

SALMONELOSIS en GALLUS DOMESTICUS

I. La eficacia de la Prueba de Aglutinación de Sangre Total para el diagnóstico de la Pulorosis¹

HANS DIKKEN² y ALEJANDRO CUADRA GERMÁN

Depto. de Patología Animal

Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G.

Se ha demostrado que las pérdidas económicas causadas por la salmonelosis constituyen un serio problema para la industria avícola mexicana (Campos, 1948; Rfo, 1931; Moreno, 1962; Rábago, 1962; Rocha, 1962; Cortez, 1963). No obstante que existen drogas útiles para combatir este grupo de enfermedades, el uso de las mismas no resuelve el problema de la salmonelosis puesto que los animales tratados pueden convertirse en portadores y focos de nuevos brotes de la enfermedad. Existe el riesgo adicional de que los organismos causales adquieran resistencia a las drogas usadas (Manten et al, 1961; Manten et al, 1964). La quimioterapia confiere únicamente un control temporal sobre estas enfermedades y su erradicación depende de la detección y eliminación de los portadores de las parvadas de cría y otras fuentes de infección. Por medio de las pruebas de aglutinación no ha sido posible, sin embargo, erradicar otras infecciones de *Salmonella* diferentes de la *S. pullarum*.

La prueba rápida de aglutinación en placa con sangre total y la prueba de suero en tubo han probado ser eficaces en otros países para la erradicación de la pulorosis (Van Roekel, 1949; Roepke, 1961; Van Roekel, 1964). En México parece ser que los intentos para erradicar la enfermedad sobre bases voluntarias

por medio de la prueba rápida de aglutinación en placa no han tenido éxito (Bachtold, 1963). Los presentes estudios se desarrollaron con el propósito de valorar el uso de la prueba rápida de aglutinación de sangre total como medio de erradicar la pulorosis en México.

Materiales y métodos

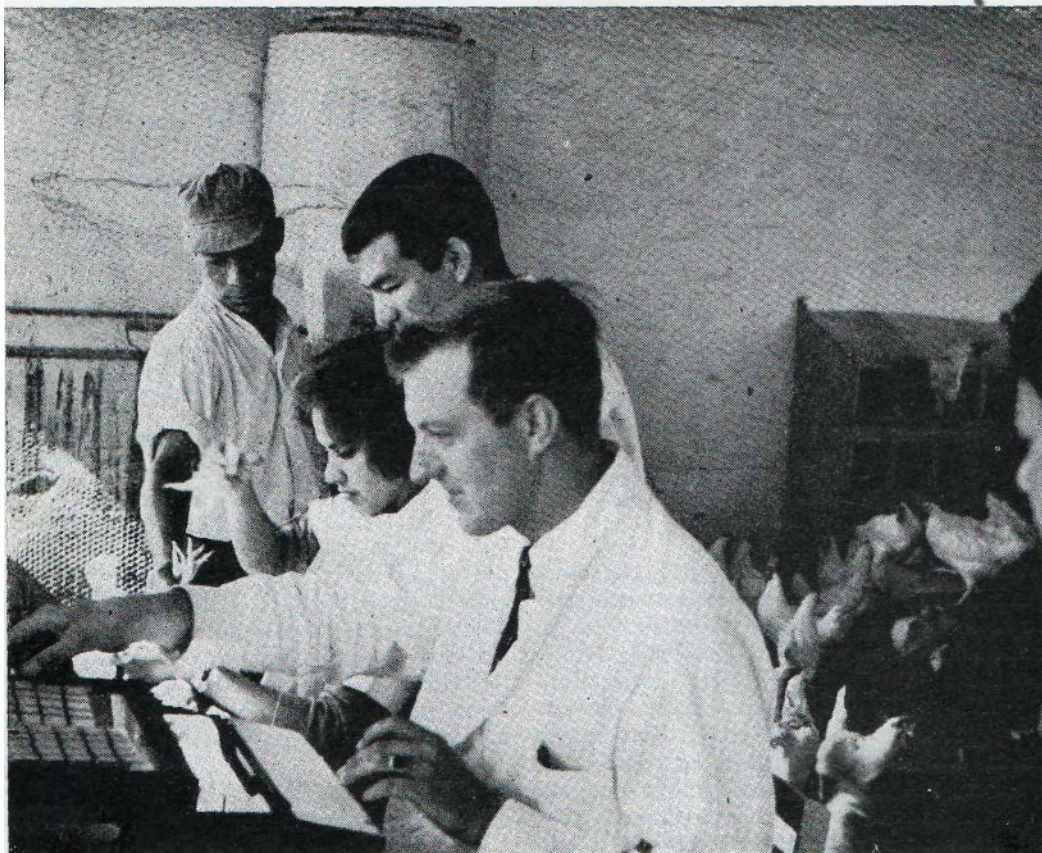
La eficacia de los diversos antígenos de preparación comercial disponibles en México para el diagnóstico de la pulorosis por medio de las pruebas de aglutinación de sangre total se investigó bajo condiciones de laboratorio y de campo.

Experimento 1

Se estudiaron cuatro diferentes antígenos comerciales utilizados en el Valle de México y un antígeno elaborado localmente con fines experimentales. Se numeraron éstos del 1 al 5. Se obtuvieron dos frascos de cada antígeno y se guardaron bajo temperaturas normales de refrigeración, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método usado para examinar la eficacia de los antígenos fue una modificación al usado en el Centraal Diergeneskunding Instituut (C.D.I.) Holanda, para la estandarización del antígeno de *Salmonella*

¹ Esta investigación fue realizada en colaboración con la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

² Experto Asociado de la FAO.



Un grupo de técnicos del C.N.I.P. examinando pollas para el diagnóstico de Pullorosis.

Este método modificado se describe a continuación:

A. Prueba de especificidad

Consistió en comparar el tipo de reacción de aglutinación obtenida con el antígeno "Estándar C.D.I." (Recibido del Centraal Diergeneeskunding Instituut Holanda) con la obtenida con los antígenos bajo estudio. Todos los antígenos se probaron contra:

- a) Suero estándar y variante (que aglutina con la cepa estándar y con la cepa variante).
- b) Suero específico-variante (que aglutina únicamente con la cepa variante).
- c) Suero negativo.

Se usaron cantidades iguales de suero y antígeno (0.05 ml). La eficacia de un antígeno se basó en su capacidad para producir, con suero positivo de *S. pullorum*, una aglutinación marcada en grumos color púrpura claramente definidos con aclaramiento de la mezcla circundante de sangre antígeno. Si la reacción ocurría al momento de mezclar la sangre y el antígeno o al minuto de haberse iniciado, ésta se consideró como positiva. Las reacciones granulares pequeñas observadas entre uno y dos minutos se clasificaron como dudosas. Las reacciones observadas después de dos minutos o la ausencia de cambios en la mezcla de sangre-antígeno, se calificó como negativo.

B. Prueba de sensibilidad

Consistió en comparar el título del antígeno "C.D.I." con el de los otros antígenos. Para esta prueba se usaron dos sueros:

- a) Suero estándar y variante.³
- b) Suero variante específico.

Se mezclaron 0.05 ml de antígeno con las cantidades de suero indicadas en los Cuadros

³ Los sueros estándar variante y los específicos-variantes, así como el antígeno polivalente preparado de cepas estándar y variante se obtuvieron de Holanda (C.D.I.).

2 y 3. En cada dilución se valoraron los aspectos de la prueba de aglutinación, conforme a la clave que se indica bajo el Cuadro 1. La intensidad del color de la reacción se tomó también en consideración; en cada dilución no debe ser menor de la correspondiente al antígeno estándar del C.D.I.³

Experimento 2

Se hicieron pruebas de aglutinación en placa con sangre total de gallinas reproductoras de más de cinco meses de edad en cinco

Cuadro 1.—Especificidad de aglutinación de varios antígenos de *S. pullorum*

Antígenos 0.05 ml.	Suero Estándar Variante 0.05 ml	Suero Específico Variante 0.05 ml	Suero negativo 0.05 ml
Estándar			
C.D.I.	3	1	—
1	3	—	—
2	3	1,2	—
3 ^a	3	1	—
4	3	1	—
5	3	2	—

CLAVE para los cuadros 1, 2 y 3.
 1 Grumos muy pequeños rodeados de una zona poco clara
 2 Grumos de tamaño medio rodeados de una zona parcialmente clara
 3 Grumos grandes rodeados de una zona casi completamente clara
 4 Grumos grandes rodeados de una zona completamente clara
 ± Grumos muy pequeños rodeados de una zona turbia
 Negativa sin grumos y turbia
 a) Antígeno experimental.

Cuadro 2.—Sensibilidad de aglutinación de varios antígenos de *S. pullorum*

Antígenos	Suero estándar variante, en ml							
	0.05 ml	0.04	0.02	0.01	0.005	0.004	0.002	0.001
Estándar C.D.I.	3	3	3	3	2	1	±	—
1	3	3	3	3	2	1	1. ±	—
2	3	3	3	3	2	1	—	—
3 ^a	3	3	2	2	1	1	—	—
4	3	3	3	3	2	1	±	—
5	4	4	3	3	2	2	1,2	±

Cuadro 3.—Sensibilidad de aglutinación de varios antígenos de *S. pullorum*

Antígeno	Suero específico variante, en ml							
	0.05 ml	0.04	0.02	0.01	0.005	0.004	0.002	0.001
Estándar C.D.I.	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	—	—
2	2	1.2	1	—	—	—	—	—
3 ^a	2	1	±	—	—	—	—	—
4	2	1.2	1	±	—	—	—	—
5	3	2	2	1	1	±	—	—

granjas, cada una con un total de 2,000 a 3,000 aves. En cada una de las tres granjas se examinaron 250 aves, elegidas al azar. En las otras dos granjas se examinaron 126 y 152 aves, respectivamente. El antígeno que en el experimento 1 resultó ser el más sensible fue utilizado en estas pruebas.

En la realización de las aglutinaciones se siguieron minuciosamente las instrucciones correspondientes de la casa productora del antígeno. En cada una de las granjas, 10 de las aves que mostraron la reacción más intensa se llevaron al laboratorio de diagnósticos aviarios, de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en donde se obtuvieron muestras de sangre para hacer una nueva prueba de aglutinación en placa y compararla con la hecha en la granja. Las aves fueron sacrificadas y se hizo una molienda de hígado, corazón, bazo, vesícula biliar, oviducto y ovario de cada animal, y se agregaron 5 g de esta mezcla a 50 ml de caldo tetrionato. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 24 horas. Se hizo un subcultivo en medio de verde brillante el que se incubó otras 24 horas. De aquí, las colonias semejantes a *Salmonella* se inocularon en tubos que contenían Triple Azúcar Hierro (Difco) y aquéllas que se comportaron como bacterias del género *Salmonella* se diferenciaron mediante la prueba de asimilación de carbohidratos. El mismo procedimiento se siguió con muestras individuales de intestino y de contenido intestinal.

Resultados y discusión

Experimento 1

Los resultados se presentan en los Cuadros 1, 2 y 3. Estos fueron iguales al repetir los experimentos usando lotes distintos de antígeno de un mismo laboratorio. Los antígenos 2 y 3 dieron una coloración menos intensa, haciendo más difícil la lectura de la reacción y fueron ligeramente menos sensibles. Uno de los antígenos comerciales (No. 1) no dio ninguna reacción con el suero variante de *S. pullorum* (Cuadro 3). Como la cepa variante se encuentra altamente difundida en los Estados Unidos y la mayor parte de las aves de cría que hay en México son importadas de dicho país, la falta del factor variante en este antígeno es importante. Los antígenos comerciales Nos. 4 y 5 parecieron dar los mejores resultados. En general, su sensibilidad fue más alta y la coloración más intensa que las de los demás antígenos. Uno de los antígenos (No. 5) se mostró particularmente sensible. Este fue usado en las pruebas hechas en las granjas.

Experimento 2

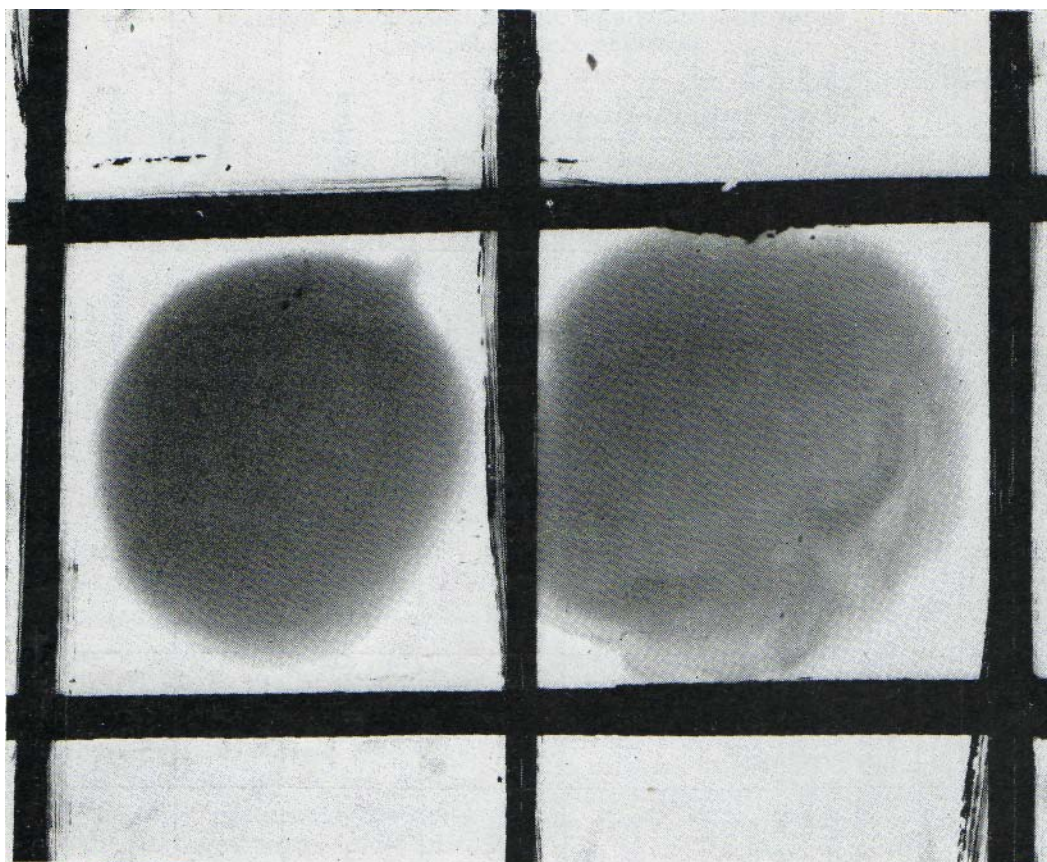
De las pruebas de aglutinación de las aves llevadas al laboratorio (Cuadro 4) y hechas en el mismo, se encontró que aproximadamente el 50% de las reacciones positivas y dudosas encontradas en la granja fueron aparentemente falsas positivas. La lectura de reacciones falsas positivas y dudosas pueden haber sido causadas por partículas de polvo o debidas al uso de equipo inadecuado. Notamos que en México durante los meses calurosos no es necesaria una lámpara para ca-

Cuadro 4. — Resultado de las pruebas de aglutinación en placa, Efectuadas en el campo y en el laboratorio y de los Intentos de aislamiento de Salmonella.

Granja	PRUEBAS DE CAMPO					PRUEBAS DE LABORATORIO				
	No. de aves estudiadas	No. de aves con reacción positiva o dudosa	Aves con reacción positiva o dudosa %	No. de aves remitidas al Lab. Para examen post-mortem	Resultados de la reaglutinación en placa con sangre entera		Aislamiento		Reacción de aglutinación cuando fue aislada Salmonella en aves	
					Positiva o dudosa	Negativa	Organos	Intestinos		
I	250	20	8	10 ^a	5	4	Neg.	S. móvil Aisl. de un ave	dudosa	
II	252	35	13.9	10	5	5	S. móvil aisl. de un ave	neg.	dudosa	
III	126	15	11.9	10	5	5	neg.	S. móvil aisl. de un ave	dudosa	
IV	152	16	10.5	10	6	4	+ S. móvil aislada de un ave	+ +	positiva	
V	250	55	24.4	10	10	0	+ S. pullorum aislada de nueve aves	+ +	positiva	

+ Las salmonellas móviles aisladas se identificaron por fermentos por para las series de placas

(A) Una ave murió y no fue posible hacerle la necropsia.



La prueba rápida de aglutinación en placa con sangre total. Reacción negativa (sin grumos).

lentar la platina usada para la aglutinación, porque la temperatura de la placa de vidrio aumenta demasiado causando la desecación de la mezcla sangre-antígeno y por consiguiente dificulta la lectura de la reacción.

En cada una de las cuatro granjas primeramente visitadas, una de las diez aves llevadas al laboratorio era portadora de una salmonela móvil, por tanto no podía ser ni *S. pullorum* ni *S. gallinarum*. Tres de estas aves dieron en el laboratorio reacciones dudosas a la prueba de sangre total y un ave dio reacción positiva. En dos casos se aislaron estas salmonelas del intestino, en un caso de los órganos⁴ y en el otro de los órganos y el intestino.

Un brote de pulorosis estaba afectando a la granja V. Las reacciones de las aves a la prue-

⁴ Corazón, bazo, hígado, vesícula biliar, oviducto y ovario, inoculados en la misma botella.

ba de sangre total en esta granja fueron intensas y rápidas y se encontraron muy pocas reacciones dudosas en ella. Cuando se hicieron las reacciones de aglutinación en el laboratorio no se encontraron discrepancias con los resultados de las aglutinaciones hechas en la granja. En esta granja se aisló *S. pullorum* de los órganos de 9 de las 10 aves llevadas al laboratorio. Se aisló también *S. pullorum* de los intestinos en 7 de estas aves

Conclusiones

Experimento 1

Aunque los resultados referidos aquí se basan en un número limitado de muestras,

podemos concluir que la sensibilidad y especificidad de los distintos antígenos comerciales disponibles en México son variables. Esto hace difícil y confusa la interpretación de las pruebas de aglutinación. Quizá sea aconsejable utilizar antígenos estandarizados en México con objeto de erradicar la pulorosis.

Experimento 2

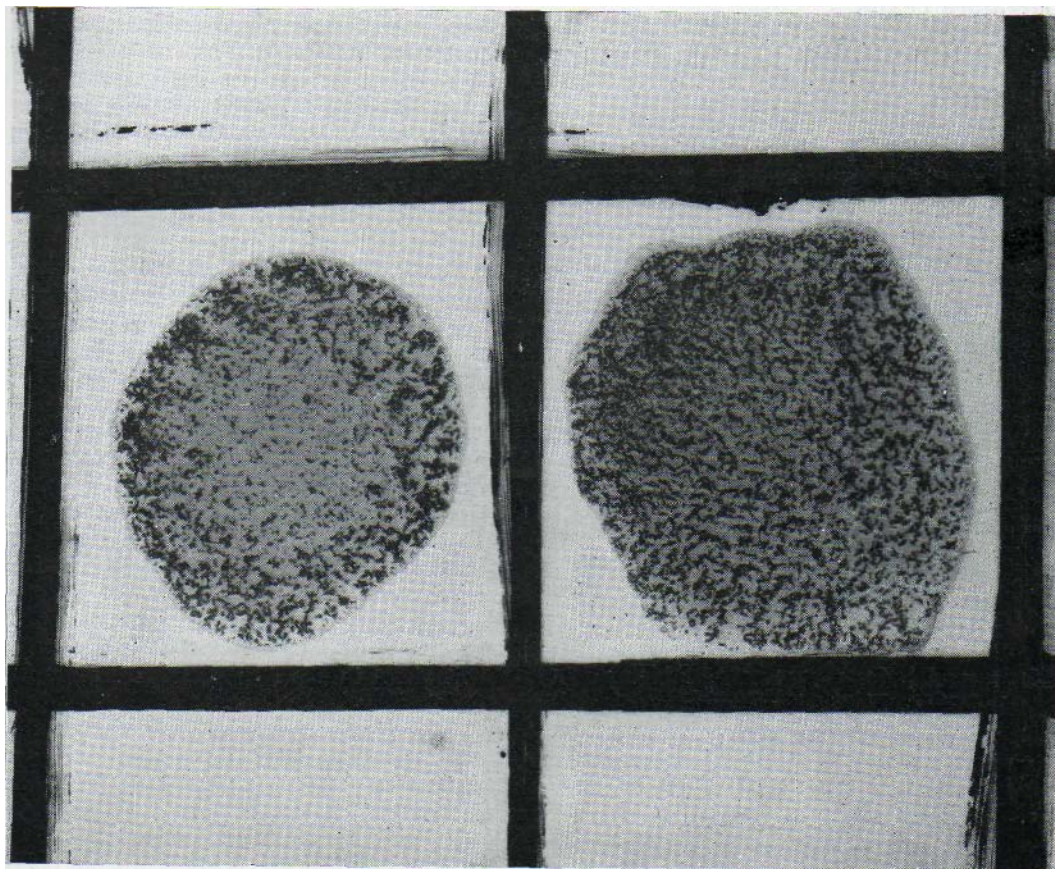
La comparación entre las pruebas de aglutinación desarrolladas en las primeras cuatro granjas y las efectuadas en el laboratorio muestran que aproximadamente el 50% de las lecturas de las reacciones positivas y dudosas fueron aparentemente falsas positivas. El polvo, la temperatura elevada y el equipo ineficiente (foco para calentar la placa de vidrio) pueden ser la causa de la dificultad

para leer las reacciones de aglutinación en el campo.

Los resultados indican la necesidad que existe de investigar la eficacia de la prueba de suero en tubo y la prueba de suero en placa bajo las condiciones que prevalecen en México para la erradicación de la pulorosis.

Resumen

Se realizaron dos experimentos. En el experimento número uno se probó, según una modificación al método usado por el Cent-Diergeneeskunding Instituut de Holanda, la sensibilidad y especificidad de cinco antígenos de *S. pullorum* para la prueba rápida en placa con sangre total. La sensibilidad y especificidad de los antígenos probados fue variable. Uno de los antígenos comerciales usa-



La prueba rápida de aglutinación en placa con sangre total. Reacción positiva (con grumos).

dos no dio ninguna reacción con el suero variante de *S. pullorum*. Se observó también una diferencia en la coloración de la mezcla antígeno-sangre. Se sugiere la estandarización de antígenos de *S. pullorum* en México.

En el experimento número dos se emplearon un total de 1,030 aves escogidas de 12,000 a las que se hizo la prueba de aglutinación rápida en placa con sangre total, usando el antígeno que en el experimento uno resultó ser más sensible. Diez de las aves que mostraron reacción más intensa de cada una de las cinco granjas fueron llevadas al laboratorio en donde se obtuvieron muestras de sangre para repetir la prueba de aglutinación. Las aves fueron sacrificadas y se obtuvieron

muestras para su examen bacteriológico. Un total de cuatro aves eran portadoras de una salmonela móvil y nueve eran portadoras de *S. pulloium*; estas nueve aves pertenecían a una granja en la que había un brote de pulorosis.

Al comparar las pruebas de aglutinación efectuadas en el laboratorio y en las cuatro primeras granjas se observó que aproximadamente el 50% de las pruebas calificadas como positivas y dudosas en las granjas fueron negativas en el laboratorio. El polvo, la temperatura elevada y el equipo ineficiente pueden ser la causa de las reacciones falsas positivas.

Literatura citada

- BACHTOLD GÓMEZ, E., 1963. Comunicación personal.
- CAMPOS NIETO, E., 1948. Contribución al estudio de la incidencia de salmonelosis aviaria en el Distrito Federal. Tesis profesional. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F.
- CORTEZ MIRANDA, E., 1963. Contribución al estudio estadístico de la frecuencia relativa de las enfermedades aviarias entre sí en el Valle de México. Tesis profesional. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F.
- MANTEN, A., KAMPELMACHER, E. H. y GUINÉE, P. A. M., 1961. Incidence of resistance to chloramphenicol and tetracyclines among 11981 *Salmonella* strains isolated in 1960. *Antonie van Leeuwenhoek*. 27:103.
- MANTEN, A., KAMPELMACHER, E. H. y GUINÉE, P. A. M., 1964. Frequency of resistance to tetracycline and chloramphenicol among *Salmonella* strains, isolated in the Netherlands during 1962. *Tijdschr. Diergeneesk.* 88:1858.
- MORENO MELÉNDEZ, I., 1962. Explotaciones avícolas y principales enfermedades de las gallinas en Colima. Tesis profesional. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F.
- RÁBAGO MARTÍN, A., 1962. Estudio del desarrollo y epizootiología de la avicultura en los Altos de Jalisco. Tesis profesional. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F.
- RÍO PÉREZ, M. del, 1931. Algunas consideraciones sobre la infección de las gallináceas domésticas por la *Salmonella pullorum*. Tesis profesional. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F.
- ROCHA RODRÍGUEZ, E., 1962. Datos sobre la incidencia de salmonelosis en el Distrito Federal y diagnóstico diferencial en la *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*. Tesis profesional. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F.
- ROEPKE, W. J., 1961. Der Geflügelgesundheitsdienst in den Niederlanden. *Archiv für Geflügelkunde*. 25:219.
- VAN ROEKEL, H., 1949. Progress in pullorum disease control in poultry. *J. A. V. M. A.* 115:475.
- VAN ROEKEL, H., 1964. Is eradication of pullorum disease realistic? *J. A. V. M. A.* 114:19.

SALMONELLOSIS EN GALLUS DOMESTICUS

En el primer experimento fueron examinados cinco antígenos diferentes de **S. pullorum**, por medio de la prueba de aglutinación en placa con sangre total, en relación a su especificidad y sensibilidad por medio de una modificación del método usado en el Centraal Diergenneeskunding Instituut de Holanda. Las pruebas muestran una diferencia en sensibilidad, especificidad y coloración de los antígenos. Esto sugiere la conveniencia de usar antígenos estandarizados en México.

En el segundo experimento, se seleccionaron al azar gallinas reproductoras de cinco granjas y por medio de la prueba de aglutinación de sangre total se buscaron anticuerpos de **S. pullorum**. De cada granja se tomaron 10 aves que mostraban las mejores reacciones positivas. Se llevaron al laboratorio donde se obtuvieron muestras de sangre para pruebas de aglutinación para comparar la prueba del laboratorio con la efectuada en la granja. Los resultados muestran que aproximadamente 50% de las reacciones positivas y dudosas encontradas en el campo fueron aparentemente falsas ;positivas. Posteriormente, las aves fueron sacrificadas y examinadas bacteriológicamente buscando la existencia de Salmonella.

H. DIKKEN y A. CUADRA GERMÁN, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., México, D. F.

Téc. Pec. en México.4:7-14 (1964)

SALMONELLOSIS EN GALLUS DOMESTICUS

Lors de la première expérience furent examinés 5 antigènes différents de **S. pullorum**, au moyen de plaque aglutinée de sang complet, en relation a sa spécifique et sensibilité, recourant à une modification de la méthode employée à la Centraal Diergenneeskunding Instituut de Hollande. Les preuves démontrent une différence en sensibilité, spécification et coloration des antigènes. Ceci démontre l'utilité d'employer des antigènes standardisés à México.

Lors de la seconde expérience, il fut selectionné au hasard des volailles reproductrices de 5 fermes différentes et au moyen de la preuve de l'aglutination de sang complet il fut recherché les anticorps de **S. pullorum**. De chaque ferme il fut prélevé 10 volailles qui démontraient les meilleures réactions positives. Conduites au laboratoire ou on préleva des échantillons de sang pour essai d'aglutination, on effectua une comparaison entre les échantillons de laboratoire et ceux de la ferme. Les résultats démontrent que aproximativement 50% des réactions positives et douteuses trouvées sur le champ furent apparament de fausses réactions positives. Dans la suite les volailles furent tuées et examinées bactériologiquement recherchant l'existence de Salmonella.

H. DIKKEN y A. CUADRA GERMÁN, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., México, D. F.

Téc. Pec. en México. 4:7-14 (1964)

SALMONELLOSIS IN GALLUS DOMESTICUS

In the first experiment five different **S. pullorum** antigens suitable for the whole blood test, were tested for their specificity and sensibility by a modification of the method used at the Centraal Diergeneeskunding Instituut of Holland. The test showed a difference in sensibility, specificity and staining of the antigens. This suggests the convenience in using standardized antigens in México.

In the second experiment chickens used for breeding were selected, at random, from five farms and tested by means of the whole blood test for **S. pullorum** antibodies. From each farm, ten of the birds showing the strongest positive reactions were selected and taken to the laboratory where additional blood samples were taken for agglutination tests in order to compare the laboratory test with that carried out on the farm. The results show that approximately 50% of the positive and doubtful reactions encountered in the field were apparently false-positive. Afterwards, the birds were killed and examined bacteriologically for the existence of Salmonella.

H. DIKKEN y A. CUADRA GERMÁN, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., México, D. F.

Téc. Pec. en México. 4:7-14 (1964)

SALMONELLENERKRANKUNG IN GALLUS DOMESTICUS

In dem ersten Experiment wurden auf Grund der Totalblutagglutinationsprobe fünf verschiedene Antigene von **S. pullorum** in Bezug auf ihre Spezifität und Empfindlichkeit unter Anwendung einer Modifikation der Methode des Centraal Diergenneeskunding Instituut, Holland, untersucht. Man stellte einen Unterschied Spezifität, Empfindlichkeit und Färbung der Antigene fest. Auf Grund dieser Ergebnisse erscheint es angebracht, Antigene zu benutzen, die in Mexiko standardisiert worden sind.

In dem zweiten Experiment wurden in fünf Hühnerfarmen beliebige Reproduktionshennen durch die Totalblutagglutinationsprobe auf Antikörper gegen **S. pullorum** untersucht. Es wurden von jeder Farm die 10 Hennen ausgewählt, welche die besten positiven Reaktionen ergaben. Sie wurden nach dem Laboratorium gebracht, wo man die Agglutinationsprobe wiederholte, um die auf der Farm und im Laboratorium erzielten Ergebnisse vergleichen zu können. Man stellte daraufhin fest, dass ungefähr 50% der positiven und fraglichen Reaktionen auf der Farm, falsche positive Reaktionen gewesen waren. Zum Schluss wurden die Tiere getötet und bakteriologisch untersucht, um das Vorhandensein von **Salmonella spp.** festzustellen.

H. DIKKEN y A. CUADRA GERMÁN, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., México, D.F.

Téc. Pec. en México." 4:7-14 (1964)