

Laboratorium voor Hygiëne van de Veeartsenijschool  
der Rijksuniversiteit te Gent — Kliniek voor Pluimvee

Directeur : Prof. Dr. A. DEVOS

**EXPERIMENTELE INFECTIES MET *S. PULLORUM*  
EN *S. TYPHIMURIUM*.  
CONTACTBESMETTING, KIEMUITSCHEIDING,  
SEROLOGISCHE REACTIES EN KIEMLOCALISATIES  
BIJ KUIKENS EN DUIVEN**

A. DEVOS, J. VAN IMPE, N. VIAENE, L. SPANOGHE

(Ontvangen voor publicatie : maart 1966)

De epidemiologie en de pathogenese van de salmonella-infecties bij pluimvee zijn zeer uitgebreid, precies omdat de besmettingsmogelijkheden zo gevarieerd zijn. Meestal gaat het om congenitale infecties, terwijl ook aerogene en per os besmettingen via de broedmachine, de dozen, het bodemstrooisel<sup>(2)</sup>, het sexen<sup>(5)</sup>, de ontbekker<sup>(10)</sup>, het voeder, enz. mogelijk zijn. In al deze gevallen stelt zich het probleem van de smetstofreservoirs en van de salmonella-uitscheiding en verspreiding. Anderzijds dient bij de bestrijding van de salmonellosen de nadruk gelegd te worden op het opsporen van kiemdragers, die in zeer veel gevallen kiemuitscheiders kunnen worden.

Dit onderzoek had tot doel, na de experimentele infectie met *S. pullorum*, na te gaan in welke mate bij kuikens de ziekteverspreiding tot stand kwam en welk verband kon gelegd worden tussen de serologische reacties van deze proefdieren en het bacteriologisch aantonen van de infectie bij dezelfde proefdieren. Verder werd onderzocht in welke organen de salmonellas het meest werden aangetroffen om dan deze gegevens te benutten bij het routine bacteriologisch onderzoek, aangewend voor het opsporen van salmonella-infecties bij pluimvee.

## Eigen onderzoek

### Proef 1

Het doel van deze proef is na te gaan welk sterftepercentage zich bij kuikens voordoet eerst na een experimentele perorale infectie, vervolgens na een contactinfectie; verder vast te stellen wanneer de kiemuitscheiding tot stand komt en welke serologische reactie deze proefkuikens vertonen.

#### Proefopzet

##### 1. Kiem

Een *S. pullorum*-stam werd geïsoleerd uit de longen van een kuiken 8 dagen oud. Op het bedrijf waaruit dit kuiken afkomstig was bedroeg de kuikensterfte 83 %. De cultuur werd een 3-tal weken vóór het begin van de proef afgezonderd.

##### 2. Kuikens

Deze waren 60 ongesexte Hubbard ééndagskuikens, die in twee groepen van 30 kuikens elk werden ingedeeld.

##### 3. Voeder

Het kuikenmeel had de volgende samenstelling \*: milocorn 55, sojaschroot 16,5, haringmeel 8, vetkern (reuzel 30 %, sojaschroot 70 %) 15, minerale kern 15, voederfosfaat 1,2, kriet 1,0, AD3 droog (2500/835/g) 0,3, vital-pluimvee (B-complex) 2,5. Het bevatte geen antibioticum noch furazolidone. Bij bacteriologisch onderzoek (seleniet - SS agar, Müller - Gassner) konden uit dit voeder geen salmonellas worden geïsoleerd.

##### 4. Methode

###### a) Infectie

Van de *S. pullorum*-stam werd een bouilloncultuur aangelegd. Voor de kiemtelling werd de verdunningsmethode toegepast. Het kiemgehalte bedroeg  $9.10^8$  kiemen per ml cultuur. Aan de eerste groep van 30 kuikens (groep A) werd individueel 0,1 ml bouilloncultuur per os toegediend. Al de kuikens van deze groep werden met Ziehl-fuchsine aan de kop gemerkt.

De tweede groep van 30 ongemerkte kuikens (groep B) werd niet besmet, doch bij de eerste groep geplaatst en samen gehouden gedurende 1 week in een hokje met 1 m<sup>2</sup> grondoppervlakte. De temperatuur bedroeg de eerste dag 35° C en op het einde van de 1<sup>e</sup> week 31° C. Na de eerste week werden de 2 groepen afzonderlijk opgefokt tot op een ouderdom van 42 dagen.

###### b) Mestonderzoek

Dit onderzoek werd verricht op de 18<sup>e</sup>, 20<sup>e</sup>, 25<sup>e</sup>, 27<sup>e</sup> en 33<sup>e</sup> dag na de perorale infectie. Van de goed gehomogeniseerde uitwerpselen werd 1 gram afgewogen en geënt op een seleniet-bouillon. Na een incubatie van 18 uren en 42 uren bij 37° C werd overgeënt op SS agar. Deze SS agar-platen werden na 24 u. verder

\* Dit voeder werd ons ter beschikking gesteld door Prof. Dr. F. Vanschoubroek, waarvoor we hem hier onze dank betuigen.

bebroeden op aanwezigheid van *S. pullorum* onderzocht. Van verdachte kolonies werden zowel de biochemische als de antigenische eigenschappen verder nagegaan.

c) Serologisch onderzoek

Van al de kuikens, zowel uit de groep A als uit de groep B, werd bloed getrokken aan de vleugelvene (<sup>3</sup>). De buisjes werden bij kamertemperatuur schuin gelegd om vlug te stollen en om een helder serum te verkrijgen. Eerst werd de snelle serummethode op een draagglas doorgevoerd met 3 antigenen uit de handel, nl. RIT, Nobilis en Behring-Werke. Alleen van de positieve sera werd ook een trage agglutinatie doorgevoerd met een eigen standaard antigeen. Hiervoor werden de positieve sera in gelijke hoeveelheden gemengd en hiervan alleen werd de titer bepaald.

## Resultaten

In totaal stierven 7 kuikens uit groep A en 7 kuikens uit groep B. In groep A bleef de sterfte beperkt tot de eerste 2 weken, in groep B stierven 6 kuikens binnen de 3 weken na de contact-infectie, het 7<sup>e</sup> kuiken stierf na 35 dagen, ten gevolge van een synovitis-arthritis door *S. pullorum* veroorzaakt. Uit de gestorven kuikens, zowel van groep A als van groep B, kon *S. pullorum* opnieuw worden geïsoleerd, wat er op wijst dat een contact-infectie tussen de kuikens van groep A en groep B, tijdens de 7 dagen die ze samen doorbrachten, wel heeft plaats gevonden.

De 5 mestonderzoeken verliepen voor de groepen A en B negatief. Het eerste onderzoek vond plaats de 18<sup>e</sup> dag na de infectie, het laatste onderzoek op de 33<sup>e</sup> dag. Deze negatieve resultaten kunnen doen vermoeden dat de kiemuitscheiding via de faeces reeds op de 18<sup>e</sup> dag niet meer plaats vond.

Het serologisch onderzoek bleef voor beide groepen A en B negatief tot de 23<sup>e</sup> dag na de besmetting. Toen reageerden 3 kuikens van groep A op de 23 overlevenden. De titer van het mengserum was 1/640. De controle kuikens van groep B, die aan een contact-infectie waren onderworpen geweest, reageerden pas na de 26<sup>e</sup> dag, namelijk 2 kuikens op 24 met een titer voor het mengserum 1/320. De contact-infectie moet aldus zeer vroeg plaats gevonden hebben na de orale besmetting van de kuikens uit groep A. Serologische testen na 34 en 41 dagen waren voor groep A 12<sup>+</sup>/23 en 13<sup>+</sup>/23, titer 1/640 en 1/80 en voor groep B 6<sup>+</sup>/24, 8<sup>+</sup>/23, titers 1/640, 1/640.

## Proef 2

De bedoeling van deze proef is na te gaan in hoever 1 kunstmatig besmet kuiken in staat is om de besmetting in een groep kuikens te doen aanslaan.



### Proefopzet

Deze proef werd in dezelfde voorwaarden opgezet als proef 1, doch in plaats van 30 kuikens per os te besmetten werd nu slechts 1 ééndagskuiken per os geïnfecteerd met 0,1 ml van dezelfde *S. pullorum*-cultuur ( $9 \cdot 10^8$  kiemen/ml) als in proef 1. Dit kuiken werd dan onmiddellijk in een groepje van 30 ééndagskuikens gebracht van dezelfde herkomst. Het faecesonderzoek werd om de 3 dagen doorgevoerd en de stalen werden 's morgens, 's middags en 's avonds gepreleveerd. Hiervoor werden de kuikens gedurende 30 minuten in een kartonnen doos geplaatst, waarvan de bodem vóór iedere staalname met een nieuw vel papier werd bedekt.

### Resultaten

Tijdens de duur van de proef (42 dagen) is geen enkel kuiken gestorven. Het faecesonderzoek van het kunstmatig besmet kuiken werd positief na 6 dagen. *S. pullorum* werd bijna steeds in morgen- en avondmest teruggevonden tot de 14<sup>e</sup> dag na de infectie. Daarna bleef het bacteriologisch onderzoek van de mest op *S. pullorum* negatief. Bij de controle-kuikens, die aan de contactbesmetting onderhevig waren, werd nooit *S. pullorum* uit de faeces geïsoleerd.

Het serologisch onderzoek bleef negatief voor het besmet kuiken en voor de contact-kuikens tot op het einde van de proef.

### Proef 3

In verband met het overdragen van de pullorumbesmetting zowel bij kuikens als bij leggende dieren was het van belang na te gaan in welke organen *S. pullorum* kon worden teruggevonden. Dit kon bovendien een praktische waarde hebben omdat dan bij het routine bacteriologisch onderzoek, juist die organen in het onderzoek kunnen worden betrokken, waar de salmonellas na experimentele infectie konden worden aangetoond.

### Proefopzet

#### *Kuikens*

Na de observatieperiode van 42 dagen, die in proef 1 en 2 werd toegepast, werden de 77 normaal uitzierende overlevende kuikens geslacht. De experimenteel besmette kuikens werden afzonderlijk gehouden, dit was eveneens het geval met de contactkuikens.

#### *Bacteriologisch onderzoek*

Na de slachting werden op een steriele manier de volgende organen in hun geheel of fragmentair gepreleveerd en afzonderlijk geënt in selenietbouillon: slokdarm, kliermaag, pancreas, caecale tonsillen, galblaas met gal, hart, milt, nieren, bursa fabricii, testes of eierstok, schildklieren, longen, hersenen en beenmerg. Na een incubatietijd bij 37° C gedurende 18 u. werden entingen verricht op SS agar-platen, die 24 u. in de broedstoof werden bebroed.

## Resultaten

Bij 11 van de 24 per os geïnfecteerde kuikens kon *S. pullorum* worden geïsoleerd, alhoewel bij het serologisch onderzoek 14 kuikens positief gereageerd hadden. Onder deze 11 kuikens waren er 4 die een negatieve agglutinatiereactie hadden gegeven, zodat dan onvermijdelijk ook 7 kuikens met een positieve serologische reactie, negatief bleken bij het bacteriologisch onderzoek.

Bij de eerste controlegroep (groep B, 8<sup>+</sup>/23) viel bij 7 dieren de isolatie positief uit, hiervan hadden slechts 4 een positieve agglutinatiereactie vertoond. De overige 4 kuikens met een positieve serumtest werden bij het bacteriologisch onderzoek vrij van *S. pullorum* bevonden.

Bij al de kuikens uit proef 2 kon geen *S. pullorum* worden afgezonderd, zelfs niet bij het ene kuiken dat experimenteel met ongeveer 10<sup>9</sup> kiemen per os was besmet geworden. Dit kuiken had tot 14 dagen na de infectie *S. pullorum*-kiemen uitgescheiden en had toen uiteindelijk een negatieve agglutinatiereactie vertoond.

Wanneer alleen de gepreleverde stalen in aanmerking worden genomen dan verliep de frequentie van isolatie van *S. pullorum* in dalende lijn als volgt: gal en galblaas, hart, pancreas, testes of eierstok, milt, longen, caecale tonsillen, nieren en bursa fabricii. Waren steeds vrij van *S. pullorum*, slokdarm, kliermaag, hersenen, schildklieren en beenmerg.

In dezelfde zin werden ook steekproeven verricht bij duiven afkomstig uit een duiventil sedert meer dan 1 jaar besmet met *S. typhimurium*. Al de duiven, in totaal 36, werden aan een serologisch en bacteriologisch onderzoek onderworpen volgens het schema gevolgd in de proeven 1 en 3.

Eerst werden ze serologisch getest. Daarvoor werd bloed getrokken aan de pootvene. Twaalf duiven waren negatief, 24 positief. Na het afslachten werd het bacteriologisch onderzoek verricht uitgaande van lever, milt, darm met darminhoud en geslachtsorganen en de resultaten werden vergeleken met de uitslagen van het bloedonderzoek (tabel 1).

Uit deze tabel blijkt dat slechts bij 7 duiven op 24 *S. typhimurium* kon worden aangetoond en aldus 17 duiven met een positieve serologische reactie bij het bacteriologisch onderzoek negatief bleken. Anderzijds kon uit de milt van 1 duif met een negatieve bloedreactie, *S. typhimurium* worden geïsoleerd. Lever (<sup>3</sup>), milt en darmfragmenten moeten bij het routine bacteriologisch onderzoek worden ingeschakeld om de gevallen van duivensalmonellose op te sporen.

TABEL 1

	Aantal duiven	Positief bacter. onderzoek	Isolatie van <i>S. typhimurium</i>			
			Lever	Milt	Darm	Geslachtsorganen
Serologisch positief	24	7/24	4/36	4/24	4/24	1/24
Serologisch negatief	12	1/12	-/12	1/12	-/12	-/12
Totaal	36	8/36	4/24	5/36	4/36	1/36

### Discussie

Alhoewel de *S. pullorum*-stam, die in deze proeven werd gebruikt, aanvankelijk een kuikensterfte van 83 % had veroorzaakt, was het maximale sterftepercentage na een éénmalige, doch ernstige perorale infectie ( $\pm 10^9$  kiemen), slechts 23 %. Deze perorale besmetting werd nochtans gevolgd van een kiemuitscheiding, die kon aangetoond worden door de sterfte en de isolatie van *S. pullorum* uit de controle groep B, die met de eerste groep gedurende 7 dagen samen waren gebleven. In deze groep bereikte het sterftecijfer eveneens 23 %, doch het ritme van de sterfte was vertraagd. Of deze gereduceerde sterftepercentages aan constitutiefactoren<sup>(6)</sup> of aan omgevingsomstandigheden<sup>(5,9)</sup> dienen te worden toegeschreven, werd hier niet uitgemaakt. Van Roekel et al<sup>(12)</sup> vermelden bovendien dat een perorale besmetting bij kuikens niet zo gemakkelijk aanslaat; andere onderzoekers verkregen 44 % besmetting en 3 % bij contact-infectie<sup>(7)</sup>.

Analoge proeven bij albino ratten met *S. pullorum*, *S. newington* en *S. enteritidis*<sup>(11)</sup> wijzen er op, dat het aanslaan van een perorale besmetting en de daaropvolgende ziekteverschijnselen en serologische reacties in nauw verband staan met het kiemaantal ( $10^8$  of  $10^9$ ) dat experimenteel werd toegediend.

De kiemuitscheiding in onze proeven was nochtans van korte duur, daar na de 18<sup>e</sup> dag geen pullorumkiemen meer in de uitwerpselen konden worden aangetoond. De isolatie van salmonellas was frequenter na een incubatie van 18 u. in selenietbouillon dan na 42 uren. Een duidelijke serologische reactie bleef uit tot na de 23<sup>e</sup> dag en was zeer ongelijkmatig verdeeld, zowel in de proefgroep A als in de controlegroep B.



Uit proef 2 komt duidelijk tot uiting, dat na een kortstondige kiemuitscheiding via de uitwerpselen bij het per os geïnfecteerde kuiken, de infectie volledig uitdoofde. Dit wordt bevestigd door de negatieve bacteriologische controles en agglutinatiereacties.

Proef 3 toont aan, dat er geen absolute correlatie bestaat tussen positieve agglutinatie-reactie en kiemisolatie. Het bacteriologisch onderzoek verliep evenzeer positief bij kuikens met een negatieve serologische test als met een positieve reactie. Dit kan in verband gebracht worden met de *S. pullorum*-uitscheiding via de eieren<sup>(13)</sup>. Van positief reagerende kippen zijn alleen 5 % tot 40 % van de eieren besmet, met 10-15 % als gemiddeld percentage<sup>(7)</sup>. Anderzijds kon *S. pullorum* nog uit kuikens worden geïsoleerd, die bij de mestcontrole negatief reageerden.

### Besluit

Bij *S. pullorum*-infecties kunnen besmetting, kiemuitscheiding en positieve serologische reactie zich vrijwel onafhankelijk van elkaar gedragen. Dit kwam eveneens tot uiting bij de onderzochte duiven, die met *S. typhimurium* besmet waren. De meeste *S. pullorum*-isolaties werden verkregen uitgaande van galblaas met gal, hart, pancreas, geslachtsorganen, milt en longen. Deze organen worden dan ook best bij het routine-onderzoek betrokken, wanneer bij kuikens een salmonella-infectie wordt vermoed. Bij duivensalmonellose dienen cultures aangelegd uit lever, milt en darmen.

### LITERATUUR

1. BARGER E., L. CARD, B. POMEROY : Diseases and parasites of poultry - 5th Ed. 1958, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 408.
2. BOTTS C., L. FERGUSON, J. BIRKELAND, A. WINTER : The influence of litter on the control of Salmonella infections in chicks. *Am. J. Vet. Res.*, 1952, 13, 562-565.
3. FADDOL G., G. FELLOWS : Clinical manifestations of paratyphoid infection in pigeons. *Avian diseases*, 1965, 9, 3, 377-381.
4. FREDRICKSON T., H. CHUTE, D. O'MEARA : A simple method for drawing blood from chickens. *J.A.V.M.A.*, 1958, 132, 390-391.
5. FRITZSCHE K., E. GERRIETS : Geflügelkrankheiten, 2. Aufl., 1962, Verl. Paul Parey, Berlin/Hamburg, pp. 445.
6. GERRIETS E., H. BROSELL : Therapieversuche an Küken bei experimenteller *S. pullorum* Infektion mit w'rkstoffhaltigen, höheren einheimischen Pflanzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 1957, 70, 152-154.
7. GRAUSGRUBER W., R. KISZLING : Der Einfluß von antibiotikahaltigem Futter auf die bakteriologische und serologische Pullorumdiagnose. *Wiener Tierärztl. Monatschr.*, 1964, 814-822.

8. HOEKSTRA J. : *Pluimveeziekten*. Uitg. Tjeenk Willink, Zwolle, 1961, pp. 181.
9. HUNGERFORD T. : *Diseases of Poultry*, 3th Ed., 1962, Angus and Robertson, Sidney, London, Melbourne, Wellington, pp. 395.
10. JACOBS R., M. FRAZIER, M. TOURTELOTTE : Hatchery spread of pullorum disease through debeaking. *Avian Diseases*, 1960, 4, 109-115.
11. SATO G. : Infection of *Salmonella pullorum*, *Salmonella newington* or *Salmonella enteritidis* in laboratory rats by oral inoculation. *Jap. Jnl. Vet. Res.*, 1965, 13, 19-32.
12. VAN ROEKEL H. : Pullorum disease in : *Diseases of Poultry*. Biesler H. & L. Devries, 1945, Iowa State College Press, 177-219.
13. VIAENE N., A. DEVOS, M. STAELENS : Onderzoek naar het mechanisme van de overdraging bij bacteriële infecties. 1. Dooienting met *Pseudomonas fluorescens* en *S. pullorum*. *Vl. Diergen. Tijdschr.*, 1965, 34, 385-391.

**Infections expérimentales avec *S. pullorum* et *S. typhimurium*. Expériences sur l'infection de contact, l'excrétion de germes, les réactions sérologiques et les localisations des salmonelles chez des poussins et des pigeons**

L'infection orale de 30 poussins d'un jour (groupe A) avec  $10^9$  germes de *S. pullorum* a provoqué une mortalité de 23 %. Cette infection a été suivie d'une excrétion de germes, puisque les 30 poussins (groupe B) tenus en contact avec le premier groupe pendant 1 semaine ont également subi des pertes de 23 %, mais avec une évolution plus lente. Cette excrétion a été de courte durée, puisque les examens bactériologiques des excréments sont restés négatifs, aussi bien dans le groupe A que dans le groupe B, à partir du 18<sup>e</sup> jour après l'infection. Une réaction sérologique positive n'est apparue qu'à partir du 23<sup>e</sup> jour après l'infection, elle n'a pu être démontrée chez tous les animaux puisque au 41<sup>e</sup> jour après l'infection seulement 13/23 (groupe A) et 8/23 (groupe B) réagissaient positivement.

Dans une seconde épreuve 1 poussin d'un jour, infecté expérimentalement par os avec  $10^9$  germes de *S. pullorum*, fut placé dans un groupe de contrôle de 30 poussins. Seul le poussin infecté expérimentalement a excrété des salmonelles et ce à partir du 6<sup>e</sup> jour après l'infection orale jusqu'au 14<sup>e</sup> jour. Chez les poussins du groupe de contact des salmonelles n'ont pu être mises en évidence dans les excréments. Il ne s'est produit aucune mortalité. L'examen sérologique est resté négatif. Il semble donc que l'infection s'est éteinte spontanément.

Dans une troisième épreuve les localisations des salmonelles ont été examinées bactériologiquement. Il est apparu que l'isolement de *S. pullorum* se faisait avec une fréquence décroissante à partir de la bile et la vésicule biliaire, cœur, pancréas, organes sexuels, rate, poumons, glandes lymphatiques des caeca, reins et bursa fabricii. Les isolements positifs provenaient aussi bien de poussins à réaction sérologique positive que négative.

Des examens analogues ont été effectués chez des pigeons (36), où l'infection à *S. typhimurium* existait depuis plus d'un an. Les réactions sérologiques positives ne correspondaient pas avec les résultats de l'examen bactériologique. Les isolements les plus fréquents provenaient de la rate, du foie et de l'intestin.

En conclusion, il ne semble exister aucune corrélation ferme entre l'infection à *S. pullorum*, l'excrétion de germes et les réactions sérologiques. Une situation analogue existe chez les pigeons infectés par *S. typhimurium*.



**Experimental infections with *S. pullorum* and *S. typhimurium*. Experiments on contact infection, excretion of bacteria, serological reaction and localisation of salmonellae in chicks and pigeons**

Oral infection of 30 day-old chicks (group A) with  $10^9$  germs of *S. pullorum* caused a 23 % mortality. The infection was followed by an excretion of germs, proved by a loss of 23 % in the 30 chicks of group B, which were in contact with the experimentally infected group A, during one week. The excretion was of short duration. Bacteriological examination of the droppings on the 18th day after infection and later, remained negative both in group A and group B. Positive serological reactions appeared only from the 23th day after infection but not in all chicks, as, on the 41th day after infection, only 13/23 (group A) and 8/23 (group B) showed a positive serological reaction.

In a second experiment a day-old chick experimentally infected by the oral way with  $10^9$  germs of *S. pullorum* was placed in a control group of 30 chicks. Only in the experimentally infected chick, an excretion occurred from the 6th day until the 14th day after infection. In the chicks of the contact group the presence of salmonellae in the droppings could not be demonstrated, no mortality was recorded. The infection seems to have faded away spontaneously.

In a third experiment the localisations of the salmonellae were investigated according to bacteriological methods. The frequency of isolation of *S. pullorum* out of organs was decreasing in the following order: bile and gall-bladder, heart, pancreas, gonads, spleen, lungs, caecal tonsils, kidneys and bursa fabricii. The positive isolations occurred as well in chicks with positive as with negative serological reaction.

Analogous examinations were carried out in pigeons (36) in which for more than one year a *S. typhimurium* infection was established. The positive serological reactions did not correspond with the results of the bacteriological examination. The most frequent isolations were performed from the spleen, the liver and the intestine.

In conclusion, no close correlation seems to exist between infection with *S. pullorum*, excretion of germs and serological reactions. An analogous situation exists in pigeons infected with *S. typhimurium*.