

Métodos de aislamientos e identificación de *E. coli*

AMADA GONZÁLEZ SOLER

Laboratorio de Bacteriología. Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Avícola. "Jesús Menéndez", Santiago de las Vegas. Ciudad de La Habana.

RESUMEN

En el presente trabajo el autor realizó una revisión bibliográfica de los métodos diagnósticos para aislamiento o identificación de *E. coli*, e hizo énfasis en los principales medios de cultivo utilizados.

INTRODUCCIÓN

La *E. coli* es un habitante normal del tracto intestinal. La mayoría de las cepas de este germen no son patógenas, pero en circunstancias desfavorables, los calibacilos normalmente presentes en el intestino pueden causar infecciones como por ejemplo la Colisepticemia de los polluelos (Joseph, Nuria, 1970).

Por otra parte, Newkirk (1970), plantea que el cuadro de Colibacilosis septicémica conlleva a afecciones específicas como son: Colibacilosis, Enfermedad de Hjarre, Coligranuloma, Peritonitis, Salpingitis, Sinovitis, Onfalitis, Enfermedades de los sacos aéreos y otro grupo de enfermedades condicionadas por la *E. coli*.

Los avances de la serología han permitido una diferenciación de las cepas del germen, demostrando estrecha dependencia entre ciertas cepas de *E. coli* y los estados patológicos de animales jóvenes, siendo según Sojka (1971), las cepas procedentes de casos de septicemia las pertenecientes a 3 de los grupos OK,078; K80(B); 02; K1(L) y 01:K1(L).

En el presente trabajo se realiza una recopilación de los métodos de aislamiento e identificación de *E. coli* para el trabajo diagnóstico.

Colibacilosis, definición y distribución

La colibacilosis es una enfermedad que sucede como producto de la invasión de *E. coli* a la sangre y órganos internos cuando las defensas naturales del ave se encuentran disminuidas, por acción de causas diferentes como son: factores tensionales, sed, temperaturas extremas, frío, manipulación forzadas y otras causas, como señalan. (Bauer and Zimerman, 1963, Fritzsche and Gerrietz, 1969, Dorn, 1973.)

La septicemia se presenta al penetrar la *E. coli* en el torrente sanguíneo o en los tejidos orgánicos. La septicemia aguda puede causar la

muerte, debido a la pérdida de las funciones orgánicas vitales o la toxemia.

Son numerosas las cepas de *E. coli* que infectan a la mayoría de los mamíferos y aves. El mayor número de infecciones se ha reportado en pollos, pavos y patos. La *E. coli* es un habitante común del tracto intestinal de los animales a la concentración de $10^6/g$ o menos y su presencia en el agua de bebida es considerada como un indicio de contaminación fecal. Harry y Hemsley (1965a) encontraron que el 10%-15% de coliformes pertenecen a los serotipos patógenos. Las cepas intestinales no eran necesariamente del mismo serotipo de aquellas aisladas del saco pericárdico del mismo animal.

La transmisión por el huevo de cepas patógenas de *E. coli* es común y puede ser responsable de altas mortalidades en los pollos.

Harry y Hemsley (1965b), la más frecuente fuente de infección se considera que es la contaminación fecal del huevo en su superficie, con la consiguiente penetración de la cáscara y las membranas.

Harry (1964a), plantea la contaminación de la camada y heces fecales con bacterias coliformes y el polvo en los locales de crianza que puede contener 10^5 - 10^6 bacterias de *E. coli* por gramo.

Características de E. coli

La *E. coli* pertenece al Orden Eubacteriales, Familia Enterobacteriaceae, Género *Escherichia* (Edwards y Ewing, 1972).

Las bacterias entéricas fermentadoras de la lactosa que se incluyen en este grupo se clasifican por las reacciones indol, rojo metilo y Voges-Proskauer, identificándose por el aislamiento de un bacilo Gram negativo que produce indol, no ataca la urea, no produce H_2S no licua la gelatina, ni crece en medio citrato, positivo rojo metilo y negativo a Voges Proskauer fermenta la glucosa, lactosa, manitol y maltosa con producción de ácido y gas (Ewing, Davis y Martin, 1974).

Diagnóstico de E. coli, aislamiento e identificación

Obtención de las muestras

Los fluidos y el material celular de las lesiones características pueden contener poca o mucha población de *E. coli* pero las muestras mejores son:

Saco vitelino de embriones infectados y de pollos con onfalitis.

Saco pericárdico, hígado.

Pus de las articulaciones afectadas.

Material gaseoso de Salpingitis, Peritonitis y ojos infectados.

Debido a que tanto los serotipos patógenos como apatógenos de *E. coli* son habitantes frecuentes del tracto intestinal y debe tenerse cuidado de no contaminar las muestras con contenido intestinal (Gross y Dommuth, 1975).

Medios y métodos para identificación de E. coli

Joseph, Nuria (1970), plantea como medios más utilizados en Cuba para la identificación de E. coli los siguientes:

- a) Agar Sangre.
- b) Agar Endo (o en su sustitución otros medios selectivos para Enterobacterias como son Agar Drigalsky, Agar Verde Brillante entre otros.
- c) Agar Nutriente.
- d) Agar Simon Citrato.
- e) Medio Gelatina.
- f) Medio Kligler (TSI modificado).
- g) Caldo Nutriente.
- h) Agar Urea
- i) Caldo MRVP
- j) Medio agua peptonada con reactivo Andrade y carbohidratos al 1%, manitol, dulcitol, lactosa, maltosa, esculina, dextrosa, salicina, sacarosa, fructuosa, galactosa, glicerina, enuline, inositol.

En placas de Agar Sangre, Agar Endo, Agar Nutriente y Agar Simons Citrato se siembra por líneas paralelas para obtener colonias aisladas. Para el Caldo Nutriente y Caldo MRVP utilizamos un asa de platino cargado de microorganismos.

En el medio Kligler y gelatina se debe sembrar por punción.

Los medios para carbohidratos se siembran con un asa de platino con los microorganismos y poseen un tubo de fermentación Durham invertido en el fondo del tubo de ensayo para medir la producción de gas.

Por otra parte, Gross (1972) plantea la utilización de medios selectivos como Tergitol 7, McConkey y EMB agar. (Difco)

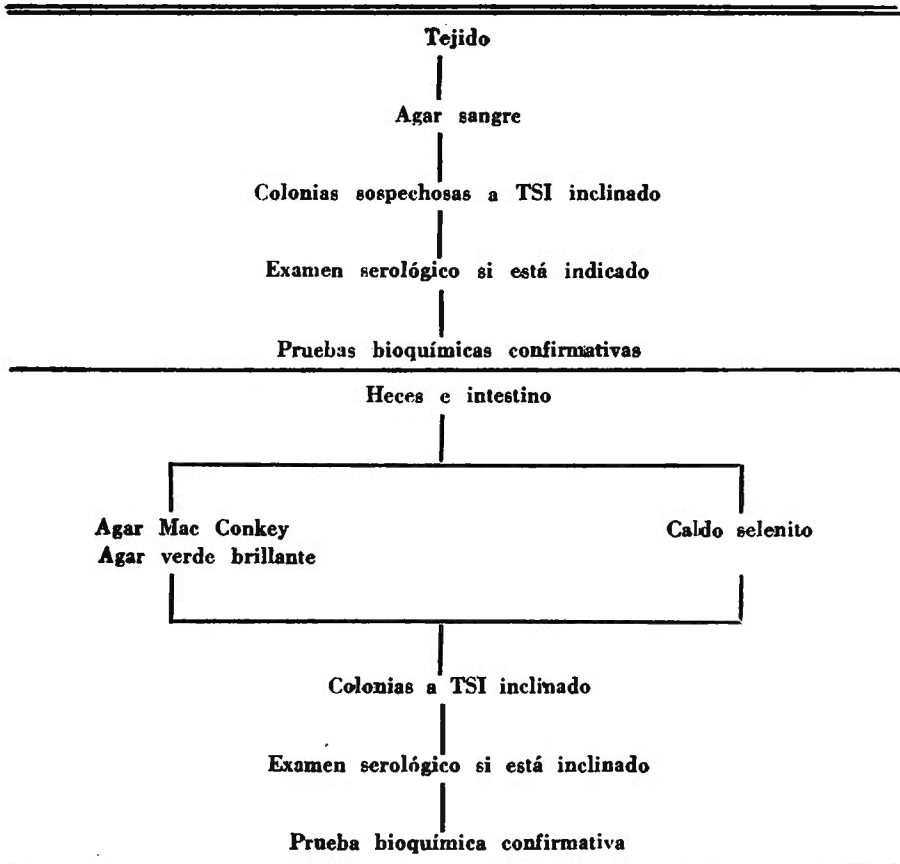
- | | |
|-------------------------|---|
| a) Agar Sangre. | No hemólisis, colonias densas, con brillo, bordes enteros, convexas. |
| b) Agar Endo. | Colonias rojas con brillo metálico, tiñen el medio de rojo, bordes y superficie lisa, elevadas. |
| c) Agar Nutriente. | Colonias translúcidas, bordes enteros, brillantes. |
| d) Agar Simons Citrato. | No crece, no utiliza citrato como única fuente de carbono. |
| e) Medio Gelatina. | No licua. |
| f) Medio Kligler. | Ácido Positivo
Gas Positivo
SH ₂ Negativo |
| g) Caldo Nutriente. | Turbidez abundante, ligero sedimento granular. |
| h) Agar Urea. | No hidroliza. |
| i) Caldo MRVP. | Turbidez, sedimento
Rojo metilo positivo
Voges Proskauer Negativo |

j) Medios con carbohidratos.

Manitol	AG
Dulcitol	AG
Lactosa	AG
Maltosa	AG
Esculina	—
Dextrosa	AG
Salicina	—
Sacarosa	AG
Fructosa	AG
Galactosa	AG
Glicerina	AG
Inulina	—
Inositol	—

Carter (1969), plantea un esquema para el aislamiento a identificación de bacterias entéricas (Tabla 1).

TABLA 1
Métodos para el aislamiento e identificación de las bacterias entéricas
(Carter, 1969)



Identificación serológica

Serológicamente existen más de 400 serotipos de *E. coli* según Craig (1968) planteando una clasificación serológica "O" basada en los componentes antigénicos de la célula bacteriana propiamente dicha, una "K" dada por los componentes antigénicos de la cápsula o envoltura del microorganismo y otra "H" correspondiente a los flagelos.

El antígeno somático O en la forma lisa es termoestable, el antígeno H se destruye por calentamiento a 100 ó 121°C. Dentro de esto se describen 3 tipos (L, B y A) que se diferencian por la variación de termolabilidad y capacidad de aglutinación. El H o flagelar es termolábil, se inactiva a 100° C. Existen ocasionalmente otros antígenos en el grupo, el R (rugoso), M (Mucoide) a, b y el F (fimbrial) (Sojka, 1971),

Por su parte, Gross y Domermuth (1975) consideran que para el diagnóstico de rutina la identificación serológica no tiene gran utilidad por las siguientes razones.

La identificación serológica no distingue los organismos infectantes de los contaminantes fecales.

Posiblemente existen muchas cepas patógenas de *E. coli* que no pertenecen a serotipos conocidos.

La identificación serológica es costosa y retrasa el diagnóstico.

Resistencia de *E. coli* a algunos antibióticos

Según Chabbert (1973) "una bacteria resiste a un antibiótico cuando una modificación de su capital genético le permite crecer en presencia de una concentración significativamente más elevada de dicho antibiótico". Este autor indica tres mecanismos principales responsables de la resistencia:

Modificación de la molécula que constituye el punto de unión o acción del antibiótico.

Producción de una enzima capaz de inactivar la molécula de antibiótico.

Modificación de la penetración del antibiótico.

Theze (1975) plantea que fueron aislada en Japón numerosas cepas bacterianas de *Salmonella* y *Shigella* resistentes a numerosos antibióticos y se demostró la transferibilidad de esta propiedad de *Shigella* a *E. coli* *in vivo* o *in vitro*.

Duval y Saussey (1977) reconocen dos mecanismos genéticos para la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Cromosómico por mutación.

Extracromosómico, las plasmidas.

Resistencia cromosómica

Como señalan Guillot y Elizabeth Chaslus (1976) este tipo de resistencia es debida generalmente a una mutación sobre el cromosoma a nivel de los genes que afectan específicamente el mecanismo de acción de un antibiótico o de una familia de antibióticos.

Resistencia plasmídica

Watanabe (1959) descubrió otro tipo de resistencia bien diferenciable de otras formas de resistencia, mediante el hecho que podía ser transmitida de una célula bacteriana resistente a una sensitiva mediante contacto.

Son numerosos los estudios realizados sobre este tipo de resistencia, así tenemos entre otros los trabajos de Naomi Data (1965), Chabbert (1973), y Guillot y Elizabeth Chaslus (1976), que coinciden en señalar que las plasmidas están constituidas de moléculas bicaternarias de ADN extracromosómicas de estructura bastante parecida a la del cromosoma bacteriano aunque presentando algunas características propias, se denominan "Factores R".

Richmond (1972) señala que los experimentos de laboratorio han demostrado que los genes intactos pasan de una cepa bacteriana a otra mediante tres métodos. Transducción, transformación y conjugación.

El modo de acción de los factores R se describe planteado que los mismos codifican para la resistencia a numerosos antibióticos tales como Sulfamida, Estreptomina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Penicilina, Nitrofuranos, Kanamicina, Neomicina y otros.

SUMMARY

A review of the literature covering the diagnostic methods for the isolation and identification of *E. coli* is presented; the author emphasizes the main culture media employed.

BIBLIOGRAFÍA

- Bauer, H.; P. Zimerman. (1963). Enfermedades de las gallinas. E. Gen Barcelona. pp. 252
- Carter, G. R. (1969). Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza pp. 85.
- Chabbert, Y. A. (1973) Données actuelle sur la resistance des bacteries aux antibiotiques. Actualites pharmacologiques Mason. Edit. Paris. 26.27-60.
- Craig, R. F. (1968) E. Colli and how you control it. World's Poultry Sci. 24(2); 141-146.
- Dorn, P. (1973). Manual de Patología Aviar. Ed. Acribia, Zaragoza, pp.128-131.
- Duval, J. et C. J. Soussy. 1977). Abrégé d'antibiotherapie. La resistance des bacteries aux antibiotiques. Ed. Mason, Paris. New York. Barcelona p. 9-31.
- Edwards, P. R. y W. H. Ewing. (1972). Identification of enterobactereacea. Burgess Publ. Co.; Minneapolis, Minnesota p. 160.
- Ewing, W. R., B. R. Davis y W. J. Martin. (1974). Biochemical characterization of Escherichia. U S Dpto. Health, Education, and Welfare, Public. Health Services, C. D. C. Atlanta, Ga p. 15.
- Fritzche, K. y E. Gerriets. (1969). Enfermedades de las aves. 2da. ed. Ciencia y Técnica. Instituto del Libro, p. 324.
- Gross, W. B. (1972). Colibacilosis. In Diseases of Poultry (6th ed.) (MS. Hofstad, B. W. Calnek, C. F. Helmoldt, W. M. Reid and A. W. Yoder, Jr eds) Iowa State University Press, Ames Iowa p. 405.

- Gross, W. B. y H. Domermuth.* (1975) Colibacilosos. In Isolation and Identification of Avian Patogens (Ed. by Hitcher, S. B. C. H. Domermuth, H. Graham, J. E. Williams Ed. Commeted or the Am. Ass. of Avian Path. Dpto. of Vet. Micro. Texas University, p. 34-37.
- Guillet, J. F., et Elizabeth Chaslus.* (1976). Resistance des bactéries aux agents antimicrobiens. *Le Point Veterinaire* 3(15): 21-59.
- Harry, J.* (1964a). A study of 119 outbreaks of Colisepticemia in broilers flacks. *Vet. Res.* 76. 443-449.
- Harry and Hemsley.* (1965a). The associations between the presence of septicemia strains of *E. coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of Colisepticemia. *Vet. Rec.* 77: 35-40.
- Harry and Hemsley.* (1965b). The relationship between environmental contamination with septicemia strains of *E. coli* and their incidence in chickens *Vet. Rec.* 77: 241-245.
- Joseph, Nuria, I.* (1970). Diagnóstico bacteriológico de *E. coli* en exámenes aviarios. *Rev. Ciencia Avícola en Cuba.* 3(4): 30-36.
- Newkirk, J.* (1970). La *E. coli*, oportunista presente. *Rev. Avicultura* 14 (1er. trimestre). 53-59 (De: Poul. Sci.)
- Naomi Dušá* (1965); Infections Drug Resistance. *Brit. Med. Bul.* 21 (3): 254-259.
- Richmond, M. H.* (1972). Some environmental consequences of the use of antibiotic or "What goes up most come down". *J. Apl. Bact.* 35: 155-176.
- Sojka, W. J.* (1971). Las enfermedades de *E. coli*. *Rev. Vet.* 20(244). 1-7.
- Theze, L.* (1975). *Microbiologie generale.* Ed. Doin. Paris. 617-621.
- Watanabe, T.* (1959). Infection Drug Resistance. *Sc. American.* 217(6): 19-27.