

EVALUACIÓN DE LA VACUNA 9R LIOFILIZADA, PARA PREVENIR LA INFECCIÓN POR *Salmonella gallinarum*

M.V.Z. JOSÉ E. ESPINOSA C.¹
M.V.Z. RICARDO FLORES C.¹
M.V.Z. CARLOS PIJOAN A.¹

Resumen

Se evaluaron las siguientes características de la vacuna 9R contra tifoidea aviar: Capacidad de estimular la producción de anticuerpos aglutinantes contra *S. pullorum*, eliminación a través del huevo y las heces, influencia sobre la capacidad de producción de huevo y peso del mismo y efectividad para prevenir la infección experimental. La vacunación de aves a las nueve semanas y revacunación a las 18 semanas de edad no estimuló la producción de aglutininas. No se aisló la cepa vacunal a partir de huevo y heces de animales vacunados. No produjo disminución de la producción de huevo y ni del peso del mismo. La vacunación protegió cuando menos al 70% (<0.01) de las aves vacunadas.

La tifoidea aviar es una enfermedad que ocasiona constantes pérdidas a la avicultura en México. Esta infección es causada por *Salmonella gallinarum* y se diagnostica con mucha frecuencia en este país (Dikken, 1967). El control de este padecimiento reviste serios problemas, puesto que la existencia de aves portadoras, en áreas enzoóticas, causa una constante diseminación del agente causal a nuevas parvadas susceptibles.

Existe una vacuna viva, atenuada, de *Salmonella gallinarum*, que fue desarrollada por Williams-Smith (1956), por medio de pases continuos de una cepa lisa, la 9S, en medios semisintéticos los cuales fueron incubados a 20°C; en esta forma se logró atenuar el germen. Además, empleando un bacteriófago, se estimuló la producción de colonias rugosas, las cuales se emplean para producir la vacuna, por lo que a ésta se le conoce como 9R.

Gordon, Garside y Turkey (1959) aislaron la cepa vacunal de una pequeña cantidad de huevos, pero demostraron que el número de salmonelas no se incrementó con la incubación, por lo que se consideró que el peligro de transmisión a otros embriones era reducido. Encontraron además que la vacuna se mantuvo estable sin que hubiera regresión a la virulencia.

En el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (I.N.I.P.), se ha producido vacuna

Recibido para su publicación el 10 de julio de 1975.

¹ Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG, km 15.5 Carretera México-Toluca, México, DF.

9R en forma experimental durante varios años (Dikken, 1967), modificándose en ciertos aspectos la técnica de producción descrita originalmente. En la actualidad se elaboran lotes de vacuna liofilizada (Flores, 1971), los cuales se han empleado en fase experimental en pequeñas explotaciones avícolas.

Se han realizado numerosas investigaciones referentes a la efectividad de la vacuna 9R para proteger aves contra la tifoidea aviar, sin embargo, la mayoría de estos trabajos se realizaron empleando la vacuna en forma líquida. Algunos autores que emplearon la vacuna en forma liofilizada encontraron que ésta confería una protección más pobre que la vacuna en forma líquida (Gordon y Lucke 1959, Gordon, Garside y Turkey, 1959; Dikken, 1967).

El objetivo de este trabajo fue evaluar las siguientes características de la vacuna 9R liofilizada, que se produce en el I.N.I.P.:

- a) Estimulación de la producción de anticuerpos aglutinantes en aves vacunadas.
- b) Eliminación de la cepa vacunal en heces y huevo de gallinas vacunadas a las 9 semanas y revacunadas a las 18 semanas.
- c) Influencia de la vacuna sobre la capacidad de postura y peso del huevo.
- d) Efectividad para proteger aves vacunadas, ante la infección experimental con una cepa patógena de *Salmonella gallinarum*.

Material y métodos

Para la realización de este trabajo se efectuaron 2 experimentos:

I. En el primer experimento se emplearon 3 grupos de gallinas raza Leghorn, con 60 animales en cada uno. Los grupos se formaron al azar. En el primer grupo, todas las aves fueron vacunadas con 1.0 ml de vacuna 9R por vía subcutánea, cuando tenían 9 semanas de edad. Las 60 aves del segundo grupo se vacunaron de forma similar, a la edad de 9 semanas y fueron revacunadas a las 18 semanas de edad. El tercer grupo de aves se dejó como control sin vacunar. Todos los grupos se sometieron a las mismas condiciones de manejo y alimentación. A partir de la primera vacunación, se observaron diariamente los animales con el fin de determinar la inocuidad de la vacuna. Las aves de estos 3 grupos fueron empleadas para evaluar las siguientes características:

Estimulación de la producción de anticuerpos aglutinantes. Todas las aves de los 3 grupos fueron sangradas antes de la vacunación, así como a los 45 y 135 días después de la misma. Las muestras de sangre fueron empleadas para realizar pruebas de aglutinación con antígeno "K" polivalente, de *Salmonella pullorum*. Sólo se emplearon en el experimento aves que resultaron negativas a esta prueba.

Eliminación de la cepa vacunal en las heces. Se dejaron transcurrir 10 días después de la primera vacunación y a continuación se inició un muestreo de contenido cloacal por medio de hisopos estériles, obteniendo muestras de 15 aves de cada grupo, escogidas al azar. Este muestreo se realizó en 15 ocasiones, con intervalos de dos semanas entre cada uno, lo que hizo un total de 225 muestras de cada grupo.

Eliminación de la cepa vacunal a través de huevo. Cuando las aves de los 3 grupos rompieron postura, se colectaron al azar 10 huevos de cada grupo; esto se hizo en 11 ocasiones, obteniéndose un total de 110 huevos de cada uno de los grupos.

Efecto de la vacuna sobre la capacidad de producción de huevo. Esta evaluación se efectuó con base en los registros diarios de producción y peso del huevo, durante 210 días.

Las cifras obtenidas fueron sometidas a estudios estadísticos utilizando X^2 .

II. La segunda fase del experimento se llevó a cabo con objeto de estudiar la efectividad de la vacuna, para prevenir la infección experimental causada por *Salmonella gallinarum*. Se utilizaron 2 grupos de gallinas de raza Harco Sexlinked. Uno de ellos tenía 50 gallinas que fueron vacunadas por vía subcutánea, con 1.0 ml de vacuna 9R; el otro grupo, de 47 aves, se dejó como testigo sin vacunar. Las 97 gallinas fueron desafiadas a la edad de 32 semanas, aplicando por vía oral a cada una de ellas, 1.0 ml (20 DL 50%) de suspensión, de una cepa patógena de *Salmonella gallinarum* previamente titulada. El desafío se realizó siguiendo el método descrito por Williams Smith (1956).

Después de la exposición, las aves se observaron diariamente con objeto de registrar los signos clínicos característicos de la enfermedad. A cada una de las aves muertas se les practicó la necropsia, se observaron lesiones y se colectaron, por duplicado, muestras de: hígado, bazo, vesícula biliar, ovario e intestino. Una muestra de cada tejido fue destinada a estudio histopatológico, mientras que la otra se sometió a exámenes bacteriológicos.

Examen bacteriológico. Los hisopos con muestras de contenido cloacal, al igual que los huevos y tejidos, fueron sembrados en medios de Selenite y tetrathionato; se incubaron 72 horas a 37°C y cada 24 horas se hicieron resiembras a partir de ellos a cajas de Petri conteniendo medio de Verde Brillante o bien medio de Mac Conkey. La identificación bioquímica de *Salmonella pullorum* se hizo de acuerdo a las técnicas descritas por Edwards y Ewing (1972). Todas las cepas de *Salmonella gallinarum* que se aislaron de los animales en estudio, se procesaron con el método de White y Wilson (1951), para determinar si se trató de la cepa vacunal *Rugosa*, o bien de una cepa patógena *Lisa*.

Resultados

Pruebas serológicas. Todas las aves empleadas fueron negativas a las pruebas serológicas de aglutinación, practicadas antes de la vacunación. En ninguna de las aves se detectaron anticuerpos aglutinantes en las 2 pruebas realizadas después de la vacunación.

Estudio bacteriológico de heces y huevo. Los resultados de los exámenes bacteriológicos practicados a partir de hisopos cloacales y huevos se presentan en el Cuadro 1. Solamente en una muestra de contenido cloacal fue posible aislar *Salmonella gallinarum*, sin embargo, mediante el método de White y Wilson (1951) se encontró que era una cepa lisa, lo cual es indicio de que no se trató de la cepa vacunal. No se logró el aislamiento de *Salmonella gallinarum* a partir de los 330 huevos estudiados.

CUADRO 1

Aislamiento de la cepa 9R a partir de contenido cloacal y huevo

TRATAMIENTO	Número de muestras positivas al aislamiento de salmonella gallinarum	
	Contenido cloacal	Huevos
Testigos	1/225*	0/110
1 vacuna	0/225	0/110
2 vacunas	0/225	0/110
TOTAL	1/675	0/330

* El aislamiento no corresponde a la cepa vacunal.

Registros de producción. Los resultados de los análisis estadísticos, correspondientes a los registros de producción y peso del huevo, se presentan en el Cuadro 2. No existieron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) respecto a porcentajes de postura ni a peso del huevo, entre ninguno de los grupos estudiados.

Resultados de la prueba de exposición. El cuadro número 3 presenta los resultados de la prueba de desafío. Se encontró que la vacuna protegió cuando menos al 70% de las aves vacunadas, ante una dosis de exposición que mató al 91.5% de las aves testigo. Estos resultados indican que sí existió una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre ambos grupos. Siempre fue posible el aislamiento de *Salmonella gallinarum*, cepa lisa, a partir de órganos y tejidos de las aves que murieron durante el experimento. En ninguna ocasión se logró aislar la cepa vacunal.

CUADRO 2

Efecto de la vacunación con 9R sobre la producción de huevo

TRATAMIENTO	DATOS DE 210 DÍAS		
	Número de huevos/ave	Porcentaje de postura	Peso promedio del huevo /g
Testigo	108	51.6	52.0
1 vacuna	103	48.9	53.5
2 vacunas	120	57.1	53.9

No hubo diferencia estadística ($P < 0.05$) en peso del huevo ni porcentaje de postura para los diferentes tratamientos.

CUADRO 3

Protección conferida por la vacuna 9R ante la exposición experimental con una cepa patógena de Salmonella gallinarum¹

GRUPOS DE AVES	Número de aves	Número de aves muertas	Porcentaje de mortalidad
Vacunas	50	15	30 ²
Testigos	47	43	91.5 ²

¹ 100 millones de bacterias vivas/ml (20 DL 50%) vía oral.

² La diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.0$).

Discusión

El hecho de que las pruebas de aglutinación con sangre completa posteriores a la vacunación fueran negativas, confirma las observaciones de Córdón, Garside y Turckey (1959) en el sentido de que la vacuna 9R no produce aglutininas que interfieran con las pruebas de diagnóstico.

En el presente experimento se encontrará que en ninguna de las muestras de contenido cloacal ni en huevo se aisló la cepa vacunal de *Salmonella gallinarum*, lo que es indicio de que esta cepa no es comúnmente eliminada por vía digestiva ni transovárica. Estos resultados coinciden con las publicaciones de otros investigadores (Williams-Smith 1956. Dikken 1967).

El análisis estadístico de los registros de postura reveló que la vacuna no produce efectos secundarios indeseables sobre la capacidad de las aves vacunadas en la producción del huevo ni sobre el peso del mismo.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron una inmunidad satisfactoria con la vacuna liofilizada, puesto que protegió al 70% de las aves contra una dosis que mató al 91.5% de las aves control. Este sugiere la posibilidad de que se obtenga una mayor inmunidad al emplear la vacuna en explotaciones comerciales puesto que en caso de infección natural las cantidades del germen infeccioso nunca son tan elevadas como las empleadas en condiciones experimentales.

Summary

The following different factors of the 9R vaccine against fowl typhoid were evalua-

Literatura citada

DIKKEN, H., 1967, El uso de una vacuna preparada con la cepa 9R de *Salmonella gallinarum* en el control de la Tifoidea Aviar, *Téc. Pec. Mex.*, II (9) : p. 11-14.

EDWARDS, P.R. and W.H. EWING, 1972, en: Identification of Enterobacteriaceae, W.H. 3 ed. Ed. Ewing, Burgess Publishing Company, New York.

FLORES, S.R., 1971, Producción de Vacuna Liofilizada 9R contra la tifoidea aviar, *Resúmenes de la VIII Reunión Anual del INIP*.

GORDON, R.F., J.S. GARSIDE and J.F. TURCKEY, 1959,

Stimulation of agglutinines, elimination through eggs or feces, influence on the average number and weight of the eggs and prevention of the experimental disease. The vaccine did not stimulate agglutinin production in hens vaccinated at 9 weeks and revaccinated at 18 weeks of age. The 9R strain was not isolated from eggs or feces. There was no influence over the production or the weight of eggs.

More than 70% ($P < 0.01$) of the vaccinated hens resisted the experimental infection.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Ernesto Avila, a todo el personal del Departamento de Avicultura del INIP y al Dr. Ricardo Cuecos, por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

The use of living attenuated vaccines in the control of fowl Typhoid, *Vet. Rec.*, 71 (15) 300-305.

GORDON, W.A.M. and D. LUCKE, 1959, A note on the use of 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks, *Vet. Rec.*, 71:926-927.

WHITE, P.G. and J.B. WILSON, 1951, Differentiation of Smooth and nonsmooth colonies of Brucellae, *J. Bact.*, 61 (2): 239-240.

WILLIAMS-SMITH, 1956, The use of live vaccines in experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens with observations on their interference effects, *J. Hyg.*, 54 (3) : 419-432.