



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DESCRIPCIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN
POLLOS CON UNA CEPA NATIVA DE *Salmonella* Enteritidis
*nal^r rif^rP-9***

ANA VERÓNICA LÓPEZ JAIME

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUIA: DRA. CONSUELO BORIE P. MV.; M.Sc.

**SANTIAGO, CHILE
2007**

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo a todos los que me apoyaron en estos 5 años de carrera y 11 meses de tesis.

Agradezco profundamente la oportunidad que me dio la Dra. Consuelo Borie, quien me aceptó como tesista y creyó en mí desde el primer momento. También a la Dra. M^a Luisa Sánchez, la Dra. M^a Antonieta Jara y al Dr. Carlos Navarro, quienes siempre tuvieron la mejor disposición cuando necesité de su ayuda.

Además, esta tesis no hubiese sido posible sin los auxiliares técnicos: Patricio, Humberto y Carlos, ni la ayuda de las otras dos tesistas del laboratorio: Pamela y Francisca, quienes facilitaron enormemente el procesamiento de las muestras.

A las tesistas del año pasado: Isabel, Pilar y Catalina, también les debo mucho, porque me advirtieron de todos los errores que cometieron debido a su inexperiencia, evitando que en el futuro los cometiera yo... (o sea, en buen chileno: ¡¡¡gracias por salvarme de los mil condoros que me iba mandar!!!).

Finalmente, las gracias más grandes son para mi familia: mi mamá y mis hermanos Rodrigo, Daniel y Patricio, quienes siempre estuvieron conmigo. También a Blas, quien ha sido incondicional para mí en estos 7 años de pololeo; a Bonnie (mi perra) quien siempre tuvo un langüetazo mojado y calentito cuando estuve triste; y a mis amigos, en especial a Macarena y Lisette.

Y por último, infinitas gracias a MÍ, por estos sacrificados 11 meses de aprendizaje, esfuerzo y por el gran aporte que hice a la ciencia y al Laboratorio de Microbiología. ☺

ÍNDICE

SUMMARY	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.- <i>Salmonella</i> y ETA.....	9
2.- Patogénesis de <i>Salmonella</i>	10
3.- Manifestaciones clínicas de <i>Salmonella</i>	15
4.- Medidas de control de <i>Salmonella</i> en la producción aviar.....	16
5.- Modelos experimentales de <i>Salmonella</i>	18
6.- El pollo como modelo experimental.....	20
7.- La dinámica de <i>Salmonella</i> en el pollo.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

SUMMARY

Salmonella Enteritidis (SE) human infections have had an outstanding increase in Chile and around the world. This is a zoonosis transmitted by the ingest of contaminated food; the main reservoir of which is poultry. This fact has led scientific research to use the avian model for an efficient control strategies formulation, to reduce the incidence of SE in poultry, and thereby reducing the transmission to human being.

The aim of this study was to describe the dynamics of experimental infections with a native strain of *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P – 9 in chickens. 320 one day-old Broiler chickens, negative to *Salmonella* spp. by bacteriologic culture and PCR test of faeces were used in this study. At 7 days of age, birds were orally inoculated with 1 ml of a suspension of *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P – 9: one group with 10^4 cfu/ml and the other one with 10^5 cfu/ml. Faecal samples were obtained from 10 chickens and euthanasia was practiced on them in order to obtain samples from their internal organs (heart, liver and spleen), caecum and intestine without caecum at 3, 6, 8, 18, 24 hours post infection (pi), and then daily until 12 days pi. Samples were cultured by traditional bacteriologic procedures for reisolation of the challenge strain.

Intestinal colonization was established at 3 hours pi, regardless of the dose used. Systemic invasion started at 3 hours pi in 70% of chickens with dose of 10^4 cfu and in 30% of chickens with dose of 10^5 cfu. Subsequently, the percentage of animals detected as positive was variable in both groups, with result ranges between 0 and 70% with dose of 10^4 cfu and between 10 and 90% with dose of 10^5 cfu. Faecal shedding of *Salmonella* Enteritidis was intermittent, and it started quickly at 3 hours pi, regardless of the dose utilized.

Caecum samples were the best at detecting infection; by this mean $\geq 80\%$ of positive birds until 6 days pi (dose 10^5 cfu) and 9 days pi (dose 10^4 cfu) were obtained.

From intestine samples $\geq 70\%$ of positive birds until 8 days pi (dose 10^4 cfu) and until 5 days pi (dose 10^5 cfu) were obtained.

Faecal samples (obtained by cloacal swabs) are not recommended at detecting infection, since they showed the most variable reisolation results during the 12 days pi.

Total infection percentage (animals with at least one positive sample) without considering fecal samples, was $> 80\%$ until 9 days pi for the dose of 10^4 cfu and $\geq 90\%$ until 6 days pi for the dose of 10^5 cfu.

It was concluded that the best days for sacrificing birds and collecting samples vary according to the aim of the study and they will change depending on the samples analyzed on each case.

RESUMEN

Las infecciones humanas por *Salmonella* Enteritidis (SE), han experimentado un aumento considerable en Chile y el mundo. Corresponde a una zoonosis transmitida por consumo de alimentos contaminados, cuyo principal reservorio lo constituyen las aves. Esta característica ha orientado a la investigación científica en la utilización del modelo aviar para establecer métodos de control eficientes, y así lograr la reducción de SE en aves y con ello la transmisión hacia los consumidores.

El objetivo de este estudio fue describir, en pollos comerciales, la dinámica de la infección experimental con una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P – 9. Para esto se trabajó con 320 pollos broiler de 1 día de edad, negativos a *Salmonella spp* por coprocultivo y PCR. A los 7 días de edad, las aves recibieron 1 ml vía oral de una suspensión de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P – 9: un grupo con 10^4 ufc/ml y el otro con 10^5 ufc/ml. Seriadamente, se obtuvieron muestras de deposiciones de 10 pollos y posteriormente se eutanasiaron para la extracción de muestras de órganos internos (hígado corazón y bazo), ciegos e intestino sin ciegos a las 3, 6, 8, 18, 24 horas post infección (pi), y luego diariamente hasta los 12 días pi. A partir de estas muestras se procedió al reislamiento de la cepa desafío mediante cultivo tradicional.

La colonización intestinal se estableció a las 3 horas pi, independiente de la dosis bacteriana recibida. La invasión sistémica se inició a las 3 horas pi en un 70% de los pollos en la dosis 10^4 ufc y en un 30% en la dosis 10^5 ufc. Posteriormente, el porcentaje de animales positivos fue variable en ambos grupos, con rangos entre 0 y 70% para la dosis 10^4 ufc y entre 10 y 90 en la dosis 10^5 ufc. La eliminación de *Salmonella* Enteritidis a través de las fecas fue intermitente y se inició tan rápido como a las 3 horas pi, independiente de la dosis utilizada.

Las muestras de ciegos fueron las mejores para detectar la infección, ya que se obtuvo $\geq 80\%$ de aves positivas hasta el día 6 pi (dosis 10^5 ufc) y día 9 pi (dosis 10^4 ufc), mientras que en las muestras de intestino sin ciegos se obtuvo $\geq 70\%$ de aves positivas hasta el día 8 pi (dosis 10^4 ufc) y hasta el día 5 pi (dosis 10^5 ufc).

Las muestras de deposiciones (obtenidas por hisopado) fueron malos detectores de

la infección en las aves experimentalmente infectadas, ya que arrojaron los valores más variables de reaislamiento durante los 12 días pi.

El porcentaje de infección total (animales con al menos una muestra positiva), sin considerar las deposiciones, fue $> 80\%$ hasta el día 9 pi en la dosis 10^4 ufc y $\geq 90\%$ hasta el día 6 pi en la dosis 10^5 ufc.

Se concluye que los mejores días para sacrificar las aves y extraer muestras dependerán de los objetivos de cada experiencia, y variarán según las muestras que se analicen en cada caso.

INTRODUCCIÓN

Una de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) y zoonosis más importantes en el mundo es la Salmonelosis, causada por el género bacteriano *Salmonella*. Éste está compuesto por dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. *S. enterica*, a su vez se divide en 6 subespecies, *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* y *salamae*. Actualmente, los serotipos no se escriben en latín y pueden acompañar al género, sin colocar la especie ni subespecie.

En la Región Metropolitana de Chile, las notificaciones de ETA han aumentado, desde 86 brotes por año en 1994 hasta 260 en el año 2000, donde *Salmonella spp.* es el principal agente causal. Esta tendencia se ha mantenido, describiéndose 2.219 casos de salmonelosis para el año 2006 a nivel nacional. Para la avicultura es muy relevante la presencia de *Salmonella spp.*, ya que las aves y sus productos constituyen para el hombre uno de los principales reservorios, en especial de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). *Salmonella* Enteritidis es uno de los serotipos responsables de la mayoría de las enteritis asociadas al consumo de carne, huevos y subproductos avícolas.

Durante las últimas décadas se han aplicado muchas estrategias en un esfuerzo por reducir la contaminación por *Salmonella* en la avicultura comercial. Estos esfuerzos incluyen el uso de antibióticos, suplementos alimenticios que inhiben la adhesión intestinal, exclusión competitiva y vacunas. Sin embargo, las medidas de control actualmente utilizadas a nivel de planteles avícolas no han sido suficientes para eliminar la contaminación por este enteropatógeno.

Para la formulación de estrategias de control de SE en pollos la investigación científica se ha orientado a la utilización del modelo aviar, donde la información entregada por las infecciones experimentales juega un importante rol en el desarrollo de medidas de control apropiadas para la reducción de SE en aves y con ello, la disminución de la transmisión hacia los consumidores.

Para investigar a SE en el modelo aviar, se hace imprescindible el entendimiento de la dinámica del proceso infeccioso en las aves. Si bien, de este proceso se conocen las vías de transmisión, la eliminación al medio ambiente, colonización e invasión a órganos

sistémicos, entre otros, es necesario establecer los momentos en que ocurre cada etapa, es decir, el tiempo que demora la bacteria en adherirse, colonizar e invadir los tejidos que afecta, así como también los momentos en que la bacteria es eliminada hacia el medio ambiente. Conocerlo a cabalidad permite saber con mayor exactitud dónde está el patógeno y en qué etapa de su ciclo está en el tiempo. Se ha determinado que el proceso de infección en modelos experimentales aviares, con SE, varía significativamente según la edad del animal afectado, la virulencia de la cepa y la dosis del inóculo utilizado.

El laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, hace algunos años trabaja con pollos como modelo experimental para estudiar medidas preventivas frente a SE. Para ello utiliza una cepa nativa de SE resistente a Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*), en un esquema tradicional de infección que se inicia al día 10 de edad y se termina al día 20 de edad. Este estudio, utilizando esta cepa bacteriana en particular, en pollos comerciales, pretende establecer la dinámica de la infección, describiendo los tiempos mínimos requeridos para las diferentes etapas del ciclo de infección. Estos datos contribuirán a la optimización del modelo experimental actualmente utilizado en pollos, maximizando los recursos al permitir el trabajo durante periodos cortos de tiempo con mayor eficiencia.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- Salmonella y ETA

Las enfermedades causadas por consumo de alimentos contaminados han surgido como una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En los Estados Unidos de América se estiman cifras de 76 millones de casos anuales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) que significan importantes gastos de salud, estimándose un total de 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes por esta causa (Mead *et al.*, 1999). En Chile, las notificaciones de ETA recibidas por el Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (SESMA) han ido en aumento, desde cifras de 86 brotes por año en 1994 hasta alcanzar 260 en el año 2000, donde *Salmonella spp.* es indicada como el principal agente etiológico (Prado *et al.*, 2002).

Salmonella Enteritidis aparece en el país con fuerza a mediados de los 90 como un notable problema de salud pública, cuyas cifras experimentaron un aumento desde 0,35 casos por 100.000 observados entre 1990 y 1993 hasta valores por sobre 5 casos por 100.000 habitantes en 1998, logrando así desplazar en importancia a *Salmonella* Typhi, de tal forma que hoy se considera al serotipo Enteritidis como endémico (Fica *et al.*, 2001).

La tendencia ha continuado en el tiempo, es así como se ha observado un aumento sostenido en los casos de Salmonelosis, desde 974 casos confirmados el año 2000 donde 402 correspondieron al serotipo Enteritidis, hasta cifras que alcanzan los 2.219 casos de salmonelosis donde 1.177 correspondieron a *Salmonella* Enteritidis en el año 2006 (Figueroa, 2007).

La salmonelosis constituye sin duda un problema de salud humana, sin embargo, los animales también se ven afectados por esta bacteria. *Salmonella* infecta un amplio rango de hospederos animales, incluyendo aves, cerdos, bovinos, ovinos y caprinos, entre otros. La enfermedad se puede manifestar como un cuadro intestinal y también como extraintestinal (aborto, neumonía, etc).

A nivel mundial, los brotes de salmonelosis humana se han asociado a una amplia gama de alimentos contaminados de diferente origen, como son los productos cárneos (bovino, cerdo, aves, cecinas), frutas y verduras, productos lácteos y alimentos elaborados (preparados en el hogar o consumidos en restaurantes, casinos, etc), incluso chocolates (Gill *et al.*, 1983). Una gran proporción de los brotes por SE se asocian al consumo de alimentos de origen aviar, entre ellos, carnes y huevos contaminados (Gast, 1994; Prado *et al.*, 2002). Un estudio norteamericano señala que desde el año 2000 al 2005, el número de aislamientos de *Salmonella spp.* en carcasas de pollos broiler aumentó en un 70%, y de este total, también aumentó la proporción de aislamientos del serotipo Enteritidis, desde un 2,5% a un 7,7% (Altekruse *et al.*, 2006). En los huevos, se estima un nivel de contaminación con *Salmonella* de 1 en 20.000 (0,00005%), sin duda una frecuencia muy baja; sin embargo, debe considerarse los altos volúmenes anuales que alcanza la producción norteamericana al año, que se estimaban a mediados de los 90' en unos 2,2 millones de huevos contaminados (Braden, 2006).

En Chile, un estudio realizado en la Región Metropolitana encontró un 0,09% de frecuencia de contaminación con SE en huevos de venta comercial, y detectó contaminación con *Salmonella spp.* en un 9,44% de muestras de carne de ave y menudencias de pollo de origen comercial (Alexandre *et al.*, 2000), lo que establece un riesgo potencial en la salud del consumidor.

2.- Patogénesis de *Salmonella*

Para lograr la infección de un individuo, el primer paso en el proceso infeccioso de *Salmonella* es la transmisión a un hospedero susceptible. En la mayoría de las especies animales afectadas, la vía de ingreso más común es la vía oral, a través del consumo de alimentos contaminados con la bacteria (Darwin y Miller, 1999). Cuando ocurre el ingreso de *Salmonella* vía oral en un hospedero, la infección aún no está asegurada, ya que depende

del número de bacterias. En seres humanos, se ha estimado que la dosis mínima infectante (DMI) varía entre 10^5 y 10^{10} bacterias. Esta cantidad varía dependiendo de varios factores, entre ellos destacan la cepa, el alimento con el que se consume la bacteria y el estado fisiológico del hospedero.

Una manifestación temprana de la interacción hospedero-patógeno es la adhesión y la invasión de la bacteria al epitelio intestinal y la subsecuente inflamación de la lámina propia y los linfonodos (Darwin y Miller, 1999).

Al ingresar *Salmonella* a su hospedero y alcanzar el intestino delgado, debe atravesar la capa mucosa intestinal y adherirse a las células del epitelio intestinal. Para esto, *Salmonella* expresa varias moléculas que contribuyen a su habilidad de adherirse a las células epiteliales intestinales. Este tropismo está mediado por dos elementos: un elemento celular al cual se une la bacteria, llamado “receptor”, y un elemento bacteriano mediante el cual se une al receptor, llamado “adhesina”. Las adhesinas que se conocen de *Salmonella* Enteritidis son: su flagelo (Dibb-Fuller y Woodward, 2000) y las fimbrias: SEF14, SEF17, SEF21 (o fimbria tipo 1), LPF (“long polar fimbriae”), y PEF (“plasmid encoded fimbriae”) (Rajashekara *et al.*, 2000).

Se desconoce el receptor al cual se adhiere SEF14 y, al menos en pollos, no ha demostrado tener un rol significativo (Dibb-Fuller y Woodward, 2000). Se sabe que SEF17 es un organelo hidrofóbico que es capaz de adherirse a la fibronectina de la matriz tisular, al plasminógeno, laminina y a las proteínas de “fase de contacto” humanas (Dibb-Fuller y Woodward, 2000; Figueroa y Verdugo, 2005). SEF21 se une específicamente con el receptor α -D-manosa (Darwin y Miller, 1999; Dibb-Fuller y Woodward, 2000), LPF es el mediador de la unión a células M y su receptor específico es la Manosa (Figueroa y Verdugo, 2005) y también se ha descrito que es el mediador de la adhesión a las células de las Placas de Peyer del intestino delgado en modelos murinos (Darwin y Miller, 1999). La función de PEF se desconoce actualmente, aunque se ha descrito que potencia la adhesión al intestino delgado, aunque no está claro si esto se refiere también a las células M, y actualmente, se desconoce el receptor al cual se adhiere esta fimbria (Darwin y Miller, 1999).

Se ha señalado recientemente que la asociación e invasión de las células epiteliales es multifactorial e involucra tanto a SEF17 como a SEF21 y a la motilidad mediada por flagelos, siendo este último el único involucrado en la explicación de la adhesión al intestino de los pollos (Dibb-Fuller y Woodward, 2000), aunque parece improbable que el flagelo posea una adhesina como tal (Allen-Vercoe y Woodward, 1999).

Gracias a las estructuras moleculares mencionadas, *Salmonella* se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M. Las células M son células epiteliales especializadas, que capturan antígenos intestinales mediante pinocitosis y transportan esos antígenos hacia las células linfoides que hay en las Placas de Peyer epiteliales (Ohl y Miller, 2001). Debido a la ausencia de borde en cepillo así como de glicocalix, las células M representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias (Figuroa y Verdugo, 2005)

Luego de la adhesión, la invasión de *Salmonella* se lleva a cabo a través del tejido linfoide, incluyendo las Placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Se dirige hacia células hospederas que no son normalmente fagocíticas, como la superficie de la capa mucosa de las células epiteliales. La invasión celular realizada por *Salmonella* se lleva a cabo mediante un mecanismo conocido como “trigger” (gatillo). El inicio de este mecanismo ocurre cuando la bacteria envía señales (proteínas) a las células epiteliales, las cuales como respuesta producen un reordenamiento de su citoesqueleto, formándose así un ondulamiento en la superficie, conocido como “ruffling”. Estos ondulamientos de membrana alcanzan y envuelven a la bacteria adherida en grandes vesículas. Al ser internalizada la bacteria, el borde en cepillo epitelial se reconstituye (Ohl y Miller, 2001). Se reconocen varias proteínas bacterianas de membrana involucradas en los reordenamientos del citoesqueleto: SipA, SopB, SopE y SopE2, todas ellas codificadas en la Isla de Patogenicidad 1 (SPI-1) (Figuroa y Verdugo, 2005).

Las proteínas efectoras (SipA, SopB, SopE y SopE2) pueden ser consideradas como toxinas, debido a que de alguna manera afectan a la célula eucariótica, sin embargo, a diferencia de éstas, carecen de receptores de unión, por lo que son incapaces de tener acceso directo a su sitio de acción (Figuroa y Verdugo, 2005).

Se ha demostrado la presencia de una enterotoxina en *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Typhi similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT) y toxina termolábil (LT) de *E.coli*, la cual produce secreción de agua y electrolitos en los enterocitos, y puede ser neutralizada con antisuero de toxina anti-cólera. Un estudio demostró que el pre-tratamiento de conejos con un compuesto químico similar al gas mostaza redujo marcadamente la secreción de fluidos inducida por *Salmonella* Typhimurium y también la inducida por la toxina de cólera en asas intestinales ligadas. Ya que la toxina de cólera, a diferencia de *Salmonella* Typhimurium, no produce diarrea mediante una reacción inflamatoria, se concluyó que el efecto antisecretorio del tratamiento no se debió a una actividad antiinflamatoria, sino a una inhibición de la secreción de cloruro. El gen *stn* es aquel que codifica la actividad de esta enterotoxina: su inactivación produce una reducción en la habilidad de *Salmonella* Typhimurium para inducir acúmulo de fluido en asas intestinales ligadas de ratón, sin embargo, no reduce la actividad de *Salmonella* Typhimurium o de *Salmonella* Dublin en la inducción de acúmulo de fluido en asas intestinales ligadas de bovinos (Zhang *et al.*, 2003).

Además de la enterotoxina, se ha descrito también la existencia de una citotoxina. Esta citotoxina está unida a la membrana externa de la pared celular bacteriana y se ha determinado que es tóxica para las células humanas AV3, Hela, Vero y cultivos celulares CHO (“Chinese Hamster Ovary Cells”). Por otro lado, se ha reportado que la citotoxina de *Salmonella* inhibe la síntesis proteica en cultivos celulares y en la mucosa intestinal, y a pesar de que el rol de la citotoxina no está claro en la enfermedad humana, se le considera un factor de virulencia que afecta la severidad de la infección de *Salmonella* (Ho y Chou, 2001).

Salmonella produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes; induce mediante la proteína efectora SipB apoptosis de macrófagos activados, además, esta bacteria induce fagocitosis en macrófagos no activados, que facilitan su transporte al hígado y bazo. En mamíferos, la bacteria invade la mucosa y la lámina propia de la unión ileocecal. Una vez que *Salmonella* es internalizada en la célula hospedera, reside dentro de la vacuola contenedora de *Salmonella*

(SCV). Al madurar la SCV, migra desde el borde luminal de la célula epitelial hacia la membrana basal, donde *Salmonella* interactúa con los macrófagos asociados con las Placas de Peyer de la submucosa y entra en ellos.

La formación de SCV ocurre paralelamente a los procesos endocíticos normales presentes en las células hospederas. La SCV adquiere marcadores endosomales involucrados en procesos intracelulares, sin embargo, no se fusiona con los compartimentos lisosomales. Gracias a esta separación, *Salmonella* evita ser destruida por los procesos fago-lisosomales celulares. Las SCV son importantes en el transporte y la supervivencia de esta bacteria en las células epiteliales, y juegan un rol fundamental en la supervivencia de *Salmonella* dentro de las células fagocíticas, como los macrófagos, permitiéndole comportarse como un patógeno intracelular facultativo (Foley y Lynne, 2007).

Salmonella se multiplica en los folículos linfoides. Los serotipos de *Salmonella* que causan infección sistémica entran en macrófagos, aparentemente mediante macropinocitosis inducida, y subsecuentemente activan mecanismos que le permiten la evasión de las funciones microbicidas de la fagocitosis, permitiendo la supervivencia y replicación en el ambiente intracelular. La migración de fagocitos infectados hacia otros órganos del sistema retículoendotelial probablemente facilita la diseminación de la bacteria en el hospedero (Ohl y Miller, 2001). Las infecciones con invasión sistémica de *Salmonella* están asociadas al Sistema de Secreción Tipo 3 (T3SS), codificado en la Isla de Patogenicidad 2 (SPI-2). Los genes de T3SS sólo se expresan dentro de la SCV, bajo condiciones ambientales específicas como: osmolaridad baja, bajos niveles de ciertos nutrientes y acidificación de la SCV. Para facilitar la infección sistémica, las salmonelas intracelulares presentes en las células inmunes (macrófagos y células dendríticas) se transportan desde el tracto intestinal hacia otras áreas del cuerpo. Las células dendríticas son fagocitos migratorios importantes que se distribuyen ampliamente, en tejidos linfoides y no linfoides. Su habilidad de migrar facilita la dispersión sistémica de *Salmonella* (Foley y Lynne, 2007).

Las funciones moleculares de SPI-2 no han sido caracterizadas en detalle. Se conoce que codifica genes esenciales para la replicación intracelular y que es necesaria para

el establecimiento de la infección sistémica (Ohl y Miller, 2001; Figueroa y Verdugo, 2005; Bohez *et al.*, 2007). Acerca de la SPI-1, se ha descrito que codifica genes necesarios para la invasión de células epiteliales intestinales y la inducción de respuestas secretorias e inflamatorias intestinales (Ohl y Miller, 2001).

Gracias a esta compleja maquinaria bacteriana, *Salmonella* es capaz de infectar y enfermar a un amplio rango de hospederos, transformándolos en portadores crónicos. Es así como esta bacteria se transforma en un problema difícil de controlar y erradicar.

3.- Manifestaciones clínicas de *Salmonella*

Salmonella spp. se asocia a 3 enfermedades diferentes en el hombre: bacteriemia, fiebre tifoidea y enterocolitis. La bacteriemia se asocia a los serotipos S. Cholerasuis y S. Dublin y es el síndrome menos frecuente en humanos. Los principales síndromes clínicos asociados con la infección con *Salmonella* son la fiebre tifoidea y la gastroenteritis. La fiebre tifoidea es causada por los serotipos S. Typhi y S. Paratyphi, exclusivos para el ser humano, y sus manifestaciones clínicas incluyen fiebre, dolor abdominal, diarrea transitoria o constipación, y ocasionalmente un rash macropapular. Las cepas no-tíficas, tales como S. Typhimurium y S. Enteritidis, causan enterocolitis, y a diferencia de las cepas tíficas, éstas infectan un amplio rango de hospederos animales, incluyendo al pollo, el bovino, el cerdo, y el ser humano, en el cual usualmente provocan una enteritis autolimitante (Zhang *et al.*, 2003; Ohl y Miller, 2001).

Las cepas no-tíficas tienen diferentes manifestaciones clínicas en animales. En ratones infectados con *Salmonella* Typhimurium ocurre una enfermedad similar a la fiebre tifoidea del hombre. En el caso del bovino, éste puede ser infectado con muchos serotipos, siendo más frecuentemente asociados con enfermedad los serotipos S. Dublin y S. Typhimurium. S. Dublin puede causar abortos en vacas preñadas sin ningún otro signo clínico asociado y en terneros, al igual que el serotipo S. Typhimurium, causa diarrea (Santos *et al.*, 2001). Por otro lado, el pollo es un caso particular, ya que éste puede ser infectado por los serotipos no-tíficos y transformarse en un portador crónico, sin manifestar

ningún signo clínico asociado y por esta razón, los alimentos provenientes de la avicultura constituyen un riesgo de infección para los seres humanos.

Para disminuir este riesgo, existe la necesidad de controlar la salmonelosis transmitida vía alimentos en los 3 mayores puntos de contaminación e infección, a saber, la reducción de la incidencia de infección de lotes de aves, el mejoramiento de la higiene en el proceso de matanza y la educación del consumidor.

4.- Medidas de control de *Salmonella* en la producción aviar

En el ámbito veterinario, se han intentado varias medidas de control orientadas a la disminución de la contaminación de SE a nivel de planteles comerciales. Entre ellas, destacan las medidas de control ambiental, tales como el control de plagas (roedores e insectos) que pueden actuar como vectores de la bacteria (Guard-Petter, 2001; Gast, 2000) y la minimización del contacto de animales silvestres con los equipos, la comida y con las aves de producción; utilización de pollos libres de *Salmonella spp.*, limpieza y desinfección de las instalaciones y equipos entre cada grupo de aves, eliminación completa del material fecal entre cada grupo de aves, aumento de medidas de bioseguridad y minimización y restricción del tráfico de personas a la granja, galpones, y entre los lotes de aves (Gast, 2000; Doyle y Erickson, 2006), sanitización de vehículos y personal y limpieza y desinfección de transporte después de cada uso, entre otras.

Otra estrategia importante es la utilización de vacunas en pollas y gallinas, que reducen la incidencia de colonización intestinal y de eliminación fecal, sin embargo, la vacunación generalmente no provee de una barrera impenetrable contra la infección y es particularmente vulnerable a las dosis de desafío muy altas de SE, constituyendo una herramienta de protección sólo parcial (Gast, 2000; Doyle y Ericsson, 2006).

Cabe destacar también el uso de probióticos como control de la colonización. Los probióticos son microorganismos que provienen de la flora intestinal normal, son resistentes a las acciones de la bilis y de los ácidos, sobreviven y colonizan el intestino; se adhieren a la mucosa y producen bacteriocinas (Sullivan, 2001). Gracias a estas características, interceptan la acción enteroinvasiva de bacterias patógenas. En estudios

internacionales, se ha señalado que el uso de cultivos preparados de aves adultas de estado sanitario conocido permitió producir profundas reducciones en la excreción fecal de *Salmonella*, bajo condiciones experimentales. En condiciones de campo su efecto es variable, ya que es influenciado por factores como las infecciones durante la incubación y las adquiridas en el ambiente (Barrow, 1993). Es valiosa su utilización cuando se trata de pollos broiler inmaduros, que carecen de microflora protectora intestinal, pero con muy poca relevancia cuando se trata de proteger gallinas adultas frente a SE adquirida del ambiente (Gast, 2000).

La suplementación con prebióticos es otra estrategia que se puede utilizar para el control de *Salmonella*. Un prebiótico es una sustancia que se agrega a la dieta para producir cambios en el ambiente gastrointestinal, los cuales fomentan la microflora gastrointestinal benéfica, ya sea en su composición y/o actividad, favoreciendo la salud y bienestar en el hospedero (Roberfroid, 2007). Experimentalmente, se comprobó que la inclusión de lactosa en dietas de pollos redujo la colonización cecal de *S. Typhimurium*. Esta inhibición se correspondió con cambios en el pH cecal y aumento de ácidos grasos volátiles no disociados, especialmente ácido propiónico. Otros prebióticos potenciales para la reducción de la colonización de *Salmonella* en pollos son: fructooligosacárido, manosa-oligosacárido e isomaltooligosacárido (Doyle y Ericsson, 2006).

Antiguamente, la inclusión de antibióticos en la dieta de los pollos era otra opción de control de patógenos entéricos, sin embargo, esta práctica actualmente no es utilizada, ya que existen reportes sobre la adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos de *Salmonella spp.* (Foley y Lynne, 2007).

A pesar de los esfuerzos, las medidas de control actualmente utilizadas a nivel de planteles avícolas no han sido suficientes para eliminar la bacteria, prueba de ello es la persistencia de la infección en aves comerciales.

5.- Modelos experimentales de *Salmonella*

En la incesante búsqueda de herramientas que logren disminuir este riesgo, científicos del área biológica dedican su tiempo a la investigación del proceso infeccioso de *Salmonella spp.*, bajo la premisa que al lograr entender cómo ocurre este evento, podrán en el futuro conocer cuáles son los momentos críticos de la infección, para así idear planes de control y prevención de la salmonelosis.

Los modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, han sido vitales en este camino de aprendizaje. De ellos se ha obtenido gran cantidad de información. Al respecto, se pueden mencionar los aportes de los modelos de cultivos celulares *in vitro*, que han sido de gran utilidad para comprender la interacción entre *Salmonella* y las células eucarióticas, la identificación de los genes involucrados en el proceso infeccioso así como los factores que regulan estos genes. Se han utilizado células HeLa, Henle-407, CHO, Hep-2, VERO, BAT, MDCK; líneas celulares de adenocarcinoma humano: Caco-2, HT29 y T84; y líneas de macrófagos J774, RAW 264.7 (Figuroa y Verdugo, 2005).

Si bien la utilización de modelos experimentales *in vitro* ha otorgado valiosa información, poseen algunas desventajas con respecto a los modelos *in vivo*: carecen de una barrera mucosa, factores inmunes del hospedero como anticuerpos y citoquinas, células inflamatorias y mediadores de la inflamación (Figuroa y Verdugo, 2005). Por estas características, se recomienda el uso de modelos *in vivo*. El uso de embrión de pollo en investigación biológica ha representado un instrumento valioso en la investigación de *Salmonella*. Se sugiere su uso para recuperar la patogenicidad de las cepas de *Salmonella* que han estado liofilizadas o congeladas por periodos mayores de dos años, inclusive se sugiere el uso del embrión de pollo, para evaluar cepas de *Salmonella* mutadas en genes involucrados en patogenicidad. Utilizando asas ligadas de ratón, se ha demostrado que las células M juegan un papel importante en la patogénesis de la salmonelosis murina, ya que en etapas tempranas de la infección estas células son los sitios primarios de invasión bacteriana, sin embargo al utilizar mutantes *inv-* se continúa observando reordenamientos

de la membrana celular en la célula M, indistinguibles de los producidos por la cepa silvestre, lo que sugiere un mecanismo de invasión *inv*-independiente. También se han utilizado asas ligadas de intestino de pollo y de bovino para conocer la invasión intestinal y comprobar funciones de las proteínas efectoras de *Salmonella* involucradas en el proceso infeccioso (Figueroa y Verdugo, 2005).

Se han utilizado hasta ahora muchos modelos mamíferos para describir la interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal de su hospedero, por ejemplo, el mono, el conejo, el cobayo y el ternero (Darwin y Miller, 1999).

Los modelos animales se utilizan para el estudio de la fase intestinal y fase sistémica de la Salmonelosis. El ratón desarrolla una enfermedad sistémica al infectarse con *Salmonella* Typhimurium, pero no se observa diarrea. La infección murina con *S. Typhimurium* resulta en una enfermedad muy similar a la fiebre tifoidea causada por la infección con los serotipos Typhi, Paratyphi A, B y C. Así, la infección murina con *S. Typhimurium* ha sido empleada como modelo para la fiebre tifoidea humana. En contraste, el bovino infectado por *Salmonella* Typhimurium desarrolla una enfermedad diarreica con manifestaciones clínicas similares a las observadas en infecciones humanas, las que también resultan en diarrea con una baja mortalidad (Santos *et al.*, 2003). El pollo se utiliza preferentemente como un modelo de colonización, ya que no existe evidencia clara de enfermedad clínica que se asocie a las infecciones de *Salmonella*. Aunque *Salmonella* logra infectar al pollo (coloniza el tracto intestinal, alcanza e invade los órganos internos), esta rara vez manifiesta la enfermedad.

Los modelos animales son un área muy importante de investigación, ya que: (i) la infección de *Salmonella* en animales de consumo (por ejemplo, bovinos y aves) son la mayor fuente de infección humana; (ii) las infecciones por *Salmonella* en animales representan una carga financiera significativa en la agroindustria; y (iii) los modelos animales son cruciales para el entendimiento de la salmonelosis (Boyle *et al.*, 2007). Tradicionalmente, uno de los modelos experimentales más usados para *Salmonella spp.* es el ratón. Su utilización es amplia para la investigación de vacunas humanas contra

Salmonella y para el conocimiento detallado de la patogenia molecular intestinal. Entre sus ventajas se puede mencionar: su facilidad de uso, su pequeño tamaño, economía de espacio y de mantención, su bajo costo de adquisición, su susceptibilidad a la infección con *Salmonella* (Darwin y Miller, 1999) y la similitud que tiene el curso de su enfermedad con respecto al ser humano (Boyle *et al.*, 2007).

Los principales estudios de patogénesis y epidemiología experimental, trabajan en las bases genéticas y nutricionales de la resistencia a la infección, y la gran mayoría de las pruebas terapéuticas de laboratorio han sido todas realizadas en el ratón blanco. Sin embargo, el modelo murino posee algunas desventajas: (i) La inoculación y el tratamiento vía sondaje son factibles, pero resultan tediosos debido a su pequeño esófago y estómago; (ii) La dificultad de obtener sangre y deposiciones para cultivo en forma regular de animales tan pequeños hacen incierto el seguimiento bacteriológico de *Salmonella*; (iii) Resulta extremadamente complicado marcar un gran número de ratones para hacer posible la identificación individual; (iv) Más importante aún, la susceptibilidad que tienen a diferentes cepas y serotipos de *Salmonella* varía marcadamente.

6.- El pollo como modelo experimental

En la búsqueda de un mejor animal experimental, la atención se dirige a las aves de corral domésticas, particularmente los pollos. Estos animales se caracterizan por ser altamente susceptibles a la infección de *Salmonella*, pero poco susceptibles a enfermar. Los pollos son hospederos naturales de *Salmonella*, no sólo de *Salmonella Pullorum* y *Salmonella Gallinarum*, sino que de la gran mayoría de los serotipos de *Salmonella* comúnmente encontrados en el hombre. Los pollos recién nacidos son económicamente asequibles y están disponibles en casi cualquier lugar. La inoculación por cualquiera de las vías comúnmente utilizadas, con excepción de la endovenosa, es relativamente simple, y las muestras son fáciles de obtener (sangre, desposiciones, tejidos, etc). Por otra parte, su identificación individual y permanente es muy sencilla, para esto se puede utilizar bandas alares numeradas correlativamente. Como animales de laboratorio ellos poseen las posibles desventajas de requerir alimento y equipamiento especial para su mantención, cuando

crecen son de gran tamaño y se vuelven resistentes a la infección, a menos que se les use cuando son muy jóvenes. Además, por ser aves y no mamíferos, posiblemente no son tan comparables al ser humano como los otros animales experimentales (Milner y Shaffer, 1952).

Se han iniciado líneas de investigación orientadas a mejorar el entendimiento de los aspectos críticos de la infección por SE en el hombre y la formulación de nuevas estrategias de control y prevención en el sector avícola (Gast, 1994). La mayoría de estos estudios se realizan utilizando pollos como modelo experimental, los cuales han permitido adquirir una cantidad considerable de información básica sobre la interacción entre SE y el hospedero aviar, analizando en detalle aspectos específicos del proceso infeccioso, de diferentes opciones para el diagnóstico de planteles infectados y de métodos que disminuyan la incidencia de SE tanto en gallinas de postura como en pollos Broiler (Gast, 1994).

Para el análisis de las medidas de control en el sector aviar (inmunoprofilaxis y biocontrol), los laboratorios microbiológicos han establecido modelos experimentales que imitan lo “natural” y donde la eficiencia del factor o medida de control se mide con el reaislamiento de la cepa desafío a nivel intestinal y/o sistémico (Gast y Beard, 1989; Desmidt *et al.*, 1997; Asheg *et al.*, 2001; Asheg *et al.*, 2003; Bjerrum *et al.*, 2003; Van Immerseel *et al.*, 2004; Gast *et al.*, 2005). Para lograr el reaislamiento de la cepa, con exactitud y eficiencia, es necesario comprender el modelo de infección de este enteropatógeno, específicamente los tiempos necesarios para lograr la colonización, multiplicación, invasión y eliminación a través de secreciones y excreciones de los animales infectados.

7.- La dinámica de *Salmonella* en el pollo

La patogenia de *Salmonella* Enteritidis en el pollo es similar a la de otros animales. En un proceso de infección natural ocurren los siguientes pasos: Primero, la bacteria ingresa por la vía oral y alcanza la mucosa de los tejidos del tracto intestinal, ocurriendo la adherencia de la bacteria a las células epiteliales. Luego la bacteria ingresa a las células

epiteliales, alcanzando así la mucosa y la lámina propia de los tejidos. Al ingresar estimula al sistema inmune, logrando entrar y sobrevivir en células fagocíticas, las cuales la transportan a órganos internos (hígado y bazo, entre otros). Mientras tanto, en el lumen del sistema digestivo, *Salmonella* logra replicarse y es eliminada en las deposiciones.

La colonización intestinal y la invasión de órganos es muy rápida, llevando tan sólo unas pocas horas. Turnbull y Snoeyenbos (1974) lo demostraron al inocular *Salmonella* Enteritidis vía oral en pollos de 1 día de edad. Lograron aislar la bacteria en el tracto intestinal en tiempos tan tempranos como 3 horas post inoculación, y al realizar cultivo de muestras de hígado y de bazo, el reaislamiento ocurrió a las 5 horas post inoculación. Consecuentemente, Desmidt *et al.*, (1997) tuvieron similares resultados al realizar una experiencia inoculando *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 vía oral en pollos libres de patógenos específicos (SPF). Obtuvieron que la colonización del tracto intestinal se estableció en un tiempo tan rápido como 3 horas post infección (pi) mientras que desde órganos internos como corazón e hígado, la bacteria pudo aislarse en tiempos que van desde las 3 a las 12 horas, dependiendo estos valores de la edad de los pollos y la dosis bacteriana usada. Asheg *et al.*, (2001) también demostraron que la invasión a órganos por parte de SE fagotipo 4 es rápida en el tiempo. Utilizaron pollos de un día a los que inocularon con 2×10^2 y 2×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc) obteniendo aislamientos de *Salmonella* en ciego desde las 6 – 18 horas pi y en hígado entre 6 horas hasta los 3 días pi, dependiendo de la dosis utilizada.

Luego de la colonización intestinal y la invasión a órganos, *Salmonella* se elimina al medio ambiente vía fecal. El movimiento del inóculo bacteriano desde el esófago hasta el ciego y el recto y su posterior salida por las deposiciones fue estudiada por Brownell *et al.*, (1970). Inocularon pollos de 5 meses de edad con una dosis de 10^8 ufc de *Salmonella* Typhimurium por la vía oral. Desde el primer hasta el octavo día post inoculación pudieron aislar la bacteria en las deposiciones de entre un 70 y 100% de las aves inoculadas. En el día 12, ya se observaba menos de 30% de positividad en las fecas, lo que se mantuvo similar hasta el día 22 post infección.

Van Immerseel *et al.*, (2004) inocularon oralmente *Salmonella* Enteritidis en pollos de 1 día (dosis bacteriana baja, 10^2 ufc) y de 6 días de edad (dosis bacteriana alta, 10^9 ufc). La eliminación fue decreciendo en el tiempo en ambos grupos. Durante las primeras 5 semanas el grupo de dosis alta obtuvo cerca de 80% de muestras positivas, mientras que entre las 6 y las 14 semanas de edad, los resultados positivos fueron variables, entre un 40 y un 80%, alcanzando en la semana 16 valores cercanos al 10% de muestras positivas. El grupo de dosis baja arrojó alrededor de 80% de resultados positivos durante las primeras 6 semanas pi y entre las 6 y las 14 semanas, los porcentajes de negatividad oscilaron entre un 60 y un 80%, alcanzando a las 16 semanas un 30% de muestras positivas. Los autores concluyeron que la eliminación de *Salmonella* es intermitente y además, fluctuante en el tiempo.

La duración de la eliminación de la bacteria por vía fecal es variable. Gast *et al.*, (2005) lo demostraron inoculando *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Heidelberg vía oral en gallinas ponedoras SPF de 30 y 42 semanas de edad. Al medir la eliminación fecal, obtuvieron que la duración de ésta tuvo valores promedio que van desde 13,83 días hasta 32,92 días según la cepa utilizada.

El tiempo en que ocurre la colonización e invasión de pollos inoculados con *Salmonella spp* también es variable. Se sabe que esta variación depende entre otros factores de la **edad** (Gast y Beard, 1989), la **dosis infectante** (Desmidt *et al.*, 1997; Asheg *et al.*, 2001) y la **virulencia de la cepa** utilizada (Gast *et al.*, 2005).

Muchos son los autores que han estudiado el efecto de la **edad** en la dinámica de infección de *Salmonella* en pollos (Milner y Shaffer, 1952; Sadler *et al.*, 1969; Turnbull y Snoeyenbos, 1974; Gast y Beard, 1989; Bjerrum *et al.*, 2003). Por ejemplo, Milner y Shaffer (1952) estudiaron la influencia de la edad en el establecimiento de la infección en pollos, al inocular vía oral *Salmonella* Typhimurium. Los pollos fueron inoculados a los 4, 7, 14, 21, 28 y 49 días de edad con dosis de 10 , 10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc y luego, a los 2 y 6 días postinoculación se realizó un reaislamiento de la cepa desafío utilizando como muestra hisopados cloacales. El resultado fue que a mayor edad de inoculación del pollo, mayor era

la dosis de inoculación que se necesitaba para detectar al menos un animal positivo, de tal manera que, la dosis de 10 ufc sólo fue capaz de infectar a pollos de 1 día de edad, pero no a las aves mayores de 4 días de edad.

Otro trabajo, estudió el efecto de la edad en la persistencia y la patogenicidad de *Salmonella* Typhimurium en pollos de 1, 3, 5, 7 y 8 días de edad; la mortalidad de los pollos declinó significativamente a medida que era mayor la edad al momento de la inoculación. Los ciegos de los pollos inoculados al día de edad fueron colonizados por mayor cantidad de bacterias adheridas el día 2 pi (10^8 ufc/g) que aquellos inoculados a los 3, 5 y 7 días de edad (10^6 ufc/g). Estos resultados demuestran la menor susceptibilidad a la infección a medida que el ave se hace mayor, sin embargo, no hubo diferencias significativas de los aislamientos obtenidos desde hígado y bazo según edad para los días 2, 9 y 30 pi (Gast y Beard, 1989). Similares resultados fueron observados por Bjerrum *et al.*, (2003) quienes inocularon pollos de un día y 14 días de edad con *Salmonella* Typhimurium vía oral con varias dosis (10^6 y 10^7 ufc en pollos de un día y 10^7 , 10^8 , y 10^9 ufc en pollos de 14 días). Luego, sacrificaron 2 animales 2 veces por semana y tomaron muestras de hígado, bazo, íleon y ciegos para realizar recuentos de *Salmonella*. La inoculación de 10^7 ufc de *Salmonella* Typhimurium a pollos de un día de edad estableció una infección cecal estable en todos los animales durante 35 días, mientras que para los pollos de 14 días de edad, se observaron infecciones estables y duraderas con la inoculación de 10^9 ufc, confirmando así que a medida que aumenta la edad del pollo, se vuelve menos susceptible a *Salmonella* y por ello, necesita mayor dosis infectante.

Por otra parte, la ***dosis infectante*** es un factor que afecta el tiempo que demora *Salmonella spp* en realizar su ciclo de infección. Bjerrum *et al.*, (2003) lo demostraron determinando la presencia de *Salmonella* Typhimurium al inocular pollos de un día de edad con dos dosis: 2×10^6 ufc y 2×10^7 ufc. En el grupo de 10^7 al cabo de 3 días se detectó *Samonella* en las muestras de bazo, hígado, ciego e íleon, en cambio, en el grupo de 10^6 demoró 7 días en arrojar como positivas todas las muestras.

Asheg *et al.*, (2003) determinaron la adhesión y colonización de dosis altas (2×10^8 ufc) y dosis bajas (2×10^2 ufc) de SE fagotipo 4 en pollos de un día de edad. SE se asoció

con la superficie epitelial de las vellosidades cecales en el grupo de dosis baja desde las 18 horas hasta los 7 días pi, mientras que en dosis altas se observó adhesión y colonización desde las 6 horas hasta los 14 días pi. La penetración a la lámina propia cecal fue dosis dependiente, con numerosas *Salmonella* presentes en células macrófago-like, observadas desde el día 1 al 21 pi en aves tratadas con dosis altas, en contraste con la penetración esporádica en aves inoculadas con dosis baja, lo que se observó desde el día 1 hasta el 10 pi.

En relación a los tiempos de eliminación fecal también se ha demostrado que son diferentes según la **virulencia de la cepa**. En un trabajo realizado por Gast *et al.*, (2005) se demostró que la duración de la eliminación fecal era significativamente diferente para cepas con diferente virulencia. Para ello inocularon gallinas ponedoras SPF utilizando una cepa de *Salmonella* aislada de huevos en un grupo, y en otro grupo se usó la misma cepa a la cual habían sometido a varios pasajes en gallinas para hacerla más virulenta. Los valores promedio de la duración de la eliminación fecal fueron tan distintos como 13,8 días para la cepa original y 32,9 para la variante sometida a pasajes.

Con la información disponible actualmente en la literatura internacional, es indudable que existen varios factores que influyen en el comportamiento de SE con las aves, en particular con los pollos. Queda claro entonces que el modelo aviar en una investigación científica debe ser caracterizado en función de los factores edad, virulencia de la cepa y dosis infectante. En Chile, actualmente existe investigación científica sobre S.E. utilizando pollos como modelo experimental. Particularmente, el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile ha desarrollado una línea de investigación sobre medidas de control que permitan disminuir la colonización de S.E. en pollos utilizando una cepa nativa aislada en 1998 por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) desde una gallina. Esta cepa nativa se ha utilizado siempre con un esquema similar de infección: se ha trabajado hasta ahora usando pollos comerciales de 10 días de edad, los que se infectan con dosis de 10^5 ufc, y luego se les realiza necropsia el día 10 pi, logrando reaislar la cepa desafío en porcentajes variables.

Parece interesante entonces caracterizar la dinámica de la infección en pollos con la cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis, que ha recibido 9 pasajes para exacerbar su virulencia y que hasta la fecha se ha utilizado en un esquema de infección que no necesariamente es el más eficiente en términos de lograr el mayor reaislamiento de la cepa desafío en los grupos experimentales. Por eso es de vital importancia conocer el momento de máxima colonización y multiplicación en los diferentes tejidos para con ello lograr una mayor eficiencia en la obtención de resultados. Por otro lado, si se pudiese determinar estos momentos con mayor exactitud, sería posible diseñar experimentos ocupando el mínimo de tiempo y recursos económicos disponibles para la investigación de SE en el modelo aviar.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la dinámica de la infección experimental con una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P – 9 en pollos comerciales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el momento de inicio de la colonización intestinal de pollos experimentalmente infectados con *Salmonella* Enteritidis.
- Establecer el momento de inicio y permanencia de la invasión sistémica en pollos experimentalmente infectados.
- Describir la intermitencia de la eliminación intestinal de *Salmonella* Enteritidis en pollos experimentalmente infectados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.– **Diseño:** El estudio se realizó como parte del proyecto Fondecyt N° 1060569, en la búsqueda de perfeccionar el modelo experimental en pollos, con el afán de optimizar los recursos económicos disponibles. Toda la experiencia fue realizada en el Departamento de Medicina Preventiva Animal, particularmente en el Laboratorio de Microbiología.

2.– **Animales:** Pollos machos de 1 día de edad, provenientes de madres vacunadas contra *Salmonella*, que fueron gentilmente donados por una empresa productora de gallinas de postura de la Región Metropolitana. La negatividad de las aves a *Salmonella* fue comprobada mediante cultivo tradicional y análisis de PCR realizado con muestras de deposiciones recolectadas en cada jaula el día 3 de edad.

Se criaron desde el primer día de edad en la unidad experimental del Departamento de Medicina Preventiva Animal, recibiendo agua y alimento preparado sin antibiótico, *ad libitum*.

El número de aves y muestras obtenidas en cada etapa (tiempo) correspondió al máximo permitido por la factibilidad técnica y económica.

3.– **Cepa desafío:** se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis, de origen aviar, que fue donada por la Dra. Irma Acevedo, del Laboratorio de Bacteriología de Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). A partir de ella el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso seleccionó una cepa mutante espontánea, con resistencia a Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*). Esta cepa fue sometida a nueve pasajes en pollos (P-9), para aumentar su virulencia.

4.– **Aislamiento de SE:** para el procedimiento se utilizaron las pautas estandarizadas australianas para muestras clínicas de Murray y Barton (1993). Las muestras se colocaron en una bolsa plástica, con la identificación correspondiente, y se le adicionó caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Difco®) en razón aproximada 1:100. Se mezcló

cada bolsa en un equipo “Masticator” (IUL Instruments®) durante 90 segundos hasta lograr la homogeneización de la muestra. La bolsa se incubó a 37°C durante 72 horas, resemebrando a las 48 y 72 horas alícuotas del cultivo en placas de agar XLD (Difco®) con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (Arlab®) (20 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y las colonias sospechosas (colonia transparente con centro negro) se aglutinaron con suero anti-*Salmonella* grupo D1 (Difco®).

5.– **Modelo experimental:** Se utilizó aproximadamente 160 pollos de 1 día de edad en cada experiencia realizada. Cuando las aves cumplieron 7 días de edad fueron inoculadas por vía oral con 1 ml de una suspensión bacteriana que contenía la cepa SE *nal^r rif^r* P-9. Se analizaron dos dosis: 10⁴ ufc/ml y 10⁵ ufc/ml.



Foto N°1: Inoculación oral forzada de SE en un pollo comercial de 7 días.

Para preparar el inóculo, la cepa se cultivó a 37°C por 24 horas en caldo

común. Se ajustó su turbidez al tubo N°0.5 del Nefelómetro de Mc Farland (1.5×10^8 bacterias/ml) y de este tubo madre, se preparó la dilución correspondiente (10^4 o 10^5). Se corroboró la dosis del inóculo mediante la realización de un recuento en placa (ufc/ml) utilizando placas de agar XLD con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno) e incubando a 37°C por 24 horas (Albala, 2007).

Una vez inoculadas las aves, se sacrificaron 10 pollos por dislocación cervical (Beaver, 2001) a intervalos de 3, 6, 8, 18 y 24 horas post infección y posteriormente cada 24 horas, hasta cumplir los 12 días pi (Tabla N°1). De cada ave se extrajo: deposiciones por hisopado, intestino completo sin ciegos, ciegos y “pool” de órganos internos (hígado, bazo y corazón) (Tabla N°1).



Foto N°2: Ciegos de pollo.

Todas las muestras se procesaron en forma individual por cultivo tradicional (ver punto 4).

6.– **Normas de Bioseguridad:** se trabajó según los criterios de bioseguridad establecidos para enteropatógenos de nivel 2 (CDC y NIH, 1999). Se utilizó

Glutaraldehído (Asepti- Steryl, Ecolab®) para esterilizar la sala de animales de experimentación (paredes, techos, jaulas, etc). Para el manejo de las aves se utilizaron delantales, trajes de plástico desechables, guantes, mangas plásticas, mascarillas y cubrebotas desechables, que fueron de uso exclusivo en la sala de aves inoculadas. Todos los residuos orgánicos sólidos que se produjeron durante las experiencias fueron incinerados, y los residuos líquidos fueron tratados con cloro antes de su eliminación.

Tabla 1: Tiempos de obtención de muestras* de deposiciones, intestino, ciegos y pool de órganos internos en pollos comerciales experimentalmente infectados con la cepa SE *nal^r rif^r* P-9.

Tiempo de muestreo	Tiempo post infección (pi)
T1	3h**
T2	6h
T3	8h
T4	18h
T5	1d***
T6	2d
T7	3d
T8	4d
T9	5d
T10	6d
T11	7d
T12	8d
T13	9d
T14	10d
T15	11d
T16	12d

* 10 aves por cada tiempo de muestreo, inoculados al día 7 de vida.

** h = Horas.

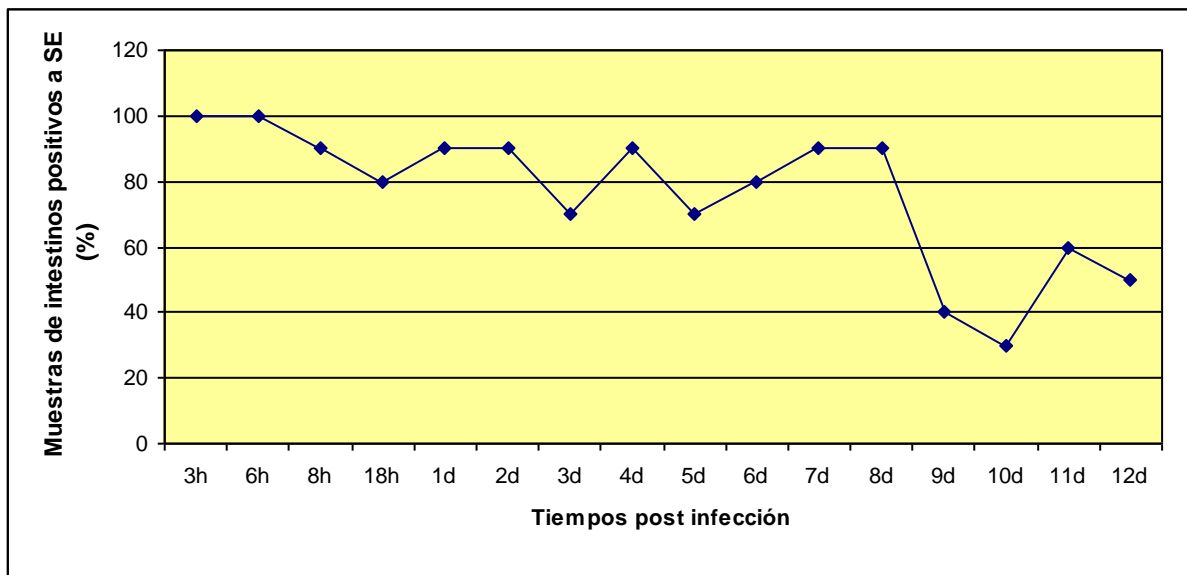
*** d = Días.

RESULTADOS

1.Dosis 10^4 : La dosis exacta inoculada correspondió a $3,9 \times 10^4$ ufc/ml.

- a) Intestinos: El inicio de la colonización intestinal de SE fue tan temprano que a las 3 horas post infección fue posible detectar un 100% de muestras positivas, lo que se mantuvo hasta las 6 horas pi. Desde las 8 horas hasta los 8 días post infección, los valores se presentaron variables, con un rango entre 70 y 90% de muestras positivas. Desde el día 9 en adelante, el porcentaje de muestras positivas fue bajo, y osciló entre 30 y 60% (Ver gráfico N° 1).

Gráfico N°1: Porcentaje de intestinos positivos a *Salmonella* Enteritidis tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^4 ufc.



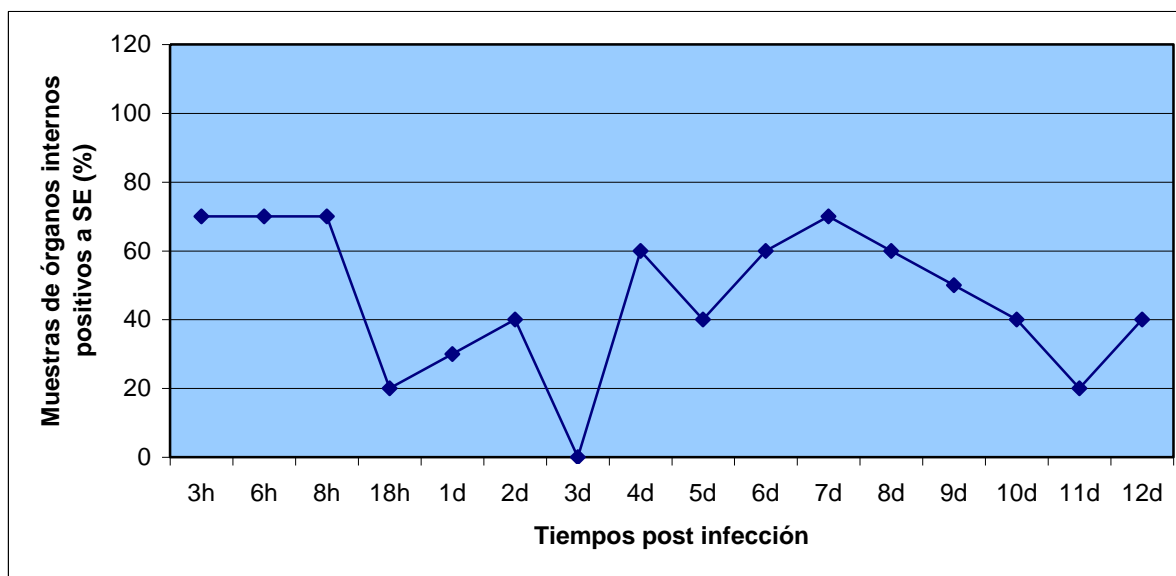
h = Horas

d = Días

b) Órganos internos: La pesquisa de SE fue tan temprana como a las 3 horas pi., donde el 70% de las aves tenían sus órganos positivos; este porcentaje se mantuvo durante las primeras 8 horas post infección. Después de las 8 horas pi., las muestras se comportaron muy variables, con valores que oscilaron entre 0% hasta 60% alcanzando un peak de 70% el día 7 post infección. Luego, el porcentaje de aislamientos descendió paulatinamente.

El porcentaje de órganos internos positivos no alcanzó el 100% en ninguno de los tiempos de muestreo (Ver gráfico N° 2).

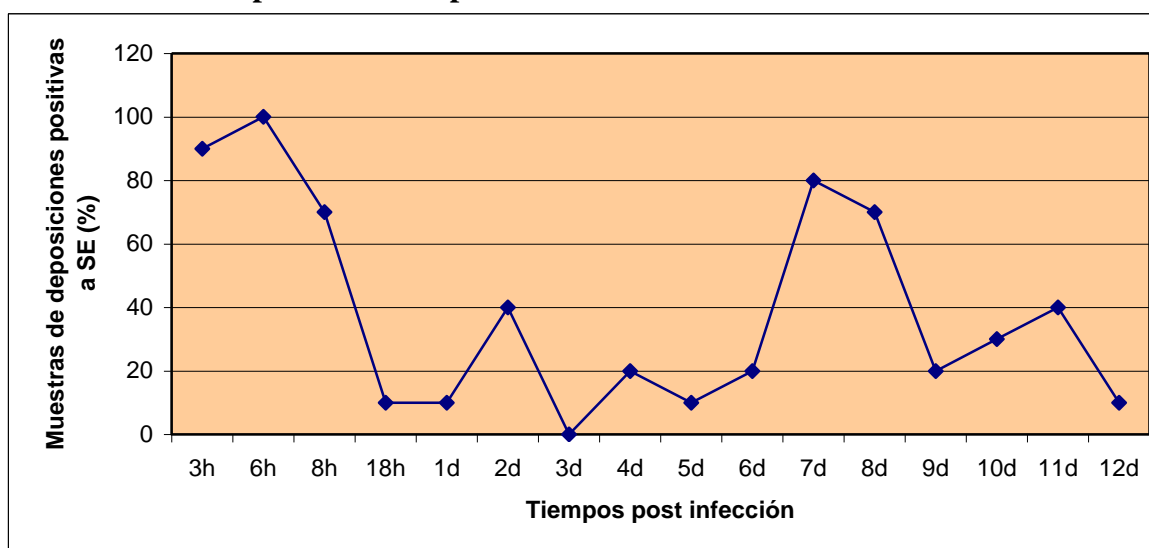
Gráfico N°2: Porcentaje de órganos internos positivos a *Salmonella Enteritidis* tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^4 ufc.



h = Horas
d = Días

c) Deposiciones: La eliminación de *Salmonella* en deposiciones fue baja y muy variable durante toda la experiencia. El 100% de aislamiento se obtuvo en un sólo tiempo, que correspondió a las 6 horas pi. Posteriormente, el porcentaje de aislamiento decayó, presentando grandes oscilaciones durante toda la experiencia. Desde las 18 horas hasta los 6 días post infección, se observaron valores bajos, que fueron desde 10 hasta 40%. Desde el día 7 en adelante, los resultados obtenidos fueron entre 10% hasta 80%. Cabe destacar que los aislamientos en el día 7 y 8 post infección presentaron una drástica mejoría, alcanzando hasta un 80% de muestras positivas (Ver gráfico N° 3).

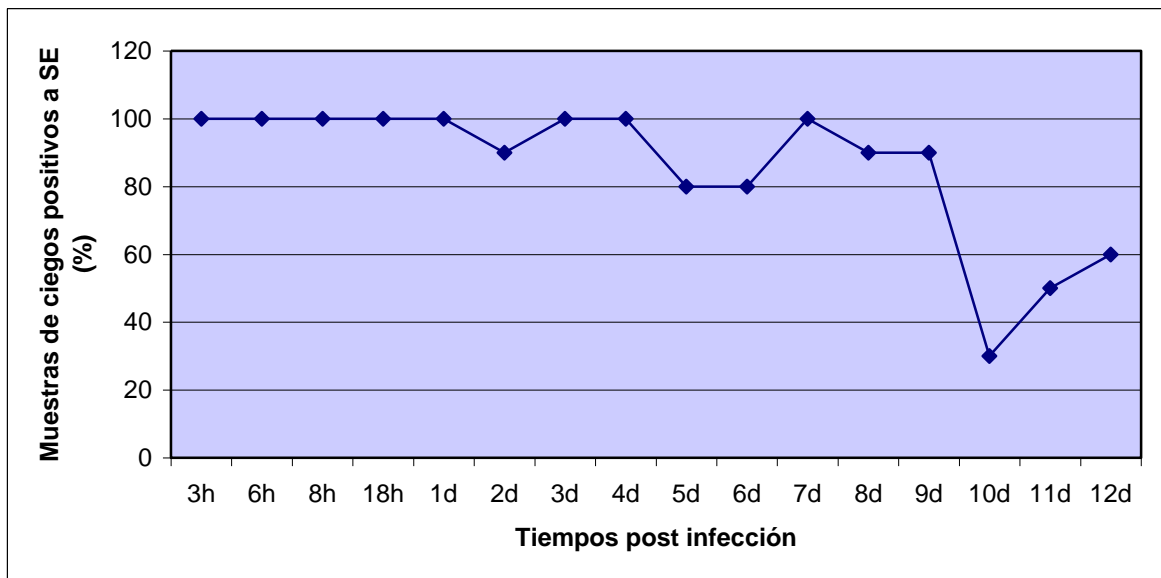
Gráfico N° 3: Porcentaje de deposiciones positivas a *Salmonella* Enteritidis tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^4 ufc.



h = Horas
d = Días

d) Ciegos: El inicio de la colonización cecal fue muy temprano, alcanzando un 100% de muestras positivas a las 3 horas pi, lo que se mantuvo estable hasta los 4 días pi. Entre los días 4 y 9 post infección, los porcentajes variaron entre 80 y 100%, decayendo luego a valores entre un 30 y 60% de muestras positivas (Ver gráfico N° 4).

Gráfico N°4: Porcentaje de ciegos positivos a *Salmonella* Enteritidis tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^4 ufc.

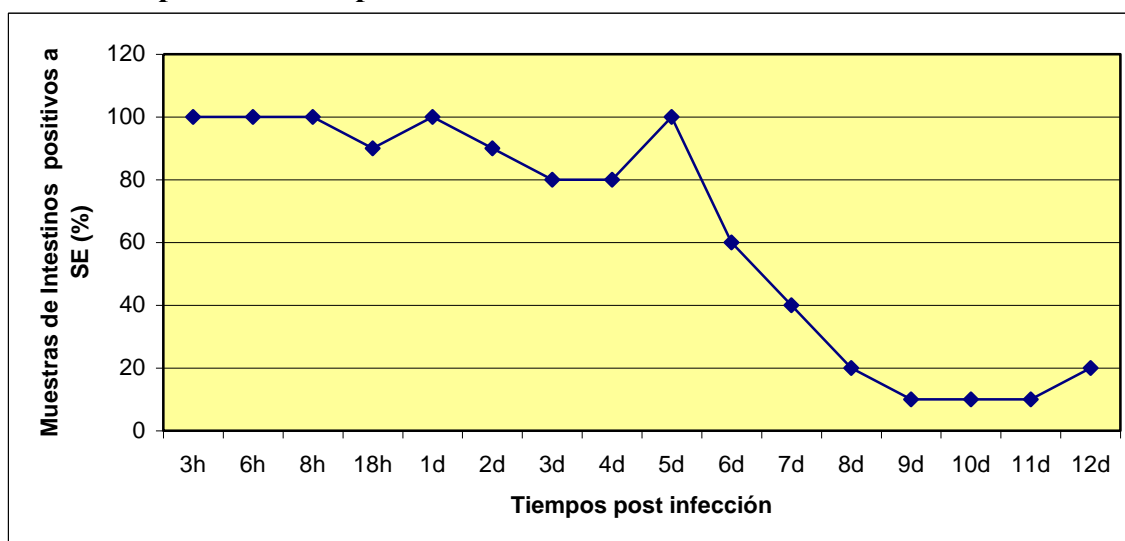


h = Horas
d = Días

2.Dosis 10^5 : La dosis exacta inoculada correspondió a $1,5 \times 10^5$ ufc/ml.

- a) Intestinos: El inicio de la colonización intestinal ocurrió a las 3 horas pi, con un 100% de aislamientos, que se mantuvieron hasta las 8 horas pi. Dentro de los primeros 5 días post infección, se presentaron variaciones que fueron entre 80 y 100%, alcanzando el peak el día 5 post infección. Luego, comenzó a descender el porcentaje de aislamientos positivos, que finalmente, entre los días 9 y 12 post infección no superaron el 20% (Ver gráfico N° 5).

Gráfico N° 5: Porcentaje de intestinos positivos a *Salmonella* Enteritidis tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^5 ufc.

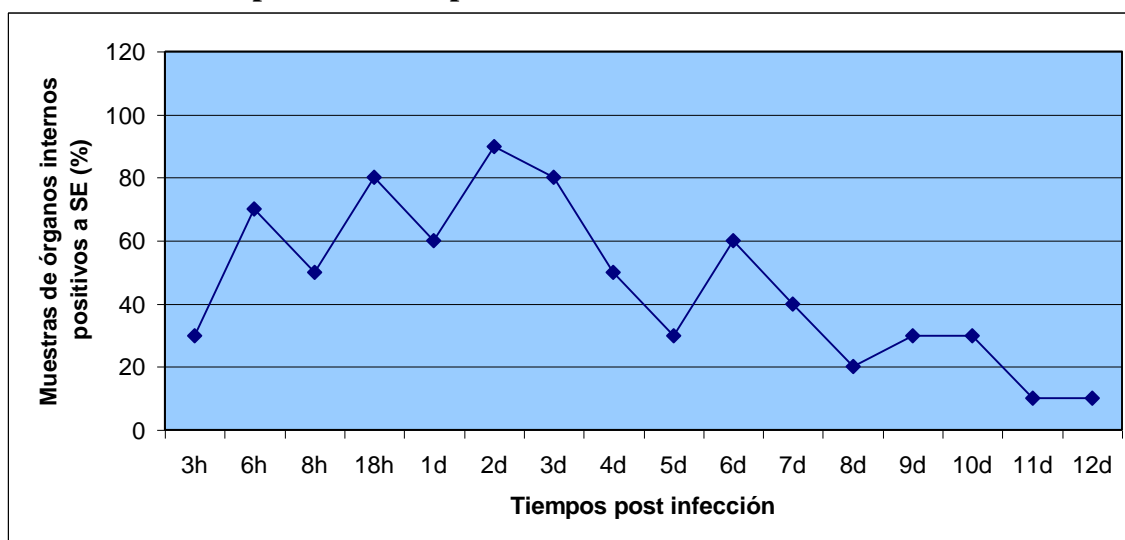


h = Horas

d = Días

b) Órganos internos: El reaislamiento de *Salmonella* Enteritidis en las muestras de órganos internos nunca alcanzó un 100% para esta dosis, sin embargo, durante los primeros tiempos de muestreo pudo observarse un aumento, hasta alcanzar un peak de 90% el día 3 post infección. Luego los valores fueron en descenso, presentando valores muy variables, con un segundo peak el día 6 post infección de 60% (Ver gráfico N° 6).

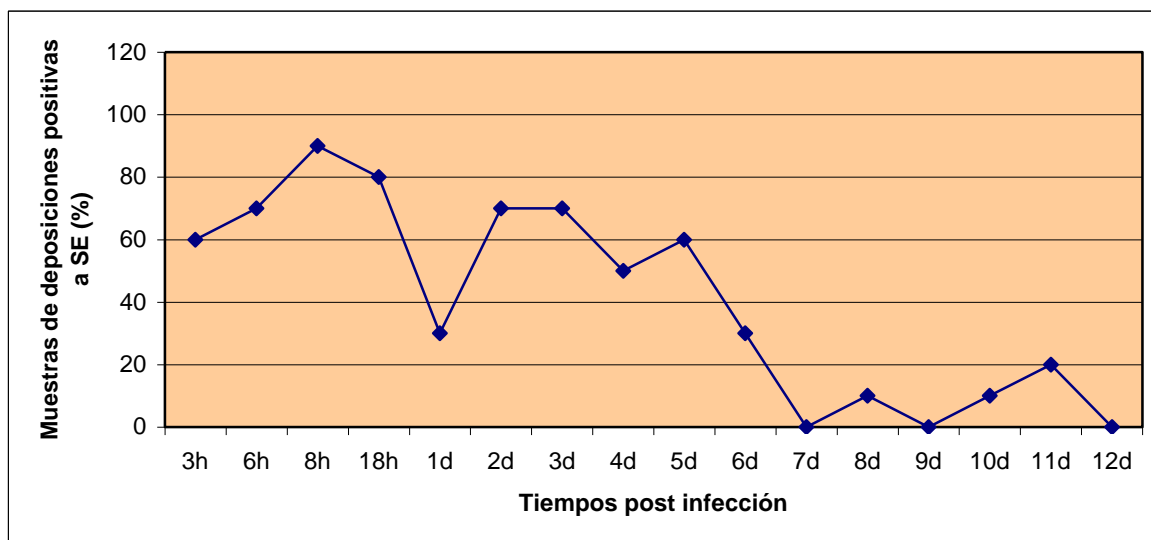
Gráfico N°6: Porcentaje de órganos internos positivos a *Salmonella* Enteritidis tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^5 ufc.



h = Horas
d = Días

c) Deposiciones: La eliminación de *Salmonella* en deposiciones fue muy variable durante toda la experiencia y nunca logró alcanzar el 100% de aislamientos. En los primeros 6 días post infección se observaron porcentajes de aislamiento relativamente altos, pero muy irregulares, entre 30 y 90%. El peak se observó en las 8 horas pi, y posteriormente se observaron valores intermedios hasta el día 5 pi. Desde el día 7 en adelante, los valores fueron bajos, y no superaron el 20% (Ver gráfico N° 7).

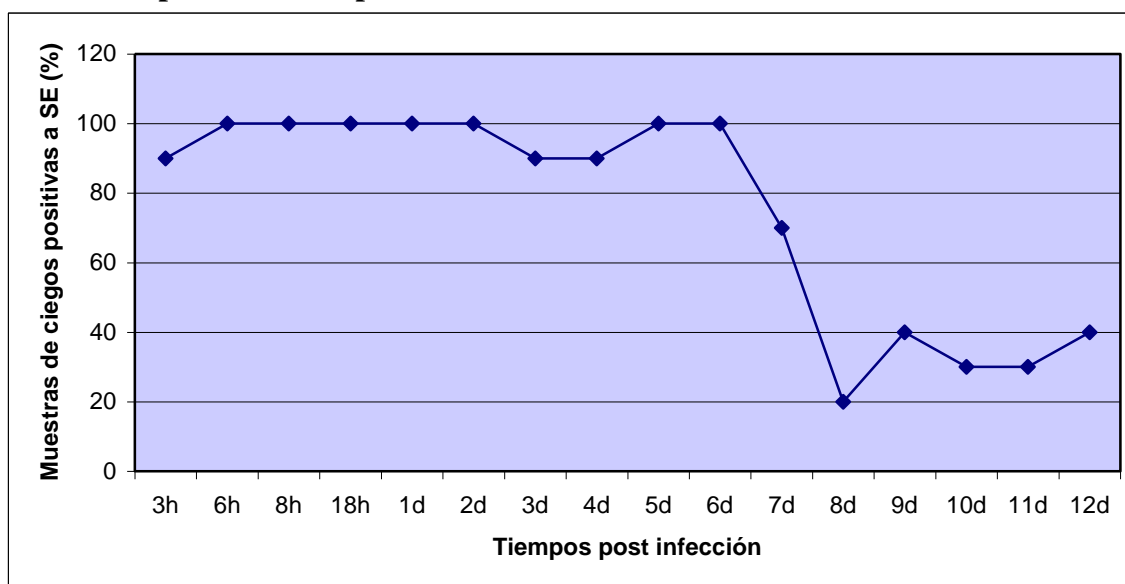
Gráfico N° 7: Porcentaje de deposiciones positivas a *Salmonella* Enteritidis tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^5 ufc.



h = Horas
d = Días

- d) Ciegos: El aislamiento desde ciegos fue alto y consistente durante los primeros 6 días post infección, alcanzando valores entre 90 y 100%. El inicio de la colonización ocurrió a las 3 horas pi, alcanzando el 100% de muestras positivas a las 6 horas pi. Desde el día 8 post infección en adelante, los porcentajes descendieron, alcanzando entre un 20 y 40% de muestras positivas (Ver gráfico N° 8).

Gráfico N° 8: Porcentaje de ciegos positivos a *Salmonella* Enteritidis tras la infección experimental de pollos con una dosis de 10^5 ufc.



h = Horas
d = Días

En ninguna de las experiencias realizadas (dosis 10^4 y 10^5) ocurrió que en un mismo tiempo de muestreo coincidiera que el 100% de los pollos fueran positivos para las cuatro muestras obtenidas. Pese a lo anterior, una alta proporción (>60%) de pollos completamente positivos se observaron en los tiempos T1 (3hpi), T2 (6hpi) y T11 (7dpi) para la dosis 10^4 , y en T4 (18hpi), T6 (2dpi) y T7 (3dpi) para la dosis 10^5 (Anexos N°1 y N°2). Si no se consideran las muestras de deposiciones, una alta proporción (>60%) de

pollos con las muestras de órganos internos, intestinos y ciegos positivos se observaron en los tiempos T1 (3hpi), T2 (6hpi), T3 (8hpi), T11 (7dpi) y T12 (8dpi) para la dosis 10^4 , y en T2 (6hpi), T4 (18hpi), T5 (1dpi), T6 (2dpi) y T7 (3dpi) para la dosis 10^5 (Anexos N°1 y N°2).

Durante el transcurso de las experiencias ningún ave murió y no hubo decaimiento u otra señal de detrimento de salud. Durante todo el periodo experimental se observó un buen consumo de alimento y agua por parte de las aves, asimismo, no se presentó ninguna lesión macroscópica en los órganos viscerales cuando las aves fueron examinadas post mortem.

DISCUSIÓN

En este estudio, se describió un modelo de infección con dos dosis, 10^4 y 10^5 ufc, de *Salmonella enterica serovar Enteritidis nal^r rif^r P-9*, en pollos inoculados a los 7 días de edad. La realización de la inoculación en esta edad, y no a los 10 días como era lo tradicional, fue de acuerdo al modelo establecido por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Este modelo busca por un lado el aprovechamiento del alto nivel de anticuerpos maternos de los pollos en el día 7 de edad (Hamal *et al.*, 2006) y por otro, la optimización de los recursos técnicos y económicos, ya que es posible economizar 3 días en trabajo y costos generales de las experiencias.

El momento de inicio de la colonización intestinal por parte de la cepa SE P-9, considerando tanto las muestras de ciego como las de intestino, fue muy temprano en ambas dosis, siendo posible la pesquisa tan temprano como a las 3 horas pi (primer tiempo de muestreo). Esto era lo esperado y coincide con los trabajos de otros autores, como Desmidt *et al* (1997), quienes aislaron *Salmonella* Enteritidis 3 horas pi en el tracto intestinal en pollos inoculados al día de edad con una dosis de 10^4 ufc. Turnbull y Snoeyenbos (1974) reaislaron SE 3 horas pi en el tracto intestinal después de inocular pollos de 1 día de edad vía oral con una dosis aproximada de 10^8 ufc. Asheg *et al* (2003) detectaron *Salmonella* Enteritidis 6 horas pi en la superficie epitelial de los ciegos de pollos inoculados al día de edad con una dosis de 10^8 ufc, primer tiempo de muestreo analizado por los autores.

En general, el comportamiento en el tiempo de las muestras de intestino y ciego siguieron tendencias muy similares, independiente de la dosis utilizada en este estudio, siendo las muestras de ciego más estables, característica que le otorgaría mayor confiabilidad. El trabajo de Fanelli *et al* (1971) coincide en identificar a los ciegos como un área intestinal con mejores reaislamientos que el intestino completo.

Al hacer un seguimiento en el tiempo de ambas muestras, los resultados de Fanelli *et al* (1971) fueron muy diferentes al de este estudio, ya que no sólo intestino y ciegos tuvieron comportamientos muy dispares, sino que también la eficiencia de reaislamiento

intestinal fue mucho menor que la de ciegos. Los autores obtuvieron en intestino un “peak” de reaislamiento el día 2 pi que alcanzó aproximadamente 40% de positividad, valor muy lejano al peak obtenido en este estudio, que fue de 100% en ambas dosis a las 3 horas pi. Al analizar los ciegos, ellos obtuvieron los mejores resultados, entre 80 y 90%, en los días 1 y 2 pi y luego los valores descendieron hasta alcanzar aproximadamente un 50% de muestras positivas el día 13 pi. La dinámica de estos autores difiere con la de este estudio, sin embargo, las diferencias de su modelo podrían deberse a que usaron pollos de 28 días de edad y una dosis de 10^8 ufc de *Salmonella* Typhimurium.

El momento de inicio de la invasión sistémica de SE P-9 en los pollos experimentalmente infectados se detectó a las 3 horas pi en ambas dosis. Esto no coincidió con los resultados de Desmidt *et al* (1997) quienes inocularon una dosis de 10^4 ufc de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 vía oral en pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad y reaislaron desde órganos internos (corazón e hígado) sólo a partir de las 12 horas pi. Tampoco coincidieron con los resultados de Turnbull y Snoeyenbos (1974), ya que ellos no detectaron *Salmonella* a las 3 horas pi, iniciando la pesquisa entre las 5 y 10 horas pi en pollos de 1 día de edad inoculados vía oral con aproximadamente 10^8 ufc de SE.

La permanencia de *Salmonella* en los órganos internos fue inestable a ambas dosis, observando alzas y bajas durante todo el periodo de muestreo. Esta situación fue diferente a lo observado por Gast y Beard (1989) quienes obtuvieron porcentajes elevados de recuperación de *Salmonella* Typhimurium de 83.3% en hígado y bazo tanto el día 2 como el día 9 pi, en pollos inoculados a los 7 días de edad con 10^8 ufc. En este estudio no se evidenció la misma estabilidad, ya que el único día donde se observó 90% de aves positivas fue el día 2 pi, posteriormente los valores descendieron a niveles tan bajos como 20%.

Las razones de esta inestabilidad de reaislamientos probablemente radican en la respuesta inmune del animal. Turnbull y Snoeyenbos (1974) describieron ciclos de alzas y bajas en el número de salmonelas presentes en órganos internos, y observaron macrófagos que contenían organismos degenerados que indicaban la destrucción exitosa de estos organismos en hígado y bazo. La observación intestinal realizada simultáneamente con los órganos, sugirió que las alzas en el número de *Salmonella* en órganos internos eran el resultado de un ciclo de multiplicación y reinvasión desde el lumen cecal más que una

proliferación directa en el hígado o en el bazo.

La intermitencia de la eliminación intestinal de *Salmonella* Enteritidis en los pollos experimentalmente infectados se describió a través de los resultados de los hisopados cloacales. Los valores obtenidos fueron muy irregulares y oscilaron durante todo el periodo de muestreo, sin mostrar una tendencia clara. Esta situación era esperada ya que a pesar de la existencia de unas pocas experiencias donde se ha trabajado con hisopados cloacales y se ha obtenido buenos resultados de reaislamiento (Bohez *et al.*, 2007), la mayoría describe exactamente lo contrario (Brownell *et al.*, 1969; Fanelli *et al.*, 1971; Hinton, 1988; Van Immerseel *et al.*, 2004); más aún, actualmente no se recomienda el uso de esta técnica debido a su imprecisión (Van Immerseel *et al.*, 2004).

Los resultados de este estudio a través del tiempo fueron tan variables como el realizado por Fanelli *et al* (1971), quienes al realizar un muestreo de hisopados cloacales durante 13 días pi, de aves inoculadas con 10^8 ufc de *S. Typhimurium* vía oral a los 28 días de edad, obtuvieron una eficiencia máxima de reaislamiento de aproximadamente 50% en el día 2 pi. En el presente trabajo, el peak de reaislamiento fue mucho mayor (entre 90 y 100%); coincidente con Fanelli *et al* (1971) en este estudio se observó que la probabilidad de obtener valores altos de reaislamiento es mayor en la medida que el muestreo se realice cercano al día de la inoculación, porque luego los valores disminuyen en el tiempo. En este trabajo, en ambas dosis se presentaron valores altos en los primeros tiempos de muestreo, siendo en la dosis 10^5 más persistente la eficiencia de reaislamiento en estos momentos. A simple vista, es fácil pensar que este fenómeno corresponde a un suceso dosis-dependiente, sin embargo sería necesario realizar otras experiencias para comprobar que no se trata de un hecho azaroso.

Al igual que en los estudios de Brownell *et al* (1969), Fanelli *et al* (1971), Hinton (1987) y el de Van Immerseel *et al* (2004), los resultados de este trabajo sugieren que el cultivo de hisopados cloacales es un pésimo indicador del estado portador de *Salmonella*.

Brownell *et al* (1969) realizaron un seguimiento de la eliminación intestinal de *Salmonella* en pollos infectados, donde pudieron comprobar que algunos animales positivos a *Salmonella* nunca eliminaron la bacteria en las deposiciones, durante un periodo de observación de 171 días. De hecho, en este estudio hubo un gran número de aves que

teniendo un cultivo de ciegos positivo fueron negativos en su hisopado, dicho de otro modo, el análisis individual de los ciegos no se correspondió con los resultados del análisis de deposiciones. Por lo tanto, si bien la obtención de muestras de deposiciones vía hisopados cloacales para la detección de *Salmonella* mediante cultivo es un método fácil de realizar, este un método cruento que no vale la pena, ya que tiene una baja confiabilidad para determinar el estado de infección de un animal y subestima la incidencia de *Salmonella* en el intestino.

De las 4 muestras analizadas, aquella que tuvo los resultados más consistentes en este estudio, fue la de ciegos. Esto concuerda con otros trabajos, que señalan que *Salmonella* exhibe una clara predilección por el tracto intestinal bajo, especialmente por los ciegos, cuando es introducida en forma oral en el pollo (Brownell *et al.*, 1969; Brownell *et al.*, 1970; Fanelli *et al.*, 1971; Turnbull y Snoeyenbos, 1974; Desmidt *et al.*, 1997; Hinton *et al.*, 1989; Bjerrum *et al.*, 2003). Turnbull y Snoeyenbos (1974) y Bjerrum *et al.* (2003) demostraron que los ciegos del pollo son uno de los mayores sitios de tránsito de *Salmonella* para alcanzar los tejidos internos. El ciego es uno de los lugares donde se realiza mayormente la invasión celular por parte de *Salmonella*, debido a que el paso por el intestino delgado es muy rápido comparado con los ciegos, donde la bacteria tendría más tiempo para establecerse y al haber menor movimiento, alcanzaría una mayor proximidad con la célula que en otros segmentos intestinales. En cuanto a la facilidad de obtención, al igual que las otras muestras usadas en este estudio, los ciegos fueron simples de extraer y trabajar, fueron fáciles de identificar del resto del intestino y su búsqueda y extirpación requirió de poco tiempo.

El porcentaje de infección total (animales con al menos una muestra positiva), sin tomar en cuenta los hisopados cloacales, fue mayor al 80% en todos los tiempos analizados hasta el día 9 pi en la dosis 10^4 y mayor o igual a 90% en todos los tiempos hasta el día 6 pi en la dosis 10^5 (Anexos 1 y 2). Al observar estos datos, es inevitable preguntarse qué sucedió con *Salmonella* en los tiempos de muestreo subsiguientes, en los cuales el porcentaje de infección total desciende bajo el 70%. Por un lado, es necesario mencionar

que el método de reaislamiento utilizado en este estudio tiene un límite de detección de 10^3 ufc/g de muestra, lo que implica que si los tejidos analizados contenían un número menor de *Salmonella*, estos fueron negativos. Por otro lado, existe un factor que hay que considerar en la dinámica de este modelo: la respuesta inmune del animal. La infección con *Salmonella enterica* en pollos gatilla la respuesta inmune humoral y celular, las cuales se han detectado a nivel local en la mucosa intestinal, las tonsilas cecales y el bazo (Lillehoj *et al.*, 2007). Se ha observado que en el ovario y el oviducto de aves inoculadas con *Salmonella* Enteritidis el número de macrófagos y células T aumentan significativamente en el epitelio el día 7 pi, con peak el día 10, y que vuelven a niveles basales el día 21. Estos incrementos en la proliferación de macrófagos y células T preceden inmediatamente a la declinación de *Salmonella* Enteritidis en los tejidos (Lillehoj *et al.*, 2007). En el presente estudio no se analizaron muestras de tejidos ováricos, sin embargo, con las muestras analizadas se observó un descenso en la recuperación de *Salmonella* Enteritidis similar, ya que en ambas dosis ocurrió una disminución en el porcentaje de infección total alrededor de los días 7 y 10 pi. Si bien las muestras ováricas no son comparables con las de órganos internos, hígado y bazo en particular, al ser estos órganos involucrados directamente con el sistema inmune del animal, es muy probable que eventos similares hayan ocurrido en estos tejidos y hayan determinado el comportamiento de la dinámica presenciada en este estudio.

Según los resultados obtenidos, queda claro que los mejores días para sacrificar los animales y extraer muestras dependerán de los objetivos de cada experiencia, y variarán según las muestras que se analicen en cada caso:

- Si se quisiera trabajar con ciegos en la dosis 10^4 , las mejores opciones para obtener un alto porcentaje de reaislamiento (mayor o igual a 80%) serán durante los primeros 9 días pi y para la dosis 10^5 , el mejor momento de muestreo será durante los primeros 6 días post infección.
- En el caso de trabajar con muestras de intestino sin ciegos, en la dosis 10^4 los mejores resultados (mayores a 70% de reaislamiento) se obtienen durante los 8 días pi. Para la dosis 10^5 , se puede obtener resultados mayores o iguales a 80% durante los primeros 5 días pi.

- Para trabajar con muestras de órganos internos, con la dosis 10^4 , hay dos opciones para obtener buenos resultados de reisolamiento (entre un 60 y 70%). La primera es obtener las muestras en periodos tempranos de infección, dentro de las primeras 8 horas pi, y la segunda es entre los días 6 y 8 pi. En cambio, para la dosis 10^5 , los mejores momentos para reisolamiento de la bacteria desde órganos internos (eficiencia de un 60 - 90%) es entre las 18 horas y los 3 días pi.
- A pesar de no ser recomendable el trabajo con hisopados cloacales, si se decide intentar, en la dosis 10^4 el mejor reisolamiento se logra durante las primeras 8 horas pi y en los días 7 y 8 pi. En la dosis 10^5 , los mejores resultados se obtienen durante las primeras 18 horas pi (60-90%) y entre los 2 y 5 días pi.

Considerando las 4 muestras que se procesaron en este estudio por cada animal, existen algunos momentos en que se alcanza un buen porcentaje de reisolamiento en todas ellas. Para ambas dosis se recomienda el trabajo dentro de las primeras 18 horas pi si lo que se busca es una pesquisa temprana. Si lo que se busca es esperar un tiempo de varios días para evaluar la eficiencia de un tratamiento, lo más recomendable sería intentar el reisolamiento en el día 7 pi para la dosis 10^4 y, en la dosis 10^5 , al ser más estables los resultados, puede realizarse en cualquier momento hasta el día 6 pi.

CONCLUSIONES

Para la dinámica de infección de pollos inoculados a los 7 días de edad con la cepa *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P-9, observados hasta el día 12 post inoculación, se concluye que:

- 1) El inicio de la colonización intestinal de pollos experimentalmente infectados con *Salmonella* Enteritidis P-9 ocurre tan temprano como a las 3 horas post inoculación.
- 2) El inicio de la invasión sistémica en pollos experimentalmente infectados es rápida, comenzando a las 3 horas post inoculación, sin embargo lo más frecuente es que esta etapa se presente a las 6 horas.
- 3) La pesquisa de la cepa desafío en órganos internos es inestable durante los 12 días post infección.
- 4) La eliminación intestinal de *Salmonella* Enteritidis en pollos experimentalmente infectados es intermitente e irregular durante los primeros 12 días post infección.
- 5) Los hisopados cloacales no permiten determinar eficientemente el estado portador intestinal en pollos infectados con *Salmonella* Enteritidis P-9.
- 6) Las muestras de ciego demuestran eficientemente el estado portador de *Salmonella* Enteritidis P-9.
- 7) Los mejores momentos para pesquisar pollos infectados con *Salmonella* Enteritidis P-9 mediante las muestras de ciegos son durante los primeros 9 días pi para la dosis 10^4 y durante los primeros 6 días post infección para la dosis 10^5 .

BIBLIOGRAFÍA

- **ALBALA, I.** 2007. Biocontrol de *Salmonella* Enteritidis en aves mediante el uso de bacteriófagos. (Título Profesional de Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 2007. Pp - 53
- **ALTEKRUSE, S.; BAUER, N.; CHANLONGBUTRA, A.; DESAGUN, R.; NAUGLE, A.; SCHLOSSER, W.; UMHOLTZ, R.; WHITE, P.** 2006. *Salmonella* Enteritidis in Broiler Chickens, United States, 2000-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(12): 1848-1852.
- **ALEXANDRE, M.; POZO, C.; GONZÁLEZ, V.; MARTÍNEZ, M.C.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I.** 2000. Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la región metropolitana. *Rev. Méd. Chile.*, 128(10):1075-1083.
- **ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M.** 1999. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *J. Med. Microbiol.*, 48: 771-780.
- **ASHEG, A.A.; FEDOROVA, V.; PISTL, J.; LEVKUT, M.; REVAJOVA, V.; KOLODZIEYSKI, L.; SEVCIKOVA, Z.; PILIPCINEC, E.** 2001. Effect of low and high doses of *Salmonella enteritidis* PT4 on experimentally infected chicks. *Folia. Microbiol. (Praha).*, 46(5): 459-462.
- **ASHEG, A.A.; LEVKUT, M.; REVAJOVA, V.; SEVCIKOVA, Z.; KOLODZIEYSKI, L.** 2003. Spreading of *Salmonella enteritidis* in the cecum of chickens. *Folia. Microbiol.*, 48(2): 277-279.
- **BARROW, P.** 1993. *Salmonella* control-past, present and future. *Avian. Pathol.* 22:657-669.
- **BEAVER.** 2001. Report of the Avma Panel on Euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218 (5): 669-696.
- **BJERRUM, L.; ENGBERG, R.M.; PEDERSEN, K.** 2003. Infection Models for *Salmonella typhimurium* DT110 in Day-Old and 14-Day Old Broiler Chickens Kept in Isolators. *Avian. Dis.*, 47(4): 1474-1480.
- **BOHEZ, L.; GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; DEWULF, J.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSSEEL, F.** 2007. The *Salmonella* Pathogenicity Island 2 regulator *ssrA* promotes reproductive tract but not intestinal colonization in chickens. *Vet. Microbiol.* [Disponible solo online]

- **BOYLE, E.; BISHOP, J.; GRASSL, G.; FINLAY, B.B.** 2007. *Salmonella*: from Pathogenesis to Therapeutics. J. Bacteriol., 189 (5): 1489-1495.
- **BRADEN, C.** 2006. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States. Clin. Infect. Dis., 43(4):512-517
- **BROWNELL, J; SADLER, W; FANELLI, M.** 1970. Role of ceca in intestinal infection of chickens with *Salmonella* Typhimurium. Avian Dis., 14(1):106-116.
- **BROWNELL, J; SADLER, W; FANELLI, M.** 1969. Factors influencing the intestinal infection of chickens with *Salmonella* Typhimurium. Avian Dis., 13 (4): 804-816.
- **CDC.; NIH. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.** 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. [En línea] <<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm>> [Consulta: 10 - 03 - 2007]
- **DARWIN, K.H.; MILLER, V.L.** 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. Clin. Microbiol. Rev., 12(3): 405-428.
- **DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F.** 1997. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. Vet. Microbiol., 56: 99-109.
- **DIBB-FULLER, M.; WOODWARD, M.** 2000. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella enteritidis* to colonization and invasion of chicks. Avian Pathol., 29: 295-304.
- **DOYLE, M.P.; ERICKSON, M.C.** 2006. Reducing the Carriage of Foodborne Pathogens in Livestock and Poultry. Poult. Sci., 85(6): 960-973.
- **FANELLI, M.J.; SADLER, W.W.; FRANTI, C.E.; BROWNELL, J.R.** 1971. Localization of salmonellae within the intestinal tract of chickens. Avian. Dis., 15(2):366-75.
- **FICA, A.; ALEXANDRE, M.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I.** 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella* Typhi a *Salmonella enteritidis*. Rev. Chil. Infect., 18(2): 85-93.
- **FIGUEROA, I.; VERDUGO, A.** 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Rev. Latinoam. Microbiol., 47(1-2): 25-42.

- **FIGUEROA, J.** 2007. Descripción y análisis de las acciones realizadas por los servicios públicos (salud animal y salud pública), frente a salmonelosis humana. (Título Profesional de Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 2007. Pp – 98.
- **FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M.** 2007. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.*, 18; [Disponible sólo online]
- **GAST, R.K.; BEARD, C.W.** 1989. Age-Related Changes in the Persistence and Pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in Chicks. *Poult. Sci.*, 68(11): 1454-1460.
- **GAST, R.K.** 1994. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contributions of experimental infections. *Int. J. Food Microbiol.*, 21: 107-116.
- **GAST, R.K.** 2000. Strategies and programs for controlling *Salmonella enteritidis* poultry and eggs. **In:** 7° Seminario Internacional Producción y Patología Aviar (24 al 26 de Mayo 2000, Valdivia-Chile). AMEVEA-Chile y Universidad Austral de Chile.
- **GAST, R.K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S.** 2005. The Relationship Between the Duration of Fecal Shedding and the Production of Contaminated Eggs by Laying Hens Infected with Strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. *Avian. Dis.*, 49: 382-386.
- **GILL, O.N.; SOCKETT, P.N.; BARTLETT, C.L.; VAILE, M.S.; ROWE, B.; GILBERT, R.J.; DULAKE, C.; MURRELL, H.C.; SALMASO, S.** 1983. Outbreak of *Salmonella* napoli infection caused by contaminated chocolate bars. *Lancet.*, 12;1(8324): 574-577.
- **GUARD-PETTER, J.** 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ. microbiol.*, 3(7): 421-430.
- **HAMAL, K.; BURGUESS, S.; PEVZNER, I.; ERF, G.** 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult. Sci.*, 85(8): 1364-1372.
- **HINTON, M.** 1988. *Salmonella* infection in chicks following the consumption of artificially contaminated feed. *Epidemiol. Infect.*, 100(2):247-256.
- **HINTON, M.; PEARSON, G.R.; THRELFALL, E.J.; ROWE, B.; WOODWARD, M.; WRAY, C.** 1989. Experimental *Salmonella enteritidis* infection in chicks. *Vet. Rec.*, 124(9):223.
- **HO, W.; CHOU, C.** 2001. Effects of carbon and nitrogen sources, sodium chloride and culture conditions on cytotoxin production by *Salmonella choleraesuis*. *Int. J.*

Food. Microbiol., 67(1-2): 81-88.

- **LILLEHOJ, H.; KIM, C.; KEELER, C.; ZHANG, S.** 2007. Immunogenic Approaches to Study Host Immunity to Enteric Pathogens. *Poult. Sci.*, 86: 1491-1500.
- **MEAD, P.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.; BRESEE, J.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.; TAUXE, R.** 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5(5): 607-625.
- **MILNER, K.; SHAFFER, M.** 1952. Bacteriologic studies of experimental Salmonella infections in chicks. *J. Infect. Dis.*, 90(1):81-96.
- **MURRAY, C.; BARTON, M.** 1993. Salmonellosis Bacteriology. **In:** Corner, L. and Bagust, T. (Eds). Australian Standard Diagnostic Techniques For Animal Diseases. CSIRO for the Standing Committee on Agriculture and Resource Management. East Melbourne, Australia. Pp. 3-8.
- **OHL, M; MILLER, S.** 2001. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annu. Rev. Med.*, 52: 259-274.
- **PRADO, V.; SOLARI, V.; ALVAREZ, I.; ARELLANO, C.; VIDAL, R.; CARREÑO, M.; MAMANI, N.; FUENTES, D.; O'RYAN, M.; MUÑOZ, V.** 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. *Rev. Méd. Chile.*, 130(5): 495-501.
- **RAJASHEKARA, G.; MUNIR, S.; ALEXEYEV, M.; HALVORSON, D.; WELLS, C.; NAGARAJA, K.** 2000. Pathogenic Role of SEF14, SEF17, and SEF21 Fimbriae in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infection of Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4): 1759-1763.
- **ROBERFROID, M.** 2007. Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*, 137:830S-837S.
- **SADLER, W.; BROWNELL, J.; FANELLI, M.** 1969. Influence of age and inoculum level on shed pattern of Salmonella typhimurium in chickens. *Avian. Dis.*, 13(4): 793-803.
- **SANTOS, R.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; ADAMS, L.G.; BÄUMLER, A.J.** 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes. Infect.*, 3(14-15): 1335-1344.
- **SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J.; ADAMS, L.G.** 2003. Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36(1): 3-12.

- **SULLIVAN, G.C.** 2001. Probiotics. *Br. J. Surg.*, 88:161-162.
- **TURNBULL, P.; SNOEYENBOS, G.** 1974. Experimental Salmonellosis in the Chicken. 1. Fate and Host Response in Alimentary Canal, Liver, and Spleen. *Avian. Dis.*, 18(2):153-177.
- **VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; BOHEZ, L.; BOYEN, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.** 2004. Intermittent Long-Term Shedding and Induction of Carrier Birds after Infection of Chickens Early Posthatch with a Low or High Dose of *Salmonella* Enteritidis. *Poult. Sci.*, 83(11): 1911-1916.
- **ZHANG, S.; KINGSLEY, R.; SANTOS, R.; ANDREWS-POLYMENIS, H.; RAFFATELLU, M.; FIGUEIREDO, J.; NUNES, J.; TSOLIS, R.; ADAMS, L.; BÄUMLER, A.** 2003. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. *Infect. Immun.*, 71(1): 1-12.

ANEXO 1: Aislamientos de *Salmonella* Enteritidis según muestra y tiempo de muestreo en pollos experimentalmente infectados con 10⁴ ufc SE.

T1 (3hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	+	+	+	
2	-	+	+	+	
3	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	
5	+	+	+	+	
6	-	+	+	+	
7	+	-	+	+	
8	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	
T2 (6hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	+	+	+	
2	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	
5	-	+	+	+	
6	+	+	+	+	
7	-	+	+	+	
8	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	
T3 (8hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	+	+	+	
2	+	+	+	+	
3	-	+	+	+	
4	+	+	+	+	
5	+	+	+	+	
6	+	-	+	+	
7	+	+	+	+	
8	+	-	-	+	
9	+	+	+	+	
10	-	-	+	+	

T4 (18hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	-	+	+	
2	-	-	+	+	
3	-	-	-	+	
4	-	-	+	+	
5	-	-	+	+	
6	-	-	+	+	
7	-	+	+	+	
8	-	-	+	+	
9	+	-	+	+	
10	-	-	-	+	
T5 (1dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	+	+	
2	+	-	+	+	
3	-	-	+	+	
4	+	-	+	+	
5	-	+	+	+	
6	-	-	-	+	
7	-	-	+	+	
8	+	-	+	+	
9	-	-	+	+	
10	-	-	+	+	
T6 (2dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	-	+	+	
2	+	-	+	+	
3	-	+	+	+	
4	-	+	+	+	
5	-	-	+	+	
6	-	-	-	-	
7	-	-	+	+	
8	-	-	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	

T7 (3dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	+	+	
2	-	-	+	+	
3	-	-	+	+	
4	-	-	-	+	
5	-	-	+	+	
6	-	-	+	+	
7	-	-	+	+	
8	-	-	+	+	
9	-	-	-	+	
10	-	-	-	+	
T8 (4dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	+	-	+	+	
3	+	-	+	+	
4	-	+	+	+	
5	-	-	+	+	
6	+	-	+	+	
7	-	-	+	+	
8	+	-	+	+	
9	-	-	+	+	
10	+	-	-	+	
T9 (5dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	
3	-	-	+	+	
4	+	-	+	+	
5	+	-	+	+	
6	+	+	+	+	
7	-	-	+	+	
8	-	-	+	+	
9	-	-	-	+	
10	+	-	+	+	

T10 (6dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	+	+	
2	+	+	+	+	
3	-	-	+	-	
4	+	-	-	+	
5	+	-	+	+	
6	-	+	+	+	
7	-	-	-	-	
8	+	-	+	+	
9	+	-	+	+	
10	+	-	+	+	
T11 (7dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	-	+	+	+	
3	-	+	+	+	
4	+	+	+	+	
5	+	+	+	+	
6	+	+	+	+	
7	-	-	-	+	
8	+	-	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	
T12 (8dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	+	+	+	
2	-	+	+	+	
3	+	+	+	+	
4	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	
6	+	+	+	+	
7	+	+	+	+	
8	-	+	+	+	
9	+	-	+	+	
10	+	-	+	+	

T13 (9dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	-	-	-	+	
3	+	-	-	+	
4	-	-	-	+	
5	+	-	-	+	
6	+	-	-	+	
7	-	-	-	+	
8	+	+	+	+	
9	-	-	+	-	
10	-	-	+	+	
T14 (10dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	
6	+	+	-	+	
7	+	+	+	+	
8	-	-	-	-	
9	+	-	+	-	
10	-	-	-	-	
T15 (11dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	+	+	-	
2	-	-	-	-	
3	-	+	-	-	
4	+	-	+	+	
5	-	-	+	-	
6	-	+	+	+	
7	+	+	+	+	
8	-	-	-	-	
9	-	-	+	+	
10	-	-	-	+	

T16 (12dpi)	Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos
1	-	-	-	+
2	-	-	+	-
3	-	-	+	-
4	+	-	-	+
5	-	-	+	+
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	+	+	+	+
9	+	-	-	+
10	+	-	+	+

ANEXO 2: Aislamientos de *Salmonella* Enteritidis según muestra y tiempo de muestreo en pollos experimentalmente infectados con 10⁵ ufc SE.

T1 (3hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	+	+	+	
2	-	+	+	+	
3	-	+	+	+	
4	-	-	+	-	
5	-	-	+	+	
6	+	-	+	+	
7	+	+	+	+	
8	-	-	+	+	
9	+	+	+	+	
10	-	+	+	+	
T2 (6hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	+	+	+	+	
3	+	-	+	+	
4	+	+	+	+	
5	+	+	+	+	
6	+	+	+	+	
7	-	+	+	+	
8	+	-	+	+	
9	-	+	+	+	
10	-	-	+	+	
T3 (8hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	+	+	+	
2	+	+	+	+	
3	-	+	+	+	
4	+	+	+	+	
5	-	+	+	+	
6	-	+	+	+	
7	-	+	+	+	
8	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	-	+	+	

T4 (18hpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	+	+	+	+	
3	+	-	-	+	
4	-	-	+	+	
5	-	+	+	+	
6	+	+	+	+	
7	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	
T5 (1dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	-	+	+	+	
3	+	+	+	+	
4	-	-	+	+	
5	+	-	+	+	
6	+	-	+	+	
7	+	-	+	+	
8	+	-	+	+	
9	-	-	+	+	
10	-	-	+	+	
T6 (2dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	+	-	+	+	
3	+	+	+	+	
4	+	-	+	+	
5	-	+	-	+	
6	+	+	+	+	
7	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	-	+	+	

T7 (3dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	
5	+	-	+	+	
6	-	+	+	+	
7	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	-	-	+	
T8 (4dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	-	-	+	
2	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	
4	-	-	+	+	
5	-	-	+	+	
6	-	-	-	-	
7	-	+	+	+	
8	+	+	+	+	
9	-	+	+	+	
10	+	-	+	+	
T9 (5dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	+	+	
2	-	+	+	+	
3	-	-	+	+	
4	-	+	+	+	
5	-	+	+	+	
6	-	-	+	+	
7	+	-	+	+	
8	-	+	+	+	
9	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	

T10 (6dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	-	+	+	
2	-	-	-	+	
3	-	+	+	+	
4	-	-	-	+	
5	+	+	+	+	
6	+	-	+	+	
7	+	-	-	+	
8	+	+	+	+	
9	+	-	+	+	
10	-	-	-	+	
T11 (7dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	-	+	+	
2	-	-	+	+	
3	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	
5	-	-	-	+	
6	+	-	+	+	
7	+	-	+	+	
8	+	-	-	+	
9	-	-	-	-	
10	-	-	-	+	
T12 (8dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	+	+	+	
2	-	-	-	-	
3	+	-	+	+	
4	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	

T13 (9dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	-	-	
2	+	-	-	+	
3	+	-	-	+	
4	+	-	-	+	
5	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	
7	-	-	+	+	
8	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	
T14 (10dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	+	-	-	-	
2	+	-	-	-	
3	-	-	-	+	
4	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	
6	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	
9	-	-	-	+	
10	-	-	-	-	
T15 (11dpi)		Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos	
1	-	-	-	-	
2	-	+	+	+	
3	-	-	-	-	
4	-	-	-	+	
5	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	
7	+	+	-	+	
8	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	

T16 (12dpi)	Muestra			
Pollo N°	Órganos internos	Deposiciones	Intestino	Ciegos
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	+
6	-	-	+	+
7	+	-	-	+
8	-	-	-	+
9	-	-	-	-
10	-	-	+	-