales, ocurre la contaminación bacteriana, si los ingredientes o el producto final no se protegen de la contaminación por plagas tales como insectos, roedores y aves silvestres, que llegan a poblar casetas avícolas y otras instalaciones

agropecuarias de bovinos, porcinos, ovinos y equinos (16, 19, 20, 21, 22).

Los roedores infectados juegan un papel importante en la prevalencia de la infección sobre granjas productoras de huevo (15, 16, 17, 20, 23) El control de esta plaga ha sido difícil pues contribuye en la diseminación de enfermedades como salmonelosis hacia otras especies animales, y hacia el hombre a través de la contaminación de los alimentos, entre los que se encuentran la carne de pollo y los huevos de gallina. Hoy en día se sabe que los roedores de la familia Muridae son vectores de más de 60 enfermedades; Savage y White (1923) encontraron *S. enteritidis* en seis de un total de 96 ratas capturadas en los alrededores de dos mataderos (24, 25, 26).

Las ratas y ratones siguen siendo una seria amenaza para los pollos por el contacto directo y la contaminación de la cama o los componentes cereales de la dieta. *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium* son particularmente capaces de vivir en roedores infectados y de aquí, infectar pollos a través del contacto con su ambiente (15)

Los roedores de la familia Muridae representan el mayor riesgo para la diseminación de la enfermedad y la persistencia de la infección en granjas de reproductores. En estudios más específicos sobre la infección por *Salmonella enteritidis*, se ha revelado que la dosis infectiva para ratones es muy baja, posiblemente menor a 15 organismos de *Salmonella* spp. El ratón infectado permanece como portador latente que puede después excretar *Salmonella* spp. intermitentemente. La rápida diseminación de la infección en colonias de ratones puede estar restringida a la subpoblación alrededor de la caseta porque el ratón no abarca un gran territorio. Las ratonas

gestantes infectadas pueden transferir la infección a su progeñie. Las heces de ratones infectados puede contener arriba de 1,000 organismos de *Salmonella* spp por bolo fecal y, hay evidencia de incremento de la virulencia de la cepa de *Salmonella* spp para aves, después de pasar a través de un ratón (15, 20, 23, 27, 28).

Los problemas ocasionados por lo roedores, además del incremento del riesgo epidemiológico por ser transmisores de un gran número de enfermedades, es también debido a los daños económicos que ocasionan en construcciones, plantas de procesamiento de alimento, instalaciones, cultivos y granos almacenados que han llegado a alcanzar cifras alarmantes en algunos países del mundo (4% del total mundial) (24, 26, 29, 30, 31, 32).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los daños en el mundo causados por lo roedores llegan a 33 millones de toneladas de productos agrícolas por año, cifra que alcanzaría para alimentar a 130 millones de personas (26).

La lucha para el control de estos animales ha sido causa de muchas investigaciones, debido al uso indiscriminado de ciertos productos para su control y eliminación (26, 31, 32).

Para el control de estos animales nocivos se han utilizado diferentes métodos, como son los entrampados, gases venenosos, ondas de sonido ultrasónico, métodos químicos (cebos rodenticidas de rápida o baja acción) y el control biológico. El método químico es el más difundido pero sus desventajas son que en su mayoría son altamente tóxicos, dañan el medio ambiente, crean con su uso continuo resistencia, causan repulsión y miedo en los roedores y en caso de consumirlos lo hacen en pequeñas cantidades, la muerte ocurre en su mayoría en forma rápida y tienen que ser aplicados con gran cuidado

para no afectar otros animales domésticos debido a la intoxicación por la ingestión accidental de los componentes que se encuentran cerca de los sitios donde se colocan los cebos, pues existen informes acerca de la mortalidad en el 100% de pollitos menores a una semana de edad por Caumafuryl (Fumarina), encontrándose 340 ppm en la paja de las cajas del transporte del pollito (26, 31, 32, 33, 34, 35, 36).

Aunque este método ha sido el más práctico, Howard (1967) menciona que el control biológico reduce la densidad de población de especies nocivas, ya sea por incremento en la predación, manipulando las condiciones del hábitat, aplicando agentes que alteren o eviten la fertilidad y por último, introduciendo o estimulando epizootias mediante la acción de parásitos, predadores o patógenos (32, 33, 37)

El control por medio del uso de bacterias está basado en la patogenicidad selectiva de los microorganismos o su capacidad de provocar enfermedades que conduzcan a la destrucción del hospedero, no provocando en él proceso de repulsión y defensa, y que, al mismo tiempo, sean inocuos para las personas y los animales domésticos (37).

Los patógenos usados para el control de animales nocivos comprenden diferentes bacterias (antiguamente llamadas "virus de ratas") y un virus, el mixomavirus. Este último es un patógeno conocido como específico de especie (conejos). El control microbiológico de roedores nocivos fue propuesto por primera vez a finales del siglo XIX, en 1870, por Luis Pasteur, Mechnikov y Gamaleia, quienes descubrieron a la bacteria del cólera aviar "*Bacterium bipolaris avisepticum*" ahora *Pasteurella multocida* (26, 28, 29, 32, 33, 37, 38)

Pasteur, en 1887, señaló la posibilidad del uso de esta última en Francia y Australia contra los conejos silvestres, quienes causaban

grandes perjuicios en las siembras de estos países, y fue el primero en sugerir el uso de microorganismos para infectar a especies dañinas sin atacar otras especies (38). Sin embargo, las dudas acerca de la seguridad ecológica de la bacteria del cólera aviar, dio inicio a la búsqueda de otros agentes patógenos para el control de roedores. La búsqueda en el desarrollo del método microbiológico contra los roedores la continuaron los siguientes científicos: Mereshkovski (1893), quien describió la patogénesis de las bacterias aplicables a diferentes especies de roedores a partir de una epidemia de marmotas (*Citellus* spp) en Samara y empleó masivamente preparados microbiológicos para la destrucción de los roedores (26, 32, 38).

Loefler (1892), Laser (1892, 1894), Bonfai y Projorov (1956), Bykovskii y Serebriamova (1958), desarrollaron diversos cultivos a partir del aislamiento de la bacteria de la tifoidea de ratón (después conocida como *Salmonella typhimurium*) y los usaron contra plagas de ratones campestres que devastaban los campos de trigo en Thessaly, Grecia (25, 26, 28, 32) Issatschenko en Rusia (1896), Bahr en Suiza (1905), Dunbar en Inglaterra (1906), Neiman en Dinamarca (1906), también lograron aislar distintos tipos de bacterias que comenzaron a emplearse para combatir las plagas de roedores (32, 37, 38).

Danzysz (1893, 1900 y 1913) examinó ratones campestres moribundos durante una epizootia en Francia en 1893 y cultivó un microorganismo (después llamado *S. enteritidis* var. *danzysz*) que utilizó en 1893 primero contra ratas negras y después contra ratas grises (*Rattus rattus* y *R. Norvegicus* respectivamente) en Francia, Suiza, Dinamarca, Inglaterra y otras ciudades europeas (27, 32, 38).

En 1897, Issatschenko, aisló cultivos puros de bacterias de los órganos de las ratas muertas en el transcurso de la epizootia entre

ratas grises (*R. norvegicus*) que se desarrolló en San Petesburgo (Rusia), denominándola "bacteria *decumanicidum*" (ahora conocida como *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, Grupo D, variedad 17 F-4) (32, 37, 38).

La patogenicidad de la bacteria de Issatschenko, actualmente *S. enteritidis* var. 17 F-4, para su uso contra animales de sangre caliente (domésticos y salvajes) fue objeto de investigaciones especiales llevadas por veterinarios y microbiólogos (22, 28, 38).

Leslie, en 1942, evaluó los principales productos usados en el control de los roedores para conocer el principio activo de cada uno y su diferenciación y, los resultados, comprobaron que los seis productos fueron serológicamente idénticos a *Salmonella enteritidis*, con estructura antigénica 0:9.12, H:gm, según el esquema de Kauffman-White (27, 28, 32, 36).

Desde 1967 a la fecha, Cuba continúa elaborando un raticida a base de *S. enteritidis* var. 17 F-4, un anticoagulante y un cebo compuesto de arroz, que ha sido utilizado en diferentes condiciones geoclimáticas como Vietnam, Guatemala, República Dominicana, Ecuador, Perú y otros, con resultados satisfactorios en el control de diferentes especies de roedores (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Rattus argentiventer*, *Rattus exulans*, *Rattus flavipectus*, *Oryzomys* spp y *Sigmodon* spp (24, 29, 30).

Los signos que se han observado por la ingestión del rodenticida elaborado con *S. enteritidis* var 17 F-4 en los roedores entre el sexto y décimo día posteriores a su ingestión son anorexia, caída del pelo y pérdida del brillo, diarrea, conjuntivitis y muerte. A la necropsia se aprecia hepatomegalia y congestión hepática.

esplenomegalia y en intestino delgado inflamación y mucosa ictérica, provocando la muerte (26, 29, 37, 39).

La estructura antigénica de *S. enteritidis* var. 17 F-4 (Issatschenko), la cual es usada como componente del Rodenticida Biológico Comercial cubano (RBC) es O: 1, 9, 12, H: g, m fase 2: 1,7. Su taxonomía cambia repetidamente y actualmente pertenece al grupo "D" de acuerdo a la cédula de clasificación de Kaufmann-White: *Salmonella enterica*, subespecie enterica serotipo *enteritidis* var. 17 F-4, grupo D, subgrupo 1 con antígenos somáticos 1, 9, 12 y flagelar g, m., lisina descarboxilasa negativa, monoespecífica de ratas y ratones (familia Muridae) (28, 37, 38, 40).

A la fecha se han realizado estudios de inocuidad en otras especies como bovinos, aves (pollos de engorda y gallina de postura) y cerdos comerciales y clínicamente sanos, indicando que la mortalidad en estos animales ha sido nula cuando el rodenticida hecho a base de la *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 se ha administrado por vía oral (26, 41). Varias investigaciones sobre la respuesta inmune han aumentado las preguntas acerca de la validez del uso de animales "normales" para estudiar la verdadera respuesta inmune primaria de ahí el hecho de utilizar, en el presente estudio, aves libres de patógenos específicos (SPF)(42).

Por ello y debido a que no se han realizado estudios de inocuidad en aves SPF inoculadas experimentalmente con *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 se formuló lo siguiente:

OBJETIVO GENERAL.-

Determinar la inocuidad, respuesta antigénica y transmisión ovárica de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 en gallinas de postura libres de patógenos específicos (SPF).

OBJETIVOS PARTICULARES.-

Determinar la eliminación de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 en heces de gallinas de postura SPF inoculadas experimentalmente.

Determinar la respuesta antigénica de las aves hacia *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 por medio de la prueba de Aglutinación Rápida en Placa (ARP)

Determinar la transmisión de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 en los huevos de las aves SPF inoculadas experimentalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una cepa de *S. enteritidis* var. 17 F-4 lisina descarboxilasa negativa (LD), fagotipo 6a que produce enfermedad y muerte a la familia Muridae, contenida en un rodenticida biológico comercial (RBC)¹.

Animales de Experimentación.

La prueba se realizó con 40 gallinas de postura SPF de 22 semanas de edad. Se les proporcionó alimento comercial y agua *ad libitum*, alojándose en jaulas de las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ, UNAM). Al arribo de las gallinas SPF se sacrificaron 4 aves y se tomaron muestras a partir de órganos internos para verificar la ausencia de *Salmonella* spp utilizando la metodología según la Norma Oficial Mexicana NOM 005-ZOO-1993, así como muestras de suero para descartar la presencia de anticuerpos contra *Salmonella* spp mediante la prueba de Aglutinación Rápida en Placa (ARP) con antígeno K polivalente comercial² (43, 44).

Preparación del inóculo.

Se obtuvo un cultivo puro de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4, LD (-) fagotipo 6a, contenida en el RBC. Se sembró en caldo infusión cerebro-corazón (CICC)³, incubándose a 37° C durante 18 horas. A partir de éste se obtuvo un cultivo puro que fue identificado mediante

¹ Laboratorio Biológico Farmacéutico (LARIOFAM) Cuba

² Antígeno K Polivalente, Solvay Animal Health Inc., USA

³ Laboratorio Bioxon de Mexico S.A. de C.V., Oaxaca, México

pruebas bioquímicas para la comprobación de género y, serotipificación somática y flagelar⁴, para identificar la especie. Para la preparación del inóculo se realizaron tres lavados con Solución Salina Fisiológica (SSF) centrifugándose a 2500 RPM a 4° C entre cada lavado y mediante espectrofotometría se obtuvo una concentración de 3×10^9 UFC/mL.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se manejó un total de 40 gallinas SPF agrupadas aleatoriamente en dos lotes como se indica a continuación:

Grupo 1. Formado por 18 gallinas SPF a las que se les administró un inóculo de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 a una concentración de 3×10^9 U.F.C./ml por vía oral como única dosis y alimento comercial y agua *ad libitum*.

Grupo 2. Testigo negativo, formado por 18 gallinas SPF que fueron inoculadas con 1 ml de solución salina fisiológica estéril por vía oral, a las cuales se les administró alimento comercial y agua *ad libitum*.

Las 4 restantes, como se indicó anteriormente, fueron sacrificadas para verificar la ausencia de *Salmonella* spp.

Las gallinas de experimentación fueron observadas durante 29 días registrándose diariamente su estado clínico y mortalidad.

Dentro del tiempo del experimento, se realizaron los siguientes:

Análisis Serológico:

- Se tomaron muestras individuales de suero al arribo de las aves, previo a la inoculación, y cada 7 días durante 29 días

⁴ DIFCO Laboratories, Detroit, USA

para posteriormente llevar a cabo la prueba de Aglutinación Rápida en Placa con Antígeno K polivalente comercial y Microaglutinación (MA) con antígeno de producción local, en los casos de ARP positiva.

Análisis Bacteriológico de Heces:

- Se realizó un muestreo diario de heces por grupo a partir del segundo día post-inoculación hasta el día 29 para la recuperación de *Salmonella* spp que incluyó las siembras de 1 g de heces en 9 ml de Caldo Tetracionato (CT)⁵ las cuales fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se sembraron en placas de agar MacConkey (McC)⁵ y Verde Brillante (VB)⁵ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al término de la incubación se realizó la lectura de las placas en busca de colonias no fermentadoras de la lactosa y se procedió a identificar a las colonias sospechosas a *Salmonella* spp mediante pruebas bioquímicas según la NOM 005-Z00-1993

Análisis Bacteriológico de Huevos:

Se realizó un muestreo tanto externo como interno de huevos a partir del cuarto al 29° día post-inoculación para la recuperación de *Salmonella enteritidis* variedad 17 F-4 de acuerdo a la metodología utilizada por Castañeda (1995), y Gentry (1972)(45, 46).

Análisis Anatomopatológico y Bacteriológico de Órganos Internos:

- Las aves fueron sacrificadas a los 29 días post-inoculación para realizarles la necropsia en búsqueda de lesiones macroscópicas sugestivas a *Salmonella* spp. Se tomaron

⁵Laboratorios Merck S.A. I de México, México

muestras de corazón, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, ovario-oviducto, tonsilas cecales y duodeno para realizar exámenes bacteriológicos siguiendo los lineamientos que señala la Norma Oficial Mexicana para el control y erradicación de Salmonelosis Aviar NOM 005-Z00-1993.

- La siembra directa de los órganos se realizó en los medios de McC⁵ y Agar de Soya Trypticaseína (TSA)³, incubándose durante 24 horas a 37° C. Para la siembra indirecta se tomaron porciones de órganos de aproximadamente 1g y se maceraron en un mortero. Posteriormente se sembraron en 9 ml de CT⁶, incubándose durante 24 horas a 37° C. Al término de la incubación se tomo una azada del CT⁶ y se realizó un cultivo puro en agar de McC⁵ y TSA³ dejándose incubar por 24 horas a 37° C. Al término de la incubación en ambas pruebas se realizó la lectura de placas tomando colonias sospechosas a *Salmonella* aquellas que fueron lactosa (-) para la realización de pruebas bioquímicas vía corta: Agar-Hierro-Tres azúcares (TSI)⁶, Citrato³, Agar de Hierro y Lisina (LIA)³, Urea, Medio de Cultivo SIM⁶ y la complementaria azúcares y aminoácidos (Dulcitol³, Glucosa⁵, Lactosa³, Lisina Descarboxilasa (LD)³, Malonato⁵, Medio MIO³, Ornitina Descarboxilasa (OD)³, Sacarosa³ y Salicina⁶ para la identificación del género (*Salmonella* spp) de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el control y erradicación de Salmonelosis Aviar NOM 005-Z00-1993. Posteriormente se realizó la serotipificación somática y flagelar⁴ para la identificación de especie.

⁶Laboratories SIGMA Chemical, St. Louis, USA

RESULTADOS

Análisis Bacteriológico de Heces:

Se obtuvo aislamiento negativo a *Salmonella* spp durante los 28 días en que se tomaron las muestras a partir de todas las aves SPF de 22 semanas de edad inoculadas experimentalmente con *S. enteritidis* var. 17 F-4

Análisis Bacteriológico de Huevos:

Se obtuvo aislamiento negativo pre-inoculación y post-inoculación, a *Salmonella* spp a partir de muestreo interno (membrana interna, clara y yema) y externo (cascarón) de huevos de aves SPF de 22 semanas de edad inoculadas experimentalmente con *S. enteritidis* var. 17 F-4.

Análisis Anatomopatológico y Bacteriológico de Órganos Internos:

De las 4 aves sacrificadas al inicio de la prueba no se encontraron lesiones patológicas aparentes y no se obtuvo crecimiento bacteriológico a partir de los órganos muestreados.

En el cuadro No 1 se muestran los resultados del aislamiento tanto en siembra directa como indirecta de *S. enteritidis* var. 17 F-4 a partir de órganos internos según la NOM-005Z00-1993 a los 28 días post-inoculación mostrándose aislamiento negativo a *Salmonella* spp a partir de los siguientes órganos: corazón (C), pulmón (P), hígado (H), bazo (B), ovario-oviducto (Ov-Od), médula ósea (MO), duodeno (D) y ciegos (C1). En las aves muestreadas no se encontraron lesiones patológicas aparentes en ninguno de los órganos.

Se puede observar en el mismo cuadro que las aves 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 16 y 17 de las aves inoculadas fueron positivas al

aislamiento de *Proteus* sp a partir de órganos, mientras el resto de las aves fueron negativas. De manera semejante en los animales testigo se observó que las aves 21, 24, 25, 26, 29 y 34 también resultaron positivas al aislamiento de *Proteus* sp a partir de ciegos y el resto de las aves fueron negativas al aislamiento de *Salmonella* spp y al aislamiento de otras bacterias.

Análisis Serológico

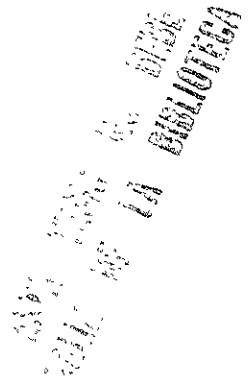
De las muestras provenientes de las 4 aves sacrificadas al inicio de la prueba se obtuvo resultado negativo en la prueba de ARP.

En el cuadro No. 2 se muestran los resultados del análisis serológico de ARP donde se observa que las aves inoculadas con *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 con el número 1, 5, 6, 7, 16 y 17 tuvieron respuesta de aglutinación en placa positiva, desde antes de la inoculación, pero sólo las aves 5 y 17 siguieron conservándose así hasta el término de la prueba en forma intermitente. Se observa también que las aves No. 2, 3, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 18 fueron negativas antes de la inoculación y hasta el término de la prueba, sin embargo las aves No. 1, 6, 7 y 16 del grupo de las aves desafiadas, fueron positivas, antes de la inoculación, el ave No 5 fue positiva previo a la inoculación y en la quinta semana. El ave No. 9 resultó negativa en la ARP, previa a la inoculación y en la cuarta semana obtuvo resultado positivo por esta misma prueba, lo contrario sucedió con el ave No. 17, cuyo resultado de ARP previo a la inoculación y en la cuarta semana post-inoculación fue positivo.

En las aves testigo negativo, los resultados fueron los siguientes las aves No 20, 21, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33.

34, 35, 36 y 37 fueron negativas antes y después de la inoculación por medio de la ARP. El ave No. 24 fue positiva a la ARP antes de la inoculación y en la segunda semana después de ésta; en un caso similar se encuentra el ave 25 de quien se obtuvo resultado positivo a la ARP previo a la inoculación y en la tercer semana posterior a ésta. Por último el ave No. 26, obtuvo resultado negativo en la ARP previo a la inoculación pero fue positiva en la segunda semana posterior a la inoculación.

A las muestras con resultado positivo a la ARP se les realizó la prueba de microaglutinación (MA), la cual es una prueba específica debido a que se realiza con diluciones del suero, y cuyos resultados en el presente estudio, fueron negativos en todos los casos.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

S. enteritidis tiene una variedad de fagotipos, incluyendo el fagotipo (PT) 6a, que es reconocido mundialmente como un patógeno para el humano de origen alimenticio y es transmitido a través de huevos de aves infectadas. Este PT se ha aislado con mayor frecuencia en Inglaterra y en algunos casos en Estados Unidos de América a partir de heces de humano. En Europa el fagotipo predominante en huevos causante de salmonelosis es el PT 4. En los Estados Unidos de América, aunque el PT 8 y el PT13 son los más comunes, ningún PT es más comúnmente asociado con infecciones de origen por consumo de huevo (47, 48, 49)

La infección por *Salmonella enteritidis* en aves provoca un incremento en la mortalidad y una disminución en la producción de huevos. A la necropsia puede haber lesiones de tipo hemorrágico en cualquiera o en todos los órganos internos incluyendo el bazo, el hígado, el corazón, los ovarios y los folículos ováricos. Como se menciona en la introducción, la naturaleza invasiva de *S. enteritidis* y su aparente predilección por el tejido reproductivo implica que puede estar presente en el contenido de huevos limpios intactos (16, 18, 19). Por lo anteriormente citado se puede observar con los resultados obtenidos en el presente estudio con aves SPF que la cepa de *S. enteritidis* var. 17 F-4 contenida en el RBC no es invasiva ya que a la necropsia de las aves, los órganos internos no sufrieron alteración patológica aparente, del muestreo interno y externo de los huevos no se aisló *S. enteritidis* var. 17 F-4 y la yema y la albúmina de dichos huevos mostraron un color y una consistencia aparentemente normal.

Por otro lado, la alta densidad de población de roedores en un medio avícola, es un factor importante en la transmisión de *S. enteritidis*. Probablemente los ratones y en menor grado las ratas, representan el mayor riesgo para el desarrollo de la enfermedad y la persistencia de la infección en explotaciones de aves reproductoras, pues éstos han sido reconocidos como vectores de *Salmonella* spp (13, 14, 20).

Los roedores infectados juegan un papel importante en la prevalencia de *Salmonella* spp sobre granjas productoras de huevo. En un estudio realizado en Maine (Henzler, D.J. 1991), se tomaron muestras de diez granjas de aves y el ambiente; la mitad fue declarada como libre de *Salmonella enteritidis* y cinco como contaminadas. En las granjas positivas, los aislamientos de *S. enteritidis* a partir de los ratones fueron tres veces más elevados que los realizados en diversos sitios del ambiente. Los ratones mostraron una alta tasa de difusión de *S. enteritidis* de 2.5×10^3 a 2.3×10^6 microorganismos por cada bolo fecal. La cantidad promedio de bolos fecales excretados por ratón fue de 100 en un período de 24 horas. En ese estudio se observó que la contaminación ambiental detectable declina en ausencia de ratones, pues en las granjas declaradas como libres de *Salmonella* no se detectó la bacteria en los ratones (13, 14, 16, 17, 20, 23).

Bulling y Helmuth (1986) sugieren que el incremento mundial de los casos de envenenamiento en humanos por consumo de huevos infectados con *S. enteritidis* se debe a razones epidemiológicas indeterminadas más que a los cambios biológicos moleculares de la bacteria. En este estudio se muestra como los roedores (*Mus musculus domesticus*), proveen una explicación epidemiológica para el incremento de casos. In efecto la dosis infectiva para ratones y para pollitos es

muy baja, posiblemente menor a 15 organismos de *Salmonella* por ratón. Sin embargo, esta es mucho menor que la dosis requerida para infectar gallinas adultas, quienes requieren al menos de 10^6 UFC para que se observe infección en órganos internos. Además, el ratón infectado permanece como portador latente que puede excretar posteriormente *Salmonella* spp intermitentemente. Las excretas de ratones infectados pueden contener más de 1,000 organismos de *Salmonella* por bolo fecal y existe evidencia de incremento en la virulencia de la cepa de *Salmonella* spp por aves después de pasar a través del peritoneo de un ratón (15, 16, 17, 19, 20, 23, 27, 28).

En el presente estudio llevado a cabo con aves SPF de 22 semanas de edad no se logró el aislamiento de *S. enteritidis* var. 17 F-4 a partir del muestreo diario de heces a pesar de haberse utilizado un inóculo con una dosis de 3×10^9 UFC/mL, que es una cantidad mayor a la excretada en heces por un ratón para infectar una gallina adulta (20).

Chitty y Southern (1954), a su vez, realizaron estudios sobre el papel desempeñado por las ratas y ratones en la contaminación de los alimentos en contacto con sus heces infectantes, por haberse empleado cultivos de salmonella como "veneno" para su control (25).

Debido a esto, se han llevado a cabo estudios para conocer la inocuidad hacia otras especies animales. En un ensayo realizado por Fustes *et al.* en 1995 se evaluó la inocuidad de *S. enteritidis* var. 17 F-4 en aves SPF de un día de edad mediante la inoculación con 0.5 ml de un cultivo conteniendo 1×10^9 U.F.C./mL. La necropsia, se llevó a cabo a la edad de 7 a 42 días (10 aves por semana) y los resultados mostraron aislamiento negativo de *S. enteritidis* var. 17 F-4 del intestino de los pollos. El período máximo de excreción llegó a ser de 5 días en un pollo, no hubo lesiones patológicas macro o

microscópicas compatibles con salmonelosis aviar y no hubo diferencia en la ganancia de peso entre los dos grupos (grupo control y desafiado) (21, 26, 39).

En un ensayo similar, Gutiérrez (1992) y LIDA* (1992) estudiaron la inocuidad de *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 a una concentración de 3.3×10^9 U.F.C./mL vía oral en un grupo de 120 aves de estirpe ligera de tres semanas de edad. Los resultados fueron similares a los del estudio anterior y no se detectaron anticuerpos por medio de la prueba de aglutinación en placa, usando antígenos de *S. enteritidis* y *S. pullorum* después del consumo del RBC en alimento y agua de bebida (26) En este estudio se observa que la carga bacteriana administrada, supera a la utilizada en el RBC y es similar a la aplicada en el presente trabajo a aves SPF, donde fue posible obtener resultados serológicos positivos de algunas aves por medio de la prueba de ARP, sin embargo en estas mismas aves, se obtuvo aislamiento positivo a *Proteus* sp. Snoeybos G.H (1995) menciona que una variedad de bacterias que presentan antígenos en común con o muy vinculadas con los de *S. pullorum* pueden infectar a las aves y producir respuesta de aglutinación positiva. Otras bacterias con antígenos comunes a *S. pullorum* también originan reacciones cruzadas, como *Proteus* sp, quien posiblemente produjo la reacción positiva de aglutinación con los sueros de las aves SPF empleadas en el presente estudio (26, 39, 50).

Se considera que los determinantes antigénicos poseen una estructura particular y única. Sin embargo, existen numerosos ejemplos en los que los epítomos reaccionantes son unidades comunes a un grupo determinado de proteínas. En consecuencia los antígenos dirigidos contra una proteína en una especie, también pueden reaccionar de una

* Laboratorios de Investigaciones y Desarrollo Avícola, Cuba

manera detectable con la proteína homóloga o similar en otra especie y por lo tanto, se observa una reacción cruzada (50, 51). El procedimiento habitual en pruebas de aglutinación bacteriana consiste en titular el suero (anticuerpos) contra una suspensión estandarizada de antígenos. Las bacterias no son homogéneas desde el punto de vista antigénico, sino que están cubiertas de un mosaico formado por muchos antígenos diferentes. El género *Salmonella* se ha clasificado en más de 2400 especies tomando como base sus antígenos polisacáridos llamados antígenos O los cuales aparecen numerados, por ejemplo, el epítipo inmunodominante del Antígeno O número 1 (Ag O1) es un trisacárido que contiene un residuo de glucosa terminal, el antígeno O2 tiene paratosa y el antígeno O3 tiene manosa (51).

Aunque cada género de la familia Enterobacteriaceae se relaciona con grupos O específicos, un solo microorganismo puede tener varios antígenos O, por lo que, la mayor parte de las *Shigellas* comparten uno o más antígenos O de *Escherichia coli*. Esto último puede reaccionar de manera cruzada con algunas especies de *Providencia* sp, *Klebsiella* sp y *Salmonella* spp, y de igual manera se encuentra el caso entre las especies de *Salmonella enteritidis* y *Proteus* sp quienes muestran una fórmula antigénica similar, lo que puede explicar el origen de la reacción cruzada obtenida en la prueba de ARP del presente ensayo con aves SPF (19, 51, 52, 53). Padrón et al. (1993), menciona que en la prueba de aglutinación en placa se pueden presentar reacciones cruzadas entre bacterias que son nombradas "falsas positivas" y que gracias a este tipo de reacciones ha sido posible identificar parvadas contaminadas con *Salmonella* de diversos grupos, principalmente B y D (54, 55)

En el presente estudio no se aisló *Proteus* sp de todas las muestras provenientes de los órganos internos de las aves cuyo resultado serológico a la prueba de ARP fue positiva antes del desafío con *S. enteritidis* var. 17 F-4 Sin embargo, en las aves donde no se aisló *Proteus* spp, no se obtuvo una respuesta positiva a la prueba de la ARP ni antes ni después al desafío con *S. enteritidis* var. 17 F-4

Se ha mencionado que una prueba diagnóstica adecuada es aquella que es capaz de identificar y separar dentro de grandes poblaciones de aves aparentemente sanas, aquellas que tienen una alta probabilidad de encontrarse enfermas. En la prueba de ARP algunas muestras pueden reaccionar en forma intermitente, lo que ocasiona la presencia de aves "falsas negativas" y se pueden presentar también reacciones cruzadas con otras bacterias como se observó en el presente estudio con aves SPF. El hecho de que la MA se lleve a cabo con diluciones séricas y con cepas estándar indica que es más específica que la ARP y esta característica puede resultar útil para diferenciar las reacciones "falsas positivas" que pueden ocurrir con la prueba de ARP y para detectar la infección bien establecida en forma más constante que la prueba de ARP (54, 55, 56). En el presente estudio se decidió aplicar la MA en los sueros de las aves cuyo resultado en la prueba de ARP fue positivo para descartar la presencia de *S. enteritidis* var. 17 F-4 y se observó que todos los resultados de los casos de la prueba de MA fueron negativos.

Dentro de un mismo serotipo puede haber antígenos flagelares en una o ambas formas que se llaman antígenos de fase 1 (designado por letras minúsculas) que sólo los presentan algunas serovariedades y pueden ser poco específicos para *Salmonella*; y de fase 2 (designado con números arábigos) que son menos específicos y pueden estar

presentes en otras especies de bacterias. El microorganismo tiende a cambiar de una fase hacia la siguiente a lo que se le llama variación de fase. Los antígenos H de la superficie bacteriana pueden interferir en la aglutinación que produce el anticuerpo anti-O, que es predominantemente IgM, lo que también pudiera dar una explicación del tipo de reacción encontrada en la prueba de la ARP obtenida en el presente estudio (52, 53).

Fustes (1995), Gutiérrez (1992) y LIDA* (1992) realizaron estudios en aves donde los resultados mostraron que *S. enteritidis* var. 17 F-4 no causó los signos clínicos de salmonelosis y no fue posible su aislamiento a partir de los órganos de las aves en experimentación. Projorov (1962), Espino (1980) y Bikovski-Kandybin (1988), reportaron la inocuidad de *S. enteritidis* var. 17 F-4 mediante el consumo oral de la bacteria mezclada con el alimento a vacas, cerdos, caballos, gansos, patos y gallos que fueron alojados por separado y durante 30 días estuvieron bajo observación dos veces al día. Los resultados indicaron que no hubo signología sugestiva a salmonelosis en el ganado vacuno, cerdos, caballos, gansos, patos y gallos durante todo el tiempo del experimento. La temperatura se mantuvo dentro de los límites normales durante y después de la prueba y las funciones fisiológicas fueron estables. No se observaron trastornos gastrointestinales y las heces tenían la consistencia normal. Con base en dichos resultados, Espino *et al* (1980), concluyó que *S. enteritidis* var. 17 F-4 no es dañina para estas especies animales. Sin embargo, Kandybin N.V (1974), obtuvo resultados diferentes en pruebas con conejos jóvenes y corderos, en donde se

* Laboratorios de Investigaciones y Desarrollo Avícola, Cuba

sospechó que la *S. enteritidis* var. 17 F-4 sólo complicó otros procesos patológicos en estos animales (26, 28, 41).

Por otro lado, el efecto de *S. enteritidis* var. 17 F-4 sobre animales silvestres ha sido poco estudiada; se encontró que es patógena para ratas almizcleras (*Ondatra ziberthica*) y gorriones caseros (*Passer domesticus*). De aquí la importancia de realizar estudios en otros animales, tomando en cuenta la gran cantidad de especies existentes en el Orden Rodentia y sus variedades (28).

En el presente estudio realizado con aves SPF se observó que antes y después de la inoculación de *S. enteritidis* var. 17 F-4, el estado fisiológico de las aves, la consistencia y el color de las heces fueron normales además de no encontrarse mortalidad alguna.

Bikovsky y Kandybin (1988), observaron que *Salmonella enteritidis* var 17 F-4 no es una cepa invasiva, excepto en roedores múridos, sugiriendo que por ello no causa signos clínicos de salmonelosis, no puede ser aislada de los órganos internos de animales que no sean roedores múridos y no causa una respuesta serológica en los animales que han sido expuestos oralmente (28).

Por lo anteriormente expuesto la resistencia de los animales domésticos a *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 se ha estudiado por mucho tiempo. Desde los inicios del empleo del método microbiológico, diferentes autores han informado acerca de la existencia en los roedores de cierta inmunidad hacia las bacterias del tifus en algunos representantes de especies de estos animales. La resistencia natural de roedores a la infección por *Salmonella* y a la multiplicación temprana son, en parte genéticamente determinadas (20, 26, 32).

Algunos de los roedores que llegan a infectarse con *Salmonella* spp pueden quedar sanos o recuperarse de la infección como lo mostró

Price-Jones (1927) donde se observó que *S. enteritidis* puede ser aislada de los órganos de dichos animales aparentemente sanos, los cuales iniciaron un brote cuando se mezclaron con lotes no infectados, lo que demuestra que los animales aparentemente sanos, pueden infectar a otros animales y también el alimento para consumo humano. Una prueba con *Salmonella* spp entre ratas mostró que permanecen con cultivos positivos por un año, tiempo durante el cual las poblaciones de ratas crecen al doble y, Branham y Roney (1929), Projorov (1956), Gristsenko (1966), Collins (1966), Golubeva, (1936) y Verishuili (1960), comprobaron que los ratones infectados con *S. enteritidis*, altamente virulenta a ellos, pueden excretar el organismo en las heces por hasta 21 días y los sobrevivientes son completamente resistentes a la re-infección; afirmaron que la inmunidad entre las ratas oscila entre un 10 y 20% y que esta inmunidad sólo transcurre durante un período de tiempo corto que oscila entre 15 a 60 días Welch (1941) mostró experimentalmente que las ratas infectadas pueden excretar el organismo en las heces por 148 días (36).

Se ha mencionado que *Salmonella enteritidis* var. *danzysz* es la que ha causado inmunidad, pues existen ensayos que muestran haber aplicado la bacteria en cebos raticidas donde se ha visto que una cantidad mínima de ratas muertas son observadas y el resto permanecieron desaparecidas y que si la cepa 17 F-4 (Issatschenko) ha llegado a causar resistencia es porque las dosis administradas han sido subletales (35).

Según las propiedades fisiológicas que les conciernen, las bacterias *S. enteritidis* var. *issatschenko* y *danzysz* son similares a otras biovariedades de *S. enteritidis*, pero tienen características específicas estables (27, 28) Para la diferenciación de las bacterias

de Danysz e Issatschenko se usa la lisozima y la l-lisina. En un medio que contenga l-lisina, la bacteria Danysz cambia el color del medio, en contraste a la biovariedad Issatschenko. Bajo la influencia de la lisozima el cultivo de un día de la bacteria Issatschenko forma zonas de lisis sobre el medio, pero la lisis no ocurre con otras biovariedades, incluyendo la bacteria Danysz. Este aislamiento es de valor práctico de acuerdo a los especialistas médicos quienes han encontrado que la biovariedad *issatschenko* es mas segura que la *danysz* para el uso con humanos y animales domésticos (28)

La patogenicidad de *S. enteritidis* var. 17 F-4 ha sido estudiada por muchos investigadores, sobre la familia *Muridae* y *Cricetidae* en un periodo de 22 días involucrando 31 especies de roedores: Lirón del bosque (*Dryomys nitedula*), Jerbo (*Alactagulis pygmaeus*), jerbo de tres dedos del norte (*Dipus saggita*), ratón de la madera (*Apodemus sylvaticus*), ratón de campo de cuello amarillo (*A. flavicollis*), ratón de campo rayado (*A. agrarius*), ratón doméstico y doméstico caucásico (*Mus musculus musculus* y *M. musculus hortulansus*), ratón de las cosechas (*Mycromys minutus*), rata negra (*Rattus rattus*), rata negra de Turquía, Irán, Afganistán y Nepal (*Rattus rattoides*) rata gris (*Rattus norvegicus*), rata bandicut de cola pequeña (*Nesokia indica*), rata topo (*Ellobius talpinus*), hamster armeniano (*Cricetullus migratorius*), hámster de Georgia (*Mesocricetus raddei*), hámster de Turquía (*M. Brandti*), Jerbo de Tamarisk, jerbo monogoliano y jerbo grande (*Meriones tamariscinus*, *M. unguiculatus* y *Rhombomys opimus*), conejo noruego de la estepa (*Lagurus lagurus*), topo de agua (*Arvicola terrestris*), rata de agua (*Microtus majori*), rata de agua de cráneo estrecho (*M. gregalis*), rata de agua social (*M. socialis*), rata de agua de campo (*M. agrestis*), rata de agua común (*M. arvalis*), y donde

la *S. enteritidis* var. 17 F-4 llegó a ser patógena para la mayoría de ellos. De estas especies, 14 fueron altamente susceptibles, su mortalidad en pruebas no fue menor a 80%, debido a ello se ha mencionado que la bacteria está limitado a un grupo de especies altamente susceptibles de roedores dañinos (28).

El hecho de que ciertos roedores puedan permanecer con cultivos positivos de *S. enteritidis* var. 17 F-4 conduce a la necesidad de obtener más información y realizar más pruebas acerca de su inocuidad hacia el hombre y otras especies animales. Leslie (1941) confirmó que la virulencia de la cepa se puede incrementar mediante la inoculación en el peritoneo de roedores, por lo que se debe tomar en cuenta que si bien puede recuperar su virulencia en esta especie, lo podría hacer en humanos o en cualquier otra especie animal (27, 28, 32).

Concluyendo el presente estudio se tiene que:

- No se observaron signos clínicos sugestivos a Salmonelosis en las aves SPF de 22 semanas de edad inoculadas con *S. enteritidis* var. 17 F-4.
- No se observaron lesiones en los órganos de las aves SPF inoculadas experimentalmente después de 22 días post-inoculación.
- No se aisló *S. enteritidis* var. 17 F-4 a partir de heces
- No se aisló *S. enteritidis* var. 17 F-4 a partir del muestreo interno y externo de huevos.
- En algunas aves se obtuvo serología positiva en la prueba de ARP con Antígeno K polivalente comercial pero en MA estas mismas muestras fueron negativas.
- Con este estudio no es posible calificar a *S. enteritidis* como inocua por lo que se sugiere innovar técnicas de diagnóstico

más sensibles y específicas para discriminar *S. enteritidis* var. 17 F-4 de *S. enteritidis* y otras enterobacterias debido a su antigenicidad cruzada que puede detectarse con ARP, prueba oficialmente aprobada por la Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993 y que podría provocar resultados confusos y hasta entonces, posiblemente, emplear a *S. enteritidis* var. 17 F-4 como control biológico.

- Se sugiere realizar más estudios en aves SPF y libres de enterobacterias así como en animales inmunodeprimidos para declarar la inocuidad de *Salmonella enteritidis* 17 F-4 en más especies que no sean de la familia Muridae.

LITERATURA CITADA

(1) Burdon KL, Williams RP. Fiebre tifoidea y paratifoidea. En: Burdon KL, Williams RP. Microbiología. México:Centro Regional de Ayuda Técnica, 1971:617-632.

(2) Keusch GT, Thea DM. Patógenos bacterianos entéricos invasivos y que lesionan los tejidos: diarrea hemorrágica y disentería. En: Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante resolución de problemas. Argentina:Médica Panamericana, 1994:284-301.

(3) Tizard I. Invasores del cuerpo. En: Tizard I. Inmunología Veterinaria. México:Interamericana McGraw Hill, 1998:11-21.

(4) Sèller LH. *Salmonella enteritidis*: información general, incidencia e importancia en salud pública. Memorias del curso sobre diagnóstico de laboratorio para la campaña de enfermedad de Newcastle y salmonelosis aviar. Anexo. 1993 enero 14-15; México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 1993:1-8.

(5) Cottral GE. Manual de métodos estandarizados en microbiología veterinaria. 1ª ed. México: La Prensa Médica Mexicana, S.A., 1986.

(6) Salyers AA, Whitt DD. *Salmonella* Infections In:Bacterial pathogenesis: a molecular approach. U.S.A.:ASM Press. 1994:2269-243

(7) Gast RK. Aplicación de modelos experimentales para comprender y detectar las infecciones por *Salmonella enteritidis* en pollos. Memorias del curso de actualización sobre el control y prevención de la infección por "*Salmonella enteritidis*". 1994 febrero 24-25, México (D.F.). Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C., 1994:1-7.

(8) Guthrie RK. *Salmonella*. 1a ed. U.S.A.: CRC Press,1992.

(9) Acha PN, Szyfres B. Bacteriosis. Síntomas en el hombre, serotipos adaptados. En: Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. LVA:OMS. 1986:3 213.

- (10) Weisbroth SH. Bacterial and Mycotic Diseases. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. The Laboratory Rat Vol. I Biology and diseases. Nueva York: Academic Press, Inc, 1979:193-242.
- (11) Gast RK, Beard CW. Evaluation of a chick mortality model for predicting the consequences of *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. Avian Dis 1992;71:281-287
- (12) Gast RK, Beard CW. Production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. Avian Dis 1990;34:438-446.
- (13) Padrón M. *Salmonella typhimurium* outbreak in broiler chicken flocks in Mexico. Avian Dis 1990;34:221-223.
- (14) Shivaprasad HL, Timoney JF, Lucio B, Morales S, Baker RC. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission clinical signs, fecal shedding and serologic responses. Avian Dis 1990;34:548-57
- (15) Blackwell M. The role of rodenticides in biosecurity & salmonella control in broilers. Bulletin Antec Internacional Ltd. February, 1997. Available from: URL:[http://www antecint.co.uk/main/poulrat.htm](http://www.antecint.co.uk/main/poulrat.htm).
- (16) Cox NA, Bailey JS, Heneidi A, Humphrey TJ, Shane S, Opitz HM et al. Curso de Actualización sobre *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter* en las aves domésticas; 1991 octubre 10-11; México (D.F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C , 1991:1-96.
- (17) St Louis ME, Morse DL, Potter ME, DeMelfi TM, Guzewich RV, Tauxe RV and Blake PA. The emergence of Grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. new implications for the control of salmonellosis JAMA 1988;259:2103-2107.
- (18) Poppe C, Demezuk W, McFadden K, Jonson RP. Virulence of *Salmonella enteritidis* phagetypes 4, 8 and 13 and other *Salmonella* spp for day-old chicks, hens and mice. Can J Vet Res 1993;57:281-281.
- (19) Barnes HJ, Beard CW. Salmonellosis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW Jr. Enfermedades de las aves México. [El Manual Moderno. S.A de C.V. , 1995 101 160.

- (20) Henzler DJ, Optiz HM. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infection on chicken layer farms. *Avian Dis* 1992;36:625-631.
- (21) Urquiza BO, Nava MG, Paasch ML, Jandet DG, Fehervari BT, Téllez IG. Determinación de la inocuidad de un rodenticida biológico comercial elaborado con *Salmonella enteritidis* var. 17 F-4 en pollos de engorda de 1 y 8 días de edad. Memorias de la XXIII Convención Anual de la ANECA, 1998 Mayo 6-9, Puerto Vallarta (Jalisco) México. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A.C., 1998:253-256.
- (22) Alcalá IA, Dávila DM, Téllez IG, Urquiza BO. Papel de *Alphitobius diaperinus* como vector de *Salmonella enteritidis* PT 13 en pollitos de dos días de edad. Memorias de la VI Jornada Médico Avícola; 1997 Marzo 12-14, México, (D.F.) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., 1997:153-162.
- (23) Friedman CR, Malcolm G, Rigau-Pérez, Tauxe RV. Public Health Risk from *Salmonella*-based rodenticides. *Lancet* 1996;347:1705-1706.
- (24) Villagra RM, Eola RJE BIORAT, el flautista de nuestros tiempos. Empleo de BIORAT en la Cárcel de San Pedro y Hospital General (Boletín) La Paz, Bolivia, septiembre-octubre, 1995.
- (25) McDiarmid A. Enfermedades de los animales salvajes en libertad. FAO, Estudios agropecuarios No. 57 Roma, Italia 1962:19-20.
- (26) Martínez RJ, Mansilla CL. Importancia Socioeconómica de la Utilización del Rodenticida Biológico BIORAT para el control de Roedores Dañinos. Folleto informativo LABIOFAM, 1996:3-41.
- (27) Leslie PH. The Bacteriological Classification of the Principal cultures used in rat and mouse control in Great Britain. *J Hygiene* 1941;42:552-562.
- (28) Bikovsky VA, Kandybin NV. Biological principles and perspectives of the use of bacteria and viruses. In: Bikovsky VA, Kandybin NV. *Rodent Pest Management*. U S A CRC Press Inc , 1988: 377-390

- (29) Mairena MM. Cuba regala mataratas. El Nuevo Diario 1999 junio 24; Sec Nacional (col.1).
- (30) Mairena MM. Sigue llegando ayuda cubana El Nuevo Diario 1998 noviembre 24; Sec Nacional (col. 1)
- (31) Shakuntala S, Krishnamurthy TR. Population dynamics of *Rattus rattus* in poultry and implications for control Proc. 15th Vertebrate Pest Conf. Published at University of Calif., Davis. 1992: 224-227.
- (32) Wodzicki K. Prospects for biological control of rodent populations. Bull World Health Organ 1973;48:461-467.
- (33) Spratt DM. The role of helminths in the biological control of mammals. Int J Parasitol 1990;20:543-550.
- (34) Munger LL, Su JJ, Brarnes HJ. Caumafuryl (Fumaryl) Toxicity in chicks. Avian Dis 1993;37:622-624.
- (35) Drummond DC, Renisson BD. The detection of rodent resistance to anticoagulants. Bull World Health Organ 1973;48:239-242.
- (36) Taylor J. Bacterial Rodenticides and Infection with *Salmonella enteritidis*. Public Health Lancet 1956;1:630-634
- (37) Villafaña F, Montero G, Díaz M, Bornote J. Efectividad del rodenticida Salmocumarín en objetivos pecuarios y urbano. Rev Cubana Med Trop 1995;47:45-50.
- (38) Gamez HGD. Caracterización de la cepa de *Salmonella enteritidis* variedad *decumanicum* (Tesis maestría), Cuba (Ciudad de la Habana). Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". 1996.
- (39) Martínez J, Espino R. Ensayo demostrativo de la efectividad del BIORAT en la granja avícola "Villa Ito", Folleto informativo LABIOFAM Mixco, Guatemala, 1996.
- (40) Threlfall EJ. Report on work carried out on *Salmonella enteritidis* var. *assastchenko* Public Health Laboratory Service. Laboratory of Enteric Pathogens London, October, 1996.

- (41) Trakhanov DF, Kadırov af. Izuchenie vospriimchivosti porosyat k bakteriyam Isachenko. Probl Vet Sanit 1972;42:248-253.
- (42) Arrington LR, Kling JM. The laboratory animals In: Arrington LR, Kling JM. Introductory Laboratory Animal Science. The breeding, care and management of experimental animals. U.S.A.:The Interstate Printers and Publishers, Inc., 1978:7-28.
- (43) Alfaro CJC, Arce MJ, Avila GE, Banda CA, Cabriaes JJ, Camacho FD, Casaubon HMT, Castañeda SMP, Charles NML, Hernández VX, López CC, Moreno DR, Merino GR, Rubio GME, Tamayo SM, Urquiza BO. Sistema de Producción Animal I: Aves. 1ª Ed. México: S.U.A , 1998.
- (44) Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993. Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Diario Oficial. México (D.F.), septiembre, 1994.
- (45) Castañeda SMP. Efecto de la irradiación con electrones en huevos fértiles inoculados experimentalmente con *S. enteritidis* sobre la incubabilidad y desarrollo productivo. (tesis de maestría), México (D.F.) U.N.A.M., 1995.
- (46) Gentry RF The measurement of bacterial contamination on egg shell Poultr Sci 1972;21:930-933.
- (47) Coyle EF, Palmer SR, Ribeiro CD, Jones HI, Howard AJ, Ward L, et al . *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection: association with hen's eggs Lancet 1988;2:1295-1297.
- (48) Evans M, Lane W, Ribeiro CD. *Salmonella enteritidis* PT6: another egg-associated salmonellosis?. Emerg Infec Dis 1998;4:4.
- (49) Dodhia H, Kearney J, Warburton F. A birthday party, home-made ice cream, and an outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 6 infection. Communicable Dis Public Health 1998;1:31-34.
- (50) Gorman NT, Halliwell REW. Introducción. En: Halliwell REW, Gorman NT. Inmunología Clínica Veterinaria. España. Acribia, 1989.1-20.
- (51) Lizard I. Resistencia a las bacterias. En: Inmunología Veterinaria Mexico:Interamericana McGraw Hill, 1998 306 321.

(52) Edman JC. Bastoncillos intestinales gramnegativos (Enterobacteriaceae) En. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JJ, Ornston LN. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adalberg. Microorganismos Gram negativos entéricos. México: El Manual Moderno S.A de C.V., 1996:228-242.

(53) Carter GR. Enterobacteriaceae En, Carter GR. Bacteriología y Micología Veterinarias Aspectos Esenciales. México: El Manual Moderno S.A. de C.V., 1985:171-190.

(54) Padrón NM Bacteriología y serología diagnóstica de tifoidea aviar. Memorias del curso sobre diagnóstico de laboratorio para la campaña de enfermedad de Newcastle y salmonelosis aviar; 1993 Enero 14-15; México, (D.F.) Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A.C., 1993:49-63.

(55) Miranda RAL. Evaluación de los métodos de diagnóstico de tifoidea aviar en aves pesadas semimaduras. (tesis de licenciatura), México (D F.) U.N.A.M., 1989.

(56) Becerril FM. Técnicas de diagnóstico oficiales para *Salmonella* y Newcastle Memorias del curso sobre diagnóstico de laboratorio para la campaña de enfermedad de Newcastle y salmonelosis aviar; 1993 Enero 14-15; México, (D.F.) Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A.C., 1993:5-9

Cuadro No. 1 Aislamiento de *S. enteritidis* var. 17F-4 a partir de órganos internos de aves SPF de 22 semanas de edad, según NOM.005ZOO.1993 y bacteriológico general a los 28 días post-inoculación siembra directa e indirecta

No. de ave	O R G A N O								
	Inoculados	C	P	H	B	Ov-Od	MO	D	Ci
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Testigos	C	P	H	B	Ov-Od	MO	D	C	
20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
26	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Proteus</i> spp
35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

C - Coarazón B - Bazo D - Duodeno P - Pulmon H - Hígado Ov-Od - Ovario, Oviducto MO - Medula Osea Ci - Ciegos

No. de suero	Día 1 (pre-inoculación)		Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
	Ap	MA	Ap	MA	Ap	MA	Ap	MA	Ap	MA
Inoculados										
1	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
6	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Testigos	Ap	MA	Ap	MA	Ap	MA	Ap	MA	Ap	MA
20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
25	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
26	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)