

## EXCLUSION COMPETITIVA DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* EN POLLITOS DE UN DIA DE EDAD POR LA FLORA BACTERIANA NORMAL DEL CIEGO DE AVES ADULTAS

Sergio Rosende O. (MV), María A. Juri V. (MV)

Laboratorio de Patología Aviaria. Departamento de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15. Santiago, Chile.

### COMPETITIVE EXCLUSION OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* BY NORMAL CAECUM BACTERIA FLORA IN HENS OF ONE DAYS CHICKS

*The colonization of one day chicks gut by Normal Caecum Bacteria Flora of Hens and the later capacity to inhibit the development of Salmonella Typhimurium was studied. Chicks pretreated with Normal Caecum bacteria Flora showed a significant ( $p < 0.001$ ) resistance to S. typhimurium infection on relation to non pretreated chicks. This resistance was a consequence of an early colonization of the one day chicks gut by Normal Caecum Bacteria Flora, which inhibit the S. typhimurium development; this phenomenon is know as "Competitive Exclusion".*

La Flora Bacteriana Normal del Ciego (FBNC) de las aves, es un complejo sistema ecológico constituido, en más de un 90%, por bacterias anaerobias estrictas y facultativas (Barnes, 1970; Barnes y Cols., 1972; Salanitro y Cols. (1973). Esta FBNC cumple una importante función en la nutrición de las aves, debido a su participación en algunos procesos metabólicos y síntesis de nutrientes (Williams y Fuller, 1971). Otra función está relacionada con la Exclusión Competitiva (EC). Este término, describe un fenómeno biológico referido a una temprana colonización del tubo digestivo de las aves por la Flora Bacteriana Normal y su posterior capacidad para impedir una reconalización por bacterias enteropatógenas (Snoeyenbos y Cols., 1979).

La EC ha sido demostrada para varios gérmenes enteropatógenos, a saber: *Salmonella infantis* (Nurmi y Rantal, 1973); *Salmonella typhimurium* (Lloyd y Cols., 1977); *Salmonella heidelberg* (Snoeyenbos y Cols., 1978); *Salmonella enteritidis* (Weynack y Cols., 1979) y seis cepas de *Escherichia coli* patógenas (Soerjodi y Cols., 1981).

El fenómeno se explica, fundamentalmente, a través de teorías basadas en la especificidad de unión entre las bacterias del tubo digestivo y la célula intestinal; esta unión se realiza a través de

una fibra, sintetizada por la bacteria, denominada "Pili" o "Glicocalix" (Arp y Jensen, 1980; Costerton, 1978). Este fenómeno, sumado a procesos metabólicos tóxicos (Hughes, 1972) y competencia por nutrientes (Lloys y Cols., 1977) constituyen un importante mecanismo inespecífico de defensa para las aves.

### MATERIAL Y METODOS

#### A. Material.

- 1. Flora Bacteriana Normal del Ciego.** Se obtuvo de los ciegos de 10 aves reproductoras broilers de 24 semanas de edad. Estas aves estaban serológicamente negativas a *S. pullorum-gallinarum* y sin antecedentes de paratífosis.
- 2. Aves en Experimentación.** Se utilizaron 180 pollitos de un día de edad provenientes del mismo plantel que las aves adultas, por lo que tenían los mismos antecedentes sanitarios. Ellos recibieron alimento de crianza, exento de proteína de origen animal. Se mantuvieron en dos criadoras de cinco pisos cada una (Petersime Modelo 25 SD), ubicadas en una dependencia aislada.

3. **Medios de cultivo.** Se utilizaron los medios de cultivo descritos por Williams y Cols. (1980) para el aislamiento e identificación de salmonelas de origen aviar.

4. **Cepa *Salmonella typhimurium*.** Aislada en el laboratorio de Patología Aviaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile.

## B. Métodos

### 1. Controles previos a la experiencia

Se realizaron controles bacteriológicos según método descrito por Williams y Cols. (1980), para el aislamiento e identificación de salmonelas de origen aviar, a fin de descartar contaminación por salmonelas ajenas a la experiencia tanto de los pollitos, FBNC y alimento. Para el examen de los pollitos, se sacrificaron 20 de ellos al día de edad, tomándose muestras individuales de ciegos y "pool" de algunos órganos: hígado, vitelo, corazón y bazo.

En el caso de FBNC, este material correspondió a la extracción de los ciegos asépticamente y triturados bajo constante burbujeo de nitrógeno. El macerado se diluyó al 50% en solución fisiológica estéril, previamente regenerada; para bacteriología se tomaron cinco muestras de 5 ml cada una.

El alimento se controló en cada saco usado en la experiencia, tomándose tres muestras de 30 g cada una por saco de alimento.

### 2. Diseño experimental

A fin de comprobar la capacidad competitiva de la FBNC y su inocuidad, las aves se dividieron en cuatro grupos de 40 pollitos cada uno, ubicándose en dos grupos por baterías (A y B) dispuestos de a 20 en cada piso.

El pretratamiento consistió en la administración de 0,5 ml/ave de FBNC directamente en la ingluvia.

En el caso del desafío se administró directamente en la ingluvia un concentrado de  $10^5$  células de *S. typhimurium* por ave.

En la Batería A., se ubicaron los siguientes grupos:

**Grupo 1 (G1).** Pretratados al día de edad y en el cual se quería controlar la inocuidad de la FBNC.

**Grupo 2 (G2).** Testigo. Sin pretratamiento ni desafío, a fin de comprobar la ausencia de patologías ajenas a la estudiada y excluir

infecciones laterales por *S. typhimurium*. En la Batería B se distribuyeron los grupos 3 y 4.

**Grupo 3 (G3).** Experimental: Pretratados al día de edad y posteriormente desafiados al tercer día de edad. Su objetivo era evidenciar la capacidad de EC de la FBNC.

**Grupo 4 (G4).** Control de la cepa *S. typhimurium*. Desafiados al tercer día de edad. Con este grupo se comprobaba la infecciosidad o patogenicidad de la cepa desafío. Veinte pollitos de cada grupo fueron marcados y enumerados con autocrotal y con ellos se efectuó un control bacteriológico seriado, los días 7, 10, 13, 16, 23 y 30.

El control se hizo a través de tómulas cloacales individuales y dos muestras de fecas de 5 g cada una, recolectadas de la bandeja de cada grupo.

3. **Análisis Estadístico.** Los resultados del aislamiento de *S. typhimurium* a partir de tómulas cloacales, se sometieron a una prueba de hipótesis de independencia de chi cuadrado ( $X^2$ ) con  $p < 0,001$ . Se compararon los resultados de los grupos 3 y 4.

## RESULTADOS

Las muestras colectadas previo a la experiencia (macerado de los ciegos de las aves adultas, alimento y vísceras de los pollitos) resultaron negativas al aislamiento de salmonelas.

En el cuadro 1 se resumen los resultados obtenidos del examen bacteriológico de las fecas frescas y tómulas cloacales. En él se puede observar que los grupos 1 y 2, se mantuvieron libres de *S. typhimurium* durante toda la experiencia, en cambio, en los grupos 3 y 4 fue posible aislar *S. typhimurium* de las fecas sólo en el primer control efectuado al grupo 3 y durante toda la experiencia en las aves del grupo 4.

Las tómulas cloacales de las aves del grupo 3, dieron dos aislamientos positivos a *S. typhimurium* hasta el día 13, luego uno el día 16, para luego, ser negativas en los controles siguientes. En el grupo 4 los pollitos fueron, en su totalidad, positivos en los dos primeros controles; luego en los dos siguientes, disminuyeron a 19 y finalmente a 12 en los dos últimos.

No hubo mortalidad de aves durante toda la experiencia.

El análisis estadístico de los resultados del

CUADRO 1. AISLAMIENTO DE *SALMONELLA*  
*TYPHIMURIUM* DE TORÚLAS  
CLOACALES (TC) Y FECAS (F) DE  
POLLITOS PRETRATADOS Y NO PRETRATADOS  
CON FLORA BACTERIANA NORMAL DEL  
CIEGO Y CON O SIN DESAFIO CON  
*S. TYPHIMURIUM*

EDAD (días)	G 1		G 2		G 3		G 4	
	TC	F	TC	F	TC	F	TC	F
	%		%		%		%	
7	0	—	0	—	10	+	100	+
10	0	—	0	—	10	—	100	+
13	0	—	0	—	10	—	95	+
16	0	—	0	—	5	—	95	+
23	0	—	0	—	0	—	60	+
30	0	—	0	—	0	—	60	+

— muestras negativas

+ muestras positivas

G 1 Pretratados al día de edad

G 2 Sin ningún tratamiento

G 3 Pretratados al día de edad y desafiados con *S. typhimurium* al tercer día.

G 4 Desafiados con *S. typhimurium* al tercer día de edad.

examen bacteriológico de las tómulas cloacales, para  $p < 0,001$ , demostró que existe una significativa relación entre la presencia de FBNC y la resistencia de los pollitos a la infección con *S. typhimurium*.

## DISCUSION

En el grupo 3, las muestras de fecas del primer control fueron en su totalidad positivas al aislamiento de *S. typhimurium* y luego negativas en el segundo control hasta el final del ensayo. El examen de las tómulas cloacales de este mismo grupo entregó aislamientos positivos hasta el día décimosexto. Esto significa que las muestras de fecas no evidenciaron la excreción de *S. typhimurium* de dos aves enfermas. En relación a esto, Weinack y Cols., (1979) demostraron que la cantidad de salmonelas excretadas por las aves pretratadas es pequeña, por lo que una muestra tomada de un grupo de aves puede no evidenciar la presencia de *S. typhimurium*. Las tómulas cloacales, en cambio, por ser muestras individuales, son más sensibles para detectar pequeñas cantidades de *S. typhimurium*. El hecho que la primera muestra de fecas fuese positiva concuerda con los resultados obtenidos por Lloyd y Cols., (1977), quienes determinaron que el inóculo del desafío puede excretarse vivo por

un tiempo determinado; sin que ello signifique enfermedad en el ave.

Las aves del grupo 4 excretaron *S. typhimurium* durante todo el ensayo, en estas aves no hubo mortalidad, pero sí síntomas clínicos de la infección, como diarrea acuosa. Esto se explica por una baja letalidad de la cepa, la cual es capaz de producir síntomas sin mortalidad; en cambio se aprecia una excelente capacidad infectiva ya que el 100% de las aves se infectaron, quedando un porcentaje alto de ellas como portadoras.

El análisis estadístico mostró que existe una significativa relación entre el pretratamiento con FBNC y la resistencia de las aves a la infección con *S. typhimurium*. Este fenómeno ha sido demostrado por varios autores como: Lloyd y Cols. (1977) y Snoeyenbos y Cols. (1978).

Finalmente es interesante destacar que se necesita una mayor investigación acerca de fenómenos de exclusión competitiva, en relación a la identificación de las especies bacterianas de mayor importancia que participan en él.

## RESUMEN

Se estudió el fenómeno de colonización del tubo digestivo de pollitos de un día de edad, por la Flora Bacteriana Normal del Ciego (FBNC) de aves adultas y su posterior capacidad para inhibir el desarrollo de *Salmonella typhimurium*.

Las aves pretratadas con FBNC mostraron una significativa ( $p < 0,001$ ) resistencia a la infección con *S. typhimurium*, en relación al grupo no pretratado con FBNC. Esta resistencia resultó como consecuencia de una rápida colonización del tubo digestivo de los pollitos por la FBNC, que inhibió el desarrollo de la *S. typhimurium*, fenómeno conocido como "Exclusión Competitiva".

## REFERENCIAS

- ARP, L.H.; A.E., JENSEN. Piliation, hemagglutination, motility and generation time of *Escherichia coli* that are virulent for turkeys. Avian Dis. 24: 153-161, 1980.
- BARNES, E.M.; C.S. IMPEY. The isolation and properties of the predominant anaerobic bacteria in the caeca of chickens and turkeys. Br. Poultry Sci., 11: 467-481, 1970.
- BARNES, E.M.; G.C., MEAD; D.A., BARNUM. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. Br. Poultry Sci. 13: 311-326, 1972.
- COSTERTON, Y GEESEY. How bacteria stick. Sci. Am. 238: 86-94, 1978.

- HUGHES, K.L. Recent knowledge of the strict anaerobes of the gut. *Aust. Vet. J.* 48: 508-513, 1972.
- LLOYD, A.G.; R.B., CUMMING; R.D., KENT. Presentation of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Aust. Vét. J.* 53: 82-87, 1977.
- NURMI, E.; M., RANTAL. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature.* 241: 210-212, 1973.
- SALANITRO, J.P.; J.G., FAIRCHILD; P.A., MUIR-HEAD. Intestinal microflora of the broiler chicken. *In: West Poults. Dis. Conf. 22nd and 7th Poults Health Symp. Davis. Calif. ed. Agric. Ext. University of California. Proceedings. Davis, 1973 pp. 86-90.*
- SNOEYENBOS, G.H.; O.M., WEINACK; C.F., SMYSER. Protecting chicks and poultry from *Salmonella* by oral administration of normal gut microflora. *Avian Dis.* 22: 273-278, 1978.
- SNOEYENBOS, G.H.; O.M. WEINACK; C.F., SMYSER. Further studies on competitive exclusion for controlling *Salmonellae* in chicken. *Avian Dis.* 24: 904-914, 1979.
- SOERJODI, A.S.; S.M., STHEMAN; G.H., SNOEYENBOS. Some measurements of protection against paratyphoid *Salmonella* and *Escherichia coli* by competitive exclusion in chickens. *Avian Dis.* 25: 706-712, 1981.
- WEINACK, O.M.; G.H., SNOEYENBOS; C.F., SMYSER. A supplemental test system to measure competitive exclusion of *Salmonellae* by native microflora in the chickens gut. *Avian Dis.* 24: 1019-1030, 1979.
- WILLIAMS, D.J.; R., FULLER. The influence of the intestinal microflora on nutrition. *In: Bell, D.J. and Freeman, B.M., eds. Physiology and biochemistry of the domestic fowl. London, Academic Press, 1971, V 1: pp 73-91.*
- WILLIAMS, J.E.; E.T., MALLISON; G.H., SNOEYENBOS. Salmonellosis and arizonosis. *In: Hitcher, S.B. et al. eds. Isolation and identification of avian pathogen. New York. Am. Ass. of Avian Patholog., 1980. pp. 1-8.*

Aceptado para su publicación. 12 Diciembre 1985.