

01663



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INMUNOPROFILAXIS MEDIANTE LINFOCINAS
APLICADAS *in ovo* Y EN POLLOS DE ENGORDA
CONTRA LA INFECCION POR *Salmonella gallinarum*

T E S I S

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A :

ROSA ANA WONG GONZALEZ



ASESORES: MVZ., PH. D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
MVZ., E.P.A. JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ
DVM., PH. D. BILLY M. HARGIS

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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.

El autor da consentimiento 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 la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rosa Ana Wong González', with a large, stylized flourish above the text.

Rosa Ana Wong González

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo de tesis a mis padres: Socorro y Luis

Por todo su apoyo y aliento para
continuar mis estudios.
Gracias a su amor y confianza
puedo ver realizada
una meta más
en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a cada una de las personas del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por su apoyo y colaboración en la realización de la presente investigación.

Gracias: A Productores Agropecuarios Tepexpan S.A. de C.V.
Al USAID-University Development Linkage Project No. PCE-5063-A-00-2045-00.
Incubadora de Cuautla, Morelos.
Por el financiamiento otorgado, así como las aves disponibles para la elaboración del presente trabajo.

De manera muy especial al MVZ., Ph. D. Guillermo Tellez Isaías y al MVZ., E.P.A. José Antonio Quintana López, por su apoyo y disponibilidad en el transcurso de la presente tesis.

A los integrantes del Jurado, por el tiempo dedicado a la revisión de la presente investigación.

A los MVZ Matin Silva y Javier Balcazar por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

WONG GONZÁLEZ ROSA ANA. Inmunoprofilaxis mediante linfocinas aplicadas *in ovo* y en pollos de engorda contra la infección por *Salmonella gallinarum*. (Bajo la asesoría de: MVZ., Ph. D. Guillermo Téllez Isaías; MVZ., E.P.A. Jose Antonio Quintana López; DMV., Ph. D. Billy M. Hargis.)

En los 2 primeros experimentos, se evaluó el efecto profiláctico de linfocinas derivadas de aves inmunizadas ya sea con *Salmonella enteritidis* (Se-ILK) o *Salmonella gallinarum* (Sg-ILK) en pollos de engorda infectados experimentalmente con *Salmonella gallinarum*. Al día de edad, se les inyectó vía peritoneal con .5ml de Se-ILK, Sg-ILK o linfocinas de aves no inmunizadas (NILK). Treinta minutos después, todas las aves fueron desafiadas vía oral con 10^4 ufc (unidades formadoras de colonia)/ml o 10^6 ufc/ml de *Salmonella gallinarum*. A 10 días posinoculación (p.i.) se evaluó ganancia de peso, mortalidad, cultivo directo de hígados de la mortandad, e invasión en órganos de aves sobrevivientes. El tratamiento con Se-ILK indujo una protección significativa contra la infección por *Salmonella* en comparación con NILK, según se indica por: aumento significativo en la ganancia de peso ($P<0.05$); reducción significativa en invasión a órganos ($P<0.01$) y mortalidad ($P<0.05$) en pollos desafiados con 10^4 o 10^6 ufc de *Salmonella gallinarum*. Con la administración de Sg-ILK a diferencia de las NILK se observó: descenso significativo en mortalidad sólo en pollos desafiados con 10^4 ufc de *Salmonella gallinarum*; disminución significativa en la invasión de órganos por *Salmonella* al cultivo de aves muertas ($P<0.01$) y sobrevivientes ($P<0.05$); un significativo aumento en la ganancia de peso corporal ($P<0.05$) únicamente en dosis baja. En el tercer experimento, para evaluar el efecto *in ovo* de Sg-ILK, se inyectó en amnios Sg-ILK o NILK al día 18 de incubación; se determinó el número de pollos nacidos y peso corporal, posteriormente fueron desafiados con 10^5 de *Salmonella gallinarum*. A diez días p.i. se estudio mortalidad, ganancia de peso corporal e invasión en órganos. El tratamiento de Sg-ILK *in ovo*, causó un aumento significativo en la ganancia de peso ($P<0.05$). La mortalidad en pollos tratados *in ovo* con Sg-ILK fue significativamente menor los días 3, 4, 5, ($P<0.01$) y 6 p.i. ($P<0.05$) en contraste con NILK. Sin embargo, al cultivo de la mortandad y en mortalidad a 10 días p.i. no hubo diferencias significativas comparado ambos tratamientos. Al cultivo de pollos sobrevivientes se observó una reducción significativa ($P<0.05$) en la invasión de órganos por *Salmonella*. Los resultados de estos experimentos sugieren que la administración profiláctica de Se-ILK o Sg-ILK, pueden reducir significativamente la mortalidad e invasión en órganos por una cepa virulenta de *S. gallinarum* en pollos de engorda. Además de nueva información con respecto a la longevidad de protección, resistencia contra un serotipo de *Salmonella* antigénicamente diferente e incremento en el desarrollo corporal en las aves. La administración *in ovo* de Sg-ILK no altera el porcentaje de nacimientos, otorga un efecto protectorio durante los primeros 5 días posdesafío en mortalidad e invasión en órganos de dicha mortalidad en pollos de engorda.

ABSTRACT

WONG GONZÁLEZ ROSA ANA. Immunoprophylaxis of lymphokines administered *in ovo* and in broiler chicks against *Salmonella gallinarum*.

In the first 2 experiments, the prophylactic treatment of neonatal broiler chicks with derived from *S. enteritidis* (Se)- or *S. gallinarum* (Sg)-immunized chickens (Se-ILK or Sg-ILK) was evaluated for their effect on the birds resistance to an experimental infection with *S. gallinarum* (Sg). On the day of hatch, chicks were administered intraperitoneally (IP) .5ml of Se-ILK or Sg-ILK or control nonimmune lymphokines (NILK). Thirty min later, all chicks were gavaged with either 10^4 cfu or 10^6 cfu Sg. At 10 days after challenged were evaluated: weight gains, mortality, and organ invasion of Sg in the birds that died during the experiment, and in the chickens that survived at 10 days postinoculation (PI). The prophylactic treatment of chickens with Se-ILK induced significant protection against organ invasion Sg infections when compared to NILK as evidenced by: 1) significant reduction ($P < 0.5$) in the mortality of chicks challenged with either 10^4 and 10^6 cfu Sg (79.4% and 33.4%, respectively); 2) increased average weight gains of chicks challenge with either 10^4 and 10^6 cfu Sg (15g and 33g, respectively); and 3) a significant ($P < 0.01$) reduction in the number of Sg-organ-culture positive chicks. The prophylactic treatment of chickens with Sg-ILK induced significant protection against Sg infections when compared to NILK as evidenced by: 1) significant reduction ($P < 0.5$) in the mortality only in the chicks challenged with 10^4 cfu Sg; 2) increased average weight gains of chicks challenged with 10^4 cfu Sg; and 3) a significant ($P < 0.01$) reduction in the number of Sg-organ-culture positive chicks. In the third experiment, the effect, of *in ovo* administration with Sg-immune lymphokines on hatchability, hatch weight, and resistance to an experimental infection with Sg was investigated. On day 18 of embryogenesis, injections were made into the amnion with either Sg-ILK or nonimmune ILK (NILK). On the day of hatch, the chicks were orally challenged with 10^5 cfu Sg. At 10 days after challenged were evaluated: weight gains, mortality, and organ invasion of Sg in the birds that died during the experiment, and in the chickens that survived at 10 days pi. Hatchability of Sg-ILK-and NILK treated chicks was not different from that of untreated chicks. Hatch weight of ILK-treated chicks were approximately 2g more ($P < 0.05$) than that of NILK-treated. In the mortality in Sg challenge of Sg-ILK-treated chicks there were a significant reduction in the days 3, 4, 5 and 6 pi as compared with the NILK-treated. However, there was not differences in the mortality at ten days postchallenge between Sg-ILK- and NILK-treated chicks. The treatment *in ovo* with Sg-ILK resulted in significant ($P < 0.05$) increase in weight gains of chicks. Organ invasion with Sg was markedly and significantly decreased in the Sg-ILK-treated chicks as compared with chicks treated with NILK. The results suggest that the prophylactic administration of Se-ILK or Sg-ILK can significantly reduce the mortality, and organ infectivity of Sg, and provides important new information on the longevity of the protective response, enhanced resistance against an antigenically different *Salmonella* serotype, and enhanced bird performance. The results suggest that *in ovo* administration of Sg-ILK can significantly reduce the mortality, and organ infectivity of Sg in broiler chicks, during the first 5 days of life.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN	III
TABLA DE CONTENIDO	V
LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
Tifoidea Aviar	2
Paratifoidea por <i>Salmonella enteritidis</i>	6
Inmuización <i>in ovo</i>	8
Estructuras y crecimiento embrionario	8
Detección y actividad de leucocitos en embrión de pollo... ..	10
Distribución de inmunoglobulinas	10
Investigaciones en embrión de pollo.....	11
Primera Línea de Defensa contra <i>Salmonella spp.</i>	13
Proteínas Solubles Secretadas por Linfocitos T	17
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	50
LITERATURA CITADA	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Efecto a la administración de Se-ILK en la mortalidad de pollos de engorda desafiados al día de edad con <i>S. gallinarum</i>	68
2	Efecto a la administración de Se-ILK en la ganancia de peso corporal en pollos de engorda desafiados con <i>S. gallinarum</i>	69
3	Efecto a la administración de Sg-ILK en la mortalidad de pollos de engorda desafiados al día de edad con <i>S. gallinarum</i>	70
4	Efecto a la administración de Sg-ILK en la ganancia de peso corporal en pollos de engorda desafiados con <i>S. gallinarum</i>	71
5	Efecto <i>in ovo</i> de la administración de Sg-ILK y NILK al día 18 de incubación y peso corporal al día de edad.	72
6	Efecto <i>in ovo</i> del Sg-ILK y NILK en la mortalidad diaria de pollos engorda desafiados al nacimiento con <i>S. gallinarum</i>	73
7	Efecto <i>in ovo</i> del Sg-ILK y NILK al cultivo de hígado en la mortalidad infectada con <i>S. gallinarum</i> a 10 días del período experimental.	74
8	Efecto <i>in ovo</i> del Sg-ILK y NILK al cultivo de bazo e hígado y tonsilas cecales en aves sobrevivientes a 10 días posdesafío.	75
9	Efecto <i>in ovo</i> del Sg-ILK y NILK en la ganancia de peso corporal de pollos de engorda desafiados con <i>S. gallinarum</i>	76

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1 Efecto del Se-ILK al cultivo de hígado en la mortalidad infectada con <i>S. gallinarum</i> a 10 días del período experimental.	77
2 Efecto del Se-ILK al cultivo de hígado, bazo y tonsilas cecales en pollos sobrevivientes a 10 días del período experimental.	78
3 Efecto del Sg-ILK al cultivo de hígado en la mortalidad infectada con <i>S. gallinarum</i> a 10 días del período experimental.	79
4 Efecto del Sg-ILK al cultivo de hígado, bazo y tonsilas cecales de pollos sobrevivientes a 10 días del período experimental.	80

INTRODUCCIÓN

TIFOIDEA AVIAR

La Tifoidea Aviar (TA) se encuentra presente en la avicultura comercial de algunos países de Latinoamérica, África y Medio Oriente (67). En México se ha detectado en los estados de Chiapas, Guadalajara, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Toluca, Coahuila y Durango por laboratorios de diagnóstico (50). La enfermedad afecta principalmente a las aves de postura y reproductoras, su prevalencia se ve favorecida ante las deficientes medidas higiénico sanitarias en varias de las explotaciones de reproductoras. El tipo de transmisión de la enfermedad, vertical y horizontal causa que las aves enfermas y portadoras perpetúen y difundan la enfermedad (59,67). Las aves infectan no solo a su propia generación, sino también a generaciones sucesivas, en virtud de la transmisión a través del huevo. Este tipo de explotaciones puede constituir un reservorio importante de la infección (59,67).

Las pérdidas económicas en la avicultura mexicana por la TA a través de los años, se han presentado por la mortalidad en aves adultas y jóvenes, disminución en la producción de huevo, retraso en el crecimiento, baja fertilidad e incubabilidad en aves reproductoras, gastos que derivan de su control y programas de erradicación (34,59,70,86).

La *Salmonella gallinarum* agente etiológico de la TA, es un bacilo corto, Gram-negativo, inmóvil, que no forma esporas ni contiene cápsula, es aerobio o anaerobio facultativo (6,68,59). Posee el antígeno "O" somático 1, 9, y 12. No posee los antígenos "H" flagelar, ni "Vi" capsular (68,59).

Una vez que *S. gallinarum* entra por vía oral, pasa al tracto gastrointestinal, donde se confronta con la actividad microbiciida del extracto de intestino delgado (que contiene ribonucleasas, enzimas proteolíticas, tripsina y lisozima (71). Ya presente en intestino grueso y ciegos se ve favorecida su multiplicación y colonización debido a la baja motilidad, pH alcalino y una

general carencia de enzimas digestivas (57). Posteriormente se adhiere a las células epiteliales de la mucosa, mediante moléculas (adhesinas) como por ejemplo la fimbria o pili, expresadas en la superficie de la bacteria, facilitando su colonización y penetración (11,12). Las bacterias no adheridas son barridas fuera del contenido luminal por medios mecánicos tales como la acción ciliar, peristalsis y excreción (11). Después de atravesar la capa de células epiteliales encuentran la membrana basal, la cual actúa como un filtro y puede en algún grado detener la infección; pero la integridad funcional de la membrana es pronto abatida por la inflamación o el daño celular epitelial (21). En este punto, mediante invasión alcanza el tejido subepitelial y aquí esta expuesta a tres importantes sistemas de defensa del hospedador: fluidos tisulares, sistema linfático y células fagocíticas. Al ser la *Salmonella* bacteria intracelular facultativa gana acceso al lumen de un linfático subepitelial o vaso sanguíneo como un microorganismo libre o después entra a una célula móvil (leucocito) transportándola a otras partes del cuerpo (25). En sangre causa anemia hemolítica severa con pérdida de más del 70% de los eritrocitos circulantes originales. Se piensa que los eritrocitos modificados por la endotoxina presente en la bacteria son eliminados por el sistema reticuloendotelial (8); Por otro lado la *S. gallinarum* invade órganos internos principalmente hígado, bazo, riñón, corazón y ovarios (37,70). En hígado se ha reportado que los hepatocitos son altamente permisibles para el crecimiento de la *salmonella*, la cual sobrevive a los mecanismos microbicidas de células Kupffer, continúa la invasión y crece cerca de los hepatocitos, antes de entrar en ellos, primero debe sintetizar nuevas proteínas de membrana (88). Adicionalmente los mecanismos tempranos de defensa son necesarios para controlar esta fase en el proceso de infección (mediada por polimorfonucleares) y días después por la respuesta mediada por linfocitos (37,74,88). La infección disminuye cuando el sistema inmune sigue con la eliminación de la bacteria

antes de que se desarrolle signología clínica. Alternativamente, el daño en tejidos aumenta a un nivel significativo antes de que el sistema inmune pueda controlar al agente patógeno de manera efectiva, manifestándose la enfermedad clínicamente (37,74).

Un ave en la fase aguda de la enfermedad, es capaz de excretar la bacteria en las secreciones de la boca, oculares, nasales y por heces, contaminando rápidamente alimento, agua y cama, convirtiéndolos en fuentes de infección y favoreciendo así la rápida diseminación de la enfermedad. Las aves que se recuperan y entran a la fase crónica, eliminan la bacteria a través del huevo (34,39,68).

El período de incubación de la enfermedad es de 4 a 5 días, aunque puede variar de acuerdo con la virulencia del microorganismo (70).

Aunque la TA se considera una enfermedad de aves adultas, se ha demostrado que las aves de todas las edades son susceptibles (67,70,93).

Los signos observados en pollos jóvenes o recién nacidos que provienen de huevos infectados muestran somnolencia, pobre crecimiento, debilidad, inapetencia y empastamiento fecal en la cloaca, o bien un excremento blanquecino rico en uratos debido a un proceso de deshidratación y muerte. En aves adultas se observa súbito descenso en el consumo de alimento, decaimiento, cresta pálida y doblada, diarrea verdosa o amarillenta, renuencia a moverse. En gallinas gravemente enfermas cesa la producción de huevo debido a la infección ovárica (68,70).

Las lesiones presentes en pollitos se confinan principalmente a hígado, bazo y riñones. El hígado y bazo muestran un notable aumento de tamaño, puntos necróticos blanquecinos focales o multifocales; los riñones se observan inflamados y aumentados de tamaño; pulmones, corazón y mollejas pueden presentar abscesos. Las aves adultas que padecieron un curso crónico o subagudo presentan el hígado, bazo y riñón aumentados de tamaño, el hígado

presenta un color café verdoso o bronceado con puntillado necrótico blanquecino además una enteritis catarral hemorrágica, los ovarios se observan flácidos, hemorrágicos y algunas veces con ruptura (70).

Para el diagnóstico definitivo de TA se requiere aislar e identificar la *S. gallinarum*; la historia de la parvada, los signos clínicos y las lesiones son altamente sugestivas; los hallazgos serológicos mediante aglutinación en placa o hemoaglutinación pueden ser provechosos en aves de crecimiento y adultas para llegar a un diagnóstico presuntivo (34,70). *S. gallinarum* es fácilmente aislada de órganos viscerales, siendo el hígado y bazo los órganos de preferencia para el cultivo (6).

Actualmente en México, cuando se presenta una infección a nivel de progenitoras, la parvada debe ser eliminada por completo. En el caso de gallinas reproductoras, se debe muestrear al 100% de las aves, y eliminar a las reproductoras positivas. Además se emplea el tratamiento masivo con antibiótico y la vacunación sobre brote con la vacuna 9R (59). Sin embargo, la protección conferida por la vacuna es mínima ante cepas muy virulentas de *S. gallinarum* (14). En muchas ocasiones, la culminación de todos los esfuerzos por controlar el brote ya presente, es el envío de la parvada al rastro (34,59).

PARATIFOIDEA POR *Salmonella enteritidis*

La infección por *Salmonella enteritidis* en aves existe en todas partes del mundo (26) con excepción de los países Escandinavos (63). El número de aislamientos de *S. enteritidis* se ha incrementado considerablemente en los últimos 10 años en el norte de los Estados Unidos, representando el 18% y en Europa del 50 al 90% de los brotes de salmonelosis, esta especie se ha encontrado junto con *S. typhimurium* (10,35,63); en los Estados Unidos los brotes de salmonelosis han sido reportados en 40,000 casos y han muerto 500 personas y los costos en tratamientos han excedido los \$50 billones de dólares anualmente (35). En México los casos de salmonelosis registrados en humanos durante 1987 ascendieron a 68,423 y para 1991 se incrementó a 105,104 (87); quizá el principal problema en la industria avícola es que *S. enteritidis* se asocia a una contaminación del huevo debido a la transmisión vertical, trayendo como consecuencias grandes pérdidas económicas en el sector avícola (19,24,27,81).

La epizootiología del complejo de *S. enteritidis* en las aves puede ocurrir en diferentes etapas del ciclo productivo (en los primeros días de edad, al momento de la madurez sexual y durante la inducción de la pelecha) (63). En aves jóvenes la mortalidad se presenta en las primeras 2 semanas después de la incubación, con las más altas pérdidas entre el 6º y el 10º día; en brotes agudos los signos no pueden ser notados y se ha observado un 80% de mortalidad. Brotes agudo en aves semimaduras y adultas bajo condiciones naturales son raras, generalmente no muestran signos aparentes (31,34), únicamente se ha observado depresión de la producción de huevo (26); sin embargo estas gallinas actúan como transportadoras de la infección intestinal por largos periodos (34).

La *Salmonella enteritidis* puede ser aislada a partir de los seres humanos y de muchas especies animales entre las que se encuentran: bovinos, equinos, perros, gatos, roedores y las aves. También es posible su aislamiento a partir de alimento y agua de bebida. Esto demuestra que la transmisión vertical, no es necesariamente la vía más importante de difusión de la bacteria (26,33). En Holanda durante 1992 se reporta que el 40% de los brotes de *S. enteritidis* en pollos de engorda y gallinas de postura fue causada por la transmisión horizontal y para 1993 la gran mayoría de los casos fueron por transmisión horizontal (31).

Después de la inoculación oral de las gallinas, *Salmonella enteritidis* coloniza el tracto gastrointestinal y, a menudo, invade subsecuentemente y se disemina hacia varios órganos internos y, en ciertas instancias, se deposita en el contenido de los huevos (26). Al ser una bacteria Gram-negativo, móvil, intracelular facultativa con antígenos somáticos 1, 9, 12 y antígenos flagelares *g* y *m* (26,34) induce el desarrollo de la respuesta inmune de tipo celular. Esta inmunidad celular consiste en diferentes reacciones: la fagocitosis y destrucción de los microorganismos por los macrófagos los cuales presentan el antígeno procesado a linfocitos T, estos responden dividiéndose repetidamente originando células de memoria y efectoras; estas últimas sintetizan y secretan proteínas llamadas linfocinas, las cuales son un importante componente de la inmunidad celular (37,74).

INMUNIZACIÓN *in ovo*

Estructuras y crecimiento embrionario

Las membranas del cascarón mantienen la integridad microbiológica del huevo, permitiendo la difusión de gases dentro y fuera del huevo (61,75). La distribución de gases dentro del huevo es facilitado por la membrana corioalantoidea altamente vascular, la cual sirve como el órgano respiratorio del embrión. La formación de esta membrana ocurre adyacente a la membrana del cascarón. Durante el desarrollo, alrededor del tercer día esta membrana forma una cavidad relativamente amplia conocida como saco alantoideo, el cual contiene entre 5-10 ml de líquido (32,61). Su función es oxigenar la sangre del embrión y eliminar el bióxido de carbono, elimina las excreciones del riñón embrionario y las deposita en la cavidad alantoidea, ayuda en la digestión de la albúmina y la absorción de calcio del cascarón (61). El embrión se encuentra rodeado por la membrana amniótica formando el saco amniótico, el cual contiene 1-2 ml de líquido que le sirve al embrión para flotar durante su desarrollo. El saco vitelino localizado aproximadamente en el centro del huevo, envuelve a la yema y secreta una enzima que cambia el contenido de la yema a una forma soluble para que el material alimenticio pueda ser transportado y absorbido por el embrión en desarrollo (32,61,75).

Durante las primeras 24 horas de incubación hay varios procesos embrionarios.

Primer y segundo día: Se inicia el desarrollo del corazón y de los vasos sanguíneos, a las 12 horas el corazón comienza a latir, fomentando la circulación de la sangre con la unión de los vasos sanguíneos del embrión al saco vitelino; desarrollo del segmento del mesodermo, estructura de forma alargada que se desarrolla a ambos lados de la médula espinal. A partir de está, se desarrollan el hueso y el músculo.

Aparece el aparato digestivo, la columna vertebral, sistema nervioso y formación de cabeza, ojos y oído (32,61).

Tercer al quinto día: formación de nariz y alas, desarrollo de piernas, rotación del embrión y aumento rápido del sistema circulatorio. Los órganos reproductores se diferencian y se desarrolla el sexo, el corazón empieza a tomar su forma definitiva y el área vascularizada del saco vitelino cubre dos terceras partes de la yema. En este período ya se encuentran todos los órganos del cuerpo (32,61).

Sexto al décimo día: Pico y diente del nacimiento empiezan a tomar su forma normal, movimientos voluntarios del embrión, rápido desarrollo del cuerpo, aparecen los folículos de las plumas, y el origen de las regiones emplumadas, aparecen los dedos al igual que las escamas de los tarsos (32,61,75).

Undécimo al decimocuarto día: aparecen las paredes del abdomen, se observan los intestinos en el saco vitelino, el esqueleto se empieza a calcificar, la mayor parte de los órganos están diferenciados. El embrión rota a una posición paralela al eje longitudinal del huevo, con la cabeza orientada hacia el extremo más ancho del huevo (61,75).

Decimoséptimo al vigésimo día: La cabeza gira de modo que el pico se coloca debajo del ala derecha, el saco vitelino empieza involucionar hacia la cavidad abdominal a través del ombligo. El embrión ocupa toda el área del cascarón, excepto la cámara de aire. Se inicia la cicatrización del ombligo. Con el pico rompe la membrana interna del cascarón llegando a la cámara de aire, comienza la respiración pulmonar (61,75).

Vigésimo primer día: después de picar el cascarón, descansa por varias horas, luego corta una línea circular alrededor del cascarón en dirección contraria a las manecillas del reloj (61,75).

Aparece el aparato digestivo, la columna vertebral, sistema nervioso y formación de cabeza, ojos y oído (32,61).

Tercer al quinto día: formación de nariz y alas, desarrollo de piernas, rotación del embrión y aumento rápido del sistema circulatorio. Los órganos reproductores se diferencian y se desarrolla el sexo, el corazón empieza a tomar su forma definitiva y el área vascularizada del saco vitelino cubre dos terceras partes de la yema. En este periodo ya se encuentran todos los órganos del cuerpo (32,61).

Sexto al décimo día: Pico y diente del nacimiento empiezan a tomar su forma normal, movimientos voluntarios del embrión, rápido desarrollo del cuerpo, aparecen los folículos de las plumas, y el origen de las regiones emplumadas, aparecen los dedos al igual que las escamas de los tarsos (32,61,75).

Undécimo al decimocuarto día: aparecen las paredes del abdomen, se observan los intestinos en el saco vitelino, el esqueleto se empieza a calcificar, la mayor parte de los órganos están diferenciados. El embrión rota a una posición paralela al eje longitudinal del huevo, con la cabeza orientada hacia el extremo más ancho del huevo (61,75).

Decimoséptimo al vigésimo día: La cabeza gira de modo que el pico se coloca debajo del ala derecha, el saco vitelino empieza involucionar hacia la cavidad abdominal a través del ombligo. El embrión ocupa toda el área del cascarón, excepto la cámara de aire. Se inicia la cicatrización del ombligo. Con el pico rompe la membrana interna del cascarón llegando a la cámara de aire, comienza la respiración pulmonar (61,75).

Vigésimo primer día: después de picar el cascarón, descansa por varias horas, luego corta una línea circular alrededor del cascarón en dirección contraria a las manecillas del reloj (61,75).

Detección y actividad de leucocitos en embrión de pollo

Estudios realizados por Janse *et al.* (1991) empleando anticuerpos monoclonales específicos para fagocitos mononucleares y leucocitos, encontraron macrófagos en saco vitelino y bazo al noveno día, en intestino, bolsa de Fabricio y timo al décimo día, y en hígado al día 12 de incubación. Los primeros leucocitos fueron detectados el día 6 en saco vitelino, el día 8 en bazo, también se encontraron en hígado e intestino al noveno día y en bolsa de Fabricio como en timo el día 10. Además determinaron mediante la inyección de carbono coloidal y el antígeno FITC-Ficoll, actividad fagocítica por macrófagos y células reticulares en bazo e hígado (39).

Allsep *et al.* (1990) reportaron en el conteo diferencial de células blancas en embrión de pavo, un gran número de heterófilos en sangre periférica el día 12 de incubación, constituyendo el 66 al 80 % del total de leucocitos en sangre. Los segundos más numerosos fueron linfocitos con un 10 al 33 %. En embrión de pollo los niveles encontrados de heterófilos el día 15 son entre un 80 y 90 %, y los eosinófilos, basófilos y monocitos constituyen menos del 10 % (5). Se menciona que una vez encontrado heterófilos en circulación periférica en embrión de aves su concentración se incrementa antes del nacimiento (73).

Distribución de Inmunoglobulinas

Se ha determinado en huevo fértil, concentraciones de IgA, IgG e IgM en yema, siendo IgG cuantitativamente la de mayor concentración (91). La concentración promedio de IgG en yema es de 8.7 mg/ml, en saco vitelino a los 14 días de vida embrionaria se encuentra en 5.7 mg/ml, y conforme se acerca el nacimiento disminuye aun más (40). Esto es debido en parte, por la gran cantidad de fluido en movimiento de la clara al saco vitelino, durante el tercer y quinto día, que ocasiona una dilución del contenido del saco vitelino. La transferencia de IgG dentro de la circulación del embrión comienza alrededor

del día 12 (40,46). Se ha determinado entre los 19 y 21 días aumento en la concentración de IgG en suero fetal (40).

Las inmunoglobulinas IgM e IgA se encuentran durante los primeros 10 días de vida embrionaria en la clara, por lo cual su concentración es baja o casi nula en saco vitelino durante este período (40). Se han encontrado estas inmunoglobulinas en líquido amniótico comenzando el día 11 del desarrollo embrionario después de la ruptura de la conexión sero-amniótica (75). La concentración promedio reportada el día 21 en saco vitelino de IgM es de 0.145 mg/ml y de IgA 0.207 mg/ml, y su presencia probablemente, es debida a la síntesis por el embrión o resultado de su transferencia desde la clara al saco vitelino, durante el último tercio del desarrollo embrionario (40).

Investigaciones en Embrión de Pollo

El embrión de pollo hasta el momento, ha sido uno de los sistemas hospederos más usados para el aislamiento, propagación y caracterización de virus aviares y para la producción de vacunas virales (77); En gran parte se debe a su disponibilidad y cantidad durante todo el año, bajo costo por unidad, facilidad de transporte en gran número, fácil manejo y obtención de resultados en un período corto (76).

En los últimos 10 años se han empleado exitosamente como modelos experimentales para la inmunización de aves (2,3,79,80). Se ha determinado que la exposición prenatal a ciertos antígenos induce una alta y sostenida respuesta de anticuerpos (56).

Ahmad *et al.* (1992) reportaron en pollos, que días antes del nacimiento, éstos ya han desarrollado cierto grado de respuesta inmune ante agentes extraños al organismo (2). Sharman (1981) demostró que pollos nacidos de embriones inoculados el día 18 de incubación con vacuna herpesvirus de pavo contra la enfermedad de Marek y desafiados con herpes virus, presentaron una

mayor resistencia al desafío en comparación con pollos vacunados al primer día de edad; La vacunación embrionaria no afectó la incubabilidad o la sobrevivencia de los pollos. La ruta de inyección ya sea en saco vitelino, cuerpo del embrión o fluido amniótico fue igualmente efectiva en inducir resistencia contra el desafío con herpes virus (79). En estudios similares, realizaron la vacunación embrionaria inyectando una mezcla de vacunas (Infección de la Bolsa de Fabricio y Marek) obteniendo protección a las 3 semanas del desafío con virus virulento de ambas enfermedades (80). Ahmad *et al.* (1992,1993) mostraron que pollos y pavos pueden ser inmunizados mediante la inyección *in ovo* con vacuna contra la enfermedad de Newcastle (2,3).

Las investigaciones han demostrado que la administración *in ovo* de vacunas contra infecciones por virus puede resultar en protección contra éstos y otros patógenos al nacimiento del pollo. Además, se ha desarrollado una máquina para inyectar huevos fértiles de uso comercial. La máquina fue diseñada para transferir embriones los días 18 o 19 a la nacedora mientras se inyectan a un ritmo de 30,000 huevos por hora (48).

PRIMERA LÍNEA DE DEFENSA CONTRA *Salmonella spp.*

La protección contra una variedad de bacterias intracelulares facultativas incluyendo *Salmonella*, es primariamente dependiente de la respuesta inmune mediada por células; mientras que los factores inmunes humorales tienen poco o nulo valor protectorio (16,88). Así un mecanismo temprano de defensa existe, para prevenir patógenos con un corto tiempo de generación, desde su multiplicación en un número capaz de abrumar alguna inmunidad desarrollada por linfocitos T (88).

El fagocito al ser la parte más importante del sistema de defensa innato del hospedador, opera contra la invasión del microorganismo después de un daño a la superficie epitelial (62). En general hay dos tipos de células fagocíticas especializadas, los macrófagos y los polimorfonucleares (PMN) (49,62,74).

Los macrófagos derivan de células (monocitos) circulantes en sangre periférica procedentes de la médula ósea; tienen varias funciones además de la fagocítica actúan como células presentadoras de antígeno procesado, a linfocitos y como células secretoras de monocinas (83). Estructuralmente, presentan lisosomas que contienen peroxidasa e hidrolasa, útiles en la destrucción de microorganismos (74); poseen receptores para citocinas tales como Interleucina-4 (IL-4), Interferón- δ (IFN- δ) y Factor inhibidor de la migración (MIF). Por consiguiente, la función de estos puede ser incrementada por linfocinas derivadas de linfocitos T a través de estos receptores (74,83).

Los PMN son producidos en la médula ósea, su función predominante es la fagocitosis. No muestran alguna especificidad inherente por los antígenos, pero juegan un importante función en la inflamación en contra de los microorganismos (5,74). Existen tres tipos de PMN: los heterófilos (neutrófilos en mamíferos), los basófilos y los eosinófilos (43,47). Los heterófilos,

constituyen el 70% del total de leucocitos en sangre, son capaces de producir sustancias bactericidas tales como peróxido de hidrógeno, superóxido y lactoferrin en respuesta a la estimulación por citocinas así como por lipopolisacáridos (LPS), sobre receptores específicos favoreciendo la activación de mecanismos bactericidas (15,45,82). El receptor activado por LPS es CD14, el cual controla la expresión de los receptores CD11b y CD18 importantes en la fagocitosis y en la adherencia de neutrófilos a los endotelios (52). Las citocinas secretadas por estas células fagocíticas incluyen interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), y factor de necrosis tumoral. Estos factores secretados pueden promover la migración, fagocitosis, e interacción con células asesinas, monocitos, y linfocitos (69).

Canning *et al.* (1989) evaluaron el efecto *in vitro* del INF- δ en neutrófilos de bovino ante *Brucella abortus*, obtuvieron un incremento del metabolismo oxidativo y la enzima mieloperoxidasa resultando en una mayor habilidad del neutrófilo para matar *B. abortus* (17). Se ha reportado en aves que los heterófilos son metabólicamente activados y atraídos hacia el tejido dañado, por liberación de IL-1 (69).

Cuando *S. enteritidis* u otras salmonelas penetran en el intestino, se inicia una respuesta inflamatoria caracterizada por el flujo de un gran número de células PMN al sitio de infección (44). En las aves, estas células provienen de la sangre, siendo originalmente producidas por células de la médula ósea. Una vez en el sitio de infección, los PMN parecen intervenir en dos distintos mecanismos:

- i) fagocitosis directa y muerte de bacteria extracelular con o sin opsonización seguida de la penetración del epitelio intestinal por PMN.
- ii) células infectadas por bacterias son lizadas por PMN los cuales se acumulan en el sitio de infección y luego es ingerida la bacteria liberada por los mismos

PMN. Estos actúan antes que los macrófagos arriben al sitio de inflamación (43,44,74).

Cuando los PMN o macrófagos se adhieren a las bacterias se inicia el proceso de fagocitosis (22,62).

En dicho proceso están involucradas diferentes etapas secuenciales: quimiotaxis, adherencia, endocitosis, incremento en el metabolismo general de las células fagocíticas, formación del fagosoma, interacción fagosoma-lisosoma para formar el fagolisosoma, mecanismos para la destrucción del agente y finalmente la expulsión del material de desecho durante el proceso de la exocitosis (1,22,62,74).

La fagocitosis no es suficiente para eliminar el agente, ésta debe ser seguida por muerte y digestión intracelular de la bacteria (1,18). Se han descrito diferentes mecanismo de liquidación bacteriana por parte de los fagocitos, los más importantes son: actividad bactericida dependiente del oxígeno, vía del óxido nítrico y cambios en el pH del fagolisosoma (4,15,52,90).

Stabler *et al.* (1994) estudiaron las interacciones de *S. enteritidis*, con heterófilos y monocitos de la aves, concluyendo que dichas células juegan un papel determinante para evitar la presentación de un cuadro clínico en las aves, por *S. enteritidis*, ya que los heterófilos, y en menor grado los monocitos la fagocitan y destruyen eficazmente (82). Investigaciones realizadas por Kogut *et al.* (1994c) sugieren que los heterófilos son extremadamente importantes en controlar la inicial diseminación en órganos por *S. enteritidis* y la subsecuente patogenia de la enfermedad en pollos (44).

Por otro lado, estudios realizados *in vitro* determinaron que el macrófago de aves es relativamente ineficiente en la destrucción de *Salmonella* en comparación con el heterófilo aviar (82). Se ha observado en hígado que *S. typhimurium* puede sobrevivir en células Kupffer dentro del fagosoma, debido a que inhibe la fusión fago-lisosoma (88). La adhesión de citocinas como IFN- δ ,

TNF- α (liberadas principalmente por linfocitos T), a receptores de macrófagos aumenta su actividad bactericida gracias a la formación de óxido nítrico y otros mecanismos microbicidas (65,74,84,90).

PROTEINAS SOLUBLES SECRETADAS POR LINFOCITOS T

Los linfocitos T CD4, al reconocer el antígeno sobre la superficie del macrófago asociado con moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), más la liberación de IL-1, incrementan el metabolismo de dichos linfocitos ocasionando división, síntesis y secreción de diferentes citocinas (49,74,84).

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, usualmente entre 15 y 25 kDa. Actúan de forma transitoria y la mayoría actúan localmente, aunque IL-1 y IL-6 pueden mediar la secreción de proteínas en fase aguda desde el hígado. Presentan múltiples efectos en distintas áreas:

- i) control del crecimiento de linfocitos.
- ii) activación de mecanismos de la inmunidad innata (incluyendo inflamación).
- iii) control de la hematopoyesis en médula ósea.
- iiii) reparación del tejido (13,49,74).

Estas proteínas solubles pueden actuar secuencialmente, y así a través de una citocina inducir la producción de otra o por transmodulación de los receptores por otra citocina; pueden actuar también en forma sinérgica o antagónica (74,84).

Los linfocitos T CD4 se han dividido en TH1 y TH2 según el tipo de linfocinas liberadas. Así los TH1 producen linfocinas tales como: IL-2, una de las más importantes encargada de regular, activar el crecimiento y la diferenciación de la misma TH1, TH2, CD8, y linfocitos B. También secretan IFN- δ , Factor de necrosis tumoral (TNF- α) entre otras que intervienen en diversas funciones relacionadas con citotoxicidad y reacciones inflamatorias locales. Dichas linfocinas son particularmente importantes para combatir virus, parásitos y bacterias intracelulares. IFN- δ es inmunorregulador de citocinas, antiviral y antitumoral. También se producen TNF- β y MIF. Cuando están

presentes IFN- δ y TNF- α poseen un fuerte sinergismo y actividad citolítica. Los efectos por TH1 son predominantemente de una respuesta inmune celular (7,74,84).

La estimulación de TH2 conduce a la secreción de: IL-3 también llamado Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); IL-4 actúa en linfocitos B para secretar una gran cantidad de IgG e IgE, IL-5 incrementa la secreción de IgA; IL-6 es capaz de estimular la secreción de todo tipo de inmunoglobulinas; IL-9 activa a los mastocitos así como también IL-5 e IL-13, e IL-10 (49,74).

En todas estas reacciones, los macrófagos juegan un papel importante como células presentadoras de antígenos y también por la secreción de citocinas tales como TNF- α , IL-1, IL-6, GM-CSF, Factor transformante de crecimiento (TGF) el cual inhibe la síntesis de citocinas, Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). TNF- α juega un papel importante en la activación de la respuesta inmune por ejemplo, activa TH1, CD8, eosinófilos, macrófagos y PMN, tiene efectos sinérgicos con IFN- δ , linfotoxinas y especialmente en PMN, incrementa los aniones del peróxido de hidrógeno, aumenta la actividad de los lisosomas y degranulación de enzimas proteolíticas (13,74,84). Al mismo tiempo la activación y secreción de IFN- δ por TH1 dirige la actividad de macrófagos (84).

Por otra parte los linfocitos T CD8 reconocen el antígeno sobre la superficie de las células, asociado con las moléculas de clase I del CPH, activándolos de tal forma que la mayoría de gránulos citoplasmáticos se movilizan hacia la periferia de su membrana colindante a la célula infectada (virus, bacteria intracelular), por exocitosis del contenido de los gránulos (perforinas, enzimas, y TNF) lesionan la membrana y causan muerte celular por apoptosis. Poseen receptores para TNF- α , liberan IFN- δ y TNF- α (13,84).

Por lo tanto las citocinas tienen múltiples funciones y, más de una citocina puede mediar la misma o varias funciones similares (84). Una de las funciones más importantes de IL-8 es la quimiotaxis y activación de PMN (41). Larsen *et al.* (1989) demostró que la inyección intradérmica de IL-8 inicia una respuesta inflamatoria aguda, la cual se caracteriza por acumulación local de PMN (47).

Se ha reportado que la administración profiláctica de citocinas (IL-2, IL-1, IL-6, y INF- γ) presentan un efecto protector al hospedador disminuyendo la infección por bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Brucella abortus* y *Candida albicans*. Dichos estudios sugieren que el empleo de linfocinas puede ser útil en la profilaxis de infecciones bacterianas, en medicina veterinaria (17,20,29,45,69).

Estudios realizados por Kogut y Slajchert (1992) mostraron que linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con coccidia confieren protección contra *Eimeria tenella* (41). En investigaciones recientes se ha observado que la administración profiláctica del sobrenadante con linfocinas obtenidas de Linfocitos T de aves hiperinmunizadas con *S. enteritidis* y activados con concanavalina A "Se-immune lymphokines" (Se-ILK), confirió protección significativa contra la invasión por *S. enteritidis* en órganos de pollos de 18 días de edad. Esta protección ocurrió en un periodo de 24 horas y fue asociada a un incremento de células inflamatorias en la lámina cecal (85). Estudios similares en los cuales se administró linfocinas vía intraperitoneal (Se-ILK), estas confirieron una significativa protección contra la invasión en órganos de pollos de un día de edad, desafiados vía oral con 10^4 , 10^5 , o 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml de *S. enteritidis*, en un periodo de 24 h (55).

Además, Ray *et al.* (1993) reportaron que con la aplicación de Se-ILK se presentó una reducción significativa en la invasión de órganos en pollos de un día de edad, desafiados vía oral con 10^5 o 10^6 ufc/ml de *Salmonella*

thyphimurium, obteniendo protección cruzada (bacterias heterólogas) inducida por el SE-ILK (72).

Estudios preliminares, han demostrado la presencia de IL-2 e INF- δ en el sobrenadante obtenido de linfocitos T de aves hiperinmunizadas con *S. gallinarum* o *S. enteritidis*, lo cual sugiere que estas linfocinas participan en el efecto profiláctico conferido por Se-ILK en pollos desafiados con *S. enteritidis* (30).

Actualmente la vacunación tradicional de las aves contra *Salmonella* ha tenido aceptación comercial y éxito limitado ante cepas virulentas, por lo cual resulta interesante evaluar si el Se-ILK y el sobrenadante que contiene linfocinas de aves hiperinmunizadas con *S. gallinarum* (Sg-ILK) tienen un efecto profiláctico contra la infección producida por una cepa de campo patógena de *S. gallinarum* en pollos de engorda, durante los primeros 10 días de vida. La manipulación del aparato inmunocompetente mediante estas linfocinas aplicadas en las aves se puede contribuir a la solución de la salmonelosis en las aves explotadas comercialmente.

Con respecto a la inyección de linfocinas *in ovo*; Estudios realizados por McGruder *et al.* (1995b) confirieron protección en pollos neonatos contra la invasión en órganos por *S. enteritidis* con la administración de Se-ILK en huevos fértiles a los 18 días de vida embrionaria. Este experimento sugirió que está vía resulta más práctica que la intraperitoneal (54).

Debido a que la inyección *in ovo* presenta ventajas tales como: administración de dosis uniforme, aplicación al momento de transferir el huevo fértil a la nacedora y se evita el manejo de aves al día de edad por consiguiente el estrés, es interesante conocer si la aplicación del Sg-ILK *in ovo* influye en la

incubabilidad, y si confiere protección durante 10 días después del nacimiento al desafío con *S. gallinarum*.

HIPÓTESIS

- La administración de Se-ILK o Sg-ILK pueden proteger a pollos de engorda de un día de edad contra la invasión en órganos y mortalidad causada por la infección de *S. gallinarum*.

- La administración del Sg-ILK *in ovo* no afecta la viabilidad al nacimiento y puede proteger contra la invasión en los órganos y mortalidad por *S. gallinarum*, al desafiar dichos pollos al día de edad.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar el efecto profiláctico de Se-ILK o Sg-ILK en pollos de engorda inoculados al primer día de edad con 10^4 y 10^6 ufc/ml de *S. gallinarum*.

- Evaluar el efecto de Sg-ILK aplicado al día 18 de incubación del embrión en pollos de engorda desafiados con 10^5 ufc/ml *S. gallinarum* al día de edad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el % de viabilidad, así como el peso corporal en pollos de engorda al primer día de edad, inoculado con Sg-ILK *in ovo*.

- Determinar el efecto profiláctico del Sg-ILK *in ovo* así como de Se-ILK o Sg-ILK vía intraperitoneal, en pollos de engorda desafiados con *S. gallinarum* mediante la ganancia diaria de peso, mortalidad, cultivo primario de hígado en la mortalidad, e invasión a órganos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacterias

Para la hiperinmunización, se utilizó una cepa de *S. enteritidis* fagotipo 13 obtenida del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LNSV) Ames, Iowa, aprobada para su uso en el Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves) de la FMVZ, UNAM, y una cepa de campo patógena de *S. gallinarum*¹, la cual fue seleccionada por su resistencia a novobiocina y al ácido nalidíxico (NO-AN), las cuales se mantuvieron en agar nutritivo. Los inóculos para la inmunización con *S. enteritidis* y *S. gallinarum* fueron preparados con solución salina fosfatada estéril (PBS) y ajustados a una concentración de 10⁹ ufc/ml mediante espectrofotometría.

Para el desafío de las aves se utilizó la cepa de *S. gallinarum*, la concentración de 10⁹ ufc/ml, diluida en PBS para obtener 10⁴, 10⁵ y 10⁶ ufc/ml. La concentración celular viable de los inóculos se determinó por el conteo de colonias en placas de agar tripticosa soya (TSA).

Proceso de Inmunización

Para la obtención de las linfocinas de aves hiperinmunizadas, se utilizó 21 gallinas de postura raza "White Leghorn"² de 42 semanas de edad, 7 fueron desafiadas vía oral con una dosis de 10⁸ ufc/ml de *S. enteritidis* y las restantes se desafiaron con 10⁸ ufc/ml de *S. gallinarum*. Se aplicaron dosis iguales de refuerzo 14 y 21 días después con la respectiva bacteria. Como grupo testigo se mantuvieron 21 gallinas no infectadas, bajo condiciones similares, en una unidad de aislamiento por separado, con el objeto de obtener linfocinas de aves sin inmunizar.

¹ Donada por el MVZ. Mario Padrón Navarro

² Alpes S.A. de C.V.

Preparación de la suspensión de células esplénicas

Diez días después del proceso de inmunización, se colectaron asépticamente los bazos de las aves inmunizadas experimentalmente y de los testigos no infectados. Los bazos se pasaron a través de una criba del número 50, de acero inoxidable para tejidos, utilizando medio RPMI 1640 que contiene 100 u/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina (P-E). Las células esplénicas fueron centrifugadas a 250 x g por 10 min a 4 C, resuspendidas en agua destilada estéril fría para lisar los eritrocitos, se diluyó a 1:25 en medio frío RPMI 1640 que se recentrifugó a 250 x g por 10 min a 4 C. Se realizó una sola suspensión celular ($5-7 \times 10^6$ células/ml) en medio RPMI 1640 libre de suero, suplementado con L-glutamina (mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E. Las células testigo fueron preparadas a partir de los bazos de aves no inmunizadas, mediante el mismo método.

Aislamiento de Linfocitos T

La suspensión celular a partir de Bazo preparada con anterioridad, se pasó a través de columnas de lana de nylon³ descrito por Julius *et al.*, adaptado por Kogut y Salichert para la purificación de linfocitos T (41). Las columnas fueron preparadas con lana de nylon húmeda, a razón de 3.5 g, introduciéndola sin compactarla, en jeringas de 35 ml y esterilizadas por autoclave. Las columnas se preincubaron con medio RPMI 1640 tibio más 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB), a 41 C por una hora en una incubadora con 5 % de CO₂. Las células se aplicaron a las columnas con 10 ml de medio RPMI 1640. Hecho lo anterior se incubaron a 41 C durante una hora en una incubadora con 5 % de CO₂. Las células no adherentes a la lana de nylon fueron eluidas de la columna con medio RPMI 1640 tibio. La viabilidad de las células eluidas se determinó mediante tinción con azul de tripano al 0.1 % y se

³ Fenwal Laboratories, Morton Grove, IL

ajustó la densidad celular a la concentración de 2×10^6 células viables/ml con medio RPMI 1640 libre de suero más P-E. Diez ml de células no adherentes a la lana de nylon se incubaron en placas de petri, de 100 x 15 ml, durante 2 h a 41 C, en una incubadora con 5 % de CO₂, para eliminar a los macrófagos. Las células no adherentes (células T) se lavaron de las cajas de petri, se verificó su viabilidad tiñéndolas con azul de tripano al 0.1 % y se ajustaron a las diversas densidades celulares con medio RPMI 1640 libre de suero, estas se utilizaron para la preparación de las linfocinas.

Preparación de las Linfocinas

Las linfocinas se obtuvieron mediante la incubación de linfocitos T purificados (1×10^7 células/ml) en medio RPMI 1640 conteniendo 7.5 mm/ml de concanavalina A en cajas de petri para cultivo tisular por 48 h, a 41 C en una incubadora con 5 % de CO₂. Después de la incubación, el sobrenadante se colectó y centrifugó a 2,000 x g por 15 min para remover todas las células, se le adicionó methyl α -mannopyranosida (40 mm/ml) para inactivar residuos de concanavalina A. Se concentraron los sobrenadantes de 10 a 12 veces mediante ultrafiltración, empleando membranas YM-10⁴ (10 kilodaltons). Al final se pasó a través de un filtro (0.45 mm); el sobrenadante fue guardado en refrigeración a 20 C hasta que se utilizó. Con esto se obtuvieron las Se-ILK y Sg-ILK, bajo el mismo procedimiento fueron obtenidas las linfocinas de aves no inmunizadas con *S. enteritidis* o *S. gallinarum* "No-immune lymphokines" (NILK).

⁴ Amicon Corp., Danvers, MA01915

Aves de experimentación

Se utilizaron 580 pollos de engorda⁵ de una incubadora comercial de un día de edad (Arbor Acres x Arbor Acres), y se alojaron en baterías eléctricas, ubicadas en las unidades de aislamiento del DPA: Aves de la FMVZ, UNAM. Los pollos se alimentaron con una dieta comercial y agua *ad libitum*. Antes del desafío se realizó el estudio bacteriológico de la paja de transporte, alimento y de 20 pollos, para descartar la presencia de *Salmonella spp.* empleando métodos de cultivo estándar (6). Para el tratamiento *in ovo* se utilizaron 200 huevos fértiles de reproductoras pesadas (Peterson x Aviam Farm) libres de *S. gallinarum*, los cuales fueron incubados hasta el nacimiento del pollo y posteriormente se alojaron en baterías eléctricas, ubicadas en las unidades de aislamiento del DPA: Aves. Los pollos se alimentaron con una dieta comercial y agua *ad libitum*.

Diseño Experimental

Experimento 1:

Estudio a) Al primer día de edad, las aves se asignaron de manera aleatoria en 5 grupos de 20 pollos con 3 réplicas cada uno. A los grupos 1 y 2 se les inyectó vía intraperitoneal 0.5 ml de Se-ILK, los grupos 3 y 4 se inyectaron por la misma vía con NILK (testigos positivos). Treinta minutos después se desafiaron vía oral los grupos 1 y 3 con 10^4 ufc/ml de *S. gallinarum*, los grupos 2 y 4 se desafiaron con 10^6 ufc/ml de *S. gallinarum*.

Estudio b) Al primer día de edad, las aves se asignaron de manera aleatoria en 4 grupos de 20 pollos con 3 réplicas cada uno. A los grupos 1 y 2 se les inyectó vía intraperitoneal 0.5 ml de Sg-ILK, los grupos 3 y 4 se inyectaron por la misma vía con NILK (testigos positivos). Treinta minutos

⁵ Arbor Acres, Productores Agropecuarios de Tepexpan, Texcoco, MX08200

después se desafiaron vía oral con 10^4 ufc/ml de *S. gallinarum* los grupos 1 y 3, a los grupos 2 y 4 se desafiaron con 10^6 ufc/ml de *S. gallinarum*.

Un quinto grupo (testigo negativo) se inoculó y desafió con PBI estéril por las mismas vías y sirvió para los estudios a y b.

A partir de este momento, de cada estudio fue realizado un seguimiento diario de la morbilidad y mortalidad en las aves, se registró el peso corporal al nacimiento y al día 10 de edad, así como estudio bacteriológico a partir de los pollos muertos durante el experimento. De las aves sobrevivientes a los 10 días posinoculación se sacrificaron por dislocación cervical y posteriormente se tomaron muestras de órganos para su cultivo y determinación de *S. gallinarum*.

Experimento 2:

Al día 18 de vida embrionaria, los⁴ huevos fértiles se asignaron de manera aleatoria en tres grupos. Posteriormente se limpiaron con ethanol al 70% en la parte roma del huevo y se les inyectó 0.1 ml en cavidad amniótica de Sg-ILK al grupo 1 y NILK al grupo 2 (testigo positivo) empleando jeringas estériles de 1 ml y agujas de 22 x 25 mm, siguiendo el procedimiento descrito por Sharman *et al.* (79). El tercer grupo (testigo negativo) no fue inyectado.

Al momento del nacimiento, se registró el número de pollos nacidos, así como el peso corporal de cada uno. Posteriormente de los pollos nacidos se utilizaron 216 pollos, 36 en cada grupo con 2 réplicas; los cuales fueron desafiados vía oral con 10^5 ufc/ml de *S. gallinarum*. El testigo negativo no fue desafiado.

A partir de este momento, se realizó un seguimiento diario de la morbilidad y mortalidad en las aves, fue registrada la ganancia de peso diaria y estudio bacteriológico a partir de los pollos muertos durante el experimento. De las aves sobrevivientes a los 10 días posinoculación se sacrificaron por

dislocación cervical y posteriormente se tomaron muestras de órganos para su cultivo y determinación de *S. gallinarum*.

Los datos obtenidos en los estudios se reportaron en forma separada.

Determinación de S. gallinarum en órganos

De las aves muertas durante los Experimentos 1 y 2, se realizó una toma directa de hígado (en la parte más lesionada) con una aza estéril sembrando por estría en placas de Agar verde brillante (AVB), incubadas a 37 C por 24 h y examinadas para determinar la presencia de *S. gallinarum* resistente a NO-AN. Los órganos colectados de las aves sobrevivientes se cultivaron de acuerdo a los lineamientos del Plan Nacional de Mejoramiento Avícola de los E.U.A. (NPIP) (21). El hígado, bazo y tonsilas cecales se colectaron asépticamente y fueron cultivados; trabajándose bazo e hígado como una muestra combinada y tonsilas cecales por separado. Se incubaron durante 18 h a 37 C en caldo tetracionato. Después de incubación, el caldo fue sembrado por estría en placas de AVB conteniendo 25 mg / ml de novobiocina y 20 mg / ml de ácido nalidíxico, las cuales se incubaron a 37 C por 24 h y se examinaron en busca de la presencia de colonias típicas de *S. gallinarum*. Además se hicieron pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de la bacteria en cuestión (6).

Análisis Estadístico

Se utilizó análisis de Ji-cuadrada para determinar diferencias significativas en la invasión de órganos por *S. gallinarum* entre los tratamientos de grupos, la viabilidad al nacimiento, así como la mortalidad de cada experimento (92).

Para determinar posibles diferencias en los pesos de las aves se utilizó análisis de varianza empleando el procedimiento de Modelos Generales Lineales. Las diferencias estadísticas significativas fueron separadas mediante la prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS (51).

Análisis Estadístico

Se utilizó análisis de Ji-cuadrada para determinar diferencias significativas en la invasión de órganos por *S. gallinarum* entre los tratamientos de grupos, la viabilidad al nacimiento, así como la mortalidad de cada experimento (92).

Para determinar posibles diferencias en los pesos de las aves se utilizó análisis de varianza empleando el procedimiento de Modelos Generales Lineales. Las diferencias estadísticas significativas fueron separadas mediante la prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS (51).

RESULTADOS

Experimento 1: Efecto de Se-ILK o Sg-ILK en pollos de engorda desafiados con *S.gallinarum*

Estudio a)

Signos clínicos

En aves que recibieron NILK se observó depresión, inapetencia, amontonamiento, deshidratación, anorexia, emaciación, diarrea y debilidad. En contraste con las aves que recibieron Se-ILK, las cuales no mostraron signos de tifoidea aviar.

Mortalidad

Se observó una reducción significativa en la mortalidad acumulada de los grupos tratados con Se-ILK desafiados con 10^4 ufc ($P < 0.01$) y 10^8 ufc ($P < 0.05$) de *S. gallinarum* a los 10 días posinoculación a diferencia de las aves tratadas con NILK. La mayoría de las aves tratadas con NILK y desafiadas con ambas dosis de *S. gallinarum* murieron a partir del día 6 posinoculación. El pico de mortalidad se presentó los días 6 y 7 (Cuadro 1).

Ganancia de peso corporal

A los 10 días posinoculación se encontró un aumento significativo en la ganancia de peso en aves que recibieron Se-ILK ($P < 0.05$) y desafió con *S. gallinarum* a diferencia de las aves inyectadas con NILK y desafiadas con dicha bacteria. Sin embargo la ganancia de peso de aves tratadas con Se-ILK fue significativamente menor que el grupo testigo negativo (Cuadro 2).

Invasión de órganos por *S. gallinarum*

Al aislamiento de *S. gallinarum* a partir del hígado de aves muertas durante el experimento se encontró en el grupo tratado con Se-ILK 0/8 aves (0 %) y 2/26 (7.6 %) positivas a las dosis 10^4 y 10^8 , a diferencia del grupo tratado

con NILK 36/44 (81.8 %) y 40/48 (83.3 %) respectivamente, se obtuvo diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.01$) entre grupos de misma dosis (Figura 1).

En la bacteriología de las aves sobrevivientes tratadas con Se-ILK, fueron positivas a 10^4 y 10^6 de *S. gallinarum* en bazo e hígado 1/44 aves (2.2 %) y 5/22 (22.7%), de tonsilas cecales 3/44 (6.8 %) y 0/22 (0 %) respectivamente, en contraste de las aves tratadas con NILK, de las cuales se aisló la bacteria en bazo e hígado de 5/15 aves (33.3 %) y 9/11 (81.8 %), en tonsilas cecales 8/15 (53.3 %) y 8/11 (72.7 %) de las respectivas dosis, obteniéndose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) entre grupos de diferente tratamiento y misma dosis. Todas las aves del grupo testigo negativo, resultaron negativas al aislamiento de *S. gallinarum* (Figura 2).

Estudio b)

Signos clínicos

Los signos observados tanto en aves que recibieron NILK como Sg-ILK fueron depresión, inapetencia, amontonamiento, deshidratación, anorexia, emaciación, diarrea y debilidad. Sin embargo los signos fueron leves en el grupo tratado con Sg-ILK, y en el grupo testigo negativo no se observó ningún signo.

Mortalidad

El porcentaje de mortalidad acumulada a los 10 días posinoculación, se registro en el grupo tratado con Sg-ILK y desafiado con 10^4 ufc de *S. gallinarum* 33.8 % (20/59) en contraste con el grupo de NILK desafiado con la misma dosis 74.5% (44/59), obteniéndose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.01$) entre estos dos grupos. Sin embargo las aves desafiadas con 10^6

ufc de *S. gallinarum* y tratadas con Sg-ILK y NILK no hubo diferencias significativas entre grupos. El grupo testigo negativo solo registró 2 aves muertas (Cuadro 3).

Ganancia de peso corporal

Se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre la ganancia de peso corporal promedio a los 10 días de edad únicamente en los grupos desafiados con 10^4 ufc de *S. gallinarum* que fueron: grupo tratado con Sg-ILK 108.62 g y el grupo con NILK 86.36 g. Sin embargo la ganancia de peso de aves tratadas con Se-ILK fue significativamente menor que el grupo testigo negativo 128.01 g (Cuadro 4).

Invasión de órganos por *S. gallinarum*

Al estudio bacteriológico del hígado en aves muertas durante el experimento, fueron positivas a 10^4 y 10^6 ufc de *S. gallinarum* en el grupo tratado con Sg-ILK 4/20 aves (20 %) y 21/41 (51.2 %) respectivamente, en contraste con el grupo que recibió NILK 36/44 aves (81.8 %) y 40/48 aves (83.3 %) desafiadas con 10^4 y 10^6 ufc con dicha bacteria, obteniéndose entre grupos de misma dosis diferencias estadísticas significativas ($P < 0.01$). Las dos aves que murieron en el grupo testigo negativo, resultaron negativas al aislamiento de *S. gallinarum* (Figura 3).

Al cultivo de órganos colectados de aves sobrevivientes a los 10 días resultaron positivas a 10^4 de *S. gallinarum* en el grupo inyectado con Sg-ILK 5/39 aves (12.8 %) en bazo e hígado a diferencia del grupo que recibió NILK se aisló *S. gallinarum* de bazo e hígado en 5/15 (33.3 %) y en tonsilas cecales 8/15 (53.3 %), obteniéndose diferencias estadísticas en órganos ($P < 0.05$) y tonsilas cecales ($P < 0.01$) entre ambos grupos. En aves desafiadas con 10^6 de *S. gallinarum*, se encontró en el grupo con NILK 72.72 % (8/11) positivos al

cultivo de tonsilas cecales en contraste con el grupo de Sg-ILK 36.6 % (7/19) cultivos positivos a *S. gallinarum*, presentándose diferencias estadísticas ($P < 0.05$) (Figura 4).

Comparación entre los tratamientos Sg-ILK y Se-ILK

Se observó una reducción significativa en la mortalidad del tratamiento Se-ILK con dosis 10^4 de *S. gallinarum* en comparación con el tratamiento Sg-ILK con misma dosis. En cuanto a la invasión de órganos por *Salmonella* tanto en aves muertas como en sobrevivientes se encontró un descenso significativo en el número de cultivos positivos a dicha bacteria en el tratamiento Se-ILK dosis 10^6 a diferencia del tratamiento Sg-ILK con similar dosis (Cuadro 5).

Experimento 2: Efecto in ovo de Sg-ILK en pollos de engorda desafiados al día de edad

El cuadro 6 muestra el efecto *in ovo* de la administración de Sg-ILK en huevos fértiles. En las 2 replicas no se observó diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de nacimientos, tanto los tratados con Sg-ILK como los NILK comparado con el grupo testigo negativo. El porcentaje promedio de nacimientos fue en la réplica 1 y 2 de 97 y 93 % respectivamente.

En el cuadro 6 también se observa el promedio del peso corporal al nacimiento. En la réplica 1, el peso corporal fue mayor 2.45 g en huevos tratados con Sg-ILK que los tratados con NILK, y 0.11 g menor que el grupo con NILK. El aumento en el peso corporal fue estadísticamente significativo en la réplica 1 pero no en la 2 ($P < .05$).

Mortalidad

Los huevos fértiles tratados con NILK y desafiados al día de edad con *S. gallinarum* murieron a partir del día 2 posinoculación (p.i.), los inyectados con

Sg-ILK a partir del día 5 p.i. Se observó una reducción significativa en mortalidad los días 3, 4, 5, ($P < 0.01$) y 6 p.i. ($P < 0.05$) entre estos grupos tratados. El porcentaje promedio de mortalidad en los grupos tratados de ambas réplicas fue del 86 % no se observaron diferencias estadísticas significativas. El pico de mortalidad se presentó los días 6 y 7. En el grupo testigo negativo no se observó mortalidad (Cuadro 7).

Ganancia de peso corporal

A los 10 días posinoculación se encontró en aves de la réplica 1 un aumento significativo en la ganancia de peso en huevos fértiles que recibieron Sg-ILK ($P < 0.05$) y desafiados al nacimiento con *S. gallinarum* a diferencia de los huevos tratados con NILK. En la réplica 2 no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo la ganancia de peso en los grupos tratados de ambas réplicas fueron significativamente menor que el grupo testigo negativo. Los resultados se resumen en el cuadro 10.

Invasión de órganos por S. gallinarum

En el cuadro 8, se observa el efecto *in ovo* del Sg-ILK a 10 días p.i. de *S. gallinarum* al estudio bacteriológico del hígado de aves muertas.

Los resultados totales del cultivo primario del hígado durante el experimento, fueron en la réplica 1 positivas a *Salmonella* 28/33 (84.8 %) aves de huevos tratados con Sg-ILK y 26/29 (89.6 %) aves de huevos tratados con NILK, en la réplica 2 se obtuvo 30/31 (96.7 %) y 29/31 (93.5 %) cultivos positivos a dicha bacteria del grupo tratado con Sg-ILK y NILK respectivamente. No hubo diferencias estadísticas entre ambos grupos.

En el cuadro 9, se observan los resultados de la administración *in ovo* del Sg-ILK al cultivo de bazo e hígado y tonsilas cecales en aves sobrevivientes a 10 días posdesafo.

En la bacteriología de dichos órganos colectados, resultó en la réplica 1 positivos a *Salmonella* en el grupo tratado con NILK el 86 % (6/7) en bazo e hígado y 71 % (5/7) en tonsilas cecales a diferencia del grupo que recibió Sg-ILK

del cual no se aisló dicha bacteria de órganos y tonsilas cecales de 3 cultivos.

En las aves de la réplica 2, se encontró en el grupo con NILK 60 % (3/5) en órganos positivos a *Salmonella* y tonsilas cecales un 80 % (4/5); del grupo tratado con Sg-ILK se aisló *Salmonella* de bazo e hígado en 40 % (2/5) y en tonsilas cecales no se obtuvo *Salmonella* de 5 cultivos.

DISCUSIÓN

Efecto de Se-ILK o Sg-ILK en pollos de engorda desafiados con *S.gallinarum*

El porcentaje de mortalidad causado por la Tifoidea Aviar dependerá de la edad y en gran parte de la virulencia de la cepa de *S. gallinarum* presente en la granja (9,70). Bajo condiciones experimentales, se ha observado mortalidad del 100 % en pollos de 1 a 11 días de edad desafiados con *S. gallinarum* (28). En forma similar durante los 10 días del presente período experimental, la cepa de campo *S. gallinarum* fue altamente virulenta en pollos inyectados con NILK causando un aumento significativo en la mortalidad, incrementada conforme fue mayor la dosis administrada. El pico de mortalidad ocurrió entre los 5 y 7 días posdesafío similar a reportes previos (14,70).

Los signos clínicos de Tifoidea Aviar observados durante los estudios realizados incluyen depresión, inapetencia, amontonamiento, deshidratación, anorexia, emaciación, diarrea y debilidad los cuales son similares a los reportados previamente (67,70). El hígado ha sido identificado como el sitio común de lesiones en pollos seguido por el riñón, bazo e intestino (70). En el presente estudio se observó en bazo e hígado congestión, aumento de tamaño y focos necróticos; nefromegalia, tiflitis hemorrágica, hemorragias petequiales y engrosamiento de ureteres, presencia de material caseoso cubriendo la retina.

Al igual que en previos estudios, los cuales demostraron la eficacia de Se-ILK contra la infección por *S. enteritidis* en pollos al día de edad, en el presente trabajo se observó que el sobrenadante obtenido de linfocitos T a partir de aves inmunizadas ya sea con *S. enteritidis* o *S. gallinarum* y activados con concanavalina A, son capaces de reducir significativamente la mortalidad e invasión en los órganos de una infección causada por una cepa patógena de *S. gallinarum* en pollos de engorda.

Por otra parte, se observó que las NILK no presentaron efecto alguno en aves desafiadas con ambas dosis de *S. gallinarum*.

Se encontró que linfocinas producidas por linfocitos T de aves inmunizadas con *S. enteritidis* causante de paratifoidea en aves, confiere protección ante un desafío con *S. gallinarum* en pollos jóvenes. La paratifoidea, se asocia frecuentemente con enfermedad en humanos y en muchas especies animales, rara vez causa mortalidad alta o lesiones agudas en aves, presenta antígenos somáticos 1, 9, y 12, antígenos flagelares g, m (26,33); en contraste con *S. gallinarum* el cual es un serovar fuertemente adaptado a las aves, presenta únicamente antígenos somáticos 1, 9, y 12 (70).

Los resultados obtenidos demuestran que las Se-ILK pueden inducir una protección cruzada entre especies de *Salmonella* a pesar de las diferencias antigénicas, esto es consistente con estudios ya reportados (72) donde observaron en pollos tratados con Se-ILK una reducción en la diseminación de *S. typhimurium* a órganos internos (bazo e hígado). Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de resistencia del hospedador a *Salmonella* en aves puede ser menos dependiente de una respuesta específica hacia el antígeno, pero más eficaz al iniciar una temprana respuesta innata del hospedador durante la infección. Así, se ha reportado la potencialización de la respuesta inflamatoria del hospedador por las Se-ILK, esto asociado con la protección contra la infección por paratifoidea en aves (85).

El efecto profiláctico inducido tanto por las Se-ILK en ambos desafíos (10^4 y 10^6 ufc de *S. gallinarum*) como por las Sg-ILK (con desafío 10^4 ufc de *S. gallinarum*) parece ser de un lapso largo de días, observado en la disminución de mortalidad, reducción en la diseminación bacteriana en órganos internos y ganancia de peso corporal durante los 10 días del período experimental. En previos estudios encontraron que pollos desafiados 6 días después del tratamiento con las Se-ILK fueron protegidos contra la invasión de órganos por *S. enteritidis* (53,85). Esto es importante a considerar ya que los pollos jóvenes son altamente susceptibles a la infección por *Salmonella* durante los primeros 4

días postnacimiento, días después comienza a incrementarse la resistencia a la enfermedad (93). Por lo tanto durante estos primeros cuatro días en los cuales el mecanismo de defensa innata debe funcionar para prevenir que *Salmonella* se multiplique a un número capaz de sobrepasar alguna respuesta generada (88).

Con respecto a la dosis empleada de *S. gallinarum* para los desafíos, se ha reportado que al empleo de una dosis letal 100 % (10^8 ufc de *S. gallinarum*) en pollos al día de edad previo tratamiento con Se-ILK mostró reducción tanto en la mortalidad como en la diseminación de la bacteria en órganos durante los primeros 5 días posinoculación, sin embargo días posteriores no presentó protección alguna (89). Por consiguiente las dosis para el desafío (10^4 y 10^6 ufc) de *S. gallinarum* utilizadas en la presente investigación permiten una mejor evaluación de las Se-ILK y las Sg-ILK, el re-aislamiento del organismo inoculado a partir de órganos internos tanto de aves muertas como de sobrevivientes, indicando que ocurrió una infección activa.

Una importante ventaja de las lincocinas como inmunorreguladores de la respuesta inflamatoria del hospedador por encima del tratamiento con vacunas es la rápida respuesta protectora mostrada en un período de 24 horas (85) y un aumento de leucocitos polimorfonucleares en sangre periférica 4 horas después (42,53), inducido por Se-ILK en ambos casos. A pesar de la eficacia de una vacuna, se requiere de 7 a 10 días para la estimulación de la respuesta inmune adquirida e inducir protección (36,63). Por otra parte el uso de antibióticos en forma preventiva o en tratamiento contra infecciones por *Salmonella* presenta varias desventajas, como: incremento de la susceptibilidad del hospedador, incremento en la virulencia y resistencia del microorganismo (38).

Varios investigadores han reportado que la aplicación profiláctica de citocinas tales como TNF- α (60), G-CSF (78) e IL-1 (20,58) previenen el

desarrollo de infección por bacterias intracelulares, reduciendo la carga bacteriana en órganos y con ello protección contra la mortalidad. En el presente estudio es interesante marcar la aparente asociación en la dramática reducción en la invasión de órganos como mortalidad por *S. gallinarum* en pollos tratados con Se-ILK o Sg-ILK (dosis baja) cuando se comparo con el tratamiento de NILK, según queda en evidencia, del total de pollos tratados con Se-ILK desafiados con 10^4 y 10^6 ufc de *S. gallinarum*, sólo 3 (2.2%) y 7 (22.7%) aves respectivamente se les detectó *S. gallinarum* en órganos internos (Figura 2). De igual importancia fue el hecho que ninguno de los pollos del grupo Se-ILK + 10^4 *S. gallinarum* muertos durante el experimento fue encontrado positivo a dicha bacteria al cultivo de hígado de la mortalidad (Figura 1) y solo 2 aves del grupo Se-ILK + 10^6 *S. gallinarum*. A diferencia del tratamiento de pollos con NILK desafiados con ambas dosis presentaron 44 muertos de un total de 59 y 48 muertos de 59, de los cuales el 81.8 y 83.3% respectivamente fueron positivos a *Salmonella*. Aún en aves sobrevivientes se encontró el 33 y 81.8% de órganos internos positivos a dicha bacteria (Figura 2). Estos resultados implican que la protección mediada por las Se-ILK o Sg-ILK (dosis baja) previene la invasión bacteriana más allá de intestino o inhibe la multiplicación bacteriana en órganos extraintestinales. Adicionalmente la diferencia significativa encontrada al cultivo de tonsilas cecales entre grupos tratados y desafiados con la misma dosis, sugiere un efecto bactericida a nivel intestinal.

En lo referente al tratamiento con las Sg-ILK desafío 10^4 ufc de *S. gallinarum* únicamente 20 de 59 murieron en contraste del tratamiento con NILK de 59 murieron 44 (Cuadro 1), de igual forma es marcada la diferencia entre estos grupos de aves sobrevivientes al aislamiento de *Salmonella* a partir de órganos internos (12.8 % en Sg-ILK y 84.2% NILK) observado en la figura 4.

Sin embargo, al desafío con una dosis mayor 10^6 ufc de *Salmonella* no se observaron diferencias significativas en mortalidad e invasión a órganos

comparado con el grupo tratado NILK (Cuadro 2, Figura 4), únicamente hubo diferencias significativas entre estos dos grupos al cultivo de tonsilas cecales. Probablemente la dosis mayor de *Salmonella* en aves tratadas con Sg-ILK saturó alguna respuesta generada por las linfocinas, protegiendo a nivel intestinal disminuyendo la carga bacteriana, pero no fue suficiente diseminándose a órganos internos.

En un reporte previo se detectó la presencia de IL-2 en Se-ILK e INF- δ , en Se-ILK y Sg-ILK (30). Motivo por el cual probablemente fue mejor el efecto protector de Se-ILK comparado con Sg-ILK. Se ha reportado que IL-2 e INF- δ actúan sinérgicamente incrementando la actividad celular (74), incluso se ha observado un efecto cooperativo a la inyección de TNF- α e INF- δ incrementando la actividad bactericida contra *Salmonella in vivo* y con ello el rango de sobrevivencia en ratones (60).

El presente estudio es el primero en el cual se reporta que al tratamiento con Sg-ILK o Se-ILK un incremento del desarrollo corporal (ganancia de peso) seguido de un desafío con *Salmonella*, según se muestra mediante un incremento significativo en la ganancia de peso ($P < .05$) en pollos inyectados con Se-ILK o Sg-ILK (dosis menor) en comparación con la inyección de las NILK (Cuadro 2 y 4). Además, no se observó ningún signo de TA en aves tratadas con linfocinas durante el período experimental.

Los resultados del primer experimento sugieren que el sobrenadante obtenido de linfocitos T a partir de aves inmunizadas ya sea con *S. enteritidis* o *S. gallinarum* y activados con concanavalina A, son capaces de reducir significativamente la mortalidad e invasión en los órganos de una infección causada por una cepa patógena de *S. gallinarum* en pollos de engorda. Además, estos resultados proveen de nueva información con respecto a la longevidad en la respuesta protectora, incremento en la resistencia contra un

serotipo de *Salmonella* antigénicamente diferente e incremento en el desarrollo corporal de las aves.

Efecto in ovo de Sg-ILK en pollos de engorda desafiados al día de edad

Un estudio previo reportó que la administración de linfocinas provenientes de aves inmunizadas con *S. enteritidis* (Se-ILK) en embrión de pollo no altera el porcentaje de nacimientos (54). En el presente experimento al evaluar el efecto *in ovo* de la administración de Sg-ILK en huevos fértiles al día 18 de incubación, no se vio afectado el número de pollos nacidos tanto del grupo inyectado con Sg-ILK como el grupo de NILK comparados con los embriones no tratados (testigo negativo). El porcentaje promedio de nacimientos en ambas réplicas fluctuó entre el 93 y 97 % (Cuadro 6). Estos resultados son similares a los reportados por Mcgruder *et al.* (1995a) quienes obtuvieron un 92 % en nacimientos (54).

Por otra parte se observó en la réplica 1, que el peso corporal al nacimiento de los pollos inyectados *in ovo* con SG-ILK fue 2.45 y 2.32 g mayor que los grupos inyectados con NILK y el testigo negativo respectivamente, a diferencia de la réplica 2 en la cual el peso mayor fue en pollos con NILK. Únicamente el aumento fue significativo en la primer réplica. En general el peso promedio de los grupos experimentales se encontró por arriba de 41g, siendo un excelente peso en pollos de engorda al día de edad según reportes previos (55). Con base los resultados obtenidos se puede decir que la técnica de inmunización empleada aquí, como la inyección *in ovo* de linfocinas a partir de aves sensibilizadas con *S. gallinarum* no incrementan la mortalidad, ni afectan la etapa final del desarrollo embrionario.

Es importante a considerar el tiempo de protección obtenido a la inyección de citocinas en el cual se incrementa la resistencia en animales ante

infecciones bacterianas. Morrissey y Charrier (1991) y Ozaki *et al.* (1987) reportaron que IL-1 incrementa la resistencia bacteriana durante 7 días, máximo 10 posteriormente aumenta el número de bacterias aisladas de órganos, en forma similar el porcentaje de mortalidad aumento alrededor de los 7-10 días posdesafío (58,66). En el presente estudio la mortalidad inicio en los grupos inyectados con NILK el día 2 p.i. en contraste con el grupo inyectado con Sg-ILK comenzando al 5° día p.i., día en el cual ya llevaban 7 días de ser aplicadas las linfocinas, al final del estudio se observó una diferencia del 10% en mortalidad entre los grupos tratados de la primer réplica y ninguna diferencia entre estos en la segunda réplica (Cuadro 7). Al cultivo de la mortandad se aisló *Salmonella* en ambos tratamientos (Cuadro 8).

Es posible que la aplicación de Sg-ILK a día 18 de vida embrionaria protegió durante los primeros 5 días posdesafío, disminuyendo su efecto bactericida los siguientes días, incrementando la carga bacteriana.

Por otra parte la dosis administrada de Sg-ILK *in ovo* (0.1 ml) fue menor a la aplicada en pollos al día de edad (0.5 ml), por lo cual es posible un efecto protector menor en los pollos ante una cepa virulenta de *Salmonella*. Esta observación es similar a lo reportado por Kong (1986) quien determino que el efecto protector inducido por IL-2 *in vivo* es dependiente de la dosis administrada, obtuvo un mayor porcentaje de ratones sobrevivientes con alta dosis de dicha linfocina (45).

Se ha observado previamente que pollos tratados *in ovo* con Se-ILK son protegidos contra la invasión de órganos por *S. enteritidis* en un período de 24 horas (48). El estudio presentado aquí, al evaluar el efecto *in ovo* de Sg-ILK en la diseminación a órganos por *S. gallinarum* a 10 días posdesafío, en la réplica 1 se observa que Sg-ILK causo una reducción significativa a la invasión en bazo e hígado (85.7%) y tonsilas cecales (71.4%) por *Salmonella* comparado

con NILK. En la réplica 2, únicamente en tonsilas cecales (80%) hubo diferencia significativa entre los grupos tratados (Cuadro 9).

A pesar de que sólo sobrevivieron 8 aves tratadas con Sg-ILK sólo en dos aves se logró aislar *Salmonella*, además no se observaron signos clínicos en estas aves.

En lo referente a la ganancia de peso corporal, los grupos inyectados con Sg-ILK obtuvieron un mayor peso corporal comparado con NILK, sólo se observó diferencia significativa entre estos grupos en la réplica 1, pero los grupos tratados con Sg-ILK y NILK fueron significativamente menores que el grupo testigo negativo (Cuadro 10).

Los resultados observados en el presente estudio indican que la administración *in ovo* de linfocinas provenientes de aves inmunizadas con *S. gallinarum* no alteran el porcentaje de nacimientos, otorgan un efecto protector durante los primeros 5 días posdesafío en mortalidad e invasión en órganos de aves muertas. El porcentaje alto de mortalidad observado al día 10 posdesafío pudo deberse: i) menor cantidad de sobrenadante administrado con linfocinas, ii) período del efecto protector (alrededor de 7 días), iii) Cepa de *S. gallinarum* altamente virulenta para la inmunización de las gallinas.

Una importante observación a discutir en ambos experimentos presentados aquí, es la efectividad entre Sg-ILK o Se-ILK administrada en pollos al día de edad y Sg-ILK aplicada en huevos fértiles a 18 días de incubación contra la infección por *S. gallinarum*. Los resultados indican una mayor protección conferida por Se-ILK, probablemente cuando se hiperinmunizan las gallinas con *S. gallinarum* el sistema inmune de las aves genera más esfuerzo, pelea contra la primera infección, trata de eliminar la *S. gallinarum* antes de que mate al hospedador, así las citocinas de linfocitos T obtenidas de estas aves son menos protectoras debido a la menor cantidad de linfocinas presentes en el sobrenadante de Sg-ILK que en Se-ILK (Cuadro 5).

CONCLUSIONES

El sobrenadante obtenido a partir de linfocitos T de aves inmunizadas ya sea con *S. enteritidis* o *S. gallinarum* disminuye la invasión a órganos y mortalidad causada por la infección de *S. gallinarum* evaluado a los 10 días del período experimental.

Con la aplicación de Se-ILK o Sg-ILK se obtiene protección alrededor de 7 días después de su aplicación, incremento en la resistencia contra un serotipo de *Salmonella* antigénicamente diferente e incremento en el desarrollo corporal de las aves.

Se otorga mayor protección en aves empleando linfocinas de aves hiperinmunizadas con *S. enteritidis* ante la infección por *S. gallinarum*, ya que es menos virulenta y permite obtener mayor cantidad de linfocinas en el sobrenadante.

La inyección *in ovo* con Sg-ILK no afecta el término del desarrollo embrionario, ni el número de pollos nacidos, presenta un efecto protector en mortalidad e invasión de órganos durante 5 días posdesafío con 10^5 ufc de *S. gallinarum*. El porcentaje alto de mortalidad observado a los 10 días del período experimental, así como el aislamiento de *Salmonella* a partir de esta durante el experimento podría deberse a 3 circunstancias: a) Aplicación de una menor cantidad de sobrenadante y menor concentración de linfocinas en dicho sobrenadante de Sg-ILK, b) tiempo de protección 7 días después de aplicadas, c) Cepa de *S. gallinarum* altamente virulenta en la inmunización de las gallinas.

Se sugiere repetir el experimento *in ovo* hiperimmunizando las gallinas con dosis más bajas de *S. gallinarum* y concentrar las linfocinas obtenidas de estas aves.

LITERATURA CITADA

1. Adams, L.B., Hibbs, J.B., Tailor, R.R., and Krahenbuhl, L.: Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J. of Immun.*, 144:2725-2729 (1990).
2. Ahmad, J. and Sharman J.M.: Evaluation of a modified-live virus vaccine administered *in ovo* to protect chickens against Newcastle disease. *Am. J. Vet Res.*, 53:999-204 (1992).
3. Ahmad, J. and Sharman J.M.: Protection Against Hemorrhagic Enteritis and Newcastle Disease in Turkey by Embryos Vaccination with Monovalent and valent Vaccines. *Avian Dis.*, 37:485-491 (1993).
4. Alobaidi, T., Naccache, P.H., and Shaafi, R.I.: Calmodulin antagonist modulate rabbit neutrophil degranulation, aggregation and stimulated oxygen consumption. *Biochim. Acta.*, 675:316-320 (1981).
5. Allsep, T., Wiggins, M., and Birrenkott, G.: Normal Growth and white blood cell development in large white turkey embryos. *Poultry Sci.*, 69:2027-2034 (1990).
6. Andrews, W.H., Poelma P.L., Wilson C.R. and Romero, A.: Isolation and identification of *Salmonella*. In: *Bacteriological Analytical and Manual*, 5th ed. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, D.C. 1-29 1978.
7. Ashley, M.P., Neoh, S., Kollarski, P. and Hardy, D.: Local and systemic effects on the non-specific tumor resistance induced by attenuated *Salmonella enteritidis* 11RX in mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med.*, 54:157-168 (1976).

8. Assoku, R.K.G., and Penhale, W.I.: The pathogenesis of fowl typhoid: the influence of anaemia and erythrocyte clearance on the susceptibility of the fowl to bacterial endotoxin. *J. Comp. Pathol.*, 84:443-453 (1974) .
9. Barrow, P.A., Simpson, J.M., Lovell, M.A., and Binns, M.: Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in Fowl Typhoid. *Infect. Immun.*, 55:388-392 (1987).
10. Barrow, P.A.: *Salmonella* control-past, present and future. *Avian Path.* 22: 651-669, (1993).
11. Beachey, E.H.: Bacterial adherence. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacterial to mucosal surfaces. *J. of In. Dis.*, 143:325-345 (1981).
12. Bell, G. I.: Models for specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200:585-600 (1978).
13. Benjamini, E., and Leskowitz, S.: Immunology: A Short Course. 2nd. ed. *Wiley-Liss, Inc., New York, NY, 1991*
14. Bouzoubaa, K., Nagaraja, K.V., Newman, J.A., and Pomeroy, B.S.: Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of Fowl Typhoid infection in chickens. *Avian Dis.*, 31:699-704 (1987).

15. Brune, K., Leffell M.S., and Spitznagel, J.K.: Microbicidal activity of peroxidase less chicken heterophil leukocytes. *Infect. Immun.*, 5:283-297 (1972)
16. Campbell, P.A.: Immunocompetent cells in resistance to bacterial infections. *Bacteriol. Rev.*, 40:284-313 (1976).
17. Canning, P.C., and Roth, J.A.: Effects of *in vitro* and *in vivo* administration of recombinant bovine interferon- δ on bovine neutrophil responses to *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 20:119-133 (1989).
18. Colditz, I., Zwahlen, R., Dewald, B., and Baggiolini, M.: *In vivo* inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am. J. Pathol.*, 134:755-760 (1989)
19. Cooper, G.L., Nicholas, R.A. and Bracewell, C.D.: Serological and Bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*. *Vet. Rec.* 125: 567-572, (1989).
20. Czuprynski, C.J., Brown, J.F., Young, K.M., Cooley, A.J. and Kurtz, R.S.: Effects of murine recombinant interleukin 1 on the host response to bacterial infection. *J. of Immun.*, 140:962-968 (1988).
21. Cheney, C.P., Schad, P.A., Fomal, S.B. and Boedeker, E.: Species specificity of *in vitro* *E. coli* adherence to host intestinal cell membranes and its correlation with *in vivo* colonization and infectivity. *Infect. Immun.*, 28:1019-1027 (1980).

22. Chu, Y., and Dietert, R.: The chicken macrophage response to carbohydrate based irritants: temporal changes in peritoneal cell population. *Devel. Comp. Immunol.*, 12:109-118 (1988).
23. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. Veterinary Services, *Publication APHIS 91-40* U.S. Government Printing Office. August, 1989.
24. Ebel, E.D., Mason, J., Thomas, L.A., Ferris, K.E., Beckman, M.G., Cummins, D.R., Schroeder-Tucker, L., Sutherlin, W.D., Glasshoff, R.L. and Smithhisler, N.M.: Occurrence of *Salmonella enteritidis* in Unpasteurized Liquid Egg in the United States. *Avian Dis.* 37: 135-142, (1993).
25. Frenkel, J.K.: Adoptive immunity to intracellular infection, *J. Immun.*, 98:1309-1319 (1966).
26. Gast, R. K.: 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*". *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F.* 1994.
27. Gast, R.K. and Beard, C.W.: Detection of *Salmonella* Serogroup D-Specific Antibodies in the Yolks of Eggs Laid by Hens Infected with *Salmonella enteritidis*. *Poult. Sci.* 70: 1273-1276, (1991).

28. Godoy, O.: Patogenicidad de una cepa de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda mediante infección experimental. Tesis de Licenciatura. F.M.V.Z., U.N.A.M.
29. Gollapudi, S.S., Gupta, A., Thadepalli, H. and Pérez A.: Use of lymphokines in treatment of experimental intracellular abdominal abscess caused by *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.*, 56:2369-2372 (1988).
30. Gómez, V.G.G.: Identificación de linfocinas en sobrenadante de esplenocitos de pollo estimulados con concanavalina A. Tesis de Licenciatura. F.M.V.Z., U.N.A.M. 1995.
31. Goren, E.: Combinación de la aplicación de medicamentos y microflora intestinal como una herramienta en el tratamiento de las infecciones por *Salmonella enteritidis*. Memorias del curso de Actualización sobre Control y prevención de la infección por "*Salmonella enteritidis*". *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*, México, D.F. 1994.
32. Harrison, B.M.: Embryology of the chick and pig. 2nd ed. W.M.C. Brown, *Company publishers*. USA., 1975.
33. Heneidi, Z.A.: Reglamentación sanitaria para el control de la salmonelosis aviar en México. Memorias del curso de actualización sobre *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter* en las aves domésticas. *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*, México, D.F. 1994.

34. Hernández H.Y.: Campaña Nacional Contra la Salmonelosis Aviar en México. VII Congreso Sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L. México. 40-50 1987.
35. Hickman-Brenner, F.W., Stubbs, A.D. and Farmer III, J.J.: Phage Typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. *J. of Clin. Microb.* 29: 12, 2817-1823, (1991).
36. Hommaeche, C.E., Joysey, H.S., Ishar, M., y Stocker, B.A.D.: Immunity conferred by Aro-*Salmonella* live vaccines. *Microbial Pathogen.* 10:149-158 (1991).
37. Hsu, H.: Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. *Microbiol. Rev.*, 53:390-409 (1989).
38. Humphrey, T.J., Mead, G.C. y Rowe, B.: Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* 100: 175-184 (1988).
39. Jansen, E.M., and Jeurissen, S.H.M.: Ontogeny and function of two non-lymphoid cell population in the chicken embryos. *Immunobiology*, 182:472-481 (1991).
40. Kaspers, B., Schraner, I., and Löscher, V.: Distribution of immunoglobulins during embryogenesis in the chicken. *J. Vet. Med.*, 38:73-79 (1991).
41. Kogut, M.H., and Slajchert T.: T lymphocytes induce protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. *Immunol. Infect. Dis.*, 2:69-80 (1992).

- 42.Kogut, M.H., McGruder, E.D., Hargis, D.E., Corrier, and Deloach, J.R.: Dynamics of the avian inflammatory response to *Salmonella*-immune lymphokines. Changes in avian blood leukocyte populations. *Inflammation*, 18:373-388 (1994a)
- 43.Kogut, M.H., McGruder, E.D., Hargis, D.E., Corrier, and Deloach, J.R.: *In vivo* activation of heterophil function in chickens following injection with *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. *J. Leukocyte Biol.* (1994b) (en prensa)
- 44.Kogut, M.H., Tellez, I.G., McGruder, E.D., Hargis, D.E., Williams, J.D., Corrier, and Deloach, J.R.: Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. *Microbial Pathog.*, 16:141-151 (1994c).
- 45.Kong, C.T.: Prophylactic administration of interleukin-2 protects mice from lethal challenge with gram-negative bacteria. *Infect. Immunol.*, 55:668-673 (1987).
- 46.Kramer, T.T., and Cho, H.C.: Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hens egg. *Immunology*. 19:157-167 (1970).
- 47.Larsen, C.G., Anderson, A.O., Appella, J.J.Oppenheim, and Matsushima, K.: The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *science*, 242:1464-1466 (1989).

48. Lewis, R.H., Hebrank, J.H., Lukoszek, R.W., Thaxton, J.P., and Gildersleeve, R.P.: Development of an egg injection, vaccination and transfer machine for use in commercial hatcheries. *J. Appl. Poult. Res.*, 2:337-346 (1993).
49. Log, E.O.: Intracellular traffic and antigen processing. *Imm. today*, 10:233-239 (1989).
50. Lucio, E.D., y Baez, F.M.: Situación epidemiológica de las principales enfermedades de las aves en México. XVIII *Convención Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*, Cancun, Quintana Roo, México, 362-385 1993.
51. Luginbue, R.C., and Schlotzhaver, S.D.: SAS/STAT guide for personal computers 6th ed., *SAS Institute*, Cary, N.C. 555-573, 1987.
52. Lynn, W.A., Raetz, C.R.H., Qureshi, M.A., and Golenbock, D.T.: Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils: Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J. Immunol.*, 147:3272-3079 (1991).
53. McGruder, E.D., Kogut, M.H., Corrier, D.E., Deloach, J.R. and Hargis, B.M.: Comparison of prophylactic and therapeutic efficacy of *Salmonella enteritidis* organ invasion in neonatal leghorn chicks. *Avian Dis.*, 39:21-27 (1995a).

54. McGruder, E.D., Ramirez, G.A., Kogut, M.H., Moore, R.W., Corrier, D.E., Deloach, J. R. and Hargis, B.M.: *In ovo* administration of *Salmonella enteritidis* Immune lymphokines confers protection to neonatal chicks against *Salmonella enteritidis* organ infectivity. *Poultry Sci.*, 74:18-25 (1995b).
55. McGruder, E.D., Ray, P.M., Tellez, G.I., Kogut, M.H., Corrier, D.E., Deloach, J.R. and Hargis, B.M.: *Salmonella enteritidis* Immune leukocyte stimulated soluble. Factor: Effects on increased resistance to *Salmonella* organ invasion in day-old Leghorn chicks. *Poultry Sci.*, 72:2264-2271 (1993).
56. Mock, R.E., Morgan, D.O., Jochim, M.M., and Lock, T.T.: Antibody responses of the fetus and adult equine to Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEE-TV-84), immunoglobulins Ga & b, m, and t. In: *Equine Infections Diseases IV* J.T. Bryans and H. Gerber, ed. Veterinary Publishers, Princeton, N.J. 1978.
57. Morishita, Y., Fuller, R., and Coates, M.E.: Influence of dietary lactose on the gut flora of chicks. *Poultry Sci.*, 23:349-359 (1982).
58. Morrissey, P., y Charrier, K.: Interleukin-1 administration to C3H / HeJ mice after but not prior to infection increases resistance to *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 59:4729-4731 (1991).
59. Mosqueda, A.T.: Medidas sanitarias para prevenir la tifoidea aviar. VII *Congreso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar*. Monterrey, N.L., México, 22-32 1987.

60. Nakano, Y., Onozuka, K., Terada, Y., Shinomiya, H., y Nakano, M.: Protective effect of recombinant tumor necrosis factor- α in murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 144:1935-1941 (1990).
61. North, M.O., and Bell, D.D.: Manual de producción avícola. tercera edición. *Editorial Manual Moderno*, México D.F., 1993.
62. North, R.J.: The concept of the activated macrophage. *J. Immun.*, 121:806-809 (1978).
63. Opitz, H.M.: Efectividad de las vacunas contra *Salmonella enteritidis*. Memorias del Curso de actualización sobre el control y prevención de la infección por "*Salmonella enteritidis*". *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*, México, D.F. 1994.
64. Opitz, H.M.: Medidas esenciales para un programa efectivo de reducción de riesgo contra *Salmonella enteritidis* en granjas ponedoras. Memorias del curso de Actualización sobre Control y prevención de la infección por "*Salmonella enteritidis*". *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*, México, D.F. 1994.
65. Oppenheim J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N., and Matsushima, K.: Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617-648 (1991).
66. Ozaki, Y., Ohashi, T., Minami, A., and Nakamura, S.: Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 α . *Infect. Immun.* 55:1436-1440 (1987).

67. Padrón, N.M.: Control y prevención de la tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. II Jornada Médico Avícola. México, D.F., 1991., *Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. México*, 128-149 (1991).
68. Padrón, N.M.: Generalidades sobre pulorosis y tifoidea aviar. VII Congreso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, 13-21 1987.
69. Palma, C., Cassone, A., Serbousek, D., Pearson, C.A., and Djeu, J.Y.: Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: Relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect. Immunol.*, 60:4604-4611 (1992).
70. Pomeroy B.S., and Nagaraja, K.V.: Fowl typhoid. In: Diseases of Poultry. Edited by Calnek, B.W., Barnes, H.J., Eard, C.W., Raid, W.M., and Yoder, H.W. 9th Ed. *Iowa State University Press* Ames, Iowa, USA., 87-98 1991.
71. Prince, W. R.: The in vitro inhibition of *Salmonella gallinarum* by pancreatic intestinal extracts from chickens exposed to fowl typhoid. *Poull. Sci.*, 50:1069-1071 (1971).
72. Ray, P.M., McGruder, E., Kogut, M.H., and Hargis, B.M. The specificity of *Salmonella enteritidis* (SE) immune-lymphokine and its protection against other *Salmonella* serovars in day-old Leghorn chicks. *J. of Immun.* 150:315.1993.

73. Roberts, E., Severens, J.M., and Card, L.E.: Nature of the hereditary factors for resistance to pullorum disease in the domestic fowl. *Proc. Seventh World's Poult. Congr., Waverly Press, Baltimore, MD., 1939.*
74. Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D.: Immunology. third edition. *Editorial Mosby., E.E.U.U., 1993.*
75. Romanoff, A. L.: The avian embryos. Structural and functional development. *Macmillan, New York. 1960.*
76. Romanoff, A.L.: Pathogenesis of the avian embryo. First edition. *Wiley-Interscience., USA., 1972.*
77. Senne, D.A.: Virus propagation in embryonating egg. *Macmillan, New York. 1984.*
78. Serushago, B.A., Yoshikai, Y., Handa, M., Mitsuyama. M., Muramori, K., y Nomoto, K.: Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine resistance against *Listeria monocytogenensis*. *Immun. 75:475-480 (1992).*
79. Sharman, J.M. and Burmester, B.R.: Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with turkey herpes virus. *Avian Dis., 26:134-149 (1981).*

80. Sharman, J.M.: Embryo vaccination with infectious Bursa Disease Virus alone or in combination with Marek's Disease Vaccine. *Avian Dis.*, 29:1155-1169 (1985).
81. St. Louis, M.E., Morse, D.L., Potter, M.E., Demelfi, T.M., Guzewich, J.J., Tauxe, R.V. and Blake, B.A.: The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New Publications For the Control of Salmonellosis. *J. Am. Med. Assoc.* 259: 2103-2107, (1988).
82. Stabler J.G. McCormick T.W Powell K.C., and Kogut M.H.: Avian Heterophils and Monocytes: Phagocytic and Bactericidal Activities Against *Salmonella enteritidis*. *Yef. Microbiol.*, 38:293-305 (1994).
83. Street, N.E. and Mosmann, T.R.: Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.*, 5:171-177 (1991).
84. Sung, Y-1., Hotchkiss, H., Austic, R.E., and Dietert, R.: L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a viricotelic species. *J. of Leukocyte Bio.*, 50:49-56 (1991).
85. Tellez, I.G., Kogut, M.H., and Hargis, B.M.: Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn chicks. *Avian Dis.* 37:1062-1070 (1993).
86. Tood, C.D.: Poultry-associated foodborne disease-its occurrence, cost, sources and prevention. *J. Food Prot.*, 43:129-139 (1980).

87. Waltman, W.D., Horne, A.M., Pickle, C. and Johnson, D.C.: Prevalence of *Salmonella enteritidis* in spent hens. *Avian Diseases*, 36: 252 - 255 (1992).
88. Wayne, J.C., and North, R.J.: Early Pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.*, 60:5164-5171 (1992).
89. Wong, G.R.A.: Evaluación de linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* en la inmunoprofilaxis contra la infección de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda. Tesis de Licenciatura. F.M.V.Z., U.N.A.M. 1993.
90. Wright, C.D., Mulsch, A., Busse, R., and Oswald, H.: Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Bioch. and Bioph. Res. Com.*, 160:813-819 (1989).
91. Yamamoto, H., Watanabe, H., Salo, G., and Mikami, T.: Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Jap. J. Vet. Res.*, 23:131-140 (1975).
92. Zar, J.: Biostatistical analysis, 2nd ed. *Prentice-Hall Inc.*, Englewood Cliffs, N.J.. 384-351 1984.
93. Ziprin, R.L., Corrier, R.L. and Elissalde, M.H.: Maturation of resistance to salmonellosis in newly hatched chicks: Inhibition by cycloporine. *Poul. Sci.*, 68:1637-1642 (1989).

Cuadro 1. Efecto a la administración de Se-ILK en la mortalidad de pollos de engorda desafiados al día de edad con *S. gallinarum*.

Grupos experimentales	Mortalidad p.i. en días								#muertos/total (%) ¹
	3	4	5	6	7	8	9	10	
Testigo negativo	-	-	-	1	1	-	-	-	2/43 (4.6)
Se-ILK + Sg 10 ⁴	-	1	1	4	2	-	-	-	8/52 (15.3)**
NILK + Sg 10 ⁴	-	3	5	10	14	9	2	1	44/59 (74.5)
Se-ILK + Sg 10 ⁶	-	3	13	6	2	2	-	-	26/48 (54.1)*
NILK + Sg 10 ⁶	1	3	11	11	10	7	3	2	48/59 (81.3)

¹ Comparación entre los tratamientos Se-ILK y NILK desafiados con la misma dosis de *S. gallinarum*. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente entre los grupos de tratamiento; * (P<0.05), ** (P<0.01)

Se-ILK = "Se-immune lymphokines", linfocinas de aves hiperinmunizadas con *S. enteritidis*.

NILK = "No-immune lymphokines", linfocinas de aves no inmunizadas.

p.i. = posiroculación.

Cuadro 2. Efecto a la administración de Se-ILK en la ganancia de peso corporal de pollos de engorda desafiados con *S. gallinarum* al nacimiento.

Grupos experimentales	Dosis bacter	Promedio del peso inicial (g)	Promedio del peso al día 10 (g)	Promedio ¹ ganancia de peso (g)
Testigo negativo	-	42	170	128 ^a
Se-ILK	10 ⁴	40	124	102 ^b
NILK	10 ⁴	41	128	87 ^c
Se-ILK	10 ⁶	42	148	106 ^b
NILK	10 ⁶	42	115	73 ^{c,d}

¹ Medias de la columna con diferente literal son significativamente diferentes (P < 0.05). Evaluado mediante la prueba de Duncan.

ufc = Unidades formadoras de colonias

Cuadro 3. Efecto a la administración de Sg-ILK en la mortalidad de pollos de engorda desafiados al día de edad con *S. gallinarum*.

Grupos experimentales	Mortalidad p.i. en días								# muertos/total (%) ¹
	3	4	5	6	7	8	9	10	
Testigo negativo	-	-	-	1	1	-	-	-	2/43 (4.6)
Sg-ILK + Sg 10 ⁴	-	7	4	5	1	-	1	2	20/59 (33.8%) *
NILK + Sg 10 ⁴	-	3	5	10	14	9	2	1	44/59 (74.5)
Sg-ILK + Sg 10 ⁶	2	6	10	2	7	6	5	3	41/60 (68.3%)
NILK + Sg 10 ⁶	1	3	11	11	10	7	3	2	48/59 (81.3)

¹ Comparación entre los tratamientos Sg-ILK y NILK desafiados con la misma dosis de *S. gallinarum*. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente entre los grupos de tratamiento; * (P< 0.01)

Sg-ILK = "Sg-immune lymphokines", linfocinas de aves hiperinmunizadas con *S. gallinarum*.

NILK = "No-immune lymphokines", linfocinas de aves no inmunizadas.

p.i. = posinoculación.

Cuadro 4. Efecto a la administración de Sg-ILK en la ganancia de peso corporal de pollos de engorda desafiados con *S. gallinarum* al nacimiento.

Grupos experimentales	Dosis bacteriana (ufc)	Promedio del peso inicial (g)	Promedio del peso al día 10 (g)	Promedio ¹ ganancia de peso (g)
Testigo negativo	-	42	170	128 ^a
Sg-ILK	10 ⁴	42	150	108 ^b
NILK	10 ⁴	41	128	87 ^{cd}
Sg-ILK	10 ⁶	41	113	72 ^d
NILK	10 ⁶	42	115	73 ^d

¹ Medias de la columna con diferente literal son significativamente diferentes (P< .05). Evaluado mediante la prueba de Duncan.

ufc = Unidades formadoras de colonias

Cuadro 5. Comparación entre los tratamientos Se-ILK y Sg-ILK

Variable a 10 días p.l.	Se-ILK + Sg 10 ⁴	Sg-ILK + Sg 10 ⁴	Se-ILK + Sg 10 ⁵	Sg-ILK + Sg 10 ⁶				
Mortalidad	8/52 *	20/59	26/48	41/60				
Promedio en gancia de peso (g)	102	108	106	72				
Cultivo de ¹ mortandad (hígado)	0/8 (0)	4/20 (20)	2/28 (7.6) **	21/41(51.2)				
Cultivo de órganos ¹	B e H 1/44 (2.2)	Tc 3/44 (6.8)	B e H 5/39 (12.8)	Tc 0/39 (0)	B e H 5/22 (22.7)	Tc 0/22 (0)***	B e H 16/19 (84.2)	Tc 7/19 (36.8)

Comparación entre los tratamientos Se-ILK y Sg-ILK desafiados con dosis diferentes de *S. gallinarum*. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente entre tratamiento; (* P< .025), ** (P< 0.01), *** (P< 0.05)

¹ No. de cultivos positivos a *Salmonella* / total (%)
B e H = Bazo e Hígado, Tc = Tonsilas cecales

Cuadro 6. Efecto *in ovo* de la administración de Sg-ILK y NILK al día 18 de incubación en nacimientos y peso corporal al día de edad.

Réplicas	Grupos experimentales	Nacimientos ¹	Peso corporal ² (g)
1	Testigo negativo	44/45 (98)	42.58 ± 0.62 ^b
	Sg-ILK	44/45 (98)	44.90 ± 0.79 ^a
	NILK	43/45 (95)	42.45 ± 0.50 ^b
2	Testigo negativo	44/45 (98)	41.88 ± 0.64 ^a
	Sg-ILK	42/45 (93)	42.26 ± 1.83 ^a
	NILK	40/45 (89)	42.37 ± 0.79 ^a

^{a,b} Medias de la columna con diferente literal son significativamente diferentes, (P < 0.05)

¹ No. de pollos nacidos / No. de huevos inyectados (%).

² Media ± Desviación estándar.

Cuadro 7. Efecto *in ovo* del Sg-ILK y NILK en la mortalidad acumulada en pollos de engorda desafiados al nacimiento con *S. gallinarum*.

Días p.i.	Testigo negativo	Réplica 1 ¹		Réplica 2 ¹	
		Sg-ILK+Sg 10 ⁵	NILK+Sg10 ⁵	Sg-ILK+Sg10 ⁵	NILK+Sg10 ⁵
2	0/36 (0)	0/36 (0)	4/36 (11.1)	0/36 (0)	6/36 (16.6)
3	0/36 (0)	0/36 (0) *	11/36 (30.5)	0/36 (0) *	12/36 (33.3)
4	0/36 (0)	1/36 (2.7) *	13/36 (36.1)	0/36 (0) *	16/36 (44.4)
5	0/36 (0)	3/36 (8.3) *	16/36 (44.4)	3/36 (8.3) *	18/36 (50)
6	0/36 (0)	13/36 (36.1) **	22/36 (61.1)	13/36 (36.1)	21/36 (58.3)
7	0/36 (0)	25/36 (69.4)	26/36 (72.2)	23/38 (63.8)	26/36 (72.2)
8	0/36 (0)	30/36 (83.3)	29/36 (80.5)	30/36 (83.3)	28/36 (77.7)
9	0/36 (0)	32/36 (88.8)	29/36 (80.5)	31/36 (86.1)	30/36 (83.3)
10	0/36 (0)	33/36 (91.6)	29/36 (80.5)	31/36 (86.1)	31/36 (86.1)

¹ No. de pollos muertos / No. de pollos inyectados (%)

p.i. = posinoculación.

Comparación entre los tratamientos Sg-ILK y NILK. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente entre los grupos de tratamiento; * (P< 0.01),

** (P< 0.05).

Cuadro 8. Efecto *in ovo* de Sg-ILK y NILK al cultivo de hígado en la mortalidad infectada con *S. gallinarum* a 10 días del periodo experimental.

Réplicas	Grupos experimentales	Hígados ¹
1	Testigo negativo	-
	Sg-ILK + Sg 10 ⁵	28/33 (84.8)
	NILK + Sg 10 ⁵	26/29 (89.6)
2	Testigo negativo	-
	Sg-ILK + Sg 10 ⁵	30/31 (96.7)
	NILK + Sg 10 ⁵	29/31 (93.5)

¹ No. de cultivos positivos a *Salmonella* / total (%)

Cuadro 9. Efecto *in ovo* de Sg-ILK y NILK al cultivo de bazo e hígado y tonsilas cecales en aves sobrevivientes a 10 días posdesafío.

Réplicas	Grupos experimentales	No. de cultivos positivos a <i>Salmonella</i> / total (%)	
		Bazo e hígado	Tonsilas cecales
1	Testigo negativo	0/36 (0)	0/36 (0)
	Sg-ILK + Sg 10 ⁵	0/3 (0) *	0/3 (0)
	NILK + Sg 10 ⁵	6/7(85.7)	5/7 (71.4) **
2	Testigo negativo	0/36 (0)	0/36 (0)
	Sg-ILK + Sg 10 ⁵	2/5 (40.0)	0/5(0) ***
	NILK + Sg 10 ⁵	3/5 (60.0)	4/5 (80.0)

Comparación entre los tratamientos Se-ILK y NILK. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente entre los grupos de tratamiento; * (P< .025),

** (P< .05), *** (P< .01).

Cuadro 10. Efecto *in ovo* de Sg-ILK y NILK en la ganancia de peso corporal de pollos de engorda desafiados con *S. gallinarum* al nacimiento.

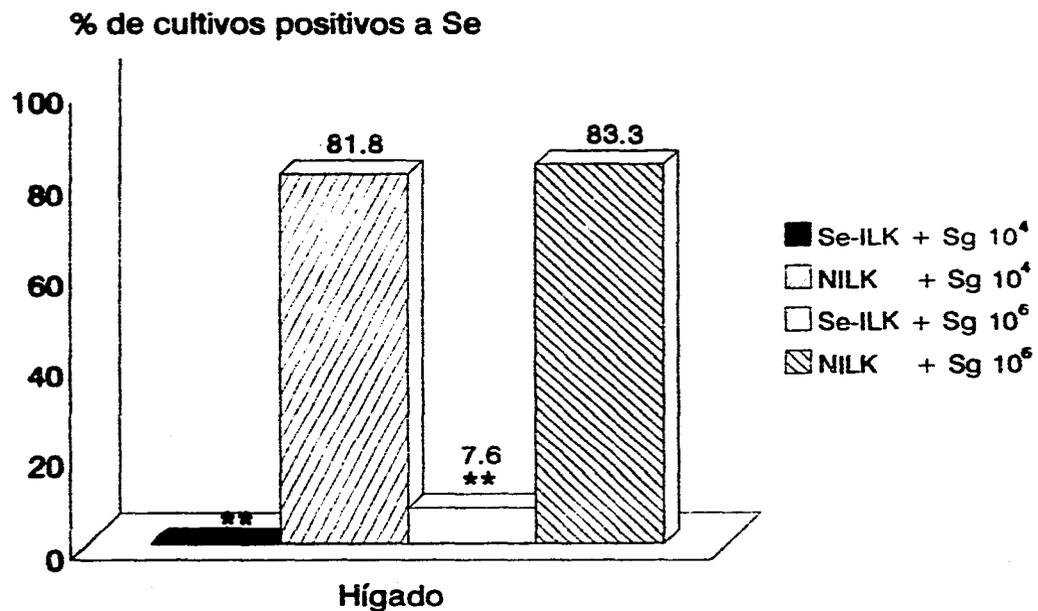
Réplicas	Grupos experimentales	Dosis bacteriana (ufc)	Promedio del peso inicial (g)	Promedio del peso al día 10 (g)	Promedio ¹ ganancia de peso (g)
1	Testigo neg.	-	43	172	129 ^a
	Sg-ILK	10 ⁵	45	145	100 ^b
	NILK	10 ⁴	42	123	81 ^{c,d}
2	Testigo neg.	-	42	173	131 ^a
	Sg-ILK	10 ⁵	42	110	68 ^d
	NILK	10 ⁵	42	112	70 ^d

^{a,b} Medias de la columna con diferente literal son significativamente diferentes (P < .05).

Evaluado mediante la prueba de Duncan.

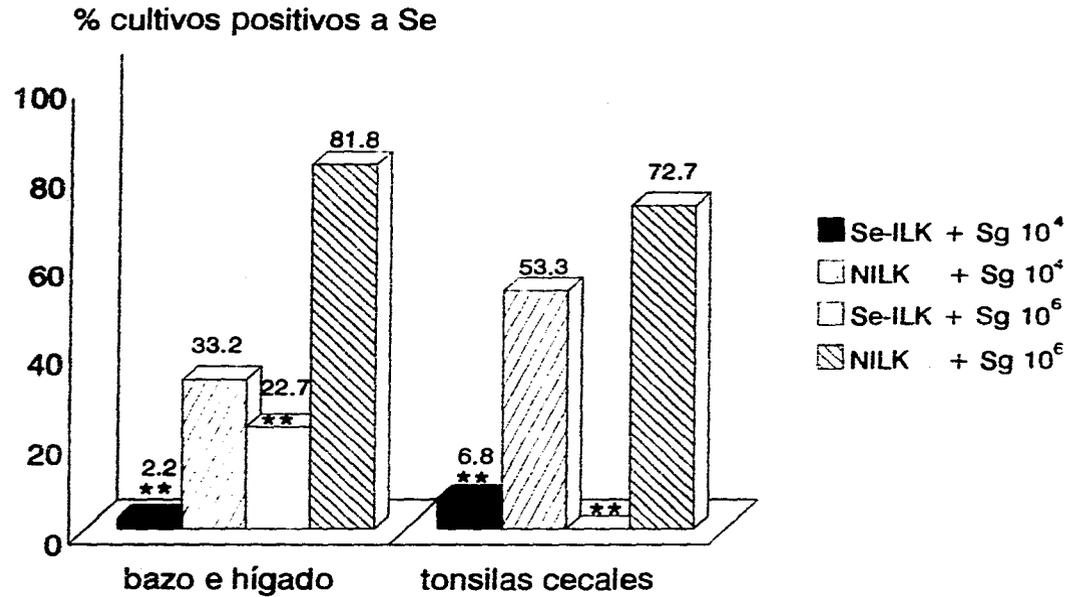
ufc = Unidades formadoras de colonias

Figura 1. Efecto del Se-ILK al cultivo de hígado en la mortalidad infectada con *S. gallinarum* a 10 días del periodo experimental



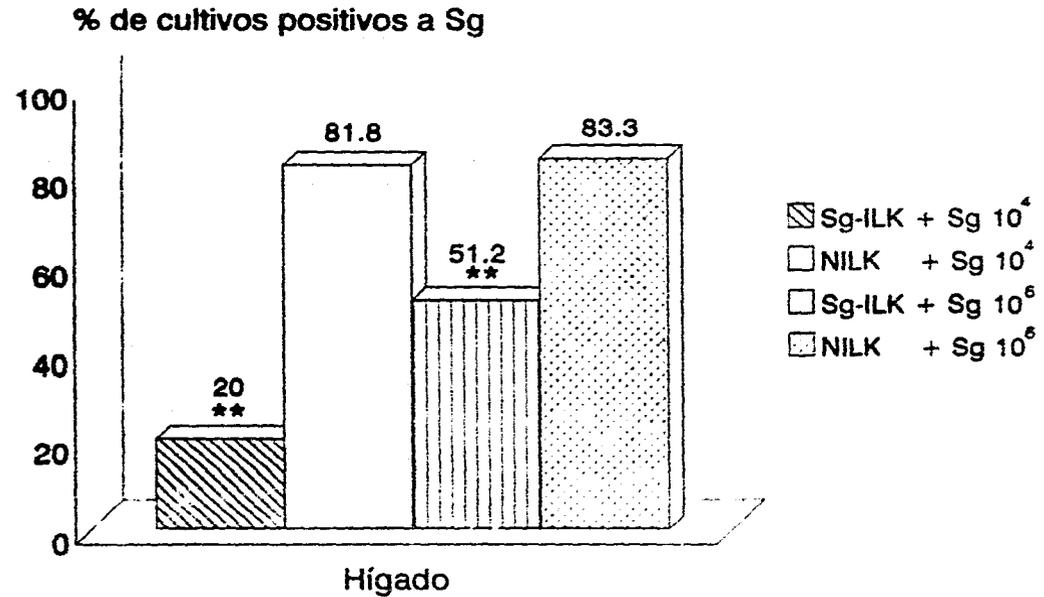
Diferencias significativas entre Se-ILK y NILK desafiados con la misma dosis de *S. gallinarum*, ** ($P < 0.01$)

Figura 2. Efecto del Se-ILK al cultivo de hígado, bazo y tonsilas cecales de pollos sobrevivientes a los 10 días del periodo experimental



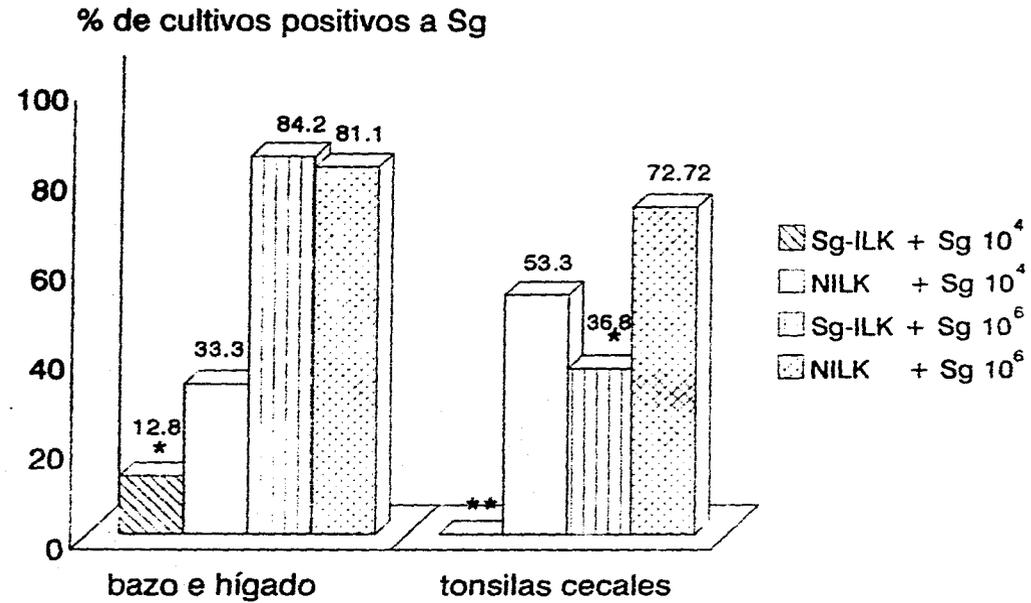
Diferencias significativas entre Se-ILK y NILK desafiados con la misma dosis de *S. gallinarum*, * (P < 0.05), ** (P < 0.01)

Figura 3. Efecto del Sg-ILK al cultivo de hígado de la mortalidad infectada con *S. gallinarum* a los 10 días del periodo experimental



Diferencias significativas entre Sg-ILK y NILK desafiados con la misma dosis de *S. gallinarum*, ** ($P < 0.01$)

Figura 4. Efecto del Sg-ILK al cultivo de hígado, bazo y tonsilas cecales de pollos sobrevivientes a 10 días del periodo experimental



Diferencias significativas entre Sg-ILK y NILK desafiados con la misma dosis de *S. gallinarum*, * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)