

Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda

Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* PT 13a and *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko in broiler chickens

Griselda Ruiz Flores* Fernando Constantino Casas** José Antonio Quintana López*
Carlos Cedillo Peláez** Odette Urquiza Bravo*

Abstract

The objective of this study was to determine *Salmonella enteritidis* phage type 13a (SE PT 13a) and *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko phage type 6a (SI) pathogenesis in 4 days old broiler chickens. Twenty-eight birds per treatment were inoculated with a dose of 1×10^8 (SE PT 13a) and 1×10^9 (SI), respectively, and fourteen chickens were inoculated with physiological saline solution (PSS) as negative controls. Samples from liver, spleen, heart, lung, crop, duodenum, jejunum, ileum and blind guts were taken during fourteen different times postinfection (6, 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 222, 246 and 270 hours postinfection (hpi) in order to obtain *Salmonella* spp isolation for bacteriological, histopathological and ultrastructural examination. During the first week, some depressed birds were observed, and the second week birds were found with yolk sac retention in both treatments. SE PT 13a was isolated at 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 246 and 270 hpi from all organs previously described. SI was isolated at 42, 150, 174 and 222 hpi, from crop, jejunum, ileum and blind gut samples. Ileum was the main organ where more frequently SE PT 13a and SI were isolated. There was no mortality in either treatments. Histopathology revealed inflammation, coagulative necrosis, congestion and hemorrhages in gastrointestinal tract (GIT) and visceral organs since 6 hpi in both treatments, with lesions from mild to severe. Ultrastructurally changes in enterocytes' cytoplasm: degeneration, necrosis, invasion and penetration of SE PT 13a and SI were observed. Results of this research showed the ability of SE PT 13a as well as SI to penetrate and invade enterocytes in experimentally infected broiler chicken, demonstrating that SI is able to infect broiler chickens and not only Muridae family.

Key words: PATHOGENESIS OF *SALMONELLA*, ISOLATION OF *SALMONELLA*, *SALMONELLA* IN BROILER CHICKENS.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la patogenia de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a (SE FT 13a) y de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko fagotipo 6a (SI) en pollitos de engorda de cuatro días de edad. Veintiocho aves por tratamiento fueron inoculadas con dosis de 1×10^8 (SE FT 13a) y 1×10^9 (SI), respectivamente, y 14 pollitos fueron inoculados con solución salina fisiológica (SSF), como testigos negativos. Se tomaron muestras de hígado, bazo, corazón, pulmón, buche, duodeno, yeyuno, íleon y ciegos durante 14 tiempos posinfección (6, 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 222, 246 y 270 horas posinfección (hpi)), para realizar el aislamiento bacteriológico de *Salmonella* spp, exámenes histopatológico y ultraestructural. Durante la primera semana, se observó que algunas aves estaban deprimidas, y en la segunda semana se encontraron aves con retención de saco vitelino en ambos tratamientos. Se aisló SE FT 13a a partir de las 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 246 y 270 hpi, en todos los órganos previamente descritos. SI fue aislada a las 42, 150, 174 y 222 hpi de muestras de buche, yeyuno, íleon y ciegos. El íleon fue el órgano de donde se aisló SE FT 13a y SI con mayor frecuencia. No se registró mortalidad en ningún tratamiento. El examen histopatológico reveló inflamación, necrosis coagulativa, congestión y hemorragias en tracto gastrointestinal (TGI) y órganos viscerales a partir de las 6 hpi en ambos tratamientos, con grados de lesión de leve a severo. Ultraestructuralmente se observaron cambios en el citoplasma celular de enterocitos: degeneración, necrosis, invasión y penetración de SE FT 13a y SI. Los resultados de la presente investigación evidenciaron la capacidad de SE FT 13a y SI para penetrar e invadir enterocitos de los pollitos infectados experimentalmente, demostrando que SI es capaz de infectar pollos de engorda y no sólo a la familia Muridae.

Palabras clave: PATOGENIA DE *SALMONELLA*, AISLAMIENTO DE *SALMONELLA*, *SALMONELLA* EN POLLOS DE ENGORDA.

Recibido el 5 de julio de 2006 y aceptado el 8 de enero de 2008.

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

**Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introduction

Since the beginning of 1980, a worldwide increase of infections by *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* (SE) was seen, which caused increment of these diseases in humans and commercial birds provoking economic losses in the poultry industry.^{1,2}

While the majority of studies on the pathogenesis of *Salmonella* spp were focused on *Salmonella typhimurium*, the pathogenesis of SE has been scarcely investigated, although in the last few years SE has exceeded *S. typhimurium* as the most commonly registered serotype in the United States of America. In Europe and the United States of America, among others, phagotypes 4,6,8,13a and 14b have been recently identified as the most important.³

Previous studies have shown high susceptibility to *Salmonella* infections in newborn chickens, which reduces its output during the first weeks of life.⁴ There are few descriptions of macroscopic and microscopic lesions after experimental infection of chickens with SE in poultry. In 1974, Turnbull and Snoeyenbos described lesions in poultry infected with SE strains, but the phagotype was not identified, this study was performed before SE infections increased in the world. Gorham *et al.*, carried out a study on persistence of SE PT 13a in chickens infected at first and seventh day of age; also in 1994, Gorham *et al.* described lesions produced in specific pathogens free chickens (SPF), infected orally at first and seventh day of age with SE PT 13a; therefore, it is necessary to generate current information on virulence and pathogenesis of *Salmonella* spp in poultry industry.

In the actual aviculture, an increase of *S. typhimurium* and *S. enteritidis* has been registered. It has also been observed that rats carry more frequently those serotypes, for which they are the most studied in the whole world.⁸ Salmonellosis in rats can be a serious problem because they act as reservoirs and vectors by having close coexistence with poultry. In literature, *S. enteritidis* biovar Issatschenko, Danysz, Gaertner, Liverpool, Ratin, Projorov, are considered as synonyms of *S. enterica* variety 17 F4, subgroup 1, group D, which kills murines. According to Kaufmann-White classification, SE belongs to group D, subgroup 1 with antigens O: 1, 9, 12, and H: g, m; this serotype affects all animal species, including humans.⁹⁻¹² With respect to this, *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SI) shows similar nomenclature (O: 1, 9, 12 and H: g, m), with the difference that it contains flagellar antigens in phase 2; 1, 7, the lysine decarboxylation is negative and rhamnose fermentation positive.¹³

Due to the possibility of the risk in poultry and public health, such records show the need to generate information on *Salmonella* spp pathogenesis in poul-

Introducción

Desde principios de 1980 se produjo un aumento mundial de casos de infecciones por *Salmonella enterica* serotipo *enteritidis* (SE), lo que produjo incremento de estas infecciones en el humano y en aves comerciales, provocando pérdidas económicas en la industria avícola.^{1,2}

Mientras que la mayoría de los estudios sobre la patogénesis de *Salmonella* spp se enfocaron en *Salmonella typhimurium*, la patogénesis de SE ha sido muy poco investigada, aunque estos últimos años SE ha superado a *S. typhimurium* como el serotipo más común registrado en Estados Unidos de América. En Europa y Estados Unidos se han identificado, entre otros, los fagotipos 4, 6, 8, 13a y 14b de SE como los más importantes actualmente.³

Estudios previos han demostrado alta susceptibilidad a infecciones por *Salmonella* en pollos recién nacidos, lo cual disminuye su rendimiento durante las primeras semanas de vida.⁴ Son escasas las descripciones de lesiones macroscópicas y microscópicas después de la infección experimental de pollos con SE en aves. En 1974, Turnbull y Snoeyenbos describieron lesiones en pollos infectados con cepas de SE, pero el fagotipo no fue identificado. Este estudio se realizó antes de que las infecciones por SE aumentaran en el mundo. Gorham *et al.* realizaron un estudio sobre persistencia de SE FT 13a en pollitos infectados al primero y séptimo días de edad; también en 1994, Gorham *et al.* describieron lesiones producidas en pollitos libres de patógenos (SPF), infectados oralmente al primero y séptimo días de edad con SE FT 13a, por ello es necesario generar información actual sobre la virulencia y patogenicidad de *Salmonella* spp en la industria avícola.

Así como en la avicultura actual se ha registrado el aumento de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, se ha observado también que las ratas llevan más frecuentemente esos serotipos, por lo que son de las más estudiadas en todo el mundo.⁸ La salmonelosis en ratas puede ser un serio problema porque éstas actúan como reservorios y vectores al tener convivencia estrecha con aves de corral. En la literatura, *S. enteritidis* biovar Issatschenko, Danysz, Gaertner, Liverpool, Ratin, Projorov, se consideran como sinónimos de *S. enterica* variedad 17 F4, subgrupo 1, grupo D, que matan a muridos. Según la clasificación de Kauffmann-White, SE pertenece al grupo D, subgrupo 1 con antígenos O: 1, 9, 12 y H: g, m; este serotipo afecta a todas las especies animales, incluyendo el humano.⁹⁻¹² Al respecto, *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko (SI) presenta nomenclatura similar (O: 1, 9, 12 y H: g, m), con la diferencia de que contiene antígenos flagelares en fase 2; 1,7, la descarboxilación a la lisina es negativa y la fermentación de rhamnosa es positiva.¹³

try, that is why, the objective of this work was to demonstrate and determine the pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phagotype 13a (SE PT 13a) and SI in broiler chicken.

Material and methods

A strain of SE PT 13a was used for treatment 1, and another strain of SI for treatment 2, that were obtained from the bacteriology laboratory of the Department of Animal Production: Poultry, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). The SE PT 13a and SI strains were plated separately in brain heart infusion (BHI) and were incubated 18 hours at 37°C. The strains were centrifuged at 1 000 g* for 60 minutes at 4°C. The supernatant of each strain was discarded and phosphate buffer solution (PBS) was deposited instead, to suspend the bacteria pellet, then it was centrifuged for 60 minutes at 4°C. The same procedure was repeated one more time. After the last wash, the SI strain was adjusted with PBS to a final concentration of 1×10^9 CFU/mL (colony forming units/milliliter) and SE PT 13a to a concentration of 1×10^8 CFU/mL, for its later oral inoculation in the chickens.

Experiment design

In the present study, 75 one day old broiler Ross chickens were used. The first day, samples of organs and feces of five chickens were analyzed to discard presence of *Salmonella* spp, using standard culture methods (Mexican Official Norm NOM-005-ZOO-1993). The study started on the fourth day and chickens were distributed in three treatments, with repetition for treatments 1 and 2. Treatment 3 consisted of one group of 14 chickens; treatment 1 had two groups of 14 chicks each one. Chickens of groups 1 and 2 were administered with 250 µL of 1×10^8 CFU/mL of SE PT 13a by oral route. Treatment 2 also consisted of two groups (14 chicks in each group), A suspension of 250 µL of 1×10^9 CFU/mL of SI by oral route was administered to each chicken. Treatment 3 was the negative control, to which 250 µL of physiological saline solution (PSS) by oral route was administered to each chicken. Commercial feed was offered to all chicks and water ad libitum during the 12 days experiment. The clinical condition and chicken mortality were recorded.

Sample collection

One chicken from each treatment group was euthanized (NOM-033-ZOO-1995) at 6,18,30,42,54,78, 102,126,150,174,198,222,246 and 270 hours post-infec-

Debido a la posibilidad de poner en riesgo la sanidad aviar y la salud pública, dichos antecedentes muestran la necesidad de generar información sobre la patogenia de *Salmonella* spp en aves, por eso el objetivo de este trabajo fue demostrar y determinar la patogenia de *Salmonella enteritidis* fagotipo 13a (SE FT 13a) y SI en pollos de engorda.

Material y métodos

Se empleó una cepa de SE FT 13a para el tratamiento 1, y otra cepa de SI para el tratamiento 2, que fueron obtenidas del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las cepas de SE FT 13a y SI se sembraron por separado en caldo infusión cerebro-corazón (Brain Heart Infusion, por sus siglas en inglés, BHI) y se incubaron 18 horas a 37°C. Las cepas se centrifugaron a 1 000 g* durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante de cada cepa fue desechado y se depositó en su lugar solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para resuspender las pastillas de bacterias, luego se centrifugó durante 60 minutos a 4°C. El mismo procedimiento se repitió una vez más. Después del último lavado, la cepa de SI se ajustó con PBS a concentración final de 1×10^9 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mililitro) y SE FT 13a a concentración de 1×10^8 UFC/mL, para su posterior inoculación vía oral en los pollitos.

Diseño del experimento

En el presente estudio se utilizaron 75 pollitos de engorda estirpe Ross, de un día de edad. El primer día se analizaron muestras de órganos y heces de cinco pollitos para descartar presencia de *Salmonella* spp, utilizando métodos de cultivo estándar (Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993). El estudio se inició al cuarto día y se distribuyeron los pollitos en tres tratamientos, con repetición para los tratamientos 1 y 2. El tratamiento 3 constó de un solo grupo de 14 pollitos; el tratamiento 1 integró dos grupos, de 14 pollitos cada uno. A cada pollito de estos dos grupos se le administró suspensión de 250 µL vía oral con concentración de 1×10^8 UFC/mL de SE FT 13a como dosis única. El tratamiento 2 también constó de dos grupos (14 pollitos en cada grupo), a cada pollito se le administró suspensión de 250 µL vía oral con concentración de 1×10^9 UFC/mL de SI como dosis única. Por último, el tratamiento 3, o sea un grupo de 14 pollitos que fungió como testigo negativo al cual se le administró 250 µL de solución salina fisiológica

*Hermlelabortechnik, Z300, Alemania.

tion (hpi). Before chickens were euthanized, 1 mL of blood was taken with ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) anticoagulant, to carry out leukocyte counting. Finally, each 24 hpi samples of feces were taken (1g) for bacteriological analysis.

For the bacteriological, histological and ultrastructural analyses samples were aseptically taken from crop, heart, lung, liver, gallbladder, spleen, duodenum, jejunum, ileum and blind gut. Each sample was divided in three portions. At necropsy, macroscopic lesions were recorded from chickens of all treatments.

Bacteriological analysis

Organ and feces samples obtained for SE PT 13* and SI isolation were deposited in aseptic plastic bags and macerated with a mortar. Qualitative bacteriological analysis was carried out, which consisted in plating each one of the samples in trypticase soy agar** (TSA), brilliant green agar*** (BGA) and Chromagar† (CHR), and then incubated at 37°C (18 hours) to allow bacterial growth.^{16,17} A quantitative bacteriological analysis was also performed which consisted in leaving the samples of macerated organs and feces in tetrathionate broth (TB)‡ to perform decuple dilutions (1:10) in PBS, plated three drops of 20 µL in TSA, BGA and CHR, of the dilution 10⁻¹ to 10⁻⁶, then incubated for 18 hours at 37°C for its lecture. Lactose negative colonies were counted from BGA and mate white colonies from CHR, to determine the concentration of *Salmonella* spp suspicious bacteria. Last, conventional biochemical tests were performed, including lysine descarboxylase° (LD) and Omitine descarboxylase°° (OD) to all suspicious colonies isolated (NOM-005-ZOO-1993).¹⁶

Leukocyte differential count

Once the samples were obtained, a blood smear was done and dyed with Wright stain for three minutes. Later, the phosphate buffer was applied for 10 minutes and then the preparation was washed with tap water and air dried. The differential count was obtained with the manual counter for leukocytes and the blood smear observation with a 100X objective.¹⁸

Histopathology

Samples for histology were also taken during the bacteriological sampling. Samples were fixed in formalin at 10%, buffered at pH 7.2 for its posterior processing according to conventional techniques, they were cut with the microtome at a thickness and of 2 to 4 µm were stained with hematoxylin and eosin (H&E) technique.¹⁹ Grades were given to quantify lesions; a

(SSF) vía oral. Posteriormente, a todos los pollitos se les dio alimento comercial y agua *ad libitum*. El experimento duró 12 días y diariamente se registró el estado clínico y mortalidad de los pollitos.

Toma de muestras

Un pollo de cada grupo por tratamiento fue sacrificado humanitariamente (NOM-033-ZOO-1995) a las 6, 18, 30, 42, 54, 78, 102, 126, 150, 174, 198, 222, 246 y 270 horas posinoculación. Antes del sacrificio de cada uno de los pollitos se tomó 1 mL de sangre con anticoagulante ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), para realizar el conteo de leucocitos. Finalmente, cada 24 horas posinoculación, se tomaron muestras de heces (1 g) con el propósito de realizar análisis bacteriológicos.

Para los análisis bacteriológicos, histológico y ultraestructural, se tomaron asépticamente muestras de buche, corazón, pulmón, hígado, vesícula biliar, bazo, duodeno, yeyuno, íleon y ciego. Cada muestra se dividió en tres porciones. Durante la necropsia se registraron las lesiones macroscópicas de los pollos de todos los tratamientos.

Análisis bacteriológico

Las muestras de órganos y heces obtenidas para el aislamiento de SE FT 13* y SI se depositaron en bolsas de plástico asépticas y se maceraron en un mortero. Se realizó análisis bacteriológico cualitativo, que consistió en sembrar cada una de las muestras en agar soya tripticasa** (TSA, por sus siglas en inglés), agar verde brillante*** (AVB) y en Chromagar† (CHR), luego se incubaron a 37°C (18 horas) para permitir el desarrollo bacteriano.^{16,17} También se realizó el análisis bacteriológico cuantitativo, que consistió en depositar las muestras de órganos macerados y heces en caldo tetrationato (CT),‡ para realizar diluciones decuples (1:10) en PBS, sembrando tres gotas de 20 µL en TSA, AVB y CHR, de la dilución 10⁻¹ a 10⁻⁶, luego se incubaron 18 horas a 37°C para su lectura. Se contaron las colonias lactosa negativa del AVB y colonias de color blanco mate de CHR, para determinar la concentración de bacterias sospechosas a *Salmonella* spp. Por último, se realizaron pruebas bioquímicas convencionales, incluyendo lisina descarboxilasa° (LD) y Ornitina descarboxilasa°° (OD) a todas las colonias sospechosas aisladas (NOM-005-ZOO-1993).¹⁶

*Hermlelabortechnik, Z300, Alemania.

**Bioxon, México.

***Acumedia, Estados Unidos de América.

†Chromagar Microbiology, Francia.

‡Bioxon de México, S.A., México.

°Hycel de México, S.A., México.

°°Merck, Alemania.

one degree was considered mild when pathological changes in studied organs covered up to 25%, moderate degree of lesion, from 25% to 50%, and severe degree of lesion, from 50% to 100% of the affected organ.

Ultrastructural review (transmission electron microscopy)

Ileum and cecum sections of 1 to 2 mm² were taken, which were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde,* in a buffered solution of sodium cacodylate 0.2 M, pH 7.2, for one hour at 4°C. Once the samples were fixed, they were washed with the same cacodylate buffer solution; afterwards, they were fixed with an osmium tetroxide solution** (OsO₄) at 1% and they were dehydrated with ascendant series of acetones*** (60%, 70%, 80%, 90%, 96% and 100%). After dehydration, they were infiltrated with a mix of epoxide resin,† finally to be included. The fine cuts were 70 to 80 nm in thickness, they were mounted on cooper grates of 200 mesh and they were contrasted with uranyl‡ acetate and lead citrate° and were reviewed under a transmission electron microscope, TEM 900 (50 kv).°°20

Results

Clinical signs

In treatment 1 (SE PT 13a), during the first week post infection, two depressed chickens were observed; in chicks of treatment 2 (SI) no clinical sign was observed during the experiment.

Findings at necropsy

At necropsy, between 6 and 126 hpi no apparent macroscopic changes were observed in both treatments. In chickens of treatment 1, at 150 hpi, liver and spleen congestion was observed; in ileum, congestion and ecchymosis, and gas in blind gut was found. During the 174 hpi in chicks of treatment 1, two were observed with yolk sac retention, in chicks of treatment 2 only gas in blind gut was observed. At 198 hpi, in treatment 2 a chicken with yolk sac retention, congestion and ecchymosis in ileum were observed. In lung and heart no apparent pathological changes were observed in neither treatment during the experiment.

Bacteriological analysis

In Table 1 the results of isolation of SE PT 13* and SI are shown. During the 6 hpi there was no *Salmonella* spp isolation obtained in any of the treatments. From

Conteo diferencial de leucocitos

Una vez obtenidas las muestras, se realizó el extendido de sangre sobre un portaobjetos de vidrio, que se tiñó con el colorante de Wright durante tres minutos. Después se aplicó el amortiguador de fosfatos por 10 minutos y luego se enjuagó la preparación con agua corriente, dejando secar al aire. El conteo diferencial se obtuvo con el contador manual para leucocitos, y la observación del extendido sanguíneo con el objetivo 100X.¹⁸

Histopatología

Simultáneamente a la toma de muestras para aislamiento bacteriológico, se tomaron muestras de órganos para el examen histopatológico. Las muestras se fijaron en formalina al 10%, amortiguada a pH de 7.2 para su posterior procesamiento según las técnicas convencionales, las muestras se cortaron en el micrótopo a un espesor de 2 a 4 µm y se tiñeron por la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).¹⁹ Para cuantificar las lesiones se dieron grados; se consideró un grado de lesión leve cuando los cambios patológicos en los órganos en estudio abarcaron hasta 25%, grado moderado de lesión, del 25% a 50%, y grado severo de lesión, del 50% a 100% del órgano afectado.

Revisión ultraestructural (microscopía electrónica de transmisión)

Se tomaron secciones de íleon y ciego de 1 a 2 mm², las cuales se fijaron por inmersión en glutaraldehído* 2.5%, amortiguado en una solución de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.2, por una hora a 4°C. Una vez fijadas las muestras, se lavaron con la misma solución amortiguadora de cacodilatos, posteriormente se fijó con una solución de tetraóxido de osmio** (OsO₄) al 1% y se deshidrató con serie ascendente de acetos*** (60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%). Después de la deshidratación, se infiltraron con mezcla de resina epóxica,† para finalmente incluirse. Los cortes finos fueron de 70 a 80 nm de grosor, se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo‡ y citrato de plomo° y se revisaron en un microscopio electrónico de transmisión, EM 900 (50 kv).°°20

*Electron Microscopy Sciences, Estados Unidos de América.

**Sigma Laboratorios, Estados Unidos de América.

***Dpto Cell Biology and Science, Estados Unidos de América.

†Merck, Alemania.

‡Electron Microscopy Sciences, Estados Unidos de América.

°Electron Microscopy Sciences, Estados Unidos de América.

°°Merck, Alemania.

18 to 30 hpi SE PT 13a isolation was only obtained from crop, jejunum and ileum. At 42 hpi in samples of chicken blind guts from treatment 1 SE PT 13a was isolated, and in samples from chicken crop of treatment 2 SI was isolated, respectively. From 54 to 126 hpi SE PT 13a was isolated in samples from duodenum, liver, spleen, gallbladder, jejunum, ileum and blind guts; in samples obtained from chickens of treatment 2 no isolation was obtained. During the 150 and 174 hpi SE PT 13a was isolated from samples of liver, spleen, gallbladder, heart, lung, duodenum, jejunum, ileum and blind guts and SI only in jejunum, ileum and cecums of chickens from treatment 2, respectively. At 222 hpi, SE PT 13a isolation could not be achieved from any organ; nevertheless, in treatment 2, SI it was isolated in samples of ileum and blind guts. Finally, at 246 and 270 hpi there was isolation of SE PT 13a only from jejunum, ileum and blind guts.

The isolation percentage of SE PT 13a in sampled organs, ileum presented 27.78% of isolation; blind guts, 18.06%; jejunum, 13.89% and duodenum, 11.11%; in the gastrointestinal tract the highest percentage of SE PT 13a isolation was recorded. In contrast, crop presented only 4.16%; the same percentage of 11.11% of isolation was present in samples of liver, spleen and gallbladder; finally, from the samples obtained from heart-lung only 2.78% of positive isolation for SEPT 13a. In chickens of treatment 2, from a total of 12 positive isolations for SI, the crop obtained 8.22%; jejunum represented 16.67%; blind guts, 25% and ileum, 50%. In samples obtained from heart-lung, liver, spleen, and gallbladder combination, no positive isolation was obtained from SI during all the experiment.

The results of isolation and quantitative bacteriological analysis of SE PT 13a per organs, the minimum range of expressed recuperation in CFU of SE PT 13a was in liver (5.6×10^3) and the maximum in blind guts (9×10^9). In the case of SI, data of the quantitative bacteriological analysis, the minimum range of recuperation was in crop samples (4×10^5) and the maximum was obtained from blind guts (7×10^9).

Bacteriological analysis of feces

In the results obtained from feces bacteriological analysis of infected chickens with SE PT 13a and SI, it was found that in days 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 and 12 it was achieved to isolate SE PT 13a from feces, obtaining minimum and maximum ranges of recuperation of 5×10^5 and 9×10^9 CFU/g, respectively. Feces obtained from infected chickens with SE PT 13a from other days were negative to isolation of *Salmonella* spp, but other bacteria were identified as *Escherichia coli* (*E.coli*), *Citrobacter freundii*, *Proteus* spp and the fungus *Mucor* spp;

Resultados

Signos clínicos

En el tratamiento 1 (SE FT 13a), durante la primera semana posinfección, se observaron dos pollitos con depresión; en pollitos del tratamiento 2 (SI) no se observó ningún signo clínico durante el experimento.

Hallazgos a la necropsia

A la necropsia, entre las 6 y 126 hpi no se observaron cambios macroscópicos aparentes en ningún tratamiento. En pollitos del tratamiento 1, a las 150 hpi se observó congestión en hígado y bazo; en íleon, congestión y hemorragias equimóticas, y gas en ciegos. Durante las 174 hpi en pollitos del tratamiento 1 se observaron dos pollitos con retención de saco vitelino, en los pollitos del tratamiento 2 sólo se observó gas en ciegos. A las 198 hpi, en el tratamiento 2 se observó un pollito con retención de saco vitelino, congestión y áreas de hemorragias equimóticas en íleon. En pulmón y corazón no se observaron cambios patológicos aparentes en ningún tratamiento durante el experimento.

Análisis bacteriológico

En el Cuadro 1 se presentan los resultados del aislamiento de SE FT 13* y SI. Durante las 6 hpi no se obtuvo aislamiento de *Salmonella* spp en ninguno de los tratamientos. Desde las 18 a 30 hpi sólo se obtuvo aislamiento de SE FT 13a en muestras de buche, yeyuno e íleon. A las 42 hpi en muestras de ciegos de pollitos del tratamiento 1 se aisló SE FT 13^a, y en muestras de buche de pollitos del tratamiento 2 se aisló SI, respectivamente. De las 54 a 126 hpi se aisló SE FT 13a en muestras de duodeno, hígado, bazo, vesícula biliar, yeyuno, íleon y ciegos; en muestras obtenidas de pollitos del tratamiento 2 no se obtuvo aislamiento. Durante las 150 y 174 hpi se aisló SE FT 13a de muestras de hígado, bazo, vesícula biliar, corazón, pulmón, duodeno, yeyuno, íleon y ciegos y SI sólo de yeyuno, íleon y ciegos en pollitos del tratamiento 2, respectivamente. A las 222 hpi no se logró aislar SE FT 13a de ningún órgano; sin embargo, en el tratamiento SI fue aislada en muestras del íleon y ciegos. Por último, a las 246 y 270 hpi sólo hubo aislamiento de SE FT 13a a partir de yeyuno, íleon y ciegos.

En el porcentaje de aislamiento de SE FT 13a en los órganos muestreados, íleon presentó 27.78% de aislamiento; ciegos, 18.06%; yeyuno, 13.89%, y duo-

*Hermlelabortechnik, Z300, Alemania.

Cuadro 1

AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO DE SE FT 13A Y SI EN POLLOS
DE ENGORDA INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE
BACTERIOLOGICAL ISOLATION OF SE PT 13A AND SI IN
EXPERIMENTALLY INOCULATED BROILER CHICKENS

<i>Hour</i> <i>post-infection</i>	<i>SE PT 13a</i>	<i>SI</i>
6	-	-
18	Crop, jejunum, ileum	-
30	Crop, ileum	
42	Jejunum, ileum, blind guts	Crop
54	Duodenum, liver-spleen, gallbladder	-
78	Ileum, blind guts	-
102	Liver-spleen, gallbladder, duodenum, Jejunum, ileum, blind guts.	-
126	Gallbladder, ileum, blind guts	-
150	Liver-spleen, gallbladder, duodenum, heart- Lung, jejunum, ileum, blind guts.	Jejunum, ileum
174	Liver-spleen, duodenum, jejunum, ileum	Ileum, blind guts
198	Gallbladder, duodenum, ileum, blind guts	-
222	-	Ileum/blind guts
246	Jejunum, ileum, blind guts	-
270	Blind guts	-

SE PT 13^a = *Salmonella enteritidis* phagotype13a; SI: *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko

in regard to treatment 2, only SI was isolated in feces samples at 5, 7, and 10 days of post infection, with a recuperation range of 7.8×10^8 to 6×10^9 .

Microscopic lesions

The microscopic lesions observed in tubular and parenchymatose organs of infected chickens with SE PT 13a and SI suggestive of salmonellosis, were similar with a variation in their degree of lesion from mild, moderate and severe at different hours post-infection.

Treatment 1 (SE PT 13a)

Since 6 to 18 hpi, it was found epithelial desquamation, mild infiltration of heterophil and macrophages in mucosa and submucosa of ileum and jejunum; in crop, only epithelial desquamation was observed. No apparent pathological changes were observed in duodenum and blind guts. In parenchymatose organs like liver, spleen, heart and lung, mild hemorrhage and congestion was observed.

deno, 11.11%; en el tracto gastrointestinal se registró el porcentaje de mayor frecuencia de aislamiento de SE FT 13a. En contraste, el buche presentó sólo 4.16%; de las muestras de hígado, bazo y de vesícula biliar, se obtuvo el mismo resultado de aislamiento, 11.11%; por último, de las muestras obtenidas de corazón-pulmón sólo se obtuvo 2.78% de aislamiento positivo a SE FT 13a. En los pollitos del tratamiento 2, de un total de 12 aislamientos positivos a SI, el buche obtuvo 8.22%; el yeyuno representó 16.67%; los ciegos, 25% y el íleon, 50%. En las muestras obtenidas de la combinación corazón-pulmón, hígado, bazo y vesícula biliar no se obtuvo aislamiento positivo de SI durante todo el experimento.

En los resultados del aislamiento y análisis bacteriológico cuantitativo de SE FT 13a por órganos, el rango mínimo de recuperación expresado en UFC de SE FT 13a fue en hígado (5.6×10^3), y el máximo en ciegos (9×10^9). En el caso de SI, los datos del análisis bacteriológico cuantitativo el rango mínimo de recuperación fue en muestras de buche (4×10^5) y el máximo lo obtuvieron los ciegos (7×10^9).

From 30 hpi, congestion, hemorrhage, epithelial desquamation, focal areas of coagulate necrosis of intestinal microvilli and infiltration of heterophil and macrophages in mild, moderate and severe lesion grade was observed in mucosa and submucosa of crop, duodenum, jejunum, ileum and blind guts, until 270 hpi, which was the time the experiment lasted. In liver, from 30 to 126 hpi, congestion, hemorrhage and infiltration of heterophils and macrophages was observed; besides, from 150 hpi, focal areas of coagulate necrosis were observed. In spleen and lung hemorrhage and mild to moderate congestion was observed and from 174 hpi, lymphoid tissue hyperplasia and infiltration of heterophils and macrophages was observed in spleen; in lung at 198 and 222 hpi infiltration of heterophils and macrophages. In heart, from 42 to 270 hpi congestion, hemorrhage and diffused and focal infiltration of heterophils and macrophages in mild and moderate lesion grade was observed.

Treatment 2 (SI)

In ileum and jejunum from 6 to 30 hpi, epithelial desquamation, heterophil and macrophage infiltration in mucosa and submucosa was observed. Besides the lesions mentioned, from 42 hpi coagulate necrosis of intestinal epithelium, with mild and moderate lesion grade was observed. Finally, at 174 and 222 hpi, mild lymphoid tissue hyperplasia was observed. In crop, duodenum and blind guts, at 6 hpi there were no histological changes suggesting salmonellosis. In crop mucosa and submucosa, from 18 to 78 hpi, only epithelial desquamation, congestion and hemorrhage was observed. From 102 hpi epithelial coagulate necrosis in mild and moderate lesion grade was also observed. From 18 hpi in mucosa and submucosa of duodenum and blind guts, congestion, hemorrhage, infiltration of heterophils and macrophages, epithelial necrosis in mild and moderate lesion grade up to 270 hpi was observed.

In liver, from 6 to 30 hpi, congestion and hemorrhage was only observed. From 42 hpi, focal areas of mild to moderate grade of heterophils and macrophages infiltration; and from 222 to 246 hpi, besides the mentioned lesions, focal areas of coagulate necrosis were observed. In heart, from 6 to 78 hpi, congestion and hemorrhage was observed; from 102 hpi, focal and diffuse infiltration of heterophils and macrophages was also observed. In spleen and lungs, congestion and hemorrhage which varied from mild to severe was only observed; in spleen, at 198 and 222 hpi, lymphoid tissue hyperplasia was also observed (Figure 1).

Análisis bacteriológico de heces

En los resultados obtenidos del análisis bacteriológico de las heces de pollitos infectados con SE FT 13a y SI, se encontró que en los días 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 y 12 se logró aislar SE FT 13a a partir de las heces, obteniéndose rangos mínimo y máximo de recuperación de 5×10^5 y 9×10^9 UFC/g, respectivamente. Las heces obtenidas de pollitos infectados con SE FT 13a de los demás días fueron negativas al aislamiento de *Salmonella* spp, pero se identificaron otras bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Citrobacter freundii*, *Proteus* spp y el hongo *Mucor* spp; en cuanto al tratamiento 2, sólo se logró aislar SI en muestras de heces a los 5, 7 y 10 días posinfección, con rango de recuperación de 7.8×10^8 a 6×10^9 .

Lesiones microscópicas

Las lesiones microscópicas observadas en órganos tubulares y parenquimatosos de pollitos infectados con SE FT 13a y SI sugestivas a salmonelosis, fueron similares con variación en sus grados de lesión de leve, moderado y severo a diferentes horas posinfección.

Tratamiento 1 (SE FT 13a)

Desde las 6 a 18 hpi en mucosa y submucosa de íleon y yeyuno se observó descamación epitelial, infiltración de heterófilos y macrófagos leve, en buche, sólo descamación epitelial. En duodeno y ciego no se observaron cambios patológicos aparentes. En órganos parenquimatosos como hígado, bazo, corazón y pulmón, se observó congestión y hemorragia leve.

Desde las 30 hpi, en mucosa y submucosa de buche, duodeno, yeyuno, íleon y ciego, se observó congestión, hemorragia, descamación epitelial, áreas focales de necrosis coagulativa de las microvellosidades intestinales e infiltración de heterófilos y macrófagos en grado de lesión leve, moderado y severo hasta las 270 horas posinfección, que fue lo que duró el experimento. En hígado, desde las 30 a 126 hpi, se observó congestión, hemorragia e infiltración de heterófilos y macrófagos, y a partir de las 150 hpi se observaron, además, áreas focales de necrosis coagulativa. En bazo y pulmón se observó hemorragia y congestión de leve a moderada, y a partir de las 174 hpi, en bazo se observó también hiperplasia del tejido linfoide e infiltración de heterófilos y macrófagos; en pulmón, a las 198 y 222 hpi, infiltración de heterófilos y macrófagos. En corazón, desde las 42 a 270 hpi se observó congestión, hemorragia e infiltración focal y difusa de heterófilos y macrófagos en grado de lesión de leve a moderado.

Ultrastructural findings

The ileum and cecum from infected groups with SE PT 13a and SI, between 6 and 30 hpi, showed bacteria in the intestinal lumen, loss of enterocyte microvilli and some of the apical border. Mild projection of the cytoplasm towards the lumen and enterocyte degeneration was observed. In the following hours post infection (42 to 270 hpi), similar changes were observed, such as enterocyte degeneration (mitochondria with mild swollen crests) and in another zones, enterocytes with necrosis (intense dilatation of mitochondria, formation of vacuoles, cellular membrane and organelle damage, karyorrhexis, karyolysis and pyknosis) and some in apoptosis (cellular constriction, condensation and fragmentation of nuclear chromatin and cytoplasmic vesicles formation and apoptotic bodies). In some cells small vacuolar formations were observed that contained round or oval structures, of 0.46 to 1.2 μm , which presented thin cellular wall and electro-dense granular content, suggesting intracellular bacteria. Likewise, in some sections cells with irregular nucleus were observed, that showed in their cytoplasm abundant electro-dense granules of different sizes (heterophils).

At 30 hpi of the group infected with SE PT 13a, in cecum section, an enterocyte with its projected cytoplasm was observed, similar to a cup formation, in which a structure of slightly round form was partially engulfed, within cellular wall and granular contents of moderate electro-density, suggesting SE PT 13a.

At 6 hpi of the group infected with SI, in the ileum section, the following was observed in intestinal

Tratamiento 2 (SI)

En íleon y yeyuno desde las 6 a las 30 hpi, en mucosa y submucosa se observó leve descamación epitelial e infiltración de heterófilos y macrófagos. Además de las lesiones mencionadas, a partir de las 42 hpi se observó necrosis coagulativa del epitelio intestinal, con grado de lesión de leve a moderado. Por último, a las 174 y 222 hpi, se observó leve hiperplasia del tejido linfoide en íleon. En buche, duodeno y ciegos, a las 6 hpi no se observaron cambios histológicos sugestivos a salmonelosis. En mucosa y submucosa de buche, de las 18 a 78 hpi, sólo se observó descamación epitelial, congestión y hemorragia. A partir de las 102 hpi también se observó necrosis coagulativa del epitelio en grado de lesión leve a moderado. Desde las 18 hpi, en mucosa y submucosa de duodeno y ciego se observó congestión, hemorragia, infiltración de heterófilos y macrófagos, necrosis epitelial en grado de lesión leve a moderado hasta las 270 hpi.

En hígado, desde las 6 a 30 hpi, sólo se observó congestión y hemorragia. A partir de las 42 hpi se observaron áreas focales de infiltración de heterófilos y macrófagos en grado leve a moderado, y de las 222 y 246 hpi, además de las lesiones mencionadas, se observaron áreas focales de necrosis coagulativa. En corazón, de las 6 a 78 hpi se observó congestión y hemorragia; desde las 102 hpi se observó además, infiltración focal y difusa de heterófilos y macrófagos. En bazo y pulmones sólo se observó congestión y hemorragia que varió de leve a severa; en bazo a las 198 y 222 hpi también se observó hiperplasia del tejido linfoide (Figura 1).

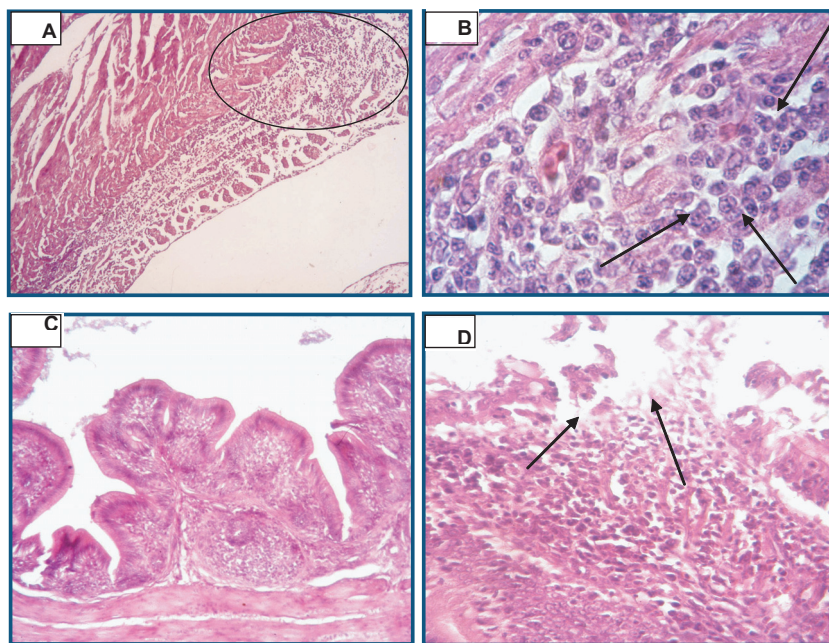


Figura 1: Secuencia de la interacción de SE FT 13a y SI en diferentes órganos de pollitos. A) Infiltrado subendocárdico, grave difuso, de heterófilos y macrófagos (elipse), a las 126 hpi con SE FT 13a. Tinción H y E. 50X. B) Detalle del infiltrado subendocárdico, grave difuso, de heterófilos y macrófagos (flechas), a las 222 hpi con SE FT 13a. Tinción H y E. 400 X. C) Ciego con áreas de infiltrado discreto con heterófilos y macrófagos, a las 222 hpi con SI. Tinción H y E. 100X. D) Intestino con necrosis hacia la punta de las vellosidades (flechas), a las 198 hpi con SE FT 13a. Tinción H y E. 400X.

Figure 1: Interaction sequence of Se PT 13a and SI in different chicken organs. A) Severe diffuse subendocardial infiltration of heterophils and macrophages (ellipse), at 126 hpi with SE PT 13a. H and E stain 50X. B) Severe diffuse subendocardial infiltration detail of heterophils and macrophages (arrows), at 222 hpi with SE PT 13a. H and E stain. 400X. C) Blind gut with mild infiltration areas of heterophils and macrophages, at 222 hpi with SI. H and E stain. 100X. D) Intestine with necrosis towards the point of villi (arrows), at 198 hpi with Se PT 13a. H and E stain. 400X.

mucosa: structure of slightly round form, within cellular wall and electro-dense granular contents; later, a similar structure was observed in contact with microvilli of an enterocyte; in another cell, projection of the cytoplasm towards the lumen was observed, forming a pseudocup, over which a structure with the same characteristics as the described was found. In other enterocytes it was seen several cytoplasmic vacuoles, contained structures of slightly round forms, thin cellular wall and slightly electro-dense, suggesting SI (Figure 2).

Leukocyte changes observed during the infection of SE PT 13a and SI

The differential leukocyte count in infected chickens with SE PT 13a and SI at 4 days of age during the first and second weeks of the experimental post-infection (poi), showed low percentage of lymphocytes, from 41.25% to 41.56%, and from 45% to 36%, respectively. The percentage of heterophils was increased in the first and second poi, for SE PT 13a was of 25% to 28.33% and in SI, of 28.33% to 49%. Eosinophils in the first week poi with SE PT 13a was of 0 and in the second week was of 3.17% (increased). In the first week poi with SI it was 0 and in the second week poi was of 3.42% (augmented). The increase of basophils in both weeks poi was, for SE PT 13a, 10% in the first week and 6.1% in the second week; and with SI in the first week was of 20% and the second, 7.36%. Finally, monocytes were also increased in both poi weeks with both bacteria, in the first week 15% and in the second week 19.89% for SE PT 13a, and with SI, 18.75% in the first week and 21.57% in the second week.

In chickens of treatment 3 (control group), no *Salmonella* spp was isolated from any organ during the whole experiment. During the histological and ultrastructural analyses, no abnormal changes were detected. The leukocyte values were found within normal ranges. During the identification of bacteria negative to *Salmonella* spp isolation in heart, lung, liver and spleen; *E. coli* was isolated in crop, duodenum, jejunum, ileum and blind guts, besides *E. coli*, *Citrobacter freundii* and *Proteus* spp. Finally, in feces samples, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus* spp and *Mucor* spp isolations were obtained.

Discussion

In the present study, 4 days old chicks were inoculated with 10^8 and 10^9 cfu of SE PT 13a and SI, respectively; likewise, it was demonstrated in previous experiments that with these doses, the birds showed a similar course of infection, suggesting salmonellosis^{21,22}

SE PT 13a was isolated from crop, liver, spleen, gall-

Hallazgos ultraestructurales

De los grupos infectados con SE FT 13a y SI, entre las 6 y 30 hpi, ultraestructuralmente en secciones de íleon y ciego, se observaron bacterias en el lumen intestinal, pérdida de microvellosidades de enterocitos, en el borde apical de algunos, proyección leve del citoplasma hacia la luz, y degeneración de enterocitos. En las siguientes horas posinfección (42 a 270 hpi), se observaron cambios similares, así como degeneración de enterocitos (mitocondrias con crestas ligeramente hinchadas) y en otras zonas, enterocitos con necrosis (dilatación intensa de mitocondrias, formación de vacuolas, daño de la membrana celular y organelos, cariorexis, cariólisis y picnosis) y algunos en apoptosis (constricción celular, condensación y fragmentación de cromatina nuclear y formación de vesículas citoplásmicas y cuerpos apoptóticos). En algunas células se observaron pequeñas formaciones vacuolares que contenían estructuras de forma redondeada a oval, de 0.46 a 1.2 μ m, que presentaban pared celular delgada y contenido granular electrodense, sugerentes de bacterias intracelulares. Asimismo, en algunas secciones se apreciaron células con núcleos irregulares, que presentaban en sus citoplasmas abundantes gránulos electrodensos de diferentes tamaños (heterófilos).

A las 30 hpi del grupo infectado con SE FT 13a en la sección de ciego, se apreció un enterocito con proyección de su citoplasma, semejando la formación de una copa, con lo que se englobaba parcialmente una estructura de forma ligeramente redonda, con pared celular delgada y contenido granular de moderada electrodensidad, sugerente a SE FT 13a.

A las 6 hpi del grupo infectado con SI, en la sección de íleon, se observó la siguiente secuencia en la mucosa intestinal: estructura de forma ligeramente redondeada, con pared celular delgada y contenido granular electrodense, posteriormente se observó una estructura similar en contacto con las microvellosidades de un enterocito; en otra célula se apreció la proyección del citoplasma hacia la luz, formando una pseudocopa, sobre la cual se encontraba una estructura con las mismas características que las descritas. En otros enterocitos, a nivel de citoplasma, de una a varias vacuolas, contenían estructuras de forma ligeramente redonda, pared celular delgada y ligeramente electrodensas, sugerente a SI (Figura 2).

Cambios leucocitarios observados durante la infección de SE FT 13a y SI

El conteo diferencial de leucocitos en los pollitos infectados con SE FT 13a y SI a los cuatro días de edad durante la primera y segunda semanas posinfección

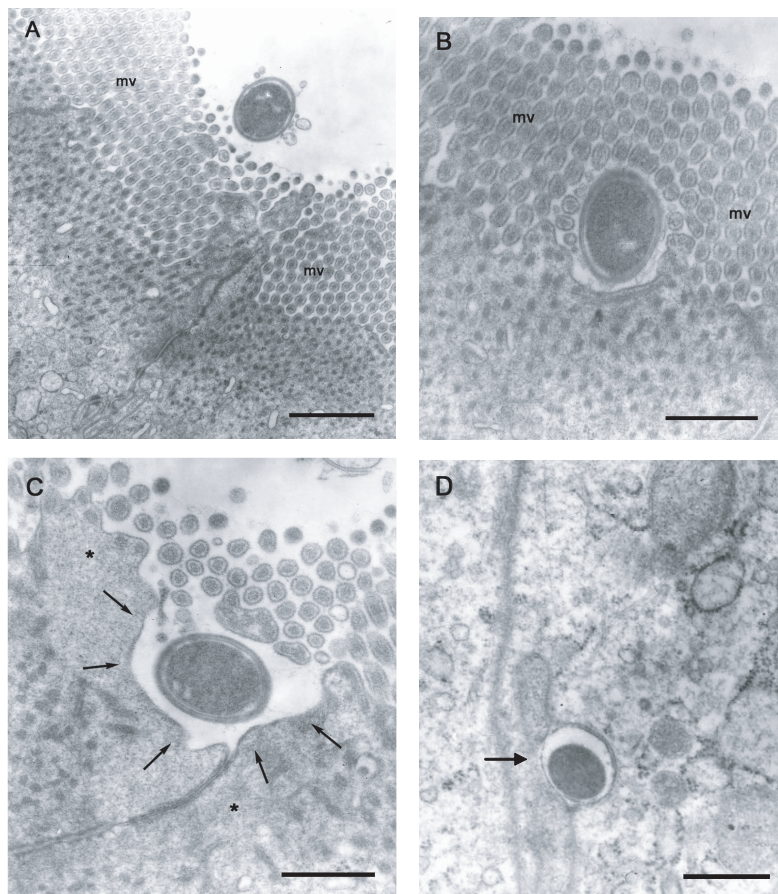


Figura 2: Secuencia de la interacción bacteriana con enterocitos de ciego, de aves infectadas con SI a las 6 hpi. A) Se observa por encima de la superficie de las microvellosidades (mv), estructura oval con pared y contenido fino granular electrodens, cuyas características son similares a las descritas para el género *Salmonella*; Barra = 0.12 μ m. B) Se aprecia estructura similar a la descrita en A, en contacto directo con las microvellosidades (mv); asimismo, por debajo de dicha estructura se observa una discreta modificación en la superficie del enterocito; barra = 0.8 μ m. C) La superficie del enterocito presenta cambios morfológicos evidentes, adoptando forma de copa (flechas), sustituyéndose la base de las microvellosidades por material granular de moderada electrodensidad (asterisco); barra = 0.8 μ m. D) Se aprecia en el citoplasma de un enterocito, estructura similar a las descritas dentro de una vacuola, barra = 0.6 μ m.

Figure 2: Sequence of the bacterial interaction with blind gut enterocytes, of SI infected birds at 6 hpi. A) Above the microvilli surface (mv), oval structure with wall and fine electro-dense granular content is observed; its characteristics are similar to the ones described for *Salmonella* genus, bar = 0.12 μ m. B) Similar structure to the one described in A is noticed, in direct contact with microvilli (mv); likewise, beneath this structure a mild modification of the enterocyte's surface is observed; bar = 0.8 μ m. C) The surface of the enterocyte presents apparent morphological changes, having a pseudocup shape (arrows), substituting the base of microvilli for moderate electro-dense granular material (asterisk); bar = 0.8 μ m. D) A similar structure as the ones described within a vacuole is seen in the cytoplasm of an enterocyte, bar = 0.6 μ m.

bladder, heart, lung duodenum, jejunum, ileum and blind guts; SI was isolated from 42 hpi in crop, jejunum, ileum and blind guts. Ileum and blind guts were the organs with higher frequency of isolation in both treatments. *Salmonella* spp, resists the acid medium of the stomach; therefore, after ingestion, colonizes small intestine, penetrates epithelial cells and migrates towards the lamina propria of the ileocecal region and multiplies in the follicles of the lymphoid region. The polymorphonuclear cells (heterophils) are stimulated and the infection is limited to the gastrointestinal tract.²³ If they are serotypes producers of enteric fever, they are not retained at this level, but migrate to liver and spleen by hematic circulation.²² Likewise, the birds recently hatched which lack protective intestinal microflora are very susceptible to intestinal colonization by *Salmonella* spp or other pathogen bacteria. The target cells (M cells, enterocytes, and caliciform cells) for the invasion of pathogen bacteria cover the last stretch of the small intestine and the first stretch of the large intestine (ileum-blind guts). If the target cell does not show *Salmonella*, it is possible that infection takes place.^{22,24,25}

Results of chickens infected with SE at 4 days of age, according to the studies of Turnbull and Snoey-

ción (poi) experimental, presentó bajo porcentaje de linfocitos, de 41.25% a 41.56%, y de 45% a 36%, respectivamente. El porcentaje de heterófilos se observó aumentado en la primera y segunda poi, para SE FT 13a fue de 25% a 28.33%, y en SI, de 28.33% a 49%. Eosinófilos en la primera semana poi con SE FT 13a fue de 0 y en la segunda semana fue 3.17% (aumentados). Con SI en la primera semana poi fue en 0 y en la segunda semana poi fue 3.42% (aumentados). Los basófilos aumentados en ambas semanas poi fue, para SE FT 13a, 10% en la primera semana, y 6.1% en la segunda semana; y con SI en la primera semana fue 20%, y en la segunda, 7.36%. Por último, los monocitos también estuvieron aumentados en ambas semanas poi con las dos bacterias, en la primera semana 15% y en la segunda semana 19.89% para SE FT 13a, y con SI, 18.75% en la primera semana y 21.57% en la segunda semana.

En los pollitos del tratamiento 3 (grupo testigo) no se aisló *Salmonella* spp de ningún órgano durante todo el experimento. Durante el examen histológico y ultraestructural, no se detectaron cambios anormales. Los valores de leucocitos se encontraron dentro de los rangos normales. Durante la identificación de las bacterias negativas al aislamiento de *Salmonella*

enbos,⁵ indicate the penetration of *Salmonella* through the cellular wall may occur early after the infection. In other study on SE PT 13a persistence performed by Gorham *et al.*,⁶ in chickens infected at first and seventh day of age, isolation of the bacterium was obtained in the majority of organs (yolk sac, liver, spleen, ileum and cecum) after the first week post infection. Alva,²⁶ managed to isolate SE PT 13a from liver and spleen samples in the first week, in 3/10 chicks and 1/10 chicks in the third week post-infection; during the second, fourth and fifth weeks post-infection, the isolation was negative in these organs. Besides, Desmidt *et al.*,²¹ carried out a study of the SE PT 4 pathogenia in one day old chicks, where it was isolated from 3 hpi, in gastrointestinal tract and from 12 hpi, in abdominal organs. It was observed that the majority of the studies performed with SE in chickens of 1 and 7 days, presented similar results to the ones obtained in the present work on the pathogenesis of SE PT 13a.

Nevertheless, in the chickens infected with SI it was not possible to isolate with the same frequency as SE PT 13a; in regards, Urquiza¹³ managed to isolate SI from internal organs and feces of chickens. Gonzalez and Dreyfus,²⁷ and Rejo *et al.*,²⁸ also showed in a poultry model, that with the inoculation of live strain in approximate doses of 10^8 - 10^9 cfu/mL, it was possible to induce immune response mediated by agglutinant antibodies, in percentages that go from 13% to 94% with the strain of the rodenticide. In the same way, Chils²⁹ carried out studies where he managed to re-isolate in feces the strain in experimentally inoculated dogs, sheep and pigs. The low frequency of isolation of SI in chicken may be due to the difference in pathogenicity among the different phagotypes of SE; for example, the PT 4 is frequently related with certain degree of elevated invasiveness and lethality to recently to hatched chickens; besides, other studies reveal that the specificity of a serotype for a particular host would not only be given by virulence factors distinctive of the bacterium, but also for the serotype capacity to circulate in a population of hosts, that is, the environment in which birds live would not allow SI to express its virulence factors.^{30,31}

During the microscopic lesion reviewed in organs of infected chickens by SE PT 13a and SI, it was observed that since the 6 hpi both bacteria under study, showed lesions, such as epithelial desquamation, severe enteritis with heterophil leukocytes and macrophages, coagulative necrosis and hyperplasia of lymphoid follicles, accompanied by hemorrhages and congestion, suggesting salmonellosis. In regard to this, Desmidt *et al.*²¹ carried out a pathogenesis study on SE PT 4 in chickens and observed small and cecum enteritis with coagulate necrosis of microvilli and infiltration of heterophils and macrophages, in

spp en corazón, pulmón, hígado y bazo, se aisló *E. coli* en buche, duodeno, yeyuno, íleon y ciegos, además de *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Proteus* spp. Por último, en muestras de heces se obtuvo aislamiento de *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus* spp y *Mucor* spp.

Discusión

En el presente estudio, los pollitos de cuatro días de edad fueron inoculados con 10^8 y 10^9 ufc de SE FT 13a y SI, respectivamente; de igual manera se demostró en experimentos previos que con estas dosis, las aves muestran un curso de infección similar, sugerente de salmonelosis.^{21,22}

Se aisló SE FT 13a de buche, hígado, bazo, vesícula biliar, corazón, pulmón, duodeno, yeyuno, íleon y ciegos; SI se aisló desde las 42 hpi en buche, yeyuno, íleon y ciegos. Íleon y ciegos fueron los órganos con mayor frecuencia de aislamiento en ambos tratamientos. *Salmonella* spp resiste el ambiente ácido del estómago, por lo que, después de la ingestión, coloniza el intestino delgado, penetra a las células epiteliales y migra hacia la lámina propia de la región ileocecal y ahí se multiplica en los folículos de la región linfóide. Los polimorfonucleares (heterófilos) son estimulados y la infección se limita al tracto gastrointestinal.²³ Si son serotipos productores de fiebre entérica, no son retenidas a este nivel, sino que migran a hígado y bazo por circulación hemática.²² Asimismo, las aves recién eclosionadas que carecen de microflora intestinal protectora son muy susceptibles a la colonización intestinal por *Salmonella* spp u otras bacterias patógenas. Las células blanco (células M, enterocitos y células caliciformes) para la invasión por bacterias patógenas revisten el último tramo del intestino delgado y el primer tramo del intestino grueso (íleon-ciego). Si la célula blanco no presenta salmonelas, es posible que se produzca la infección.^{22, 24, 25}

Los resultados de los pollitos infectados con SE a los cuatro días de edad, de acuerdo con los estudios de Turnbull y Snoeyenbos,⁵ indican que la penetración de *Salmonella* a través de la pared celular puede ocurrir temprano después de la infección. En otro estudio sobre persistencia de SE FT 13a, realizado por Gorham *et al.*,⁶ en pollitos infectados al primero y séptimo días de edad, se obtuvo aislamiento de la bacteria de la mayoría de los órganos (saco vitelino, hígado, bazo, íleon y ciego) después de la primera semana posinfección. Alva²⁶ logró aislar SE FT 13a de muestras de hígado y bazo a la primera semana, en 3/10 pollos, y en 1/10 pollos en la tercera semana posinfección; durante la segunda, cuarta y quinta semanas posinfección, su aislamiento fue negativo en estos órganos. Además, Desmidt *et al.*²¹ realizaron un estudio de la patogenia de SE FT 4 en pollitos de un día de edad, en

bursa of Fabricius, liver, spleen and heart, also focal points of infiltration of heterophils were observed. In contrast with the great molecular diversity of microorganisms, the patterns of tissue response to these agents is unlimited. Therefore, microscopically, many pathogens unleash identical reaction patterns and exclusive or pathognomonic data are scarce for each agent. What determines the histological characteristics of the inflammatory response is the interaction between the microorganism and host. Therefore, in a neutropenic host, a pyogenic bacterium that normally would unleash an energetic leukocytic response, can cause a fast tissue necrosis with excess of leukocytic exudates.³²

In this study it was observed by transmission electron microscopy that from 6 hpi, SE PT 13a as well as SI were in contact with the microvilli of the enterocytes, with ruffling and wrinkling of the cellular membrane and structures suggesting *Salmonella* spp inside the enterocytes and in the following hpi pathological changes were observed in cellular cytoplasm, coinciding with the microscopic lesions; besides, with studies done by other researchers on birds and other animal models such as: calves, rabbits, mice, pigs, to study the pathogenicity mechanisms of *Salmonella* spp.³³⁻³⁶

Salmonella is able to exploit the pre-existent cellular functions of the host and use them for its benefit. This last has been observed during the invasion when the bacterium utilizes the transduction signals of the host, which affects the rearrangement of the cytoskeleton and superior membrane proteins, producing the ruffling of the membrane and the bacterial invasion. It also occurs when *Salmonella* is inside a vacuole joined to the membrane, in epithelial cells as well as macrophages.³⁷

Though in the bacteriological test at 6 hpi the bacterium in study was not isolated from none of the two treatments, with the ultrastructural study it was possible to observe SE PT 13a inside the enterocytes and SI in ileum and blind guts of experimentally infected chickens and in the penetration sequence and other pathological changes. The negative isolation of SE PT 13a and SI at 6 hpi, suggests low colonization and multiplication in the *Salmonella* spp tissues. At the beginning of the bacterial infection the bacterium goes through environmental changes in the host's organism while orally entering, and facing unspecific defense mechanisms of this, as the stomach acid pH, low oxygen tensions, intestinal motility, microbial flora and also specific defense mechanisms, regulated by the presence of leukocytes.

The bacterium responds to these changes modulating the expression of its genes, to penetrate and invade tissues.^{16,38} The former suggests that *Salmonella*, after fighting against the specific and unspecific

los que se aisló a partir de las 3 hpi, en tracto gastrointestinal, y a partir de las 12 hpi, en órganos viscerales. Al respecto, se observó que la mayoría de los estudios realizados con SE en pollitos de uno a siete días, presentaron resultados muy similares a los obtenidos en el presente trabajo sobre la patogenicidad de SE FT 13a.

Sin embargo, en los pollitos infectados con SI no se logró aislar con la misma frecuencia que SE FT 13a; al respecto, Urquiza¹³ logró aislar SI a partir de órganos internos y heces de pollitos. González y Dreyfus²⁷ y Rejo, *et al.*²⁸ también demostraron en un modelo aviar, que con la inoculación de la cepa viva en dosis aproximadas de 10^8 - 10^9 ufc/mL, se lograba inducir respuesta inmune mediada por anticuerpos aglutinantes, en porcentajes que van desde 13% hasta 94% con la cepa del rodenticida. De la misma forma, Chils²⁹ realizó estudios en los que logró reaislar la cepa en deposiciones de perros, ovejas y cerdos inoculados experimentalmente. La baja frecuencia de aislamiento de SI en pollitos quizá se deba a las diferencias de patogenicidad entre los distintos fagotipos de SE; por ejemplo, el FT 4 frecuentemente se relaciona con cierto grado de elevada invasividad y letalidad para pollos recién eclosionados; además, otros estudios revelan que la especificidad de un serotipo para un portador particular no sólo estaría dada por factores de virulencia propios de la bacteria, sino también por la capacidad del serotipo para circular dentro de una población de portadores; es decir, el ambiente donde habitan las aves no permitiría que SI exprese sus factores de virulencia.^{30,31}

Durante la revisión de lesiones microscópicas en órganos de pollitos infectados por SE FT 13a y SI, se observó que desde las 6 hpi ambas bacterias en estudio presentaban lesiones, como descamación epitelial, enteritis severa con infiltración de leucocitos heterófilos y macrófagos, focos de necrosis coagulativa e hiperplasia de folículos linfoides, acompañadas de hemorragias y congestión, sugerentes a salmonelosis. Al respecto, Desmidt *et al.*²¹ realizaron un estudio de patogénesis de SE FT 4 en pollitos y observó enteritis del intestino delgado y ciego con necrosis coagulativa de microvellosidades e infiltración de heterófilos y macrófagos, en bolsa de Fabricio, hígado, bazo y corazón también se observaron focos de infiltración de heterófilos. En contraste con la gran diversidad molecular de microorganismos, los patrones de respuestas tisulares a estos agentes son ilimitados. Por tanto, microscópicamente muchos patógenos desencadenan patrones de reacción idénticos y son escasos los datos exclusivos o patognomónicos de cada agente. Además, lo que determina las características histológicas de la respuesta inflamatoria es la interacción entre el microorganismo y el portador. Por tanto, en un portador neutropénico, una bacteria piógena que

mechanisms of defense of the host, diminishes its concentration in tissues and finds itself in slow multiplication phase during the first hpi, which influences in its isolation in culture mediums in which the bacterium feces environmental changes by the oxygen concentration of the culture, temperature, osmolality, nutrient disposability of the culture medium, etc., which may influence its isolation.

In this study, it was evident that broiler chicken, during the first weeks of life, are susceptible to infection by *Salmonella enteritidis* PT 13a and *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko, and that the last one is not only for rodents of the Muridae family. Recently, the host's specificity is being studied in Mexico and other countries, but the molecular-genetic bases that give origin to this particular situation, have not been cleared up. The truth is that it would be considered as a complex interaction between plasmidial genes of spv virulence and chromosomal genes located in islands of pathogenicity, that, as a whole, derive in the recognition of only one species in particular. The recent infection finding, accomplished with a *Salmonella gallinarum* strain in sheep,³¹ opens a new scenario in salmonellosis epidemiology. This study revealed that the specificity of a serotype for a particular host, would not only be given by virulent factors of the bacterium itself, but also by the serotype capacity to circulate inside a host population; that is, the environment in which ovine inhabit would not allow *S. gallinarum* to express its virulent factors. In this context, the first interrogations arise on the mono-specificity of SI.³⁰

Then seems of undeniable interest to consider which would be the consequences on livestock exploitation, on public health and on salmonellosis epidemiology, each time a biological product against rodents is used, elaborated with a SI strain that belongs to *enteritidis* serotype, that has a wide range of hosts.

From this study it is concluded that the pathogenesis of *Salmonella enteritidis* PT 13a and *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko in broiler chickens, is similar to the described pathogenesis of other serotypes of *Salmonella* spp.

Salmonella enteritidis biovar Issatschenko can be isolated by bacteriology, and produces lesions since 6 hpi, in different organs of experimentally infected broiler chickens.

The transmission electron microscopy allowed to observe the penetration of *Salmonella enteritidis* PT 13a and of *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko, in enterocytes of ileum and cecum of experimentally infected broiler chickens.

Acknowledgments

This work was financed by the General Direction of

normalmente desencadena una respuesta leucocitaria enérgica, puede suscitar una necrosis tisular rápida con escaso exudado leucocitario.³²

En este estudio, mediante microscopía electrónica de transmisión, se observó que a partir de las 6 hpi, tanto SE FT 13a como SI se hallaban en contacto con las microvellosidades de los enterocitos, con rizado o arrugamiento de la membrana celular y estructuras sugerentes a *Salmonella* spp dentro de los enterocitos y en las subsiguientes hpi se observaron cambios patológicos en el citoplasma celular, coincidentes con las lesiones microscópicas, además con estudios realizados por otros investigadores en aves y en otros modelos animales, como terneros, conejos, ratones, cerdos, para estudiar los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* spp.³³⁻³⁶

Salmonella es hábil para explotar las funciones celulares preexistentes del portador y usar estas funciones para su propio beneficio. Esto último se ha visto durante la invasión, cuando la bacteria utiliza las señales de transducción del portador, lo cual afecta el rearrreglo del citoesqueleto y proteínas superiores de membrana, produciendo el rizado (*ruffling*) de la membrana y la invasión bacteriana. También ocurre cuando *Salmonella* está dentro de una vacuola ligada a la membrana, tanto en células epiteliales como en macrófagos.³⁷

Si bien en el examen bacteriológico a las seis horas posinoculación no se aisló la bacteria en estudio de ninguno de los dos tratamientos, en el estudio ultraestructural sí se logró observar dentro de los enterocitos SE FT 13a y SI en íleon y ciego de pollitos infectados experimentalmente y en la secuencia de la penetración y otros cambios patológicos. El aislamiento negativo de SE FT 13a y SI a las 6 hpi, sugiere baja colonización y multiplicación en los tejidos de *Salmonella* spp. Al inicio de la infección bacteriana, la bacteria experimenta severos cambios ambientales en el organismo del portador al ingresar por vía oral y enfrentarse con mecanismos de defensa inespecíficos de éste, como el pH ácido del estómago, bajas tensiones de oxígeno, motilidad intestinal, flora microbiana y también con los mecanismos de defensa específicos, regulada por la presencia de leucocitos.

La bacteria responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes, para penetrar e invadir tejidos.^{16,38} Lo anterior sugiere que *Salmonella* después de combatir contra los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del portador, disminuye su concentración de los tejidos y se encuentra en fase de multiplicación lenta durante las primeras hpi, lo cual influye en su aislamiento en medios de cultivo en los que la bacteria enfrenta cambios de ambiente por la concentración de oxígeno del cultivo, temperatura, osmolaridad, disponibilidad de nutrimentos

Referencias

1. Anon. Unprecedented increase in *Salmonella enteritidis* food poisoning. Vet Rec 1988; 123 - 145.
2. Hogue A, White P, Guard-Peter J, Schlosser W, Gast R, Ebel E *et al.* Epidemiology and control of egg - associated *Salmonella enteritidis* in the United States of America. Rev Sci Tech 1997; 16: 542-553.
3. Ontiveros C Ma L, Mancera MA, Vázquez NJ, Tenorio GRV. Determinación de la existencia de plásmidos en aislamientos de *Salmonella enteritidis* (Fagotipos 4 y 8) y su análisis en la resistencia antimicrobiana. Téc Pecú Méx 2004; 42(3):325-332.
4. Gast RK, Beard CW. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in chicks. Poult Sci 1989; 68: 1454-1460.
5. Turnbull PCB, Snoeyenbos GH. Experimental salmonellosis in the chicken. I. Fate and host response in alimentary canal, liver and spleen. Avian Dis 1974; 18: 153-177.
6. Gorham SL, Kadavil K, Lambert H, Vaughan E, Pert B, Abel J. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. Avian pathol 1991; 20:433-437.
7. Gorham SL, Kadavil K, Vaughan E, Lambert H, Abel J, Pert B. Gross and microscopic lesions in young chickens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*. Avian Dis 1994; 38: 816-821.
8. Barnes EM, Impey CS, Stevens BJ. Factors affecting the incidence and anti-*Salmonella* activity of the anaerobic caecal flora of the young chick. J Hyg Lond 1979; 82(2):263-83.
9. Ewing W. Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing, 1986.
10. Le Minor L. Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. In: Rods Krerg N R, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984: 427-458.
11. Mancera MA, Vázquez NJ, Heneidi ZA. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. Téc Pecú Méx 2004; 42: 287-294.
12. Padrón NM. Control y prevención de la tifoidea aviar en las aves reproductoras pesadas. Memorias de II Jornada Médico Avícola; 1995 julio 22-25; México (DF). México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, 1991:128-135.
13. Urquiza BO. Patogenicidad e Inocuidad de *Salmonella enteritidis* var. 17F-4 en animales de laboratorio y determinación de proteínas con enterotóxica (tesis de doctorado). México (DF) México: UNAM, 2001.
14. Norma Oficial Mexicana. NOM-005-ZOO-1993. Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos: Diario Oficial de la Federación. México DF: 1 septiembre, 1994.
15. Norma Oficial Mexicana NOM- 033- ZOO- 1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres

del medio de cultivo, etc., lo que puede influir en su aislamiento.

En este estudio fue evidente que los pollitos de engorda durante las primeras semanas de vida son susceptibles a la infección por *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko, y que esta última no es sólo para roedores de la familia Muridae. Actualmente la especificidad del portador se está estudiando en México y en otros países, pero no se han logrado aclarar las bases genético-moleculares que dan origen a esta situación tan particular. Lo cierto es que se trataría de una compleja interacción entre genes plasmidiales de virulencia *spv* y genes cromosomales ubicados en islas de patogenicidad, que, en su conjunto, derivan en el reconocimiento de una única especie en particular. El reciente hallazgo de infección, logrado con una cepa de *Salmonella gallinarum* en ovejas,³¹ abre un nuevo escenario en la epidemiología de la salmonelosis. Este estudio reveló que la especificidad de un serotipo para un portador particular, no sólo estaría dada por factores de virulencia propios de la bacteria, también por la capacidad del serotipo de circular dentro de una población de portadores; es decir, el ambiente donde habitan los ovinos no permitiría que *S. gallinarum* expresara sus factores de virulencia. En este contexto se producen las primeras interrogantes sobre la monoespecificidad de SI.³⁰

Parece entonces de innegable interés considerar cuáles serían las consecuencias en explotaciones pecuarias, en salud pública y en la epidemiología de la salmonelosis, toda vez que se utilice un producto biológico contra roedores, elaborado con una cepa de SI que pertenece al serotipo *enteritidis*, que tiene un amplio rango de portadores.

De este trabajo se concluye que la patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda, tiene similitud con la patogenia descrita de otros serotipos de *Salmonella* spp.

Salmonella enteritidis biovar Issatschenko puede ser aislada mediante bacteriología, y produce lesiones desde las 6 hpi, en diferentes órganos de pollos de engorda infectados experimentalmente.

La microscopia electrónica de transmisión permitió observar la penetración de *Salmonella enteritidis* FT 13a y de *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko, en enterocitos de íleon y ciego de pollos de engorda infectados experimentalmente.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico con el Proyecto

- tres. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Diario Oficial de la Federación. México, DF: 16 Julio, 1996.
16. Pérez JM, Vázquez MJR, Rodríguez SMC, Miranda MRE, Romo GAL, Nader GE. Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología. México (DF): UNAM, 1987.
 17. Urquiza BO. Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum* (tesis de maestría). México (DF): México: UNAM, 1995.
 18. Charles NML. Manual de hematología aviar. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
 19. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobón L. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC, Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.
 20. Vásquez NG, Echeverría O. Introducción a la microscopía electrónica aplicada. 2ª ed. México (DF): Fondo de Cultura Económica, 2000.
 21. Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type two after experimental infection of young chickens. Vet Microbiol 1997; 56: 99-109.
 22. Sánchez JM, Cardona CN. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asoc Colomb Infect 2003; 7: 22-29.
 23. Cox J, Berrang M. Alternative routes for *Salmonella* intestinal tract colonization of chicks. Appl Poult Sci 1996; 282-288.
 24. Salyers A A, Whitt DP. *Salmonella* infections. In: Salyers AA, Whitt DP, editors. Bacterial Pathogenesis: A molecular approach. American Society for Microbiology Press. Washington DC: Ed. ASM press, 1994: 229-243.
 25. Hirsh DC, Chung ZY. *Salmonella*. In: Hirsh D, Chun ZY, editors. Veterinary Microbiology. Iowa State, Blackwell Science Inc, 1999: 75-80.
 26. Alva PJ. Determinación de la concentración mínima detectable por medio de la reacción en cadena de la polimerasa PCR de *Salmonella enteritidis* en órganos y heces de aves infectadas experimentalmente (tesis licenciatura). México (DF): UNAM, 2005.
 27. González PB, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico 2003; 27: 45-63.
 28. Rejo T, Mosdeu V, Henreat R. Evaluación experimental de la inocuidad del producto "Biorat" en aves. 1º Simposio Internacional de Control Biológico de Ratas y Ratones, 1997, diciembre 3-5; La Habana (Cuba). La Habana (Cuba): LABIOFAM, Cuba, 1997:36
 29. Chils A. 1997. Inocuidad de *Salmonella enteritidis* var danysz, fagotipo 6a (lisina negativa) para animales domésticos (perros, ovejas, cerdos). Ier Simposio Internacional de Control Biológico de Ratas y Ratones; 1997 diciembre 3-5; La Habana (Cuba). La Habana (Cuba): LABIOFAM, Cuba, 1997: 32
 30. Borie PC, González UR. Antecedentes Microbiológicos de un rodenticida biológico presente en Chile. Posible impacto en la epidemiología de la Salmonelosis. Laboratorio de Microbiología. Dpto de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Tecno Vet 2000; 3: 95-102.
 31. Uzzau S, Leori GS, Petruzzi V, Watson PR, Schianchi G, Bacciu D et. al. *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. Infect Immun 2001; 69: 3092-3099.
 32. Samuelson J. Enfermedades infecciosas. In: Cotran R, Kuman V, Collins T, editores. Patología estructural y funcional. España: McGraw-Hill, 2003: 349-370.
 33. Amin I, Douce T, Osborne T, Stephen J. Quantitative studies of invasion of rabbit ileal mucosa by *Salmonella typhimurium* strains which differ in virulence in a model of gastroenteritis. Infect immun 1994; 62: 569-578.
 34. Bradley DJ, Ghorri N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the peyer's patches. J exp Med 1994;7:15-23.
 35. Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Baumler AJ, Adams G. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. Vet Pathol 2002; 39: 200-215.
 36. Meyerholz D, Stabel T, Ackermann M, Carlson S, Jones B, Pohlenz J. Early epithelial invasion by *Salmonella enteric* serovar *typhimurium* DT104 in the swine ileum. Vet Pathol 2002; 39:712 – 720
 37. Santos RL, Tsois RM, Baumler AJ, Adams LG. Pathogenesis of *Salmonella* induced enteritis. Braz J Med Biol Res 2003; 36:3-12.
 38. Figueroa OIM. Caracterización de la capacidad de invasión celular y citotoxicidad en macrófagos de *Salmonella gallinarum* cepa FVA1 (tesis de maestría). México (DF):UNAM, 2003.