

Inmunoprofilaxis contra la infección por *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda mediante el uso de linfocinas

Julio César Alfaro Camacho*
Gary García Espinoza*
Rosa Ana Wong González*
Guillermo Téllez Isaías*

Abstract

Broiler chicks were treated prophylactically with the soluble products from concanavalin A-stimulated T-lymphocytes from *Eimeria tenella*-infected chickens in order to study the effect of such prophylactic treatment on organ invasion by *Salmonella enteritidis*. Chicks were randomly assigned in three groups: Group A) experimental group (*S. enteritidis*-infected, treated): at one day of age, chicks were injected intraperitoneally with *E. tenella*-immune lymphokines, and thirty minutes after the lymphokine injection all chicks were challenged *per os* with 10^5 colony-forming units of *S. enteritidis*; Group B) the positive control group (*S. enteritidis*-infected, not treated) and Group C) the negative control group (*S. enteritidis*-not infected, not treated). At 24 hours post-challenge, all chicks were euthanized; liver, spleen and cecal tonsils were collected. Isolation of *S. enteritidis* was attempted from these tissues. The treatment of chicks with lymphokines resulted in reduction of *S. enteritidis* isolation from liver-spleen ($P < 0.05$) but not from cecal tonsils ($P > 0.05$). These results demonstrate that the prophylactic treatment with *E. tenella*-immune lymphokines reduces the *S. enteritidis* organ invasion but not the intestinal colonization in neonatal broiler chicks.

Key words: LYMPHOKINES, BROILER CHICKS, *EIMERIA TENELLA*, *SALMONELLA ENTERITIDIS*.

Resumen

Se investigó el efecto del tratamiento profiláctico de pollos de engorda con productos solubles de linfocitos T estimulados con concanavalina-A, procedentes de aves inmunizadas con *Eimeria tenella*, sobre la invasión de órganos por *Salmonella enteritidis*. Los pollos fueron asignados de manera aleatoria en tres grupos: a) Grupo experimental (tratado, infectado con *S. enteritidis*); las aves fueron inyectadas intraperitonealmente al día de edad con linfocinas procedentes de aves inmunizadas con *Eimeria tenella*. Treinta minutos después de la inyección de linfocinas, las aves fueron desafiadas vía oral con 10^5 unidades formadoras de colonia de *S. enteritidis*; b) grupo testigo positivo (no tratado, infectado con *S. enteritidis*); y c) grupo testigo negativo (no tratado, no infectado con *S. enteritidis*). Todas las aves fueron sacrificadas 24 horas después del desafío y se realizó cultivo bacteriológico a partir de hígado, bazo y tonsillas cecales. La administración de linfocinas redujo significativamente ($P < 0.05$) el crecimiento bacteriano en medio de cultivo a partir de muestras de hígado y bazo, pero no de tonsillas cecales ($P > 0.05$). Estos resultados demuestran que el tratamiento profiláctico con linfocinas procedentes de aves inmunizadas con *Eimeria tenella* reduce la invasión a órganos por *S. enteritidis*, pero no impide la colonización intestinal en pollitos de engorda.

Palabras clave: LINFOCINAS, POLLOS DE ENGORDA, *EIMERIA TENELLA*, *SALMONELLA ENTERITIDIS*.

Recibido el 7de octubre de 1998 y aceptado el 16 de agosto de 1999.

* Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Introducción

Algunos estudios han descrito el efecto inmunomodulador de sobrenadantes crudos de linfocinas en pollos de engorda y pollitas tipo Leghorn ante desafíos homólogos.¹⁻⁴ Por ejemplo, la administración profiláctica de linfocinas obtenidas de pollos inmunizados con *Salmonella enteritidis* reduce la invasión a órganos por esta bacteria.²⁻⁴ Es probable que el efecto profiláctico conferido por linfocinas no se limite a la reducción en la infectividad de algún microorganismo específico, sino de otros antigenéticamente distintos. En estudios anteriores se observó que linfocinas producidas por linfocitos T (LT) de aves inmunizadas con *S. enteritidis* (*S. enteritidis*-linfocinas, SEL) inducían resistencia ante desafíos con *Salmonella gallinarum* en pollitos de engorda⁵ y contra *Salmonella typhimurium* en pollitas tipo Leghorn.⁶ Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de resistencia del ave a microorganismos del género *Salmonella* depende en gran medida de una respuesta inmune inespecífica.

Es posible inducir resistencia en aves mediante extractos crudos de linfocinas dirigidas hacia un microorganismo en específico; se ha observado que esta resistencia se encuentra asociada con una importante participación de heterófilos en la resolución de la infección.^{2-4,7} Si la actividad de los heterófilos constituye el principal mecanismo inespecífico de defensa contra *S. enteritidis*, su participación podría ser modulada por linfocinas procedentes de aves inmunizadas con microorganismos de géneros distintos. La administración profiláctica de sobrenadantes que contienen linfocinas de aves inmunizadas con *Eimeria tenella* (*E. tenella*-linfocinas, ETL), parásito protozoario intracelular,⁸ podría inducir algún efecto profiláctico contra la infección producida por una cepa patógena de *S. enteritidis*, bacteria intracelular facultativa,⁹ en pollos de engorda.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto profiláctico inespecífico conferido por ETL en pollitos de engorda, por medio de la disminución en la invasión a órganos por *S. enteritidis* utilizando como indicador el aislamiento de la bacteria a partir de órganos.

Material y métodos

Material infectante

Se empleó una cepa de *S. enteritidis* fagotipo 13 (Ft-13) obtenida del National Veterinary Services Laboratory, en Ames, Iowa, Estados Unidos de Amé-

rica, seleccionada por la resistencia a novobiocina y ácido nalidíxico (NO-AN), que fue utilizada en la prueba de desafío. Asimismo, se utilizó la cepa MOR-80-QRO de *E. tenella*, proporcionada por el doctor Reynaldo Moreno Díaz (Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México), la cual fue empleada para la inmunización de las aves en la elaboración de ETL. Los oocistos fueron cosechados, esporulados y almacenados según lo descrito por Long et al.¹⁰

Preparación de linfocinas

Diez pollos de engorda de la estirpe Arbor Acres ™ Arbor Acres de 4 semanas de edad fueron inoculados vía oral durante 14 días consecutivos, con una dosis de 1 000 oocistos/ave/día. Diez días después de la última dosis las aves fueron sacrificadas para la obtención de bazos, a partir de los cuales se elaboraron las ETL mediante la técnica descrita por Kogut et al.¹

Preparación del inóculo de *S. enteritidis*

Para el desafío de las aves se utilizó una cepa de *S. enteritidis* Ft-13, cultivada en caldo infusión cerebro-corazón durante 18 horas a 37 °C. Este medio de cultivo contenía 25 mg/ml de NO y 20 mg/ml de AN, para inhibir el crecimiento de otras bacterias. El inóculo para el desafío fue preparado en solución amortiguadora de fosfatos estéril. Mediante espectrometría se determinó la turbidez del inóculo equivalente a 10^5 unidades formadoras de colonia (ufc)/ml; la concentración del inóculo se verificó mediante siembra por estría en placas de agar verde brillante (AVB).

Diseño experimental

Se utilizaron 120 pollos de 1 día de edad Arbor Acres ™ Arbor Acres, procedentes de una incubadora comercial; fueron alojados en jaulas en batería con calefacción eléctrica ubicadas en unidades de aislamiento* y asignados de manera aleatoria en 3 grupos de 40 aves, cada uno con 2 réplicas. El primer grupo fue el testigo negativo (no tratado, no infectado); el segundo grupo fue el testigo positivo (no tratado, infectado) y un tercer grupo que fue el experimental (tratado, infectado). Las aves del grupo experimental fueron inyectadas con 0.5 ml/pollo de ETL, vía intraperitoneal; treinta minutos después de la inyección de linfocinas se desafió oralmente con *S. enteritidis* Ft-13 a una dosis de 0.25 ml/pollo con una concentración de 10^5 ufc/ml. Todas las aves se sacrificaron 24 horas después del desafío; tanto el hígado como el bazo, así como las tonsillas cecales fueron colectados y

* Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

cultivados de acuerdo con el Plan Nacional de Mejoramiento Avícola, de los Estados Unidos de América.¹² El hígado y bazo se cultivaron como una muestra combinada. Los órganos fueron incubados durante 24 horas a 37 °C en caldo tetratrationato. Después se procedió a cultivar en placas de AVB con NO-AN, incubadas por 24 horas a 37 °C y examinadas para determinar la presencia de colonias típicas de *S. enteritidis*.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba estadística de Ji-cuadrada¹⁰ para determinar diferencias significativas en la invasión a órganos por *S. enteritidis* entre los distintos grupos.

Resultados

En el grupo tratado con ETL se observó una reducción estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la cantidad de muestras de hígado-bazo positivas al cultivo de *S. enteritidis* en placas de AVB, en comparación con el grupo testigo positivo (Cuadro 1). En la réplica 1 del grupo tratado con linfocinas, se observó el establecimiento de colonias de *S. enteritidis* en 2 de 18 placas de medio de cultivo (11.1% de placas), y en la réplica 2 se observó en 5 de 17 (29.4%); en total, 7 de 35 (20%) placas presentaron crecimiento bacteriano.

En la réplica 1 del grupo testigo positivo, se aisló *S. enteritidis* en 14 de 20 placas (70%), y en la réplica 2, en 16 de 20 (80%); en total, 30 de 40 (75%) placas presentaron crecimiento bacteriano. No se aisló la bacteria a

partir de muestras de hígado-bazo de pollos del grupo testigo negativo.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el aislamiento de la bacteria a partir de muestras de tonsillas cecales ($P > 0.05$) del grupo tratado con ETL, comparado con el grupo testigo positivo (Cuadro 1). En la réplica 1 del grupo tratado con ETL, se observó el establecimiento de colonias de *S. enteritidis* en 11 de 18 placas (61.1% de placas), y en la réplica 2 se observó en 15 de 17 (88.2%); en total, 26 de 35 (74.2%) placas presentaron crecimiento bacteriano.

En la réplica 1 del grupo testigo positivo, se aisló *S. enteritidis* en 16 de 20 placas (80%), y en la réplica 2, en 20 de 20 (100%); en total, 36 de 40 (90%) placas presentaron crecimiento bacteriano. No se aisló *Salmonella* a partir de muestras de tonsillas cecales de pollos del grupo testigo negativo.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el tratamiento profiláctico de pollos con ETL es capaz de inducir resistencia contra la invasión de órganos por *S. enteritidis*; esto quedó en evidencia mediante la reducción significativa en el número de pollitos de los que se aisló la bacteria a partir de muestras combinadas de hígado y bazo. Sin embargo, no se observó una disminución significativa en el número de pollitos de los que se aisló la bacteria a partir de tonsillas cecales; es decir, el tratamiento no evitó el establecimiento de la bacteria a nivel intestinal.

Cuadro 1
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ETL ANTE UN DESAFÍO CON *S. enteritidis* MEDIANTE AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO^a

GRUPO ^c Réplica	TESTIGO NEGATIVO			TESTIGO POSITIVO			ETL Tonsilas cecales ^b
	Hígado-Bazo ^b	Tonsilas cecales ^b	Hígado-Bazo ^b	Tonsilas cecales ^b	Hígado-Bazo ^b	Tonsilas cecales ^b	
1	0/20 (0%)	0/20 (0%)	14/20 (70%)	16/20 (80%)	*2/18 (11.1%)	11/18 (61.1%)	
2	0/20 (0%)	0/20 (0%)	16/20 (80%)	20/20 (100%)	*5/17 (29.4%)	15/17 (88.2%)	
Acumulativo	0/40 (0%)	0/40 (0%)	30/40 (75%)	36/40 (90%)	*7/35 (20%)	26/35 (74.2%)	

^a Los pollos fueron inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de ETL al día de edad. Treinta minutos después de la inyección, las aves fueron desafiadas con 10⁵ ufc/ml de *S. enteritidis*. Los pollos fueron sacrificados 24 horas después del desafío y se realizó cultivo bacteriológico a partir de hígado, bazo y tonsilas cecales.

^b Los valores de los tratamientos se expresan como número de cultivos positivos a *S. enteritidis*, sobre el total de cultivos en medio bacteriológico a partir de órganos (%).

^c Testigo negativo: Grupo no tratado, no infectado con *S. enteritidis*.

Testigo positivo: Grupo no tratado, infectado con *S. enteritidis*.

ETL: Grupo experimental tratado con linfocinas de aves inmunizadas con *E. tenella* y desafiado con *S. enteritidis*.

* El asterisco indica que el valor es significativamente diferente ($P < 0.05$) entre el grupo experimental y el grupo testigo positivo. Se observó una reducción significativa en el crecimiento de *S. enteritidis* en medio de cultivo, a partir de hígado-bazo en el grupo tratado con ETL, en comparación con el grupo testigo positivo. Evaluado mediante la prueba de Ji-cuadrada.

El mecanismo responsable generador de resistencia contra la invasión a órganos debió presentarse antes de que la bacteria hubiese penetrado el intestino y alcanzado los sitios de infección intracelular en órganos viscerales. *S. enteritidis* es una bacteria intracelular facultativa que se disemina por torrente sanguíneo ocasionando una infección sistémica en el ave.⁹ Cuando la infección del hospedero se produce vía oral, es necesario que las salmonelas alcancen los capilares sanguíneos que irrigan las paredes intestinales para pasar a la circulación sanguínea.⁹ Sin embargo, en el tracto intestinal existen barreras inespecíficas de tipo anatómico y fisiológico que normalmente impiden que microorganismos patógenos penetren la mucosa o se establezcan en ella.¹³ Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) también son importantes en la inmunidad inespecífica del hospedero contra infecciones por *Salmonella* debido a las siguientes razones: a) La invasión de la mucosa intestinal por *Salmonella* propicia el reclutamiento de grandes cantidades de PMN al sitio de infección o inflamación en la lámina propia;^{3,14} b) pollos granulocitopénicos con bajo número de PMN circulantes en sangre son más susceptibles a la infección por *Salmonella*;^{15,16} y c) estudios *in vitro* han demostrado que los leucocitos PMN pueden fagocitar eficientemente bacterias del género *Salmonella*.^{17,18}

A pesar de que en el presente estudio no se determinó la participación de leucocitos PMN en la resistencia observada en las aves, en un estudio similar Kogut *et al.*⁷ notificaron que existe una asociación muy marcada entre el incremento en número de leucocitos PMN en sangre periférica y la reducción en infectividad de *S. enteritidis*, tan sólo 4 horas después de la inyección de SEL; estos autores sugieren que la aplicación de SEL en aves induce heterofilia, lo que limita en forma drástica la diseminación sistémica de la bacteria.⁷ Por otro lado, Tellez *et al.*³ determinaron, basados en análisis morfométricos, que la reducción de la invasión a órganos por *S. enteritidis* está asociada con un incremento significativo en el grosor de la lámina propia cecal; este engrosamiento se debe a una destacada infiltración de células inflamatorias en la mucosa cecal después de la administración de SEL.³

A diferencia de los estudios realizados por Kogut *et al.*⁷ y Tellez *et al.*³ la resistencia contra la invasión de órganos observada en este estudio fue conferida por un sobrenadante de linfocinas producidas a partir de aves inmunizadas con *E. tenella*. Parece ser que en este sobrenadante, al igual que en SEL, se encuentra presente el mismo patrón de linfocinas secretadas por LT; Gómez *et al.*¹⁹ demostraron la presencia de interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (INF- γ) en un extracto crudo obtenido de LT (SEL). En forma independiente, García *et al.*²⁰ caracterizaron estas dos linfocinas en

sobrenadantes crudos de LT de aves inmunizadas con *E. tenella* (ETL). En particular, la presencia de IL-2 e INF- γ produce un aumento en la actividad de fagocitos activados,^{19,20} los cuales controlan eficientemente la multiplicación intracelular de *Salmonella*.²¹ Por lo anterior, la presencia de estas linfocinas, así como su acción conjunta son fundamentales para la iniciación y propagación de una respuesta inflamatoria.

Probablemente, el decremento observado en la invasión a órganos por *S. enteritidis* en este estudio, se haya debido al inicio de una cascada de citocinas después de la administración de ETL, generando a su vez una respuesta inflamatoria heterofílica a nivel intestinal. Se puede concluir que la aplicación intraperitoneal de ETL es capaz de inducir resistencia contra la invasión a órganos por *S. enteritidis* Ft-13, pero no limita la colonización intestinal, en pollitos de engorda. Actualmente se están realizando estudios moleculares para identificar las linfocinas efectoras contenidas en ETL.

Referencias

1. Kogut MH, Slajchert T. T-lymphocytes confer protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. Immunol Infect Dis 1992;2:69-79.
2. McGruder DE, Ray PM, Tellez IG, Kogut MH, Corrier DE, DeLoach JR, Hargis BM. *Salmonella enteritidis* (SE) leucocyte-stimulated soluble factors: effects on increased resistance to *Salmonella* organ invasion in day old Leghorn chicks. Poultry Sci 1989;72:2264-2271.
3. Tellez IG, Kogut MH, Hargis BM. Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn chicks. Avian Dis 1993;37:1062-1070.
4. McGruder DE, Kogut MH, Corrier DE, DeLoach JR, Hargis BM. Comparison of prophylactic efficacy of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines against *Salmonella enteritidis* organ invasion in neonatal Leghorn chicks. Avian Dis 1995;39:21-27.
5. Wong GR. Inmunoprofilaxis mediante linfocinas aplicadas *in ovo* y en pollos de engorda contra la infección por *Salmonella gallinarum* (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1996.
6. Ray PM, McGruder E, Kogut MH, Hargis BM. The specificity of *Salmonella enteritidis* immune lymphokines and its protection against other *Salmonella* serovars in day old Leghorn chicks. J Immunol 1993;150:315-320.
7. Kogut MH, McGruder ED, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. Dynamics of the avian inflammatory response to *Salmonella*-immune lymphokines: changes in avian blood leukocyte populations. J Immunol 1994;153:373-388.
8. McDougald LR, Reid WM. Coccidiosis. En: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, editores. Enfermedades de las aves. México (DF): El Manual Moderno, 1995:964-986.
9. Nagaraja KV, Pomeroy BS, Williams JE. Infecciones paratifoideas. En: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, editores. Enfermedades de las aves. México (DF): El Manual Moderno, 1995:115-152.

10. Long PL, Millard BJ, Joyner LP, Northon CC. A guide to laboratory techniques used in study and diagnosis of avian coccidiosis. Folio Vet Latinoam 1976;6:201-217.
11. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services. National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. Washington (DC): USDA-APHIS, 1989.
12. Zar J. Bioestatistical analysis. 2nd ed. (NJ): Prentice-Hall, 1984.
13. Kuby J. Immunology. Overview of the immune system. 3rd ed. New York: Freeman and Co., 1997.
14. Porter RE, Holt PS. Effect of induced molting on the severity of intestinal lesions caused by *Salmonella enteritidis* infection in chickens. Avian Dis 1993;37:1009-1016.
15. Kogut MH, Tellez IG, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. The effect of 5-fluorouracil treatment of chicks: a cell depletion model for the study of avian polymorpho-nuclear leucocytes and natural host defenses. Poultry Sci 1993;72:1873-1880.
16. Kogut MH, Tellez IG, McGruder ED, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. Microbiol Pathog 1994;16:141-151.
17. Stabler JG, McCormick TW, Powell KC, Kogut MH. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bacterial activities. Vet Microbiol 1993;38:293-305.
18. Van Dissel JT, Stikkelbroeck JJ, Sluiter W, Leijh CJ, Van Furth R. Differences in initial rate of intracellular killing of *Salmonella typhimurium* by granulocytes of *Salmonella*-susceptible C57BL/10 mice and *Salmonella*-resistant CBA mice. J Immunol 1986;136:1074-1080.
19. Gómez VG. Identificación de linfocinas en sobrenadantes de esplenocitos de pollo estimulados con concanavalina-A (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
20. García EG. Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
21. Kogut MH, Moyers RB, DeLoach JR. Las citocinas y sus interrelaciones funcionales: potenciación de la respuesta inflamatoria en el control de infecciones sistémicas por *Salmonella* en las aves. Memorias del Curso de Actualización Avances en Inmunología Aviar; 1996 marzo 15; México (DF). México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A.C., 1996:8-12.