

16
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE UN PROBIOTICO COMERCIAL
Y DE LINFOCINAS OBTENIDAS DE AVES
INMUNIZADAS CON *Salmonella enteritidis* EN LA
INMUNOPROFILAXIS CONTRA LA INFECCION DE
Salmonella gallinarum EN POLLOS DE ENGORDA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARIA LUISA CALDERON HERNANDEZ



MVZ, MC, PhD. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

MVZ, MC. ODETTE UROQUIZA BRAVO

MVZ, MC. GARY GARCIA ESPINOSA

MVZ, EPA. JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ

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.

Cuenta tu jardín

*Cuenta tu jardín por las flores,
no por las hojas caídas.*

*Cuenta tus días por las horas doradas,
y olvida las penas habidas.*

*Cuenta tus noches por estrellas,
no por sombras.*

*Cuenta tu vida por sonrisas,
no por lágrimas.*

*Y para tu gozo en esta vida,
cuenta tu edad por amigos,
no por años.*

Johann Paul Richter

DEDICATORIA

A Dios.

Por ser el pan de la vida que nunca me faltó.

A mis padres.

Papá poli y mamá Rosita por todo el cariño, comprensión, apoyo y principalmente la confianza que tienen en mí.

A mis hermanas:

Paty por quererme y consentirme tanto, a María de Jesús y Lupe a pesar que somos tan diferentes, tenemos la misma sonrisa.

A mis sobrinos.

Berenice, Ruth, Enrique, Abigail, Liliana, Monserrat y a mi amiguita Lory, por ser la vida y la fuerza de la familia, por el amor que brotan de sus pequeñas manos, por sus miradas limpias y tiernas.

A mis abuelas.

Ernestina y Eustaquia, que sin sus achaques no sabríamos que hacer.

A l mayor apoyo durante la carrera.

Jorge Enrique por darme todo su tiempo y amor, además de soportarme durante estos 5 años.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Departamento de Producción Animal : Aves.

Al Dr. Guillermo Téllez Isaias por todo el tiempo que me dedicó, por sus atenciones y por ser un jefe excepcional.

A mis asesores:

Dra. Odette Urquiza Bravo.

Dr. Gary García Espinosa.

Dr. José Antonio Quintana López.

A la Dra. Magdalena Escorcía por todo el apoyo que me ha brindado, por creer en mí y principalmente por ser más que mi maestra mi amiga.

A la Dra. Pilar Castañeda por toda la ayuda que me ha prestado.

Al Dr. David Nisbet y Gena por su confianza y atención.

A Donají por su valiosa cooperación y amistad.

A mis amigos, que me han ayudado durante la carrera y por los momentos felices que disfrutamos.

Secundaria:

Paty Arias, Claudia Ruvalcaba, Claudia Carreño, Mirella Gutiérrez, Fabián Plata, Fernando Miguel.

C.C.H.:

Alba Rojas, Vero García, Paty Espinosa, Ixta Balderas, Elizabeth Santibañez, Luisito Trejo, Javier Herrera, Alberto Martínez, Ernesto Melchor y especialmente a Antonio Sanchez, por que gracias a tus ganas de vivir, tu fe y lucha de superación es que escribo estas palabras "MIL GRACIAS AGUILAS".

Facultad:

Araceli Lima, Teresa López, Angélica Hernandez, Paty Chavez, Maribel Acosta, Adrián García, Ramón Chavez, Nazario Bañuelos, Hugo Morales.

Depto. Aves:

Blanca Bautista, Cecilia Rosario, Rosi Saldivar, Angélica Dorantes, Xóchilt Hernández, Rosario Ramos, Rosa Ana Wong, Benjamín Barrientos, Rubén Merino, Javier Balcázar, Juan Carlos del Río, Nestor Ledesma, Julio Alfaro, Edgar Peña, Daniel Marrufo, Armando Alcalá, Santiago Saldivar, José González, Jesús Cabriales, Tomás Jínez, Marco Juarez.

Al Señor Juanito por ser tan tierno con todos nosotros y ayudarnos tanto

Al Señor Adelfo por su ayuda y magnífico trabajo .

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| TABLA DE CONTENIDO | V |
| ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS | VI |
| RESUMEN | I |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| Tifoidea aviar | 2 |
| Exclusión competitiva | 4 |
| Probiótico | 5 |
| Las citocinas y sus interrelaciones | 6 |
| Redes de citocinas | 7 |
| La salmonelosis y la respuesta inflamatoria en las aves | 10 |
| OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 13 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 14 |
| Bacterias | 14 |
| Preparación del cultivo de flujo continuo | 15 |
| Proceso de Inmunización | 15 |
| Preparación de la suspensión de células esplénicas | 16 |
| Aislamiento de linfocitos T | 16 |
| Preparación de las linfocinas | 17 |
| Animales de experimentación | 17 |
| Diseño experimental | 18 |
| Determinación de <i>S. gallinarum</i> en órganos | 19 |
| Análisis de los datos | 19 |
| RESULTADOS | 20 |
| DISCUSIÓN | 22 |
| CONCLUSIONES | 28 |
| LITERATURA CITADA | 29 |

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Cuadro 1.- Bacterias presentes en el cultivo bacteriano, CF3 ^b | 37 |
| Cuadro 2.- Recuperación de <i>S. gallinarum</i> a partir de aves muertas de 4 grupos inoculados y no inoculados con 10 ⁶ ufc/ml de la bacteria previamente dosificados con diferentes tratamientos | 38 |
| Cuadro 3.- Recuperación de <i>S. gallinarum</i> a partir de las aves sobrevivientes del desafío con 10 ⁶ ufc/ml 48 hrs después de aplicados los tratamientos correspondientes ^a en grupos inoculados y no inoculados | 39 |
| Figura 1.- Mortalidad de aves inoculadas y no inoculadas con <i>S. gallinarum</i> 10 ⁶ ufc/ml previamente dosificadas con diferentes tratamientos y la recuperación de la bacteria. | 40 |
| Figura 2 .- Porcentaje de aislamiento en hígado y bazo de las aves sobrevivientes al desafío con <i>S. gallinarum</i> a las 48 hrs después de aplicados los tratamientos en grupos inoculados y no inoculados. | 41 |
| Figura 3.- Porcentaje de aislamiento a partir de tonsilas cecales a partir de las aves sobrevivientes al desafío con <i>S. gallinarum</i> a las 48 hrs después de aplicados los tratamientos en grupos inoculados y no inoculados. | 42 |

RESUMEN

CALDERÓN HERNÁNDEZ MARIA LUISA. EVALUACIÓN DE UN PROBIÓTICO COMERCIAL Y DE LINFOCINAS OBTENIDAS DE AVES INMUNIZADAS CON *Salmonella enteritidis* EN LA INMUNOPROFILAXIS CONTRA LA INFECCIÓN DE *Salmonella gallinarum* EN POLLOS DE ENGORDA. (Bajo la asesoría de: MVZ, MC, PhD Guillermo Téllez Isaías, MVZ, MC, Odette Urquiza Bravo, MVZ, MC, Gary García Espinosa y MVZ, EPA, José A. Quintana López).

El presente trabajo evalúa el efecto del probiótico CF3[®] obtenido a partir del contenido cecal de aves adultas libres de *Salmonella spp.*, comparándolo con el efecto de la administración de linfocinas obtenidas a partir de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* (SE-ILK) y el efecto de la combinación de ambos productos, sobre la colonización e invasión de órganos por *Salmonella gallinarum* (SG) así como la transmisión horizontal en pollos de engorda. Se formaron 4 grupos de 60 aves cada uno: 1) grupo testigo, 2) grupo tratado con SE-ILK, 3) grupo tratado con probiótico CF3[®], y 4) grupo tratado con CF3[®] combinado con SE-ILK. El probiótico se administró por vía oral y SE-ILK por vía intraperitoneal en pollos de un día de edad. Se desafiaron 20 aves de cada grupo con *Salmonella gallinarum* por vía oral (4×10^6 UFC/ml) 48 hrs después. La mortalidad se presentó a las 48 hrs. postdesaño existiendo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo testigo y los tratados. Se sacrificaron a las aves sobrevivientes a los 8 días postdesaño, y se realizó cultivo de órganos: hígado - bazo (como una muestra combinada) y tonsilas cecales. La invasión de órganos por SG se redujo significativamente ($P < 0.01$) con CF3[®], con SE-ILK ($P < 0.01$), y con la combinación de ambos ($P < 0.01$). Hubo disminución significativa en la recuperación de SG a partir de tonsilas cecales ($P < 0.01$) con CF3[®], y en la combinación ($P < 0.01$), sin embargo no se observaron diferencias significativas en la recuperación de SG a partir de tonsilas cecales por la aplicación de SE-ILK únicamente ($P > 0.05$).

Los resultados de este trabajo indican que el probiótico así como su combinación con SE-ILK, tienen un efecto preventivo contra la colonización e invasión de órganos por SG además de controlar la transmisión horizontal. Las linfocinas otorgan protección a nivel de órganos internos, pero no evitan la colonización.

INTRODUCCION

Tifoidea Aviar

La avicultura es una de las áreas de producción pecuaria más importantes, y también de las más susceptibles a pérdidas económicas por problemas sanitarios. En este aspecto, las bacterias del género *Salmonella* son de los agentes etiológicos que mayores pérdidas ocasionan a esta industria, a la vez que representan graves problemas de salud en el público consumidor (44,52,53).

El género *Salmonella* pertenece al grupo de bacterias Gram-negativas que se incluye en la Familia *Enterobacteriaceae*. Este género consta de más de 2,200 serotipos definidos antigénicamente, de los cuales, los de interés en la industria avícola se pueden dividir en 2 grupos, el de las Salmonelas inmóviles representado por *Salmonella gallinarum* (SG), responsable de la "Tifoidea Aviar" (TA) y *S. pullorum* (SP) de la "Pulorosis". Al segundo grupo pertenecen las salmonelas móviles como *Salmonella enteritidis* (SE) y *Salmonella typhimurium* (ST) las cuales producen "Paratifoideas" (52).

Algunos serotipos de *Salmonella* como SG o SE tienen la capacidad de penetrar al tracto digestivo de las aves y, a través del torrente sanguíneo invaden los órganos internos produciendo alteraciones patológicas (24).

En México la TA ha ocasionado grandes pérdidas económicas a la avicultura a través de los años. Los principales efectos económicos negativos son: alta mortalidad, pobre conversión alimenticia y disminución del crecimiento, con aumentos en los decomisos en canal debido a lesiones por septicemia (53). Las aves que nacen de huevos infectados por TA se observan moribundas ó muertas, tienen pobre crecimiento, inapetencia y taponamiento de la cloaca. En aves adultas se observa una baja repentina en el consumo de alimento, diarrea, erizamiento de plumas, palidez, encogimiento de barbilla y cresta (44,53). El período de incubación es de 4 a 5 días, aunque este varía por la virulencia de la cepa. El curso de la enfermedad es de 5 días pero puede extenderse hasta 2 a 3 semanas (52).

Dentro de las especies afectadas por TA se encuentran las gallinas domésticas, pavos, faisanes, codorniz y palomas (52,53). Johnson y Anderson reportaron brotes de la enfermedad en patos, pavos y gallinas de guinea (33). Padrón menciona que las razas semipesadas y pesadas son más susceptibles (52). Estudios realizados por Beca, Bauditz y Komarov han reportado la enfermedad en pollos jóvenes (37). Ziprin reportó que durante los primeros 5 días de edad los pollos son más susceptibles a la enfermedad por SG (71). Las aves infectadas por TA y portadoras son el medio más importante de perpetuación y diseminación de la enfermedad, estas aves pueden infectarse no únicamente entre ellas mismas, también en sucesivas generaciones a través del huevo (52).

La infección por *Salmonella* ocurre en el intestino grueso, probablemente por la poca motilidad, pH alcalino y la falta de enzimas digestivas (14). Se sabe que los ácidos grasos volátiles ejercen una actividad inhibitoria en infecciones por *Salmonella* en estado de disociación, el cual es determinado por el pH (4,5, 10,43,56).

Estudios recientes indican que *Salmonella* puede entrar por vía cloacal y colonizar el ciego de aves recién eclosionadas cuando entran en contacto con superficies contaminadas de la incubadora (18). Otros investigadores han reportado que los movimientos de succión espontáneos de los labios de la cloaca de pollos recién eclosionados, acompañados de contracciones peristálticas del colon, resultan en un movimiento de acarreo de materiales, desde los labios de la cloaca al ciego, dentro de las dos primeras horas después de la aplicación (63). La adherencia y subsecuente invasión de *Salmonella spp.* en la mucosa intestinal es un evento clave en las infecciones causadas por esta bacteria intracelular (10).

El mecanismo por el cual la bacteria penetra a la mucosa epitelial todavía no se entiende claramente, sin embargo hay evidencia de que la bacteria y la célula hospedera poseen factores de importancia en el proceso de penetración bacteriana (20,65).

La bacteria puede ser aislada de hígado y bazo, siendo estos, los órganos de elección para el cultivo debido a la gran capacidad de SG para penetrar la pared intestinal y diseminarse a través del torrente sanguíneo a órganos internos (24).

Exclusión Competitiva

La flora bacteriana intestinal normal de aves, es una compleja y dinámica población de microorganismos. En condiciones de crianza natural, esta microflora, es adquirida por el pollito desde su eclosión a partir del medio ambiente colonizando el tracto digestivo, especialmente a nivel de ciegos, e impidiendo que microorganismos patógenos puedan multiplicarse a este nivel, este fenómeno es denominado "Exclusión Competitiva" (59).

Los mecanismos por los cuales los microorganismos nativos intestinales de las aves protegen a su huésped contra la invasión de enteropatógenos están englobados dentro de las siguientes teorías: competencia por nutrientes limitantes (21,22,68), competencia por los sitios de ataque sobre la mucosa intestinal (38,50,62) y la producción de cadenas cortas de ácidos grasos volátiles que cuando están en su estado lipolítico son inhibidores de la invasión por enteropatógenos (5,6,57).

Actualmente se están usando métodos de control para la colonización de *Salmonella spp.* incluyendo el uso de microflora definida de contenido cecal de pollos que sea antagonista de *S. typhimurium*. Aunque este método se ha estado usando con éxito, el mecanismo exacto responsable no es definido totalmente (14, 16,45,49,50,59).

Se ha demostrado que el cultivo bacteriano de aves adultas muestra un control efectivo contra la colonización de *Salmonella* en pollos. Aunque se desconoce su composición, en Suecia y Finlandia se usan comercialmente cultivos bacterianos indefinidos, que son inaceptables en muchos países por la posibilidad de transmisión de patógenos aviares a humanos, por ésta razón se creó la necesidad del desarrollo de un cultivo bacteriano definido que sea efectivo para el control de *Salmonella* (48).

El concepto Nurmi de exclusión competitiva ha tenido buenos resultados en la reducción de la infección por *Salmonella*, se basa en la siguiente teoría: La administración de contenido intestinal proveniente de pollos adultos sanos, oralmente a pollos de un día de edad, disminuye la susceptibilidad a la infección por *Salmonella*, ya que previene el establecimiento de ésta en el intestino (50). Esta práctica ha tenido éxito en diferentes grados en la reducción de *Campylobacter jejuni* en pollos. Se está usando un cultivo bacteriano indefinido a partir de intestino de aves adultas que reduce la colonización de *Campylobacter* en pollos jóvenes pero existen 2 inconvenientes: el primero es la posible presencia de otro patógeno en el cultivo mixto, y el otro es que algunas ciudades no permitirán la exclusión competitiva con un cultivo bacteriano indefinido. (60,69).

Las primeras investigaciones sobre éste fenómeno fueron realizadas por Gause en 1934, llegando a postular que "dos especies con ecología similar no pueden vivir en el mismo sitio al mismo tiempo". Esto se conoce como "Principio de Gause"(27):

I. Que dos poblaciones que no están genéticamente emparentadas entre sí, ocupan el mismo nicho ecológico, es decir, que hagan lo mismo.

II. Que ocupen el mismo territorio.

III. Si la población A se multiplica un poco más rápidamente que la población B, terminará la población A por desplazar a la población B (27).

Probiótico

El término "probiótico" se origina de dos palabras griegas que significan : "por la vida" contraria al término antibiótico que significa "contra la vida" (27).

En el sector pecuario se están aplicando productos derivados de la biotecnología, dando lugar al uso de organismos específicos para propósitos especializados basados en el

aislamiento de microorganismos de la naturaleza y a la selección de cepas con determinadas características, dentro de este grupo están los probióticos, los cuales son microorganismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal. La palabra probiótico fue utilizada por primera vez por Parker en 1974.

Los probióticos incluyen bacterias y sus metabolitos siendo los más utilizados las bacterias productoras de ácido láctico, las levaduras y las enzimas digestivas derivadas de éstas (27).

El tratamiento exitoso de los pollos recién nacidos con cultivos de exclusión competitiva, dependen del establecimiento temprano de las bacterias protectoras. La concentración de ácidos grasos volátiles en el contenido cecal de pollos jóvenes se incrementa con el establecimiento de las bacterias cecales anaerobias nativas (61).

Recientemente, se desarrolló mediante flujo continuo, un cultivo de exclusión competitiva, denominado CF3[®], el cual demostró incrementar la concentración de ácidos grasos volátiles en el ciego de pollos de 3 días de edad, principalmente, la concentración cecal del ácido propiónico por la administración del CF3[®], protegiendo contra la colonización cecal por *Salmonella thyphimurium*. Este cultivo bacteriano consiste en una mezcla de bacterias Gram positivas y Gram negativas (47,48,49), fue usado en un estudio previo produciendo una interacción bacteriana en el intestino delgado del ratón, donde se sugiere tener control del flujo continuo procurando que se asemeje a la microflora intestinal (22).

Las citocinas y sus interrelaciones

El desarrollo de una respuesta inmune efectiva implica interacciones complejas entre células hematopoyéticas, linfoides e inflamatorias. Dichas interacciones están mediadas por proteínas solubles de bajo peso molecular o glucoproteínas, conocidas genéricamente

con el nombre de citocinas (39,66). Como su nombre lo indica, estas moléculas juegan un papel de gran importancia en las comunicaciones entre célula y célula y sirven como mensajeras de la respuesta inmune (39). Las citocinas son secretadas por diversas células inmunitarias y no inmunitarias involucradas en la respuesta inmune y actúan sobre células blanco que poseen receptores en la membrana, los cuales son específicos para una citocina dada. Dependiendo de la célula blanco, las citocinas pueden mostrar actividades *autócrina* (unirse a la misma célula que las secretó), *parácrina* (unirse a una célula que se encuentre cerca), o *endócrina* (unirse a una célula distante) (41). Resulta interesante mencionar que las citocinas a menudo pueden tener efectos pleotróficos sobre la función biológica de las células blanco incluyendo reconocimiento, diferenciación, proliferación y reclutamiento celular (64). La unión de una citocina a un receptor específico de una célula blanco induce una señal dentro de la célula que da como resultado cambios en la activación de la misma y expresión de varios genes. En respuesta a estímulos particulares, las subpoblaciones individuales de células inmunes poseen la capacidad de activar genes específicos que codifican para citocinas, lo cual puede dar como resultado la secreción de más de estas moléculas (31). Se ha demostrado que las células no inmunitarias, incluyendo a los fibroblastos, las células endoteliales y las células epiteliales, también presentan respuestas detalladas a señales específicas, las cuales conducen a la producción de otras citocinas (30,39,40). Debemos subrayar que las células y las poblaciones celulares, varían en su expresión de receptores de citocinas individuales y, por lo tanto, difieren en su capacidad de responder a las señales de citocinas específicas (25).

Redes de citocinas

La idea de las redes de citocinas (en inglés: "cytokine networks") se ha desarrollado a través de investigaciones sobre las interacciones que existen entre las poblaciones de células inmunes y no inmunes (2,3). Las evidencias, cada vez más abundantes, han demostrado la complejidad de estas cascadas de citocinas. Sin embargo, estas interrelaciones funcionales entre citocinas se pueden describir, básicamente, como la respuesta directa de una población de células (células primarias) a estímulos específicos

mediante la producción de una citocina particular para ejercer efectos distintos sobre otra población de células (células blanco, o células objetivo [en inglés: target cells]) (34,35,36). Las células blanco responden mediante la producción de citocinas que sirven ya sea como señales de retroalimentación para las células primarias, o bien para iniciar una cascada de eventos, afectando a una serie nueva y distinta de células blanco (66).

El papel funcional de las citocinas y de sus interrelaciones funcionales, es crítico para la defensa del huésped y se puede clasificar en tres categorías de la respuesta inmune del huésped: 1) *activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos*, lo cual ocurre en respuesta al reconocimiento de un antígeno específico por los linfocitos T; 2) *hematopoyesis*, la cual estimula el crecimiento y la diferenciación de las células blastos de la médula ósea, para transformarse en leucocitos maduros; y 3) *inflamación*, que está involucrada en la movilización de los leucocitos hacia los sitios de la infección o de la lesión tisular (2,39,51).

En el pollo se sabe que ocurren estas tres categorías de la respuesta inmune, aún cuando los mecanismos operativos básicos mediadores de ellas, todavía no están claros (39). Se han utilizado citocinas de aves como estimulantes de una respuesta inflamatoria vigorosa en pollos jóvenes, que da como resultado la resistencia de estas aves a infecciones sistémicas por bacterias del género *Salmonella* (40,41,65)

La premisa mayor de la inflamación es el reclutamiento de las células efectoras, como son los monocitos y los leucocitos polimorfonucleares (PMN), en los sitios de infección o lesión tisular. Los polimorfonucleares son las células inflamatorias que predominan inicialmente en los sitios de reclutamiento para llevar a cabo la inflamación (de 4 a 12 horas), particularmente en el caso de infecciones bacterianas (19,40).

La extravasación y el secuestro de células polimorfonucleares en el sitio de la inflamación, dependen de una compleja serie de eventos:

1. La generación local controlada de las citocinas de la respuesta temprana, como por ejemplo el factor de necrosis de los tumores (TNF, por sus siglas en inglés) y la interleucina (IL-1), que conducen a la activación de las células endoteliales y a la expresión superficial de las moléculas de adhesión de los polimorfonucleares, derivadas de las células endoteliales; como por ejemplo las selectinas E y P y la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1, por sus siglas en inglés). Estas moléculas de adhesión son receptores generados por las membranas lumenales de las células endoteliales que reciben internamente a los vasos sanguíneos.

2. Producción local de citocinas quimiotácticas para activar los polimorfonucleares (como por ejemplo la interleucina-8 [IL-8]).

3. En la sangre periférica, la activación de los polimorfonucleares y la expresión de las moléculas de adhesión derivadas de éstos; por ejemplo: el CD11b/CD18, ligante para el ICAM-1, y la selectina -L, ligante para las selectinas E y P.

4. Adherencia de las células polimorfonucleares y de las células endoteliales a través de los ligantes respectivos.

5. Diapedesis y migración de polimorfonucleares a través de la barrera de células endoteliales al sitio inflamado a través de gradientes quimiotácticos en el tejido local (36).

Después de haber llegado al sitio inflamado, los polimorfonucleares activados pueden responder a los estímulos mediante fagocitosis y muerte, mediante la liberación de citocinas adicionales. A medida que continúa el proceso inflamatorio agudo, después de esta etapa de iniciación, la evocación de la memoria de los leucocitos se torna dinámica con la composición celular del infiltrado inflamatorio, cambiando a una población celular en la que predominan las células mononucleares (34,35,36).

La salmonelosis y la respuesta inflamatoria en las aves

La característica histológica más común de la salmonelosis en el intestino de las aves es el reclutamiento de grandes cantidades de heterófilos (que son la contraparte de polimorfonucleares de los neutrófilos de los mamíferos) en la lámina propia (19,39,65). Los hallazgos recientes han demostrado la conexión que existe entre los heterófilos de las aves y la resistencia temprana a las infecciones por salmonelas (65). La depleción selectiva de heterófilos en pollos jóvenes causó, por el contrario, infecciones subclínicas por *Salmonella enteritidis* (SE) para convertirse rápidamente en infecciones clínicas en pollos jóvenes con severas infecciones extraintestinales, en otros órganos, y causando mortalidad, mientras que los pollos testigos presentaron infecciones que se restringieron principalmente al intestino, sin morbilidad ni mortalidad. Estos hallazgos ilustran que los heterófilos son críticos para el desarrollo de una respuesta inflamatoria efectiva contra la invasión inicial de los órganos por las salmonelas y contra la patogenia subsecuente de la enfermedad en los pollos (40).

Durante estos últimos años, se ha proporcionado evidencias que relacionan la resistencia de las aves (pollos y pavos) con la capacidad de las salmonelas de infectar a los órganos, a través de la respuesta inflamatoria heterofílica inducida por citocinas. En particular, se estableció una poderosa asociación entre la administración profiláctica de citocinas procedentes de los linfocitos T de pollos inmunizados contra *S. enteritidis* y la acumulación de heterófilos inflamatorios en el sitio de la invasión bacteriana en el intestino, y la expresión de resistencia a las infecciones sistémicas por salmonelas (65).

La presencia de una red funcional de citocinas durante la expresión de esta resistencia anti-*Salmonella* es fundamental para la iniciación y propagación de la respuesta inflamatoria protectora. El paradigma para describir el inicio de una cascada de citocinas después de la administración de linfocinas obtenidas de aves hiperinmunizadas contra *S. enteritidis* (abreviatura en inglés: SE-ILK), que ha dado como resultado la inducción de una respuesta inflamatoria heterofílica protectora, consta de cuando menos cinco pasos (65).

En primer término, se tiene evidencia de que el TNF localizado es producido después de la administración de SE-ILK y del desafío con salmonelas. Se ha encontrado que la administración del receptor soluble TNF p60 a los pollos antes del tratamiento con citocinas, inhibió la acumulación de heterófilos inflamatorios en el sitio de la invasión bacteriana (20). Este es un hallazgo significativo porque el TNF es una citocina de respuesta temprana necesaria para la inducción de la inflamación aguda. En segundo lugar, se ha demostrado que en el ambiente local está presente una proteína quimiotáctica similar a la interleucina 8. Esta proteína es responsable de la quimiotaxis de los heterófilos al sitio de la invasión bacteriana. En tercer término, el aislamiento de heterófilos de sangre periférica de pollos inyectados con SE-ILK ejerció un significativo efecto de intensificación de sus funciones biológicas efectoras incluyendo a la adherencia, la quimiotaxis, la fagocitosis y la lisis de las bacterias. En cuarto lugar, la multiplicación al cuádruple de la expresión de la molécula de adhesión CD11b/CD18 derivada de los polimorfonucleares, se observó en los heterófilos de los pollos tratados con la SE-ILK (36).

Durante el proceso de reclutamiento a lo largo de la inflamación con polimorfonucleares, la activación de estas células fagocitarias y la expresión de las moléculas de superficie CD11b/CD18, son esenciales para la extravasación y secuestro de los polimorfonucleares en el sitio de la inflamación (36,39). En quinto término y con el objeto de facilitar el estudio de la diapedesis y migración de los heterófilos a través de la barrera capilar, se utilizaron las propiedades distintivas del peritoneo del pollo, como modelo de reclutamiento de células inflamatorias. En esencia, el peritoneo del pollo es un ambiente estéril con pocas células fagocitarias residentes. Gracias a ello, la cavidad peritoneal proporcionó un modelo excelente para estudiar la acumulación de las células inflamatorias involucradas en la respuesta inflamatoria del huésped, mediada por la SE-ILK, contra *S. enteritidis* (34,35,36,39).

La inyección de SE-ILK y *S. enteritidis* viva (pero no de *S. enteritidis* muerta con formalina) dió como resultado un incremento en el influjo de heterófilos inflamatorios hacia el peritoneo, sin que se incrementaran los macrófagos peritoneales. La impresionante magnitud de la migración de heterófilos inflamatorios hacia el peritoneo debe ser el

resultado de la diapedesis y migración de estas células activadas, hacia afuera de la sangre. Además, estos heterófilos peritoneales poseen receptores IL-8, requeridos para su migración continua hacia el sitio de la inflamación (36).

Estudios realizados anteriormente han demostraron la eficacia de SE-ILK contra la infección por *S. enteritidis* en pollos al día de edad, 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 (64).

El efecto profiláctico inducido por SE-ILK 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. 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* (40,65). 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 (71). Por lo tanto es durante estos primeros cuatro días que el mecanismo de defensa innata debe funcionar para prevenir que *Salmonella* se multiplique a un número capaz de sobrepasar alguna respuesta generada (70).

Una importante ventaja de las linfocinas 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 (65) y un aumento de leucocitos polimorfonucleares en sangre periférica 4 horas después (36,40), 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 (30,51). 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 (32).

OBJETIVOS

- Evaluar la eficacia del probiótico CF3[®] en la prevención de la colonización de *Salmonella gallinarum* y su eficacia para reducir la transmisión horizontal.
- Evaluar la eficacia de las linfocinas procedentes de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* en la prevención de *Salmonella gallinarum* y su eficacia para reducir la transmisión horizontal
- Comparar el probiótico CF3[®] con las linfocinas procedentes de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* y la combinación de ambos productos.

HIPÓTESIS

La administración del probiótico CF3[®] al igual que la administración de linfocinas procedentes de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis*, a pollos de engorda de un día de edad tienen un efecto protector contra la mortalidad e invasión en los órganos causada por *Salmonella gallinarum* así como una disminución en la transmisión horizontal.

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 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. El inóculo para la inmunización con *S. enteritidis* fue preparado con solución salina fosfatada estéril (PBS) y ajustado a una concentración de 10^9 UFC/ml mediante espectrofotometría¹.

La cepa de desafío fue un aislamiento aviar primario de *S. gallinarum*, resistente a la novobiocina (NO) y al ácido nalidíxico (NA)² obtenido en el laboratorio DPA: Aves, el cultivo se mantuvo en un medio que contenía 25 µg de NO y 20 µg de NA/ml. El inóculo de desafío se preparó a partir de un cultivo de 24 hrs. transferido previamente 3 veces en caldo tripticosa soya y que se diluyó en forma seriada en solución salina fosfatada buferada estéril, para lograr una concentración de 4×10^6 UFC/1.0 ml. Se confirmó la concentración de células viables del inóculo de desafío mediante conteos de colonias en placas de agar verde brillante (AVB)³.

Los medios utilizados para cultivar el aislamiento, procedente de los pollos desafiados en el estudio experimental contenía 25 µg de novobiocina y 20 µg de ácido nalidíxico por ml para inhibir el crecimiento de otras bacterias y de otras salmonelas no resistentes.

¹ Milton Roy Spectronic 20D
² SIGMA Chemical C.O. USA
³ MERCK

Preparación del Cultivo de Flujo Continuo

Este probiótico es una mezcla de cultivos bacterianos mantenida en flujo continuo (CF por sus siglas en inglés) elaborado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica y la Universidad de Texas A & M a base de 29 bacterias (cuadro 1) anaerobias facultativas y obligadas pertenecientes a 10 géneros, denominado CF3[®].

Los ciegos de 3 aves de 10 semanas de edad libres de *Salmonella spp.*, sirvieron para la preparación del inóculo original; se obtuvieron asépticamente y fueron transferidos inmediatamente a una cámara de anaerobiosis¹. Cada ciego fué cortado en varios pedazos y macerado, homogeneizado con su contenido, se le agregó glicerol para una concentración final del 20%. Fueron añadidos 5 ml del contenido cecal a 100 ml del medio Viande Levure (VL)², incubado anaeróticamente a 39° C utilizado como el cultivo origen para el sistema de cultivo en CF (11). El probiótico se caracteriza porque las proporciones de ácido acético y propiónico son similares a las reportadas previamente en el ciego de pollos jóvenes (13).

Proceso de Inmunización

Para la obtención de las linfocinas de aves hiperinmunizadas, se utilizaron 21 gallinas de postura raza "White Leghorn" de 42 semanas de edad, las cuales fueron desafiadas vía oral con una dosis de 10⁸ UFC/ml de *S. enteritidis*. Se aplicaron dosis iguales de refuerzo a los 14 y 28 días después. 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 Coy Laboratory Products Ann Arbor, Mich.

² SIGMA Chemical C.O. USA.

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 1640¹ que contiene 100 u/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomícina (P-E)¹. 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 x 10⁶ células/ml) en medio RPMI 1640 libre de suero, suplementado con L-glutamina (mM)¹, piruvato de sodio (1 mM)² 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 nylon descrito por Julius *et al.*, adaptado por Kogut y Salichert para la purificación de linfocitos T (34). Las columnas fueron preparadas con lana de nylon húmeda³, a razón de 3.5 g, introduciéndola sin compactarla, en jeringas de 35 ml esterilizadas por autoclave. Las columnas se preincubaron con medio RPMI 1640 tibio adicionado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB)², a 41° C por una hora en una incubadora⁴ 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

¹ SIGMA Chemical Co. USA

² GIBCO BRL USA.

³ Fenwal Laboratories, Morton Grove, Ill.

⁴ NAPCO Model-3110.

con medio RPMI 1640 tibio. La viabilidad de las células eluidas se determinó mediante tinción con azul de tripano¹ al 0.1 % y se 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 tifiéndolas 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 µg/ml de concanavalina A² 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 µg/ml)³ para inactivar residuos de concanavalina A. Se concentraron los sobrenadantes de 10 a 12 veces mediante ultrafiltración, empleando membranas YM-10 (10 kilodaltons)³. Al final se pasó a través de un filtro (0.45 µ); el sobrenadante fue guardado en refrigeración a 20° C hasta que se utilizó. Con esto se obtuvieron las SE-ILK.

Animales de Experimentación.

Se utilizaron 240 pollos de engorda (Arbor Acres), de un día de edad de una incubadora comercial, se alojaron en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

¹ GIBCO BRL USA.

² SIGMA Chemical CO USA.

³ Amicon YN10

Los pollos fueron alimentados con una ración balanceada comercial y agua *ad libitum*. Antes del experimento se realizó un estudio bacteriológico de la paja de transporte, alimento y de 20 pollitos, para descartar la presencia de *Salmonella* utilizando métodos de cultivo estándares (1).

Diseño experimental.

Los animales de un día de edad se dividieron en 4 grupos de 60 pollos cada uno, grupo uno testigo sin administración de tratamiento, grupo dos con aplicación de 0.5 ml de linfocinas vía intraperitoneal, grupo tres 0.5 ml de probiótico CF3[®] y cuarto grupo con administración de linfocinas y probiótico a las dosis anteriores y por la vía correspondiente.

A las 48 hrs. se desafió con *Salmonella gallinarum* a una dosis de 0.25 ml (4X10⁶ UFC/ml), vía oral sólo a 20 pollos de cada grupo, identificándolos con una marca en la cabeza, se registró la morbilidad y la mortalidad diaria.

Las aves sobrevivientes se sacrificaron 8 días postdesafío para la determinación de *S. gallinarum* en órganos y tonsilas cecales.

| GPO | TRATAMIENTO | DOSIS | VIA DE INOCULACIÓN | DESAFIO |
|----------------|--|--|--|---------------------------------------|
| 1 (testigo) | NINGUNO | NINGUNA | NINGUNA | SG 0.25 ml (4X10 ⁶ UFC/ml) |
| 2 | LINFOCINAS | 0.5 ml/Total | INTRAPERITONEAL | SG 0.25 ml (4X10 ⁶ UFC/ml) |
| 3 | PROBIOTICO CF3 [®] | 0.5 ml/Total | ORAL | SG 0.25 ml (4X10 ⁶ UFC/ml) |
| 4 | LINFOCINAS + PROBIOTICO CF3 [®] | 0.5 ml y 0.5 ml/Total RESPECTIVAMENTE | INTRAPERITONEAL Y ORAL RESPECTIVAMENTE | SG 0.25 ml (4X10 ⁶ UFC/ml) |

Determinación de *S. gallinarum* en órganos

De las aves muertas durante el estudio, se realizó una toma directa de hígado (en la parte más lesionada) con una asa 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) (67). 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 tetrionato¹. 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 (1).

Análisis de los Datos

Para determinar las diferencias significativas en cuanto a invasión, colonización y mortalidad se utilizó un análisis de ji-cuadrada entre los diversos tratamientos, mediante los Procedimientos de Modelos Lineales Generales, utilizando el programa computarizado de análisis estadístico PCSAS, versión 6.02.

¹MERCK

RESULTADOS

Análisis bacteriológico de paja de transporte, alimento y aves

Las muestras de paja, alimento y 20 pollitos resultaron negativos al aislamiento de *Salmonella spp.*

Signos clínicos

Lo observado en aves de el grupo testigo fue depresión, inapetencia, amontonamiento, deshidratación, anorexia, emaciación, diarrea y debilidad. En los grupos tratados no se presentaron signos clínicos aparentes.

Mortalidad

Presentándose en el grupo testigo a las 48 hrs. post-inoculación, tanto en animales inoculados como en no inoculados, siendo éste el pico de mortalidad, disminuyendo hasta el día 7, con una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo testigo y los grupos tratados, al aislamiento de *Salmonella gallinarum* del cultivo primario de hígado (figura 1).

Total de aves muertas: 13, de las cuales resultaron positivos 5 al aislamiento de la bacteria (cuadro 2). El grupo cuatro registró un ave muerta al día 6 post-inoculación, resultando negativa al aislamiento directo.

Invasión en órganos por *Salmonella gallinarum* de aves sobrevivientes.

De las aves sobrevivientes que fueron sacrificadas 8 días postdesaño se realizó cultivo de órganos: hígado - bazo (como una muestra combinada) y tonsilas cecales.

La invasión de órganos por SG se redujo significativamente ($P < 0.01$) con CF3[®], SE-ILK ($P < 0.01$), y con la combinación de ambos ($P < 0.01$), en comparación con el grupo testigo (cuadro 3). Hubo disminución significativa en la recuperación de SG a partir de tonsilas cecales ($P < 0.01$) con CF3[®], y en la combinación con SE-ILK ($P < 0.01$), sin embargo no se observaron diferencias significativas en la recuperación de SG a partir de tonsilas cecales ($P > 0.05$) por la aplicación de SE-ILK al compararla con el grupo testigo (cuadro 3, figuras 2 y 3).

DISCUSIÓN

En condiciones de crianza natural, el pollito adquiere microflora bacteriana normal del medio ambiente desde su eclosión colonizando su tracto digestivo, especialmente a nivel de ciegos. Con los modernos sistemas de producción avícola, la oportunidad de que el pollo entre en contacto tempranamente con esta microflora es escasa (59). Por esta razón surge la necesidad de obtener un cultivo bacteriano definido que sea antagonista al género *Salmonella*.

La administración, a los pollos de un día de edad, de cultivos de microflora intestinal normal preparados a partir del contenido cecal o de las heces de pollos adultos sanos, protege contra la colonización por *Salmonella*, este fenómeno se conoce como exclusión competitiva (EC) (50,59). Numerosos investigadores han preparado cultivos EC que previenen la colonización por *Salmonella*, aun cuando no todos los cultivos EC tienen el mismo grado de protección (5,37,50,55,58,62).

El cultivo debe contener microorganismos conocidos para evitar la posible presencia de un agente patógeno(48).

Con el objeto de evaluar y comparar la eficacia de los cultivos EC recientemente desarrollados bajo condiciones de laboratorio, un grupo de investigadores representantes de los laboratorios en los que se están desarrollando cultivos EC en el Reino Unido, Francia, Canadá, Estados Unidos y Holanda (42) recomendó recientemente un ensayo estándar, mediante el cual, se informa sobre la eficacia de los cultivos EC, en términos de un Factor de Protección (FP). El FP de un tratamiento se calcula dividiendo el \log_{10} promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Salmonella* de un grupo control no tratado con EC de pollos desafiados con 10^4 UFC de *Salmonella*, entre el \log_{10} promedio de UFC de

Salmonella de los pollos tratados con el cultivo EC y también desafiados con 10^4 UFC de *Salmonella* (54). Por lo tanto, mientras mayor sea el valor del FP, mayor será la eficacia del cultivo EC. La comparación del valor del FP de diferentes cultivos EC dentro de un experimento en el que todos los tratamientos se comparan con el mismo grupo control, es un método excelente para evaluar la eficacia de diversos cultivos EC. Sin embargo, aun cuando los diferentes experimentos pueden usar el mismo nivel recomendado de desafío con salmonelas, los niveles reales de colonización por estas salmonelas en los pollos controles pueden variar considerablemente entre los diferentes experimentos. Debido a este nivel inconsistente de desafío entre diferentes pruebas, tal vez no sea precisa la comparación de los cultivos EC entre distintos experimentos, con base a los valores FP obtenidos. Otro método para comparar la eficacia de diferentes cultivos EC sería el uso de un parámetro biológico resultante del tratamiento con el cultivo EC que demuestre estar altamente correlacionado con la protección contra la colonización por salmonelas.

El aumento en el ácido propiónico de los pollos tratados con el cultivo CF3[®] ha estado altamente correlacionado con el aumento de 100 veces en la presencia de UFC de bacterias anaerobias en los pollos de 3 días de edad y en la disminución significativa de la colonización por *S. typhimurium* en los pollos de 10 días de edad, en comparación con los pollos testigos no tratados (46). Otro cultivo EC desarrollado mediante CF también disminuyó significativamente la colonización cecal por *S. typhimurium* e incrementó las concentraciones de ácido propiónico en los pollos de 3 días de edad, en promedio en 32 veces, en comparación con los controles (16,28,29). Este mismo cultivo CF incrementó significativamente las concentraciones cecales de ácido propiónico en los pollos tratados de 3 días de edad, en comparación con los no tratados, en una prueba de campo comercial a gran escala en la que los pollos tratados con el cultivo CF tuvieron una reducción significativa en la colonización cecal por *Salmonella* a la edad de mercado, en comparación con el grupo no tratado con el cultivo CF (15,17).

Debido a que otros investigadores no han reportado los parámetros de la fermentación en el ciego de los pollos de 3 días de edad tratados con los cultivos EC, no se sabe si este fenómeno ocurre solamente en los pollos tratados con los cultivos EC desarrollados mediante flujo continuo, o si el aumento en la concentración cecal de ácido propiónico se presenta en todos los pollos de 3 días de edad tratados con cultivos EC eficaces.

La efectividad del cultivo se relaciona con la combinación de lactosa en la dieta (7,12,25,26,28,29,42,43,44), sin embargo, en este estudio los pollos utilizados fueron alimentados con un producto comercial sin aditivos, es por esto que suponemos que la composición de la flora fecal puede ser independiente de la naturaleza de la dieta, como en el estudio reportado por García y col. (23) Otros investigadores han demostrado que el equilibrio de numerosos tipos de bacterias no es afectada por el contenido de las dietas, incluyendo las líquidas (22).

En este trabajo se demostró la eficacia que tienen tanto el Probiótico CF3[®] como las linfoquinas para prevenir considerablemente la colonización en ciegos y la diseminación a órganos internos por *Salmonella gallinarum*, estos resultados coinciden con los trabajos realizados anteriormente por otros investigadores, en los cuales se ha observado el efecto de diferentes cultivos de exclusión competitiva sobre la colonización e invasión de órganos por *Salmonella* (8,13,14,16,17,23,42,46).

Téllez y colaboradores identificaron sustancias solubles producidas por LT, que pueden conferir protección inmediata contra la invasión orgánica por *Salmonella enteritidis* (SE) en pollos (65). En este trabajo describieron el papel que los mediadores solubles derivados de los LT o linfoquinas pueden jugar en la respuesta del huésped contra la invasión por SE y reportaron una serie de experimentos en los cuales transfirieron protección contra SE a pollos, mediante el sobrenadante obtenido de LT de aves inmunizadas con SE (SE-ILK) (26). Estudios similares (12) reportan protección conferida por SE-ILK en pollos de un día de edad, al igual que Ray y colaboradores han demostrado previamente protección cruzada conferida por SE-ILK en infecciones causadas por *Salmonella typhimurium* en pollos Leghorn (12).

Varios estudios han documentado que la administración exógena de citocinas causa un efecto protector al hospedador, disminuyendo la infección por bacterias como *Listeria monocytogenes* (7), *Bacteroides fragilis* (9) y *Salmonella enteritidis* (12,26). En el presente trabajo se observó que las linfocinas sólo redujeron la invasión de órganos, pero no la recuperación de la bacteria en tonsilas cecales.

Una alternativa en el problema de la salmonelosis en aves explotadas comercialmente es la manipulación apropiada del aparato inmunocompetente (25), ofreciendo como una opción la utilización de interleucinas; las cuales actúan como mediadores solubles de la respuesta inmune específica e inespecífica (25). Trabajos llevados a cabo anteriormente demuestran el efecto de linfocinas obtenidas a partir de aves inmunizadas con *S. gallinarum* (SG-ILK) y SE-ILK al ser administrados en aves, disminuyendo significativamente la mortalidad e invasión en órganos de una cepa patógena de SG. Gómez y col. demostraron la presencia de IL-2 e IFN γ en extracto crudo obtenido de linfocitos T (SE-ILK) en forma indirecta en bioensayos y radioinmunoensayos al observar un incremento en la expresión de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de esplenocitos de pollo, sugiriendo que la protección biológica observada en este trabajo puede llevarse a cabo por la presencia de por lo menos estas linfocinas (25). En particular la presencia de IL-2 e IFN γ es de gran importancia; ya que aumenta la actividad de fagocitos activados, los cuales controlarían la multiplicación intracelular de la *Salmonella*, al mismo tiempo los macrófagos activados secretarían IL-12 interleucina directamente involucrada en la inducción de una respuesta de linfocitos Th1, los cuales son responsables de la secreción de IL-2 e IFN γ , es decir en la respuesta inmune celular. Se ha reportado que IL-2 e INF- δ actúan sinérgicamente incrementando la actividad celular, incluso se ha observado un efecto cooperativo a la inyección de TNF- α e IFN- δ incrementando la actividad bactericida contra *Salmonella in vivo* y con ello el rango de sobrevivencia en ratones (45).

El efecto protector de las linfoquinas sobre la invasión de órganos internos por SG se atribuye a las observaciones realizadas por Kogut y col. los cuales demostraron una poderosa asociación entre la administración profiláctica de linfoquinas y la acumulación de heterófilos inflamatorios en el sitio de la invasión bacteriana en el intestino (34,35,36).

En este estudio no fue evaluada la participación de los heterófilos en los resultados obtenidos, sin embargo se sabe que los éstos son críticos para el desarrollo de una respuesta inflamatoria efectiva contra la invasión inicial de los órganos por las salmonelas y con la patogenia subsecuente de la enfermedad en los pollos (40).

En el grupo en el que se combinaron las linfoquinas y el probiótico se muestra una reducción en la colonización, pero ésta puede ser atribuida al efecto del probiótico mediante la exclusión competitiva, y no a las linfoquinas, puesto que no se recuperó la bacteria de tonsilas cecales.

Obviamente, existen todavía algunos puntos oscuros que es necesario investigar antes de que se pueda llegar a conclusiones definitivas respecto al mecanismo de la respuesta inflamatoria protectora mediada por la SE-ILK contra las salmonelas. Sin embargo, se cuenta con suficiente evidencia directa de la importancia del establecimiento de la cascada de citocinas involucrada en este proceso inflamatorio. Todavía más importante resulta el hecho de que, en base a las observaciones histológicas tempranas, esta reacción inflamatoria heterofílica parece ocurrir durante las infecciones normales por *Salmonella* en las aves de corral. Sin embargo, esta reacción parece tener un efecto de gran importancia sobre la invasión de los órganos por las bacterias del género citado. No obstante, la administración de SE-ILK no sólo induce una reacción más rápida y dinámica, sino que ésta da como resultado la activación de los heterófilos con la subsecuente resistencia a las infecciones sistémicas por *Salmonella*.

La concentración, así como el tipo de linfoquinas que fueron utilizadas en este trabajo, están en investigación, solamente se ha determinado la presencia de Interleucina-2 e Interferón γ (25).

Falta mucho por investigar sobre la inmunología del ave para poder utilizar este conocimiento en beneficio del humano.

Se sugiere, la realización de otros trabajos en donde se determine hasta qué concentración bacteriana, puede proteger tanto el probiótico como las linfocinas y determinar su eficacia en otro tipo de aves y no sólo en pollo de engorda.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones y resultados de este experimento se puede concluir que la administración del probiótico definido CF3[®] administrado oralmente al día de edad y 48 horas previas a un desafío experimental con *Salmonella gallinarum* (10⁶ UFC/ml) tiene un efecto importante en la prevención de la mortalidad, colonización intestinal y su posterior invasión a órganos en pollo de engorda, además confiere una protección cuando la transmisión se realiza de manera horizontal, por el efecto de la acción competitiva. La creación de éste probiótico es un gran avance para la biotecnología dentro del sector pecuario.

El extracto crudo del sobrenadante obtenido a partir de LT (linfocinas) de aves inmunizadas con SE (SE-ILK) disminuye la invasión a órganos y mortalidad causada por la infección de SG, demostrándose la eficacia de la protección cruzada. A pesar que no se observó efecto protector contra la colonización de la bacteria, el uso de las linfocinas es una herramienta importante dentro de la inmunoprofilaxis de las infecciones por *Salmonella* y probablemente contra otros patógenos.

LITERATURA CITADA

1. Andrews, H. W., Poelma, P. L., Wilson, C. R. and Romero, A.: Isolation and identification on *Salmonella* In: Bacteriological analytical manual, 5th. Ed. Associations of Official Analytic Chemistry, Washington, D.C. pp 1-29 (1978).
2. Ashley, M.P., Kotlarski, P. and Hardy D.: Involvement of T cells in the recall of *Salmonella*-induced resistance to tumors. *Immunology*, 32:1-10 (1977).
3. Ashley, M.P., Neoh, S., Kotlarski, 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).
4. Barnes, E. M., and Impery, C. S.: Competitive exclusion of *Salmonella* from the newly hatched chick. *Vet. Rec.* 106:61-62. (1980).
5. Barnes, E. M., Impery, C. S., and Cooper, M.D.: Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *Clin. Nutr.* 33:2426-2433. (1980).
6. Barnes, E. M.: The intestinal microflora of poultry and gamebirds during life and after storage. *J. Appl. Bacteriol.* 46:407-419. (1972).
7. 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).
8. Behling, R. G. and Wong, A. C.: Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in chicks by treatment with a single culture plus dietary lactose. In: *J. Food Microbiol.* 22:1-9 (1994).
9. Bell, G. I.: Models for specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200:585-600 (1978).
10. Bohnhoff, M., Miller, C.P. and Martin, W.R.: Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. I. Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation. *J. Exp. Med.* 120:805-816 (1964).

11. 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).
12. 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).
13. Corrier, E.D., Nisbet, J.D, Hollister, G.A., Scanlan, M.C., Hargis, B. M. and DeLoach, R. J.: Development of Defined Cultures of Indigenous Cecal Bacteria to Control Salmonellosis in Broiler Chicks. Poultry Science **72**: 1164-1168 (1993).
14. Corrier, E.D., Nisbet, J.D, Hollister, G.A., Beier, R.C., Scanlan, M.C., Hargis, B. M. and DeLoach, R.J.: Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in leghorn chicks by vent lip application of cecal bacteria culture. Poultry Science **73**:648-652 (1994).
15. Corrier, E.D., Nisbet, J.D, Scanlan, M.C., Tellez, G.I., Hargis, B. M. and DeLoach, R.J.: Inhibition of *Salmonella enteritidis* cecal and organ colonization in leghorn chicks by a defined culture of cecal bacteria and dietary lactose. Jour. food Prot. **56** N° 5 p. 377-381 (1994).
16. Corrier, E.D., Nisbet, J.D, Scanlan, M.C., Hollister, G.A. and DeLoach, R.J.: Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of Cecal Bacteria. Poul. Sci. **74**:916-924. (1995)
17. Corrier, E.D., Nisbet, J.D, Scanlan, M.C., Hollister, G.A., Caldwell, D.J., Thomas, L.A., Hargis, B.M., Tomkins, T. and DeLoach, R.J.: Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce *Salmonellae* colonization. Poultry Science. **74**:1093-1101 (1995).
18. Cox, N. A., Bailery, J. S., Blankenship, L. C., Meinersmann, R. J., Sten, R. J. and McHan, F.: Fifty percent colonization dose for *Salmonella typhimurium* administered orally and intracloacally to young broiler chicks. Poultry Sci. **69**:1809-1812 (1990).

19. Eisenstein, T.K., and Sulzer, B.M.: Immunity to *Salmonella* infection. Adv. Exp. Med. Biol., 162:261-296 (1983).
20. Finlay, B., Iefferson, F. and Falkow, S.: Epithelial cell surfaces induces *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. Science 341:940-943 (1989).
21. Freter, R.: Experimental enteric *Shigella* and *Vibrio* infections in mice and guinea pigs. J. Exp. Med. 104:411-417. (1956).
22. Freter, R.: In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri*. II. The inhibitory mechanism. J. Infect. Dis. 110:38-46. (1962).
23. García, L. D.: Evaluación de un probiótico para la prevención de la infectividad y mortalidad por *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda de un día de edad. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., (1995).
24. Gillinham., S.: Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis* Memorias XVII Convención Anual de Especialistas en Ciencias avícolas, Puerto Vallarta, Jal. México, 83-94 (1992).
25. Gómez, V. G.: Identificación de linfocinas en sobrenadante de Esplenocitos de pollo estimulados con Concanavalina A. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1995).
26. 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.
27. Guerrero, R.M., y Hoyos, G.: Biotecnología aplicada en las aves. IV Jornada Médico Avícola pp. 99-103 (1993).

28. Hollister, G.A., Corrier, E.D., Nisbet, J.D., Beier, R.C. and DeLoach, R.J.: Compariso of effects of chicken cecal microorganisms maintained in continuous culture and provision of dietary lactose on cecal colonization by *Salmonella typhimurium* in turkey poults and broiler chicks. Poltry Science **73**: 640-647 (1994).
29. Hollister, G.A., Corrier, E.D., Nisbet, J.D. and DeLoach, R.J.: Effect of cecal cultures encapsulated in alginate beads or lyophilized in skim milk and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. Poltry Science **73**: 99-105 (1994).
30. Hormaeche, 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).
31. Hsu, H.: Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. Microbiol. Rev., **53**:390-409 (1989).
32. 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).
33. Johnson, J. and Reid, W. M.: Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floorpen experiments with chickens. Exp. Parasitol. **28**:30-36 (1970).
34. 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).
35. 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 (1994)
36. Kogut, M.H., Moyes Rita B. and DeLoach, J.R. Las citocinas y sus interrelaciones. Memorias del curso de Avances en Inmunologia. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. México, D.F. 1996.
37. Komarov, A.: Fowl typhoid in baby chicks. Vet. Rec. **12**:1455-1457 (1932).

38. Loyd, A. B., Cumming, B. R., and Kent, D. R.: Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. Aust. Vet. J., **53**:82-87. (1977).
39. 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 factors: Effects on increased resistance to *Salmonella* organ invasion in day-old leghorn chicks. Poultry Science, **72**:2264-2271 (1993).
40. 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*-immune lymphokines against *Salmonella enteritidis* organ invasion in neonatal leghorn chicks. Avian Diseases, **39**:21-27 (1995).
41. 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 Science, **74**:18-25 (1995).
42. Mead, G. C., Barrow, M. H., Hinton, Humbert, F., Impey, C. S., LaHellec, R. W., Mulder, A. W., Stavric, S. and Stern, N.J. Recommended assay for treatment of chicks to prevent *Salmonella* colonization by competitive exclusion. J. Food Prot. **52**:500-502 (1989).
43. Meynell, G. G.: Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of pH and volatile fatty acids in the normal gut. Br. J. Exp. Pathol. **44**:209-211. (1963).
44. Mosqueda, T. A.: Medidas Sanitarias para prevenir la Tifoidea Aviar. Memorias del VII Curso sobre el control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Comisión permanente para el control y erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, 1987.
45. 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).

46. Nisbet, D. J., Ricke, S. C., Scanlan, C. M., Corrier D. E., Hollister, A. G. and DeLoach, J. R. Inoculation of broiler chicks with a continuous-flow derived bacterial culture facilitates early cecal bacterial colonization and increases resistance to *Salmonella typhimurium*. J. Food Prot. 57: 12-15 (1994).
47. Nisbet, D.J., Corrier, D.E and DeLoach, J. R: Effect of Mixed Cecal Microflora Maintained in Continuous Culture and of Dietary Lactose on *Salmonella typhimurium* Colonization in Broiler Chicks. Avian Diseases 37:528-535 (1993).
48. Nisbet, D.J., Corrier, D.E., Scanlan, C. M., Hollister, A. G., Beier, R. C. and DeLoach, J. R. : Effect of a defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. Avian Diseases 37:1017-1025 (1993).
49. Nisbet, J.D, Corrier , E.D., Scanlan, M.C., Hollister, G.A., Beier, R.C., and DeLoach, R. J.: Effect of dietary lactose and cell concentration on the ability of a continuous-flow-derived bacterial culture to control *Salmonella* cecal colonization in broiler chickens. Poultry Science 73: 56-62 (1994).
50. Nurmi, E., and Rantala, M.: New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. Nature 241:210-211. (1973).
51. 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.
52. Padrón, N.M.: Generalidades sobre pullorosis y tifoidea aviar. Memorias del VII Curso sobre el control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Comisión permanente para el control y erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, 1987.
53. Padrón, N.,M.: Infecciones Paratifoideas en el pollo de engorde. Avic. Prof. 6:123-130. (1989).

54. Pivick, H. B. and Nurmi, E. The Nurmi concept and its role in the control of salmonellae in poultry. p. 41-70. *Developments in Food Microbiology-1*. R. Davies, de. Applied Science Publishers, London, England (1982).
55. Pivnick, H. B., Blanchfield and J. Y. D' Aoust. Prevention of *Salmonella* infection in chicks by treatment with fecal culture from mature chickens. (Nurmi cultures). *J. Food Prot.* 44:909-913 (1981).
56. Pjescak, M.: On biological effects of lactose in layers. *Act. Zootech.* 21:122-130. (1970).
57. Que, J. V., Casey, W. S., and Hentges, J. D.: Factors responsible for increased susceptibility of mice to intestinal colonization after treatment with streptomycin. *Infect. Immun.* 53:116-123. (1986).
58. Rantala, M. and Nurmi, E. Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. *Br. Poult. Sci.* 14:627-632 (1973).
59. Rosende, O. S. and Fernández, H. M.: Exclusión de *Salmonella typhimurium* del tracto digestivo de pollos de un día de edad por acción competitiva de la flora intestinal normal obtenida de cama de gallinas reproductoras. *Avanc. Cienc. Vet.* 2:116-120 (1987).
60. Schoeni, J.L. and Wong, A. C.: Inhibition of campylobacter jejuni colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. *Appl. Envir. Microb.* p.1191-1197 (1994)
61. Snoeyenbos, G. H., Weinack, M. O., and Smyser F. C.: Protecting chicks and poults from salmonellae by oral administration of normal gut microflora. *Avian Dis.* 22:273-287. (1978).
62. Snoeyenbos, G. H., Weinack, O. M. and Smyser, C. F. Further studies on comparative exclusion for controlling salmonellae in chickens. *Avian Dis.* 23:904-914 (1979).
63. Sorvari, R., Naukkarinen, A. and Sorvari, T. E.: Anal sucking-like movements in the chicken and chick embryo followed by the transportation of environmental

- material to the bursa of Fabricius, caeca and caecal tonsils. Poultry Sci. **56**:1426-1429 (1977).
64. Tellez, G.I., Dean, C. E. Corrier, E.D., DeLoach, R. J., Jaeger, L. and Hargis B. M.: Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids, and *Salmonella enteritidis* organ invasion in leghorn chicks. Poultry Science **72**: 636-642 (1993).
65. 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).
66. Tizard, I.: *Inmunologia Veterinaria*. 3a ed. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F., 1989.
67. United State 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).
68. Ushijima, T., and Seto, A.: Select fecal bacteria and nutrients essential for antagonism of *Salmonella typhimurium* in anaerobic continuous-flow cultures. J. Med. Microbiol. **35**:111-117. (1991).
69. Wabeck, C. J.: *Campylobacter* Inhibited by Colonization. Broil. Indus. p.30 (1994).
70. 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).
71. Ziprin, R. L., Corrier, R. L. and Elisaaide, M. H.: Maturation of resistance to Salmonellosis in newly hatched chicks: Inhibition by cicloporine. Poul. Sci. **68**:1637-1642 (1989).

CUADRO 1

Bacterias presentes en el cultivo bacteriano, CF3⁶, aisladas de la flora cecal nativa de pollos adultos y mantenida en flujo continuo (16)

| BACTERIA | ANAEROBIO FACULTATIVO | ANAEROBIO OBLIGADO |
|---|-----------------------|--------------------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> (cepa M) | + | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (cepa N) | + | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (cepa O) | + | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (cepa X) | + | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (cepa Z) | + | |
| <i>Enterococcus avium</i> | + | |
| <i>Lactococcus lactis</i> | + | |
| <i>Lactococcus</i> sp. | + | |
| <i>Escherichia coli</i> (cepa CC-3A) | + | |
| <i>Escherichia coli</i> (cepa CC-3B) | + | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | + | |
| <i>Enterobacter</i> sp. | + | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | + | |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | + | |
| <i>Propionibacterium</i> sp. ^{1,2} | | + |
| <i>Propionibacterium</i> sp. ^{1,2} | | + |
| <i>Propionibacterium</i> sp. ^{1,2} | | + |
| <i>Propionibacterium</i> sp. ^{1,2} | | + |
| <i>Eubacterium</i> sp. ¹ | | + |
| <i>Eubacterium</i> sp. ^{1,2} | | + |
| <i>Eubacterium</i> sp. ¹ | | + |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | | + |
| <i>Fusobacterium</i> sp. ¹ | | + |
| <i>Veillonella</i> sp. ^{1,2} | | + |
| <i>Bacteroides</i> sp. ¹ | | + |

¹ Anaerobios obligados que producen ácido graso volátil: acético, propiónico o butírico.

² Anaerobios obligados que producen ácido propiónico.

CUADRO 2

RECUPERACION DE *S. gallinarum* A PARTIR DE AVES MUERTAS DE 4 GRUPOS INOCULADOS Y NO INOCULADOS CON 10^5 UFC/ml DE LA BACTERIA PREVIAMENTE DOSIFICADOS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS

| GPO | TRATAMIENTO | INOCULADOS ^a | RECUPERACION ^b | NO INOCULADOS | RECUPERACIÓN | TOTAL DE RECUPERACIÓN |
|-----|--------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| 1 | TESTIGO | 4/20 | 1/4 | 9/40 | 4/9 | 5/13 |
| 2 | LINFOCINAS | 0/20** | 0/0 | 0/39** | 0/0 | 0/0 |
| 3 | CF3 [®] | 0/20** | 0/0 | 0/40** | 0/0 | 0/0 |
| 4 | LINF. + CF3 [®] | 0/20** | 0/0 | 1/36* | 0/1* | 0/1* |

a= Valores expresados como número de aves muertas sobre el total de aves inoculadas.

b= Valores expresados como número de aves positivas sobre el número de aves muertas.

*P<0.01

** P<0.05

CUADRO 3

RECUPERACION DE *S. gallinarum* A PARTIR DE LAS AVES SOBRE VIVIENTES DEL DESAFIO CON 10⁶ UFC/ml 48 HRS DESPUES DE APLICADOS LOS TRATAMIENTOS CORRESPONDIENTES^a

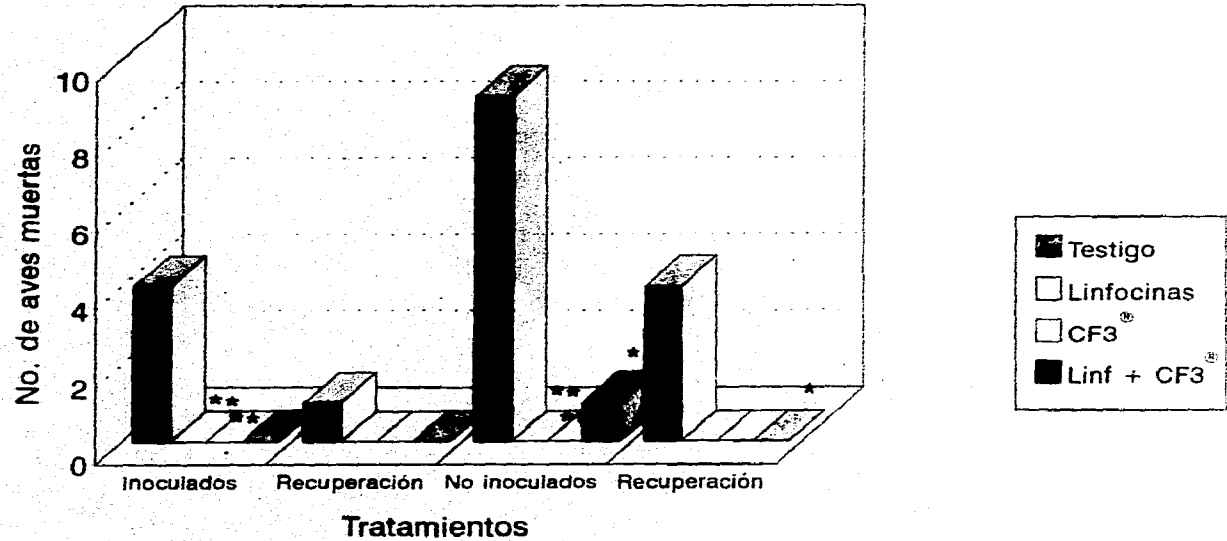
| GPO | TRATAMIENTO | INOCULADOS | | NO INOCULADOS | | TOTAL DE RECUPERACIÓN | |
|-----|--------------------------|------------|---------|---------------|-------|-----------------------|-------|
| | | H-B | TONS | H-B | TONS | H-B | TONS |
| 1 | TESTIGO | 12/17 | 16/17 | 14/30 | 15/30 | 26/47 | 31/47 |
| 2 | LINFOCINAS | 4//20* | 12/20** | 9/39*** | 25/39 | 13/59* | 37/59 |
| 3 | CF3 [®] | 1/20* | 2/20* | 1/40* | 2/40* | 2/60* | 4/60* |
| 4 | LINF. + CF3 [®] | 0/20* | 0/20* | 2/35* | 1/35* | 2/55* | 1/55* |

a= Valores expresados como número de aves positivas sobre el total de aves evaluadas.

- * P<0.01
- ** P<0.025
- *** P<0.05

ESTE DOCUMENTO
 ESTÁ EN LA
 BIBLIOTECA
 DEL IICA

Figura 1. Mortalidad de aves inoculadas y no inoculadas con *S. gallinarum* 10⁶ UFC/ml previamente dosificadas con diferentes tratamientos y la recuperación de la bacteria.



*P ≤ 0.01

**P ≤ 0.05

Figura 2. Porcentaje de aislamiento en hígado y bazo de las aves sobrevivientes al desafío con *S. gallinarum* a las 48 hrs. después de aplicados los tratamientos en grupos inoculados y no inoculados.

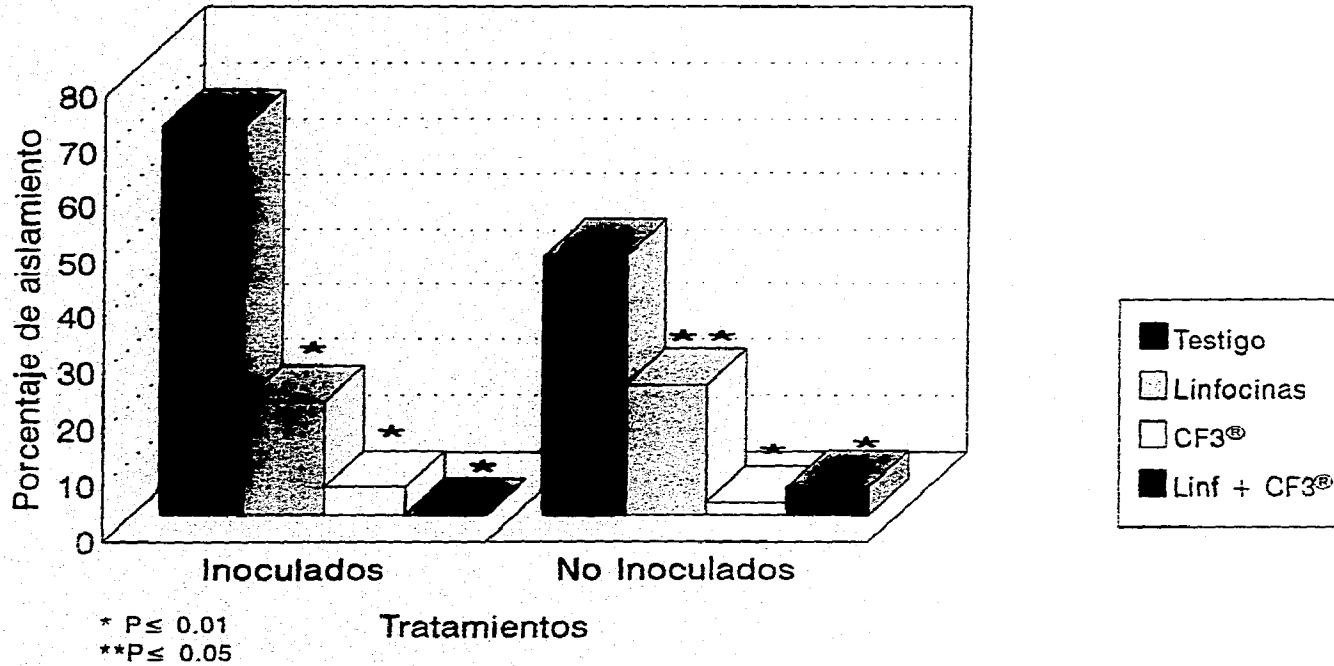
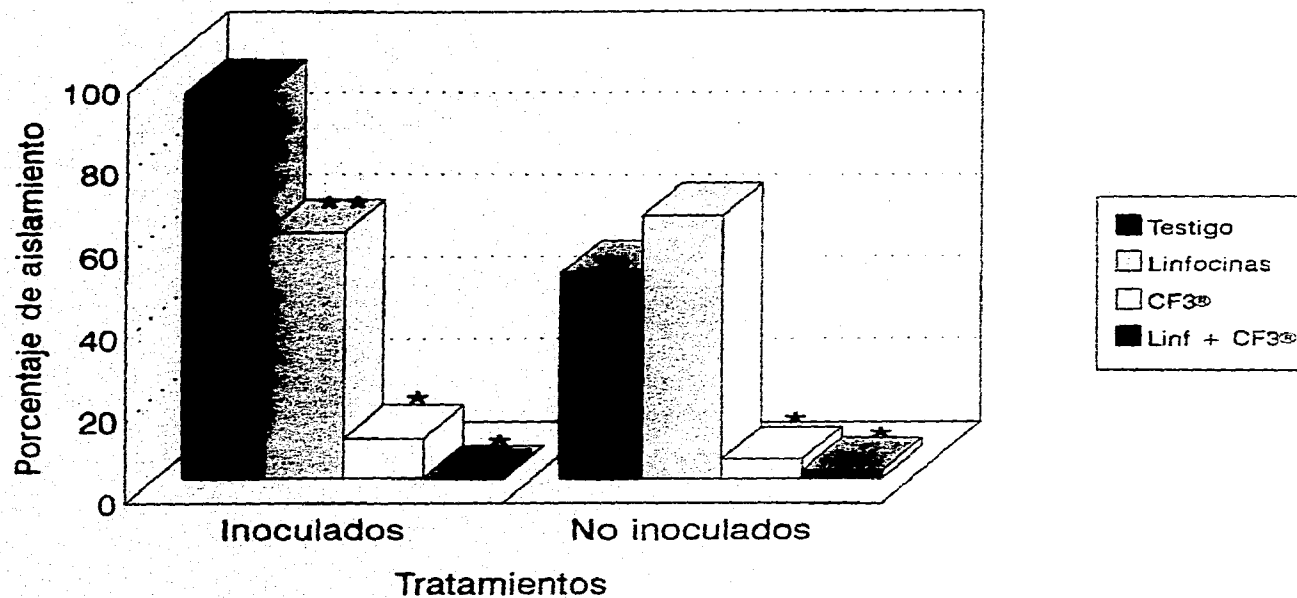


Figura 3. Porcentaje de aislamiento a partir de tonsilas cecales de las aves sobrevivientes al desafío con *S. gallinarum* 48 hrs. después de aplicados los tratamientos en grupos inoculados y no inoculados.



* $P \leq 0.01$
** $P \leq 0.025$

17