

EXCLUSION DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* DEL TRACTO DIGESTIVO DE POLLOS DE UN DIA DE EDAD POR ACCION COMPETITIVA DE LA FLORA INTESTINAL NORMAL OBTENIDA DE CAMA DE GALLINAS REPRODUCTORAS

Sergio Rosende O. (MV), María Inés Fernández H. (MV)

EXCLUSION OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* FROM ONE DAY CHICKENS GUT BY COMPETITIVE ACTION OF NORMAL GUT FLORA FROM BREEDING HENS LITTER

*The gut colonization of one day old chickens by normal gut bacterial flora supplied by breeder litter extract and its later capacity to inhibit the development of *Salmonella typhimurium* was studied.*

*Chicks pretrated with litter extract showed a significant ($p < 0,01$) resistance to *S. typhimurium* in relation to non pretrated chicks. No significant differences were observed among the weight means of the four groups ($p > 0,01$). The resistance was a consequence of the one day gut colonization by normal gut bacteria flora supplied by the breeder litter extract.*

La flora bacteriana intestinal normal de aves (FBINA), es una compleja y dinámica población de microorganismos. En condiciones de crianza natural, esta microflora, según Jayne-Williams y Fuller (1971), 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 denominado por Lloyd y Cols. (1977) "Exclusión Competitiva" (EC) fue explicado en un anterior trabajo (Rosende y Juri, 1986).

La oportunidad de que los pollitos, en los modernos sistemas avícolas, se contaminen tempranamente con esta FBINA es escasa. Las prácticas de crianza separada por edad y las óptimas condiciones de higiene, privan a las aves de adquirir esta microflora y su posterior colonización del tracto intestinal. Esta carencia, parcial o total, se traduce en una menor resistencia de las aves a infecciones por bacterias enteropatógenas especialmente salmonelas móviles. La composición de esta microflora intestinal aún no ha sido totalmente determinada, existiendo divergencias en cuanto a su papel

en la EC, Barnes y Cols., 1972, Rigby y Pettit 1979, 1980; fundamentalmente debido a su alta exigencia para multiplicarse "in vitro" al requerir la mayoría de ellas, estrictas condiciones de anaerobiosis, difíciles de obtener y mantener (Barnes e Impey, 1970).

Por las razones expuestas, es difícil obtener a nivel de laboratorio, cultivos puros de FBINA con propiedades de EC, principalmente porque en este proceso interactúan diferentes microorganismos. Se están estudiando diferentes fuentes de excreción fecal con la finalidad de colonizar el tracto digestivo de pollos recién nacidos (Salanitro y Cols., 1973). El presente trabajo pretende determinar si un extracto de cama de gallinas es una fuente adecuada, práctica e inocua de FBINA.

MATERIAL Y METODOS

Material

Flora Bacteriana Intestinal Normal de Aves: Se obtuvo a partir de la cama de un corral de gallinas reproductoras broiler, de 36 semanas de edad, libres de salmonelas.

Aves en Experiencia: Se utilizaron 140 machos Leghorn de un día de edad, obtenidos en un criadero comercial, libres de salmonelas de acuerdo a an-

Laboratorio de Patología Aviar.
Departamento de Patología Animal.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

tedentes basados en el examen serológico, periódico, del grupo de gallinas reproductoras y al cultivo bacteriológico de 20 pollitos de este grupo experimental. Las aves recibieron alimento de crianza, exento de proteína de origen animal y agua potable. Se mantuvieron en dos criaderos de cinco pisos cada una (Petersime Modelo 255D) ubicados en una dependencia aislada de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Medios de cultivo: Para la detección de salmonelas de origen aviar, se utilizaron los medios de cultivo descritos por Williams y Cols. (1980).

Cepa *Salmonella typhimurium*: Aislada en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y serotipificada en el Instituto de Salud Pública.

Métodos

Controles: Controles bacteriológicos para descartar presencia de salmonelas ajenas a la experiencia, en pollitos, cama de reproductoras y alimento, se realizaron según el método descrito por Williams y Cols. (1980).

a) **Pollitos:** Se sacrificaron 20 pollitos al día de edad, y se tomaron muestras de ciego, hígado, vitelo, corazón y bazo.

b) **Cama de reproductoras:** Se siguió la pauta recomendada por Williams y Cols. (1980). Se determinó cinco puntos de recolección en el corral de las reproductoras; de cada lugar se tomaron cinco porciones de aproximadamente 10 g para constituir una muestra final de 50 g. La muestra fue recolectada desde áreas secas superficiales, alejadas de los comederos y bebederos, y se almacenó en bolsas plásticas.

c) **Alimento:** Se controló cada saco usado en la experiencia, tomándose tres muestras de 30 g cada una por saco de alimento.

Preparación del Extracto de Cama de Gallinas Reproductoras (ECGR): Una vez descartada la contaminación por salmonelas, se recolectaron 20 g de cama, extraída desde la parte profunda. La muestra fue transportada en frascos de vidrio estériles herméticamente cerrados. El tiempo entre la recolección y su procesamiento fue aproximadamente de 12 horas. Los 20 g de cama se mezclaron con 200 ml de suero fisiológico, previamente sometido a ebullición por 20 minutos. Esta mezcla fue homogenizada en licuadora por 1 minuto bajo el flujo continuo de nitrógeno, con el fin de crear y mantener el ambiente de anaerobiosis. El extracto fue filtrado por gasa, obteniéndose lo que constituyó el ECGR usado como pretratamiento.

Diseño Experimental: Con la finalidad de com-

probar la capacidad de exclusión competitiva del ECGR y su inocuidad, las aves experimentales se dividieron en cuatro grupos de 30 aves cada uno, ubicándose en dos grupos por baterías (A y B) dispuestos en lotes de 15 en cada piso para facilitar su manejo y ulteriores controles bacteriológicos. El pretratamiento consistió en la administración de 1,0 ml/ave de ECGR directamente en la ingluvia. El desafío consistió en la administración directamente en la ingluvia de 10^5 células de *S. typhimurium* por ave.

En la batería A, se ubicaron los siguientes grupos:

Grupo 1 (G1): Testigo. Sin pretratamiento ni desafío, a fin de comprobar la ausencia de patologías ajenas a la estudiada y excluir infecciones laterales no deseables por *S. typhimurium*.

Grupo 2 (G2): Pretratados al día de edad con el fin de controlar inocuidad del ECGR.

En la batería B, se distribuyeron los siguientes grupos:

Grupo 3 (G3): Control de la cepa de *S. typhimurium*, desafiados al tercer día de edad. Este grupo se empleó para comprobar la infecciosidad o patogenicidad de la cepa de desafío y la eficiencia de los métodos bacteriológicos utilizados en la detección de la excreción fecal de salmonelas por las aves.

Grupo 4 (G4): Experimental. Pretratadas al día de edad y posteriormente desafiadas al tercer día de edad. Su objetivo fue evidenciar la capacidad de exclusión competitiva del extracto de cama de gallinas reproductoras.

Controles efectuados a los diferentes grupos: Se efectuaron seis controles bacteriológicos, los cuatro primeros con un intervalo de 3 días y los dos últimos semanalmente. Los controles comenzaron al tercer día post desafío, ya que según Lloyd y Cumming (197), los pollos desafiados excretan el inóculo durante los primeros días del ensayo antes que se logre su colonización o excreción total.

Las muestras recolectadas fueron: tómulas cloacales al 100% de las aves y 10 g de fecas de cada grupo, tomando aproximadamente 1 g de cinco áreas distintas de las bandejas receptoras de fecas, en los dos pisos de las baterías que alojaban a cada grupo. Doce horas antes del muestreo, las bandejas receptoras de fecas se limpiaban a fin de obtener material fresco y lo menos posible contaminado con flora ambiental.

Se realizó, como una medida complementaria de detectar posibles efectos observados en los diferentes tratamientos empleados, control de peso de las aves. Se hicieron cinco controles, comenzando al día de edad y cada semana, hasta los 28 días de

edad. Los pesos corporales de los cuatro grupos, se expresaron en términos de promedio de peso de cada grupo.

Análisis estadístico: Los resultados del aislamiento de *S. typhimurium* a partir de tómulas cloacales, se sometieron a una prueba de hipótesis de independencia de chi cuadrado (χ^2) con $p > 0,01$. Se comprobaron los resultados de los grupos 3 y 4. Los resultados de las diferencias de peso vivo promedio de los grupos controles y experimentales se sometieron a un análisis de covarianza y su correspondiente prueba de hipótesis F, con $p > 0,01$ (Calzada, 1964).

RESULTADOS

Las muestras colectadas previo a la experiencia (vísceras de los pollitos, extracto de cama y alimento) resultaron negativas al aislamiento de salmonelas. En el cuadro 1 se resumen los resultados obtenidos del examen bacteriológico de las tómulas cloacales (TC) y fecas (F) frescas. En él se observa que los grupos 1 y 2 se mantuvieron libres de *S. typhimurium* durante toda la experiencia, en cambio, en los grupos 3 y 4 fue posible aislar *S. typhimurium* de las fecas y tómulas cloacales de ambos grupos.

La presencia de salmonelas en las tómulas cloacales de las aves del grupo 4 fue considerablemente menor que el grupo control no pretratadas (G3). En el grupo 4, 24 controles bacteriológicos de tómulas cloacales de un total de 174 (13,79%) fueron positivas; en cambio en el grupo 3, de un total

de 180 cultivos, 169 (93,8%) resultaron positivos. En el grupo experimental 4, en los dos primeros controles, hubo sólo dos aves positivas de 29 controles, aumentando la positividad en los sucesivos controles. En cuanto a los controles bacteriológicos del "pool" de fecas, éstos resultaron positivos en los grupos 3 y 4, salvo en el primer control de este último grupo.

El análisis estadístico de los resultados del examen bacteriológico de las tómulas cloacales de los grupos desafiados 3 y 4, para $p < 0,01$, demostró que existe una significativa relación entre la presencia de ECGR y la resistencia de las aves a la infección con *S. typhimurium*.

En el cuadro 2 se resumen los promedios de los pesos corporales de las aves de cada grupo. Del análisis estadístico se comprueba que las diferencias en los pesos promedios, no son significativas.

DISCUSION

Este estudio, como otros realizados en esta línea, confirman que la flora bacteriana intestinal normal de aves, confiere una significativa protección contra la subsiguiente infección por salmonelas.

Durante el ensayo, la incidencia de infección por *S. typhimurium* medida a través de exámenes bacteriológicos de tómulas cloacales en el grupo experimental (G4), fue considerablemente menor que en el grupo control (G3); en este último grupo, se observó un gran número de aves infectadas por *S. typhimurium*, en contraste al grupo experimen-

CUADRO 1

AISLAMIENTO DE *S. TYPHIMURIUM* DE TORULAS CLOACALES Y FECAS DE POLLOS PRETRATADOS Y NO PRETRATADOS CON EXTRACTO DE CAMA DE GALLINAS REPRODUCTORAS CON O SIN DESAFIO CON *S. TYPHIMURIUM*

Edad (días)	G1		G2		G3		G4	
	TC	F	TC	F	TC	F	TC	F
6	0/30*	—	0/29**	—	29/30	+	2/29	—
9	0/30	—	0/29	—	29/30	+	2/29	+
12	0/30	—	0/29	—	29/30	+	6/29	+
15	0/30	—	0/29	—	29/30	+	5/29	+
22	0/30	—	0/29	—	29/30	+	5/29	+
30	0/30	—	0/29	—	24/30	+	4/29	+
Total	0/180		0/174		169/180		24/174	

* N° aislamientos positivos a salmonela / N° cultivos bacteriológicos realizados.

** Muere un pollo al día de edad por infección saco vitelino.

G1 Testigos sin pretratamiento y desafío.

G2 Pretratadas al día de edad sin desafío.

G3 Sin pretratamiento y desafiado al 3^{er} día de edad.

G4 Pretratadas al día de edad y desafiadas con *S. typhimurium* al tercer día de edad.

CUADRO 2. Pesos promedios de pollitos vivos en diferentes edades de los grupos con o sin pretratamiento con ECGR y con o sin desafío por *S. typhimurium*.

PESO VIVO PROMEDIO (g)				
EDAD (días)	G1	G2	G3	G4
1	36,30	36,48	36,10	36,19
7	62,46	64,00	60,95	62,06
14	116,73	113,13	113,06	118,50
21	168,35	170,81	164,65	170,43
28	225,70	237,03	230,40	244,20

Las diferencias entre los pesos vivos promedios de los cuatro grupos de aves, no son significativos desde el punto de vista estadístico. El estudio se hizo por el Análisis de Covarianza y con pruebas de hipótesis F, con $p < 0,01$. F calculado = 0,3069; F tabular = 5,42 para el mismo nivel de significación.

tal, que en los primeros controles sólo presentó dos aves positivas, aumentando levemente en los sucesivos controles. Estos resultados no son tan concluyentes como los logrados con flora bacteriana normal de ciegos (Rosende y Yuri, 1986), lo que se debe, probablemente, a que la fuente de FBINA de aves es de menor calidad que el contenido del ciego, en donde se encuentra la mayor concentración de microorganismos con capacidad de E C (Hunhtanen y Pensack, 1965).

Los resultados de las muestras de fecas confirman que este método es útil como complemento de los cultivos, es así, como en el grupo 3 (controles desafiados) todos los controles resultaron positivos y en el grupo 4 (experimental) sólo el primer control bacteriológico fue negativo, probablemente por la cantidad de fecas recolectadas que no era suficiente para pesquisar el escaso número de salmonelas excretadas en este nivel del ensayo.

Los grupos controles 1 y 2, no desafiados, mantuvieron negativos los controles bacteriológicos tanto de tómulas cloacales, como de fecas, lo cual permite asegurar que no existió contaminación ajena a la conferida por el desafío.

Los controles de peso de las aves nos permiten asumir que el tratamiento con ECGR no tuvo efecto negativo que se manifieste a través de diferencias de peso. Asimismo, se asume que la patogenicidad de la cepa de *S. typhimurium* es baja, aunque es adecuadamente infectante. Las diferencias que aparentemente existen entre los pesos vivos promedios de los cuatro grupos no son, desde el punto de vista estadístico, significativas (cuadro 2).

A través de los resultados obtenidos, se pudo comprobar que el ECGR constituye una fuente adecuada de FBINA capaz de colonizar el tracto digestivo de pollitos de un día de edad.

Finalmente, aunque los resultados de esta experiencia indican que la administración de ECGR empleada como fuente de FBINA, constituye un método efectivo y práctico, su uso, en forma rutinaria requiere de adecuados controles microbiológicos que detecten la presencia de agentes patógenos no deseables. Por otra parte, el margen de su aplicación con fines preventivos demuestra la necesidad de exponer, en las etapas iniciales de su crianza, a las aves al contacto con una cama que le permita colonizar su tracto digestivo, aproximando de esta forma el manejo a lo que ocurre en condiciones naturales.

RESUMEN

Se estudió el fenómeno de colonización del tubo digestivo de pollos de un día de edad, por la flora bacteriana normal intestinal de aves (FBINA) aportada por un extracto de cama de gallinas reproductoras (ECGR) y su posterior capacidad para impedir una recolonización por *Salmonella typhimurium*.

Las aves pretratadas con ECGR mostraron una significativa ($p < 0,01$) resistencia a la infección con *S. typhimurium*, en relación al grupo no pretratados con ECGR. Ninguno de los tratamientos empleados, tuvo efecto negativo que se expresara a través de diferencias de peso promedio en cada uno de los grupos, al no existir diferencia significativa entre ella ($p > 0,001$). Esta resistencia, resultó como consecuencia de la colonización del tubo digestivo de los pollitos por FBINA aportada por el ECGR.

REFERENCIAS

- BARNES, E.M., C.S. IMPEY. The isolation and properties of the predominant anaerobic bacteria in the caeca of chickens and turkeys. *Br. Poult. Sci.* 11: 467-481, 1970.
- BARNES, E.M., G.C. MEAD, D.A. BARNUN. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br. Poult. Sci.* 13: 311-326, 1972.
- CALZADA, B.J. Métodos estadísticos para la investigación. 2 ed. Lima, 1964. p. 366 - 368.
- HUHTANEN, C.N., J.M. PENSACK. The development of the intestinal flora of the young chick. *Poult. Sci.* 44: 825-830, 1965.
- JAYNE-WILLIAMS, D.J., R. FULLER. The influence of the intestinal microflora on nutrition. In: Bell, D.J., and B.M., Freeman, eds. "Physiology and Biochemistry of the domestic fowl". London, Academic Press, 1971. v. 1; pp. 73 - 91.
- LLOYD, A.B., R.B. CUMMING, R.D. KENT. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Aust. Vet. J.* 53: 82 - 87, 1977.
- RIGBY, C.E., J.R. PETTIT. Some factors affecting *Salmonella typhimurium* infections and shedding in chickens reared on litter. *Avian Dis.* 23: 442-455, 1979.
- RIGBY, C.E., J.R. PETTIT. Observation on competitive exclusion for preventing *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickens. *Avian Dis.* 24: 604-615, 1980.
- ROSENDE, S., M.A. JURI. Exclusión competitiva de *Salmonella typhimurium* en pollitos de un día de edad por la flora bacteriana normal del ciego de aves adultas. *Avances en Ciencias Veterinarias* 1: 26-29, 1986.
- SALANITRO, J.P., J.G. FAIRCHILD, P.A. MUIRHEAD. Intestinal microflora of broiler chicken. In: Proceeding of 22nd Western Poultry Disease Conference and 7th Poultry Health Symposium. Davis, California, Ed. Agr. Extension. University of California, 1973. pp. 86-90.
- WILLIAMS, J.E.; E.T. MALLISON, G.H. SNOEYENBOS. Salmonellosis and Arizoonosis. In: Hitchner, S.B., et al, eds. Isolation and Identification of Avian Pathogens. Texas, American Association of Avian Pathologist, Department of Veterinary Microbiology, 1980. pp. 14-33.

Recibido noviembre 1987, aprobado diciembre 1987.