

131  
2er



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TINCION DE ROJO CONGO COMO PRUEBA DE DETECCION DE COLONIAS SEPTICEMICAS DE E. coli AISLADAS DE POLLO DE ENGORDA Y SU CORRELACION CON PRUEBAS DE COLICINOGENIA Y MORTALIDAD



## T E S I S

Que para obtener el título de:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

**José Antonio Marín Heredia**

Asesores: M.V.Z. Ma. Trinidad Perusquía Jasso  
M.V.Z. Raúl Vázquez Martínez





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
MATERIAL Y METODOS .....	17
RESULTADOS .....	19
DISCUSION .....	20
LITERATURA CITADA .....	21
FIGURAS .....	27
CUADRO 1 .....	31

## RESUMEN

MARIN HEREDIA, JOSE ANTONIO. Tinción de rojo congo como prueba de detección de colonias septicémicas de E. coli aisladas de pollo de engorda y su correlación con pruebas de colicinogenia y mortalidad (bajo la dirección de Ma. Trinidad Perusquía Jasso y Raúl Vázquez Martínez).

Debido a que la colisepticemia aviar ha cobrado gran importancia en México y a que existe una gran variedad de serotipos de E. coli se han desarrollado diferentes técnicas para diferenciar cepas septicémicas de E. coli de cepas que se consideran flora normal. Sin embargo hasta la fecha no se tienen resultados concluyentes al respecto, por lo que el objetivo del presente trabajo fué comparar 3 diferentes técnicas utilizadas para la identificación de cepas septicémicas: prueba de rojo congo, de colicinogenia e inoculación en aves susceptibles, estas dos últimas realizadas previamente en otro trabajo. Se analizaron 82 aislamientos de E. coli realizados a partir de aves sospechosas de colisepticemia. Las cepas fueron sometidas a la prueba de rojo congo y los resultados se compararon con los obtenidos previamente para las pruebas de colicinogenia y mortalidad, resultando 62.19% de cepas colicino positivas, 4.87% positivas a rojo congo y 48.78% de cepas que produjeron la muerte en las aves inoculadas. Se concluye que la prueba de rojo congo comparada con las otras dos mostró una menor sensibilidad y especificidad en la detección de cepas septicémicas.

## INTRODUCCION

La colibacilosis en aves se reconoce por primera vez en 1894 (47). Kauffman en 1943 publica el esquema antigénico de E. coli (12). En México, en el periodo comprendido entre 1968 y 1971 el término colibacilosis aviar empieza a cobrar gran importancia (5).

La colibacilosis aviar es una de las infecciones de mayor impacto económico en México debido a las pérdidas que ocasiona al afectar las diferentes etapas de vida y producción de las aves domésticas, se manifiesta principalmente como infección del saco vitelino, aerosaculitis, colisepticemia, salpingitis, artritis, panoftalmitis y coligranuloma o enfermedad de Hjärre, o bien como factor de asociación en la enfermedad respiratoria crónica complicada. Todas estas formas de presentación causan altas mortalidades, reducción en ganancias de peso o bien baja calidad de la canal y decomiso en el rastro (16,17,27,33,38,39,40,41,47).

Se define como colibacilosis aviar a la enfermedad infecciosa de las aves en la que Escherichia coli actúa como patógeno primario o asociado a otras condiciones, afectando con mayor frecuencia a las aves jóvenes que a las adultas (16,27,39,47).

El agente etiológico, Escherichia coli, es una bacteria gram negativa en forma de bastón que mide 2 a 3 micras de largo por 0.6 micras de ancho, no forma esporas, algunos serotipos con cápsula y/o flagelos, y es anaerobia facultativa. Presenta las siguientes reacciones bioquímicas en su diferenciación con otras enterobacterias: positiva a indol, no produce ureasa ni ácido sulfhídrico, no crece en citrato de Simmons,

no licúa la gelatina, positiva al rojo de metilo y negativa a Voges-Proskauer y da reacción ácida y con gas en el medio triple azúcar hierro (TSI) (12,16,18).

Las diferentes cepas septicémicas de E. coli se clasifican de acuerdo con su estructura antigénica, la cual está dada por los antígenos O (somático), K (capsular) y H (flagelar), además de contar con pili o fimbria que es otra estructura antigénica asociada a patogenicidad y virulencia (16,17,33,49).

El antígeno O (somático) es el antígeno principal de superficie que corresponde a la fracción polisacárida del complejo denominado lipopolisacárido (LPS) o endotoxina, el cual consta además del lípido A al que se le atribuye toda la toxicidad. El lipopolisacárido está firmemente unido a la superficie celular y es liberado por lisis de la bacteria (18,19).

El antígeno K (capsular) está formado por un ácido poli-mérico y azúcares reductivos (18). Las células encapsuladas forman colonias lisas o mucoides. Esta estructura está relacionada con la virulencia de la bacteria al protegerla de la fagocitosis e impedir que ciertos virus se fijen a la pared celular (19).

El antígeno H (flagelar) está compuesto totalmente por una proteína denominada flagelina y se fija a la bacteria a base de una serie de anillos unidos a la membrana y pared celular (19).

Los pili, fimbria o fimbriillas son pequeñísimas estructuras proteínicas que favorecen la adherencia y persistencia de la bacteria en las células epiteliales del huésped. Se han encontrado en cepas patógenas de E. coli aisladas de aves con

colisepticemia, pero no se conoce cuantos tipos de fimbrias existen en estas cepas (39) aunque estudios recientes indican que aún tratandose de un mismo serotipo, como el 078, pueden variar los tipos de fimbrias que con él se asocian, según describen Naveh y Ron (30). Si se llegara a encontrar que las cepas patógenas de E. coli tienen algún tipo de fimbria común para ellas, podría tenerse la esperanza de desarrollar vacunas que impidan la colonización en pollos, como las que ya existen y se aplican con éxito en bovinos y cerdos (29,39).

Es conocida la gran variedad que existe de cada uno de estos antígenos, por lo que la tipificación de la bacteria es difícil. Hay cientos de combinaciones de antígenos en las cepas de E. coli y por lo menos 20 de ellas se asocian a la enfermedad septicémica en las aves (39,40).

Los antígenos O son los que varían más, pero a la vez son los más fáciles de clasificar, resultando los serotipos O1, O2 y O78 los más frecuentes en aves y son responsables de por lo menos el 50% de los casos de colisepticemia (16,17,33, 39,40,49).

Algunos serotipos prevalecen en ciertas áreas, por ejemplo, el O35 es el más abundante en Delaware, E.U., mientras que el O111 lo es en Sudáfrica (39). El serotipo O2:K1:H5 tiene una marcada tendencia para invadir tejidos de las aves (21).

La colibacilosis aviar se ha descrito en todo el mundo y afecta a todo tipo de aves domésticas, aunque la mayoría de los brotes se registran en pollos, pavos y patos (16,47).

Entre los agentes bacterianos, E. coli es de los microorganismos más frecuentemente aislados de aves psitacinas con enfermedad respiratoria (25).

E. coli es un habitante normal del intestino de las aves y mamíferos y entre la flora normal también pueden encontrarse de un 10 a 15% de cepas patógenas en aves domésticas y por tanto las aves están continuamente expuestas a través de las heces las cuales contaminan la cama y el medio ambiente; así, cuando disminuye la resistencia del animal estas cepas facultativas pueden causar problemas clínicos (16,47).

Bajo malas condiciones de manejo, camas polvosas, mala ventilación, sobrepoblación, estados de tensión como reacciones postvacunales, infecciones por micoplasmas, virus respiratorios de campo o bien agentes causales de inmunodepresión (infección temprana con virus de Gumboro o micotoxicosis) el crecimiento de la bacteria es rápido y puede resultar en un brote de colisepticemia con el consiguiente aumento en la mortalidad (9,16,21,35,43).

El hecho de que la bacteria sea eliminada por las heces le coloca la etiqueta de "cosmopolita" y por lo tanto las vías de transmisión son múltiples en parvadas comerciales, siendo las más importantes:

- Transmisión a través del huevo:

Se atribuye principalmente a la contaminación del cascarón con heces poco después o al momento de la ovoposición o bien por infección ovárica o del oviducto. Este fenómeno se ve favorecido por una mala higiene en la granja de reproductoras, por un mal sistema de recolección, selección y fumigación de los huevos así como por bajos estándares de higiene en la planta incubadora. Y en apoyo a esto se ha visto que E. coli es de las bacterias que con mayor frecuencia se encuentran en huevos incubados y es un agente importante que cau-

sa mortalidad embrionaria entre los 12 y 21 días de incubación (16,27,31,32,37,47).

- Transmisión aérea:

Cuando existen camas con humedad baja, la bacteria puede sobrevivir por periodos prolongados y encontrarse en proporción de  $10^5$  -  $10^6$  microorganismos por gramo, la acción del viento contamina fácilmente el aire dentro de la caseta y favorece la penetración de bacterias a las vías respiratorias donde los microorganismos podrán ocasionar problemas si las condiciones son favorables (16,18,27,31,35).

- Transmisión a través del alimento y agua de bebida:

Ocurre cuando el agua de bebida y el alimento se encuentran contaminados con materia fecal, pero esta vía es de menor importancia (27,31).

- Transmisión a través de portadores, vectores y vehículos:

Los portadores sanos, convalecientes o enfermos pueden contribuir a la multiplicación de la bacteria en la caseta, lo que resultaría peligroso si se tratara de cepas resistentes a antibióticos. Las ratas, perros, aves silvestres, moscas y otros insectos también contribuyen a la diseminación de E. coli (27).

La coliseritocemia se presenta en pollos de engorda especialmente entre la 4a. y 5a. semanas de vida aunque no es raro ver brotes en aves aún más jóvenes (16).

Gran parte del problema económico radica además de la mortalidad en la morbilidad, ya que las aves que presentan lesiones serán confiscadas en la planta procesadora por no ser

aptas para el consumo humano (31).

Debido a que E. coli es un habitante normal del intestino de las aves y a la gran variedad de serotipos existentes, pueden encontrarse varios serotipos en un mismo individuo, la mayor dificultad ha sido la identificación de la cepa virulenta involucrada en el proceso de enfermedad (7,27).

Antes de mencionar la importancia que tiene la detección de cepas septicémicas de E. coli es necesario hacer énfasis en el papel que éstas juegan en la patogenia de la enfermedad.

Para que las bacterias puedan causar daño al ave deben existir dos factores que están estrechamente relacionados: las propiedades de los microorganismos que los capacitan para producir enfermedad y la forma en que el huésped infectado responde a la invasión microbiana, todo esto rodeado de ciertas condiciones medio ambientales y/o factores predisponentes (9,21,35).

De todas las formas de presentación, la colibacilosis septicémica es la más común en aves domésticas (21).

Mucho se ha hablado de la patogenia de la colibacilosis aviar debido a los diversos cuadros que ésta puede presentar pero lo cierto es que los mecanismos patogénicos aún no quedan bien establecidos y difieren radicalmente de los observados en humanos, cerdos y bovinos (3,21).

La diferencia estriba fundamentalmente en lo siguiente:

- Las aves (pollos y guajolotes) son más resistentes a la endotoxina de E. coli ya que se ha visto que dosis de 1 mg/kg en pollos de cinco semanas de edad sólo produce fiebre ligera, en cambio dosis de 0.01 mg/kg en

becerros de la misma edad produce la muerte (3,21). Pero no se descarta que esta endotoxina juegue algún papel en la patogenia de la enfermedad porque produce lesiones necróticas en hígado al ser inoculada en pollos (21).

- Existe un menor número de cepas de E. coli aviarias productoras de enterotoxina y por lo tanto el cuadro diarreico común para mamíferos es muy raro en las aves (3).
- La enteritis con diarrea es una manifestación rara en aves pero que puede llegar a presentarse (16,47) y es probable que en este caso el mecanismo patogénico sea similar al de la colibacilosis entérica que se observa en lechones principalmente, donde se requiere que cepas de E. coli enteropatógenas colonicen el intestino y produzcan su enterotoxina, la cual ejerce su acción estimulando a la enzima adenil-ciclase que a su vez provoca un incremento en el adenosin monofosfato cíclico (AMP cíclico) de la célula intestinal estimulándose así la salida de agua, cloruros y potasio e inhibiéndose la entrada de sodio, lo que resulta en aumento de líquido en el lumen intestinal y diarrea profusa (19,21).
- Las hemolisinas de E. coli tampoco se asocian con su capacidad para producir enfermedad (21).
- Truscott y López Alvarez (21) estudiaron una toxina que es letal para pollos de 2 semanas de edad, obtenida a partir de E. coli 078:K80 de origen aviar y bovino, termolábil y de naturaleza proteínica, a la que denominaron toxina letal de los pollos (CLT) y

que parece ser la responsable de los principales cambios patológicos producidos durante la toxemia (21).

En invasiones sistémicas por E. coli la relación huésped-parásito adquiere una mayor complejidad debido a los diferentes tipos celulares involucrados y a los variables nichos bioquímicos en los cuales dicha relación se lleva a cabo (21).

En las aves la infección respiratoria (inhalación) puede considerarse como la principal vía de entrada. Una vez que la bacteria se ha establecido en el aparato respiratorio puede producir diferentes grados de afección que dependen de ciertas condiciones inherentes a las aves y su medio ambiente (16, 21).

Al iniciar la enfermedad, la infección involucra la porción superior del aparato respiratorio produciéndose traqueítis y aerosaculitis, siendo los signos más prominentes el estornudo, estertor traqueobronquial y disnea (16,27,36).

Entre los factores predisponentes que pueden favorecer este establecimiento inicial en el aparato respiratorio se cuentan ciertos virus de campo o vacunales como el de la bronquitis infecciosa, enfermedad de Newcastle y laringotraqueítis infecciosa que destruyen los cilios traqueales (9,16,47).

La integridad del epitelio traqueal es esencial como mecanismo de defensa del animal para evitar el establecimiento de agentes nocivos y su migración a partes bajas del aparato respiratorio. Así pues, causas que alteren esa integridad como la hipovitaminosis A o concentraciones excesivas de amoníaco en las casetas pueden influir notoriamente en el establecimiento de la infección por E. coli (4,18,48). Si se su-

man los factores ya mencionados a cualquier condición que disminuya las defensas del animal, E. coli podrá pasar a la circulación sanguínea produciendo septicemia aguda y muerte repentina o bien lesiones crónicas fibrinopurulentas en pericardio, hígado, peritoneo y sacos aéreos (16,27,47).

También es necesario mencionar que en el establecimiento de la infección se requiere un gran número de bacterias para producir enfermedad si se compara por ejemplo con Pasteurella multocida de la que solamente son necesarios unos cuantos microorganismos para causar enfermedad (21).

La elevada frecuencia del plásmido Col V en aislamientos de E. coli septicémica se ha relacionado con la patogenicidad de la misma en la colisepticemia aviar. Almanza y colaboradores (1) demostraron lo anterior al confirmar que las cepas portadoras del plásmido Col V producían porcentajes de mortalidad bastante mayores que las cepas no portadoras de dicho plásmido.

Hoy en día los datos más convincentes en cuanto a patogenicidad de las cepas provienen de pruebas de mortalidad mediante la inoculación de cepas sospechosas en aves de 3 semanas de edad y de pruebas de colicinogenia en las que indirectamente se detecta la presencia del plásmido Col V el cual codifica para la síntesis de una bacteriocina (colicina), que es una sustancia bactericida de tipo antibiótico, y de un sideróforo, compuesto quelante que le proporciona hierro a la bacteria, indispensable para su desarrollo, y que interfiere con la fagocitosis de la misma in vivo (1,19,21,44). La virulencia asociada al hierro se demostró en pavos infectados en los que aumentó la severidad de la enfermedad al aplicarles hierro (8).

Se ha demostrado que las cepas portadoras del plásmido Col V son fagocitadas con menor eficiencia que las cepas no portadoras, pero a la vez no mostraron mayor resistencia intracelular a la fagocitosis lo que sugiere que además del plásmido Col V son necesarios otros factores para interferir con el proceso de fagocitosis (2).

Se sabe que existen mutantes avirulentas que pueden incrementar su virulencia si se suplementan de hierro en agar de rojo congo, que ya ha sido usado por Surgalla y Beesley (34,42) para diferenciar colonias virulentas y avirulentas de Yersinia pestis.

Los mecanismos de fagocitosis pueden jugar un papel muy importante en la patogénesis de la infección septicémica por E. coli, ayudados por respuestas inmunes específicas a cargo de anticuerpos y complemento (21,44). Se sabe que los antígenos K son estructuras importantes que confieren resistencia a la fagocitosis y el complemento, pero los anticuerpos en contra de estos antígenos pueden neutralizar las propiedades antifagocitarias de la cápsula sensibilizando así a la bacteria para la fagocitosis (19,21,44).

La patogenicidad y virulencia de E. coli también se ve favorecida por el uso indiscriminado de antibióticos que repercute en la selección de cepas patógenas multiresistentes que resultan difíciles de erradicar (15,46).

Los síndromes en los que E. coli se ve comunmente involucrada incluyen:

#### Mortalidad embrionaria

La contaminación fecal del huevo fértil provoca penetración de la bacteria a través del cascarón, siendo ésta una de

Las causas importantes de mortalidad embrionaria (28,37).

#### Infección del saco vitelino y onfalitis

Estos padecimientos ocurren por contaminación del huevo, de las incubadoras y de las nacedoras y provocan mortalidad durante las dos primeras semanas de vida (16,27,47). Es recomendable el monitoreo bacteriológico de pollitos de un día de edad para saber el papel que E. coli juega en estas entidades y sus posibles repercusiones en la parvada (23).

#### Enfermedad respiratoria crónica complicada

Se presentan signos respiratorios de severidad variable y lesiones fibrinopurulentas en sacos aéreos, superficie hepática, pericardio y peritoneo (16,27,36,41,47). La pericarditis fibrinosa y perihepatitis no son hallazgos comunes a la necropsia en pavos (21). En este padecimiento en el que E. coli es el factor complicante, se considera a los micoplasmas como factores determinantes y entre ellos, el Mycoplasma gallisepticum es el de mayor importancia, pero también Mycoplasma synoviae bajo ciertas condiciones puede causar lesiones en sacos aéreos (14,26,27,45).

#### Septicemia aguda

Se caracteriza por muerte repentina de aves jóvenes o adultas en buen estado nutricional que presentan lesiones como pericarditis, peritonitis y focos necróticos en hígado, además de hemorragias y congestión en órganos parenquimatosos (18,47).

#### Salpingitis

La inflamación del oviducto puede ocurrir como una extensión de la infección del saco aéreo abdominal o bien por

migración ascendente de bacterias a partir de la cloaca. El padecimiento se caracteriza por acumulación de exudado fibrinoso purulento o caseoso en el oviducto. El desarrollo de E. coli en el aparato reproductor se asocia a la elevada actividad estrogénica que presentan las gallinas en producción (18,27).

#### Sinovitis y artritis

Se presenta como secuela del proceso septicémico. Las aves afectadas se encuentran postradas o con cojera (18,47).

#### Panofthalmitis

También es consecuencia de la colisepticemia y se observa hipopión generalmente unilateral (18,47).

#### Enteritis

Puede ocurrir este proceso acompañado de diarrea, pero es poco frecuente en pollos, sin embargo en pavos E. coli complica la enteritis hemorrágica de origen viral (3,18,20).

#### Nuevo síndrome del pato

Se presentan signos respiratorios y hay aerosaculitis, pericarditis, perihepatitis y peritonitis. De algunos brotes se ha aislado E. coli y de otros Pasteurella anatispestifer (47).

#### Coli granuloma o enfermedad de Hjärre

Es una condición patológica que se ha observado en gallinas y pavos y se caracteriza por la presencia de granulomas en intestino, mesenterio e hígado. Se ha demostrado la participación de cepas mucoides de E. coli porque reproducen las lesiones al inocularse intravenosa o intramuscularmente en aves y conejos (27). También se presenta en aves de compañía

maduras y se asocia a cepas mucoides de E. coli pertenecientes a los serogrupos O8, O9 y O16 (13).

La importancia de la detección de cepas septicémicas radica en que identificando con un método rápido y eficaz las cepas septicémicas de E. coli y conociendo su papel en la patogenicidad de la enfermedad (factores de virulencia, invasividad, colonización y producción de toxinas) será mucho más fácil desarrollar métodos de inmunización eficientes que ayuden a prevenir o atenuar la enfermedad (29,39,40,43).

Se han sugerido algunas pruebas tentativamente para determinar la patogenicidad de cepas de E. coli, como son la producción de hemólisis en medios de cultivo que contienen sangre, o bien la hemoaglutinación de eritrocitos de aves o cobayos relacionada con la presencia de pili o fimbria. En el primer caso se han descubierto cepas patógenas hemolíticas y no hemolíticas y en el último no se tiene experiencia en México hasta la fecha (49).

Recientemente algunos trabajos sugieren la posibilidad de identificar cepas septicémicas aviarias de E. coli mediante la tinción de rojo congo, resultando positivas a dicha tinción las cepas virulentas que adquieren una coloración roja (rojo congo positivas) y negativas las cepas avirulentas, las cuales son blancas en este medio (rojo congo negativas) (6,7).

Berkhoff y Vinal (6,7) encontraron una correlación directa entre cepas patógenas de E. coli y su capacidad para unirse al rojo congo. Demostraron que las cepas de E. coli rojo congo positivas reproducen el cuadro de colisemicemia y que las cepas de E. coli rojo congo negativas son avirulentas. Sus hallazgos se basaron en estudios bacteriológicos en 30

parvadas de pollos de engorda, 26 de las cuales presentaban la enfermedad y 4 parvadas sanas. De 144 aislamientos de E. coli obtenidos de tejidos internos de aves enfermas se encontró que todos fueron positivos al rojo congo y de 170 aislamientos de E. coli obtenidos del medio ambiente en casetas de aves y de la tráquea y cloaca de aves sanas, más del 50% resultaron negativos al rojo congo (6).

También estudiaron 20 cepas de E. coli con las que relacionaron la tinción de rojo congo y la presencia del plásmido Col V. De 15 cepas portadoras del plásmido, 10 de ellas resultaron positivas al rojo congo y de 5 cepas no portadoras del plásmido 3 de ellas fueron positivas al rojo congo. Ellos sugieren que la presencia del plásmido Col V y la afinidad por el colorante rojo congo son factores de virulencia independientes, como también lo son la capacidad de captar hierro por la bacteria y su afinidad por el colorante (6).

Las bases moleculares de la interacción entre este colorante y los componentes bacterianos son poco comprendidas. Aunque la capacidad de otras bacterias patógenas de unirse al rojo congo parece estar relacionada a la pared celular o proteínas externas de la membrana, esto no se ha demostrado (7).

Se sabe que la unión de E. coli al rojo congo es un fenómeno inestable ya que pueden ocurrir conversiones espontáneas de cepas rojo congo positivas a negativas y viceversa, aunque esto último con menor frecuencia (7). En el caso de otras bacterias Gram negativas esta transición se asocia a la pérdida de un plásmido, como es el caso de Shigella flexneri, que también pierde su virulencia al perder su afinidad al colorante (7,11,24).

La estabilidad del fenotipo rojo congo depende de las condiciones de desarrollo, el tipo de medio de cultivo utilizado y de la diferencia entre cepas (7).

Se menciona también que la forma septicémica de E. coli necesita otros factores genéticos en adición al fenotipo rojo congo positivo para ser virulenta, ya que al retirar el plásmido Col V en una cepa que conservaba su capacidad de unión al rojo congo, ésta resultó ser avirulenta y cepas que contienen el plásmido Col V pero que no se unen al rojo congo igualmente son avirulentas (7). Por otro lado se menciona que si bien la pigmentación es usualmente asociada con virulencia, determinantes genéticos no relacionados a virulencia pueden afectar también la capacidad de las células de unirse al rojo congo (24).

El objetivo de este trabajo fue determinar la validez de la tinción de rojo congo en la identificación de cepas septicémicas aviarias de E. coli relacionándola con resultados obtenidos previamente con pruebas de mortalidad y colicinogenia (22).

**MATERIAL Y METODOS**

**SITIO:** El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Diagnósticos Clínicos Veterinarios, S.A. de C.V., propiedad del Grupo Industrial Pecuario, S.A. de C.V.

**CEPAS:** Se analizaron un total de 82 cepas a las que previamente se habían realizado pruebas de colicinogenia según la técnica descrita por Almanza, López y Pérez (1,2) e inoculación en aves susceptibles, de éstas resultaron 32 cepas colicino positivas que produjeron mortalidad en pollos, 19 cepas colicino positivas que no produjeron mortalidad, 8 cepas colicino negativas que produjeron mortalidad y 23 cepas colicino negativas que no produjeron mortalidad (22).

**MEDIO:** Todas las cepas fueron sembradas en el medio de rojo congo que consiste en agar de tripticasa soya adicionado de 0.03% de colorante rojo congo y 0.15% de sales biliares de acuerdo a lo descrito por Berkhoff y Vinal (6).

Las 82 cepas se sembraron por estría en 14 cajas de petri (6 cepas por caja) conteniendo el agar rojo congo y se incubaron por 24 horas a 37 C en condiciones de aerobiosis. Todas las siembras se efectuaron por triplicado.

Se consideraron como positivas aquellas colonias que adquirieron un color rojo intenso y fueron negativas las colonias con una tonalidad menor, naranja pálido.

## ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron sometidos a la prueba de  $\chi^2$  (ji cuadrada) con el fin de determinar el grado de relación entre las pruebas de colicinogenia y mortalidad en pollos con la prueba de rojo congo, utilizando para ello la siguiente fórmula (10):

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

$\chi^2$  = ji cuadrada

$\sum$  = sumatoria

O = datos observados

E = datos esperados

**RESULTADOS**

De los 32 aislamientos analizados que fueron positivos a colicina y mortalidad, 2 de ellos (6.25%) resultaron positivos a la tinción de rojo congo y 28 fueron negativos (87.5%); 2 cepas se consideraron sospechosas (Figura 1).

De 19 cepas colicino positivas que no produjeron mortalidad 1 fue positiva al rojo congo (5.26%) y 17 resultaron negativas (89.47%); 1 cepa se tomó como sospechosa (Figura 2).

De 8 aislamientos colicina negativos que produjeron mortalidad ninguno de ellos resultó positivo al rojo congo, con 7 cepas negativas (87.5%) y una sospechosa (Figura 3).

De 23 cepas negativas a colicina y mortalidad 1 fue positiva a rojo congo (4.34%) y 19 resultaron negativas a esta tinción (82.60%); 3 cepas fueron consideradas sospechosas (Figura 4).

Del total de 82 aislamientos 4 resultaron positivos a rojo congo (4.87%), 71 fueron negativos (86.58%) y 7 se tomaron como sospechosos (8.53%) (Cuadro 1).

Con base en el análisis estadístico se obtuvo un valor para  $\chi^2$  de 1.70, siendo el valor de  $\chi^2$  tabulada 12.59, por lo que se demuestra que no existe relación alguna entre las pruebas de colicinogenia y mortalidad con la tinción de rojo congo.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos difieren con lo descrito por Berkhoff y Vinal (6,7) quienes describen a la prueba de rojo congo como altamente sensible en la detección de cepas septicémicas de E. coli, pues en este trabajo no se encontró relación estadística entre la tinción de rojo congo y pruebas de colicinogenia y mortalidad para detectar cepas septicémicas de E. coli.

Por lo anterior se concluye que las pruebas de colicinogenia y mortalidad resultaron ser importantes auxiliares en la identificación de cepas virulentas de E. coli, lo que coincide con lo descrito por otros autores (1).

## LITERATURA CITADA

- 1.- Almanza, M.Y., López, A.J. y Pérez, M.J.A.: Papel del plásmido Col-V en la patogenicidad de la colisepticemia aviar: I. Estudios in vivo. Proc. Memorias reunión de investigación pecuaria en México. México, D.F.,: 244 (1986).
- 2.- Almanza, M.Y., López, A.J. y Pérez, M.J.A.: Papel del plásmido Col-V en la patogenicidad de la colisepticemia aviar: II. Participación del plásmido Col-V en la interacción de E. coli con macrófagos peritoneales de pollo. Proc. Memorias reunión de investigación pecuaria en México. México, D.F.,: 245 (1986).
- 3.- Anónimo: Patogénesis de la colibacilosis. Avances en Med. Vet. II (3): 88-94 (1987).
- 4.- Antillón, R.A. y López, C.C.: Enfermedades nutricionales de las aves. 1a. ed. Ed. FMVZ, SUA, UNAM, México, 1987.
- 5.- Antillón, R.A.: Panorama de las enfermedades respiratorias en México. Memorias de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas sobre enfermedades respiratorias de las aves, México, D.F.: 45-49 (1987).
- 6.- Berkhoff, H.A. and Vinal, A.C.: Congo red medium to distinguish between invasive and non invasive Escherichia coli pathogenic for poultry. Avian Dis., 30 (1): 117-121 (1985).
- 7.- Berkhoff, H.A. and Vinal, A.C.: Differentiation of virulent and avirulent avian Escherichia coli using congo red binding. Proc. of the 36th. Western Poultry Disease Conference. Davis, California.: 42-45 (1987).
- 8.- Bolin, C.A.: Effects of exogenous iron on Escherichia coli

- li septicaemia of turkeys. Amer. J. Vet. Res., 47 (8): 1813- 1816 (1986).
- 9.- Campbell, R.S.F.: The pathogenesis and pathology of avian respiratory infections. Veterinary Bulletin, 56 (7): 521-543 (1986).
  - 10.- Daniel, W.W.: Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. la. ed. Ed. Limusa, México, D.F., 1977.
  - 11.- Daskaleros, P.A. and Payne, Sh. M.: Cloning the gene for congo red binding in Shigella flexneri. Infection and Immunity, 48 (1): 165-168 (1985).
  - 12.- Frappé, M.R.C.: Manual de infectología veterinaria. Ed. Méndez Oteo, México, D.F., 1981.
  - 13.- Gerlach, H.: Bacterial diseases, Clinical Avian Medicine and Surgery. Edited by: Harrison, G.J. and Harrison, L.R., 434-453, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
  - 14.- Glisson, J.: Vacunación contra Mycoplasma gallisepticum: Efecto en la transmisión a través del huevo. Avicultura profesional, 2 (4): 153-154 (1985).
  - 15.- Gómez, S.J.J.: Manual de terapéutica antimicrobiana aviar, Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
  - 16.- Gordon, R.F. y Jordan, F.T.W.: Enfermedades de las aves. 2a. ed. Ed. El Manual Moderno, México, D.F., 1985.
  - 17.- Gross, W.B. and Domermuth, C.H.: Colibacillosis, Isolation and identification of avian pathogens. Edited by: Hitchner, Domermuth, Purchase and Williams, 9-10, Ameri-

- can Association of Avian Pathologists, Texas, 1980.
- 18.- Gross, W.B.: Colibacillosis, Diseases of poultry. Edited by: Hofstad, M.S., 321-330, Iowa State University, Ames, Iowa, 1978.
  - 19.- Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A.: Manual de microbiología médica. 8a. ed. Ed. El Manual Moderno, México, D.F., 1979.
  - 20.- Larsen, C.T., Domermuth, C.H., Sponenberg, D.P. and Gross, W.B.: Colibacillosis of turkeys exacerbated by hemorrhagic enteritis virus. Laboratory studies. Avian Dis., 29 (3): 729-732 (1985).
  - 21.- López, A.J.: Escherichia coli: Mecanismos de patogenicidad, Ciencia Veterinaria. Editado por: Moreno, Ch.R. Vol. 1, 1-39, UNAM, FMVZ, México, D.F., 1976.
  - 22.- López, M.G.: Frecuencia de cepas septicémicas de E. coli en pollos de engorda, Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1987.
  - 23.- Madrigal, S.V.: Monitoreo en parvadas. La historia clínica. Memorias de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas sobre sistemas de producción de huevo, Cd. Obregón, Sonora, : 36-40 (1986).
  - 24.- Maurelli, A.T., Blackmon, B. and Curtis, R.: Loss of pigmentation in Shigella flexneri 2a. is correlated with loss of virulence and virulence-associated plasmid. Infection and Immunity, 43 (1): 397-401 (1984).
  - 25.- Mc Donald, S.E.: Enfermedad respiratoria en las aves psittacinas, Terapéutica Veterinaria. Editado por Kirk, R.W.

- Vol. 2, 696-703, C.E.C.S.A., México, D.F., 1984.
- 26.- Mc Owan, K.J., Randal, C.J., Jones, H.G.R. and Brand, T.F.: Association of Mycoplasma synoviae with respiratory disease of broilers. Avian Pathology, 112: 479-480 (1982).
- 27.- Mosqueda, T.A. y Lucio, M.B.: Enfermedades comunes de las aves domésticas. 1a. ed. Ed. FMVZ, SUA, UNAM, México, 1985.
- 28.- Mosqueda, T.A.: Transmisión de enfermedades de las reproductoras a su descendencia. Memorias de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas sobre manejo de reproductoras, Guadalajara, Jal.: 124-133 (1985).
- 29.- Naveh, M.W., Zussman, T. and Ron, Z.E.: Adherence pili from avian strains of Escherichia coli and their possible use in protective vaccination. Memorias de la 33th. Western Poultry Disease Conference. Davis, California.: 16 (1984).
- 30.- Naveh, M.W. y Ron, Z.E.: Un nuevo tipo de pili de adherencia en cepas de E. coli avícolas. Memorias de la XI convención anual de Especialistas en Ciencias Avícolas y Proc. of the 35th. Western Poultry Disease Conference, Puerto Vallarta, Jal.: 127-128 (1986).
- 31.- North, M.O.: Manual de producción avícola. 2a. ed. Ed. El Manual Moderno, México, D.F., 1986.
- 32.- Pacheco, G.O.: Estudio bacteriológico y micológico de detritus de incubación (plumón, cascarones y yema). Memorias de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas sobre importancia de la incubación en la

- producción avícola, México, D.F.: 68-74 (1979).
- 33.- Parry, S.H. and Porter, P.: Immunity to Escherichia coli and Salmonella. Avian Immunology. Edited by: Rose, Payne and Freeman, 327-344, British Poultry Science LTD, Edinburgh, 1981.
  - 34.- Payne, Sh.M. and Finkelstein, R.A.: Detection and differentiation of iron-responsive avirulent mutants on congo red agar. Infection and Immunity, 18 (1): 94-98 (1977).
  - 35.- Pederson, E.H.: Naturaleza de la enfermedad VII. Síntesis avícola, 4 (4): 12-18 (1986).
  - 36.- Perusquía, J.M.T. y Paasch, M.L.: Necropsias en aves. 1a. ed. Ed. Trillas, México, D.F., 1985.
  - 37.- Quintana, L.J.A.: Las aves: Manejo y medio ambiente, tomo III. 1a. ed. Ed. FMVZ, SUA, UNAM, México, 1981.
  - 38.- Rojo, M.E.: Enfermedades de las aves. 1a. ed. Ed. Trillas, México, D.F., 1984.
  - 39.- Ron, Z.E.: Patogenicidad y alternativas de control de E. coli. Industria avícola, 34 (5): 27-30 (1987).
  - 40.- Ron, Z.E.: Colisenticemia aviar: Problemática y programas potenciales de control. Memorias de la XII convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, Iztapa, Zihuatanejo, : 1-3 (1987).
  - 41.- Runnells, R.A., Monlux, W.S. and Monlux, A.W.: Principios de patología veterinaria. 1a. ed. Ed. C.E.C.S.A., México, D.F., 1980.
  - 42.- Surgalla, M.J. and Beesley, E.D.: Congo red agar plating medium for detecting pigmentation in Pasteurella pestis.

Appl. Microbiol., 18: 834-837 (1969).

- 43.- Thacker, L.H.: Enfermedades respiratorias, patología e inmunidad. Memorias de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. de Med. Vet. y Zoot., sobre fisiopatología sistémica de la gallina doméstica, México, D.F.: 44-57 (1987).
- 44.- Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria. 1a. ed. Ed. Interamericana, México, D.F., 1979.
- 45.- Valdivieso, G.A.: Infección por Mycoplasma synoviae. Memorias del curso problemas del aparato locomotor en aves, UNAM; FMVZ, México, : 19-27 (1982).
- 46.- Vázquez, R.F.: El problema de la resistencia bacteriana. Memorias del VIII ciclo de conferencias internacionales sobre avicultura de la Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal, México, D.F.: 169-205 (1987).
- 47.- Whiteman, C.E. y Bickford, A.A.: Manual de enfermedades de las aves. 2a. ed. Ed. Asociación Americana de Patólogos Aviáres, Pennsylvania, 1983.
- 48.- Wyatt, R.D.: La ventilación en los galpones. Avicultura profesional, 3 (2): 75-76 (1985).
- 49.- Zurita, D.J.: Relación entre el aislamiento de Escherichia coli y enfermedad. Memorias de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas sobre apoyo del laboratorio al diagnóstico, Monterrey, N.L.: 33-41 (1985).

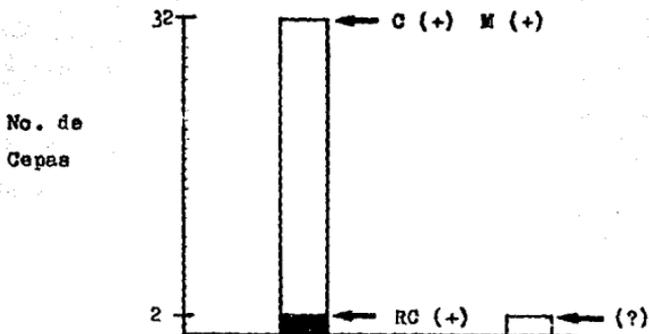


Figura 1. Comparación cuantitativa entre las pruebas de colicinogenia y mortalidad con la tinción de rojo congo.

- C (+) = Cepas positivas a colicina
- M (+) = Cepas positivas a mortalidad
- RC (+) = Cepas positivas a rojo congo
- (?) = Cepas sospechosas

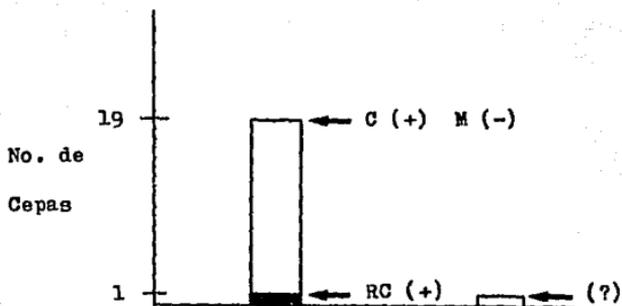


Figura 2. Comparación cuantitativa entre las pruebas de colicinogenia y mortalidad con la tinción de rojo congo.

C (+) = Cepas positivas a colicina  
 M (-) = Cepas negativas a mortalidad  
 RC (+) = Cepas positivas a rojo congo  
 (?) = Cepas sospechosas

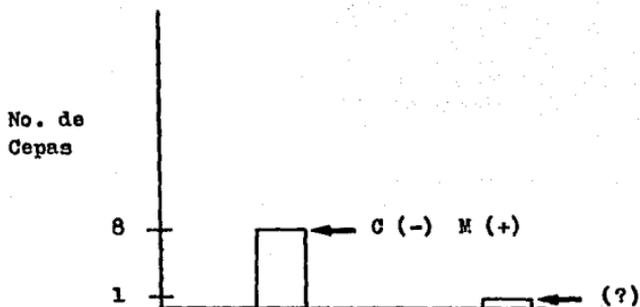


Figura 3. Comparación cuantitativa entre las pruebas de colicinogenia y mortalidad con la tinción de rojo congo.

C (-) = Cepas negativas a colicina  
M (+) = Cepas positivas a mortalidad  
(?) = Cepas sospechosas

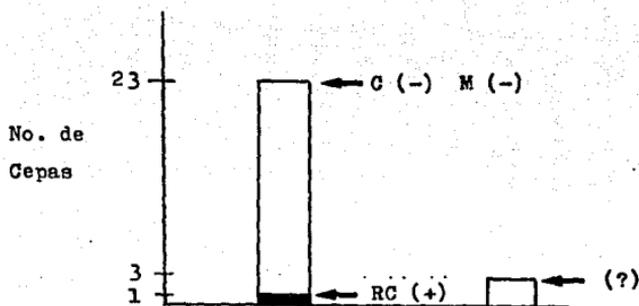


Figura 4. Comparación cuantitativa entre las pruebas de colicinogenia y mortalidad con la tinción de rojo congo.

- C (-) = Cepas negativas a colicina  
 M (-) = Cepas negativas a mortalidad  
 RC (+) = Cepas positivas a rojo congo  
 (?) = Cepas sospechosas

Cuadro 1. Comparación entre los resultados obtenidos en el medio rojo congo con las pruebas de colicinogenia y mortalidad en pollos de 3 semanas de edad.

P R U E B A	RC (+)	RC (-)	(?)	TOTAL
C (+) M (+)	2 (6.25%)	28 (87.5%)	2 (6.25%)	32
C (+) M (-)	1 (5.26%)	17 (89.47%)	1 (5.26%)	19
C (-) M (+)	0 (0.0%)	7 (87.5%)	1 (12.5%)	8
C (-) M (-)	1 (4.34%)	19 (82.60%)	3 (13.04%)	23
T O T A L	4 (4.87%)	71 (86.58%)	7 (8.53%)	82

C (+) = Cepas positivas a colicina  
 M (+) = Cepas positivas a mortalidad  
 C (-) = Cepas negativas a colicina  
 M (-) = Cepas negativas a mortalidad  
 RC (+) = Cepas positivas a rojo congo  
 RC (-) = Cepas negativas a rojo congo  
 (?) = Cepas sospechosas