

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Estudio Experimental Sobre la Transmisión de Escherichia Coli
A través de Cascarón Intacto
de Huevo de Gallina**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

AIDA RIVERA ARAMBULA

GUADALAJARA, JALISCO. 1974

CON PROFUNDO RESPETO Y AGRADECIMIENTO
A MIS QUERIDOS PADRES:
IGNACIO Y MA. GUADALUPE .

CON TODO CARINO Y AGRADECIMIENTO
A MI ESPOSO HECTOR

A MIS HERMANOS:
IGNACIO
ISAAC LEONEL
XOCHITL
ADOLFO JAVIER

CON AGRADECIMIENTO POR EL TESON PARA EL
LOGRO DE ESTA TESIS A MI ASESOR M.V.Z.
JAVIER RIVERA HERNANDEZ

AL ESTIMADO DIRECTOR DE TAN QUERIDA ESCUELA
M.V.Z. RAMON FERNANDEZ DE CEBALLOS

A TODOS MIS MAESTROS, A QUIENES DEBO LOS
CONOCIMIENTOS ADQUIRIDOS

A TODOS MIS COMPANEROS

ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LA TRANSMISION
DE ESCHERICHIA COLI A TRAVES DE CASCARON
INTACTO DE HUEVO DE GALLINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

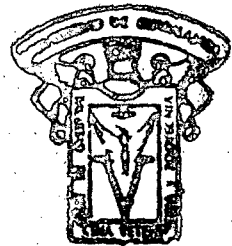
PRESENTA

AIDA RIVERA ARAMBULA

C O N T E N I D O

- I INTRODUCCION
- II MATERIALES Y METODOS
- III RESULTADOS
- IV DISCUSION
- V CONCLUSIONES
- VI SUMARIO
- VII BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION



OFICINA DE
ESTUDIOS CIENTÍFICOS

Por muchos años se han hecho interesantes y detalladas investigaciones sobre la penetración de microorganismos a través del cascarón de huevos de las aves.

Los organismos que logran acceso al interior del huevo a través del cascarón, pueden en el caso de ser huevos embrionados, transmitir enfermedades infecciosas al vitelo del embrión en desarrollo, determinando infecciones en pollitos recién nacidos, causando pérdidas considerables a la industria avícola por la mortalidad elevada de estos animales, y en huevo de plato estos microorganismos serán los agentes causales de zoonosis, al ser consumido el huevo infectado.

La Colibacilosis de las aves es una de las enfermedades más frecuentes en La República Mexicana, ya que como reportan los Laboratorios de Patología Animal dependientes de la Secretaría de Agricultura y Ganadería, en el año de 1970 dicha enfermedad representó un 18.35% de incidencia según su Boletín Zoonosario. (2) Ricardo García Lozano reporta que en el Laboratorio de Patología Animal de Tlaquepaque Jal., a partir de 1965, ha habido un incremento en la incidencia de ésta enfermedad, ya que en este año el porcentaje de colibacilosis en aves representó el 8.8%, en 1966 el 23.6%, en 1967 el 17.6%, en 1968 el 30.6%, en 1969 el 27.1%, en 1970 el 26.3% y en 1971 el 22.0%. (3)

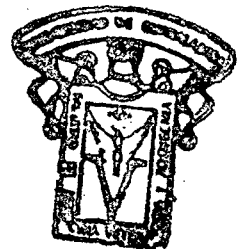
El presente trabajo consiste en determinar las posibilidades de penetración de *Escherichia Coli* a través de cascarones intactos, se ha querido llevar a cabo este trabajo, por la importancia que puede tener la transmisión de *Echerichias Coli* a humanos al ingerir huevos

contaminados con ésta bacteria, tan frecuente en nuestro medio, ya que según Ewing (et.A1.) en 1964 reportaron que había una correlación de serotipos de E.Coli de animales con diarrea, con los serotipos encontrados en diarreas infantiles.(1)



OFICINA DE
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

MATERIAL Y METODOS



OFICINA DE
PUBLICACIONES CIENTIFICAS

M A T E R I A L

Anillos de Carrizo
Charolas
Gradillas
Isopos
Jeringas
Lápiz Graso
Ovoscopio
Parafina
Pinzas de disección
Pipetas
Tijeras
Formol

Medios de Cultivo.-

Caldo Selenite
Caldo Lactosado
Mac. Conkey Agar
Verde Brillante Agar

Material Biológico.-

Huevos
Antisueros de E. Coli
Cepa de E. Coli



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

M E T O D O

Se utilizaron 50 huevos embrionados de 9 días de incubación, procedentes de una incubadora comercial situada en la periferia de Guadalajara. Y 100 huevos para consumo humano, que procedían de una granja diferente también situada en la periferia de Guadalajara.

Los huevos fueron llevados al Laboratorio de Diagnóstico de Patología Animal de Tlaquepaque, para trabajarse ahí. Se dispusieron en charolas con la cámara de aire hacia arriba. Se ovoscopiaron y fueron desechados los que presentaban roturas, cámaras de aire flotantes, o restos de excrementos. Con un lápiz grueso se definió el área que ocupara la cámara de aire. Se señaló también el área de exposición (fig.1), por debajo de la cámara de aire y en un ángulo aproximado de 45°. (Fig.2).

No se efectuó desinfección alguna del cascarón.

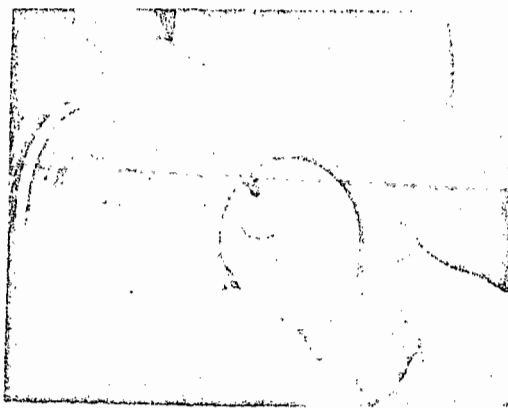


Figura N°1.- Señalamiento de la cámara de aire y el área de exposición.

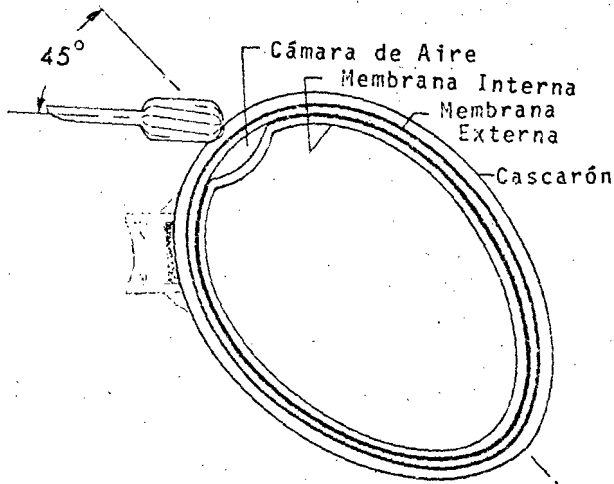


Figura N° 2

Se colocaron anillos de carrizo en el área señalada para la exposición bacteriana, adhiriéndose a la superficie por medio de parafina, con la cual también se impermeabilizaron dichos anillos. (fig. 3y 4).

La cepa de *Escherichia Coli* que se utilizó fue de un aislamiento de un caso de aves presentado al laboratorio. La cepa fue tipificada con antisueros procedentes de la Sección de Reactivos Biológicos de Atlanta Georgia que se obtuvieron por medio de la Organización Mundial de la Salud.

El método de tipificación fue el siguiente:

En un tubo estéril que contenía 10 c.c. de solución salina fisiológica estéril se depositaron varias asadas

del cultivo de E.Coli. El paso siguiente fue la incubación de esta mezcla durante 24 horas a 37°C. Al cabo de ese tiempo se le añadió formol al 0.5%. Posteriormente se calentó el antígeno a 50°C por una hora, al término de ese tiempo se refrigeró la muestra. Posteriormente en tubos estériles se colocaron 0.5 ml del antígeno - formalinizado con 0.5 ml. de solución de antisuero en dos diluciones 1:10 y 1:50, utilizando los siguientes antisueros: o 111 a b, o 138, 141 a c, o 139, o111 a c, o 8, 39 y o 38.

Se dejaron incubar los antígenos mezclados con los antisueros a una temperatura de 48 a 50°C durante 24 horas. Inmediatamente después se hizo la lectura en los tubos interpretandose como completo (50% o más de aglutinación), Parcial (menos del 50% de aglutinaciones) o No aglutinación. Resultando nuestra cepa positivo al antisuero o111 a c.

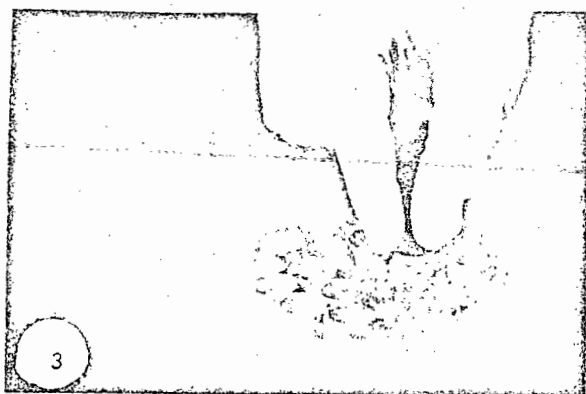


Figura N°3 Impermeabilización de los anillos.

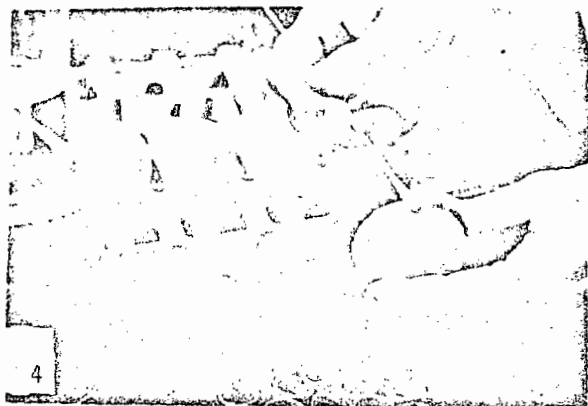


Figura N°4 Colocación de los anillos.

La cepa ya tipificada se dejó incubar en un medio de caldo lactosado por 24 horas, pasadas las cuales se procedió a la inoculación de los huevos.

Los inóculos fueron preparados de la siguiente manera: Se hicieron 5 diluciones en 5 tubos que contenían cada uno 4.5 ml. de agua bidestilada estéril, se colocó en el primer tubo 0.5 ml. de la cepa enriquecida y de este tubo 0.5 ml. al segundo y así sucesivamente.

El tiempo de exposición del huevo al inóculo fue de 24 horas para el primero, 48 para el segundo, 72 para el tercero, 96 para el cuarto y 120 horas para el quinto, mismas en que permanecían en incubación.

Una vez hecha la inoculación el huevo colocado en charclas se sometió a incubación durante el tiempo an-

tes mencionado y a una temperatura de 32.2°C-90°F, con una humedad relativa de 60%.

La cosecha se efectuó cada 24 horas de cada una de las diluciones, de la siguiente forma: en los huevos infértiles se hacía de membrana externa - área I, membrana interna- área II, albúmina-área III, vitelo-área IV. (figs. 5,6,7 y 8). Y de los huevos embrionados se cosechó igualmente cada 24 horas, y de cada una de las diluciones. Por medio de un isopo, membrana externa y - membrana alantoidea, y por medio de una jeringa, líquido amniótico y líquido alantoideo.

Este método se repitió en cada una de las pruebas que fueron necesarias.

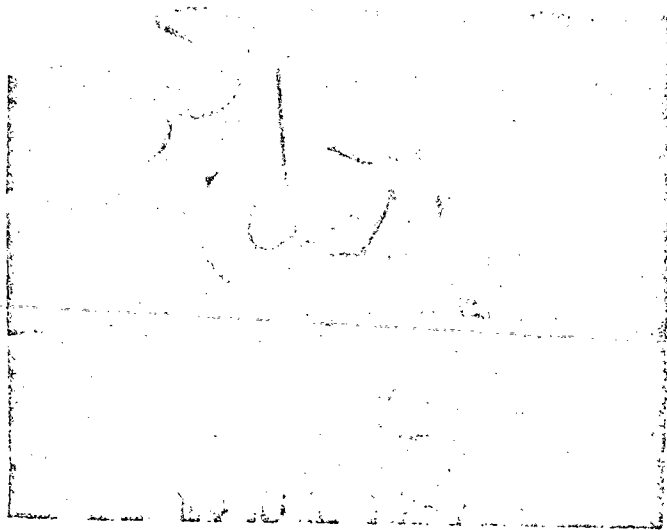


Figura N°5 Recolección de membranas, externa e interna.

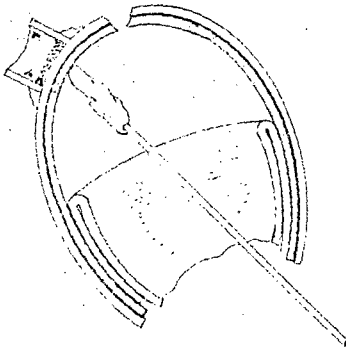


Fig. 6

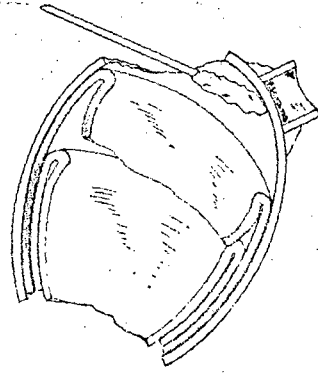
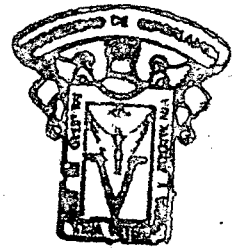


Fig. 7

Se utilizó el método de Inmersión para una sola prueba, la exposición fue total en todo el cascarón manteniendo sumergidos los huevos en el medio de selenite enriquecido de E. Coli, después de 30 minutos de exposición fueron incubados.

En todas las pruebas se dejaron 5 testigos para la interpretación de resultados.



OFICINA DE
ESTUDIOS CIENTÍFICOS

RESULTADOS



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

PORCENTAJE DE PENETRACION EN HUEVOS EXPUESTOS A E. COLI EN RELACION AL METODO UTILIZADO.

METODO	HUEVOS EXPUESTOS			RECUPERACION DE E. COLI			% PENETRACION		
	I	F	E	I	F	E	I	F	E
INMERSION	30								
EXPOSICION LOCALIZADA	60	10	50	30			50		

I INFERTIL
F FERTIL
E EMBRIONADO

INFLUENCIA DE LAS DILUCIONES DE LA CEPA E. COLI EN LA PENETRABILIDAD BACTERIANA POR AREAS. METODO EXPOSICION LOCALIZADA.

DILUCION	AREA I	AREA II	AREA III	AREA IV
10^{-1}	+	+	-	+
10^{-2}	+	+	-	-
10^{-3}	+	+	-	-
10^{-4}	+	+	-	-
10^{-5}	-	-	-	-

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION EN LA PENETRACION A DIFERENTES AREAS Y PORCENTAJE DE HUEVOS POSITIVOS. METODO EXPOSICION LOCALIZADA.

TIEMPO DE EXPOSICION	AREA I	AREA II	AREA III	AREA IV
24 hs	16%	8%		
48 hs	6%	1%		
72 hs	4%	4%		
96 hs	8%	8%		4%

D I S C U S I O N

Se expusieron 60 huevos infértiles, 10 huevos fértiles y 50 huevos embrionados, la recuperación de la bacteria *E. Coli* solamente se hizo en el 50% de los huevos infértiles por el método de exposición localizada. Con un 8% de penetración en el área I, 8% en el área II, y 4% en el área IV en el tiempo máximo de exposición que fué de 96 horas.

De los 50 huevos embrionados y de los 10 huevos fértiles, no se obtuvieron resultados positivos, es decir, recuperación de la bacteria por ninguno de los dos métodos utilizados.

Encontramos así nuestros resultados muy similares a los obtenidos por la Dra. Acosta Padilla en su estudio experimental de transmisión de *Salmonella* a través de cascarón intacto de huevo fresco, infértil de gallina, en el año de 1970 (4), ya que ella encuentra un 12% de penetración bacteriana en el área I, un 5.5% en el área II y 0.5% en el área III, no encontrando penetración en el área IV con un tiempo máximo de exposición de 60 minutos.

La explicación a nuestros resultados en que recuperamos *E. Coli* solamente en huevos infértiles y no de fértiles o embrionados, la encontramos en uno de los múltiples trabajos sobre la penetración de microorganismos a través de cascarón intacto realizado por el Dr. J.E. Williams and L.H. Dillard. En el que nos dice que con el desarrollo embrionario de los huevos fértiles decrece la potencia de penetración a las estructuras del huevo de bacterias como *S. Typhimurium*.

La poca penetración está aparentemente asociada, con las mezclas y sustancias químicas que se encuentran en los lugares en donde se desarrollan los embriones. Además pueden existir sustancias antibac-

terianas que protejan en forma natural y que se encuentran en las estructuras del huevo, las cuales son activadas por el desarrollo embriónico, sin embargo no se han hecho esfuerzos por establecer la existencia de ellas.

El cascarón y la estructura de las membranas de huevos fértiles, actúan como buffer en invasión bacteriana durante la incubación. (5)

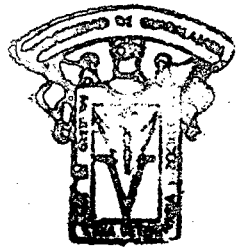
En las pruebas en que utilizamos huevos fértiles y embriones para la comprobación del pase de *E. Coli*, estos se encontraban en el 9º día de incubación, los resultados fueron negativos, y sin embargo encontramos resultados positivos obtenidos por el Dr. B.W. Bierer (1962) en sus pruebas realizadas por el método de inmersión en un cultivo de *E. Coli* a huevos de 20 días de incubación de los cuales el 30% murió a los 11 días después del nacimiento con típica infección de *E. Coli*. En otra de sus pruebas también con embriones de 20 días de y en que los mantiene a temperaturas frías en la incubación, 54° a 88°F, mueren 7% de los polluelos a los 10 días de edad presentando, pericarditis, perihepatitis, peritonitis, e inflamación de los sacos aéreos. (6)

Los mismos resultados positivos a la penetración del cascarón por *E. Coli* los obtienen W. Malcolm Reid (et. Als.) , en 1960 en un trabajo de mortalidad y morbilidad en embriones y pollitos inducida por una cepa de *E. Coli* patógena para los pollitos que fue usada para infectar huevos en el 18avo día de incubación, vía penetración del cascarón. La mortalidad después de la incubación aumentó a 22.0% en los huevos expuestos. (7)

Cabe hacer notar despues de estos reportes, que la cepa utilizada en este trabajo, como ya se mencionó en la metodología, fue tipificada como o 111 a c, y que no todos los autores antes mencionados, especifican el tipo de cepa utilizada por ellos, exepto B.W Bierer que menciona un tipo no mótil o 1. Dato que no deja de sernos significativo.



I CONCLUSIONES



OFFICE OF
SCIENTIFIC RESEARCH AND DEVELOPMENT

C O N C L U S I O N E S

En el 50% de los huevos infértiles se aisló Escherichia Coli en diferentes áreas.

De los 10 huevos fértiles y los 50 embrionados no se aisló Escherichia Coli.

Existe una correlación directa entre el tiempo de incubación con el área de penetración.

Se observó una concordancia entre la concentración bacteriana con la penetración.



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

S U M A R I O

S U M A R I O

Se trató de comprobar la penetración de Escherichia Coli a través de cascarón intacto y la profundidad alcanzada por esta bacteria al infectarse huevos.

Se utilizaron para este fin, huevos infértiles, destinados para el consumo alimenticio humano; huevos fértiles y embrionados destinados a la reproducción aviar, encontrándose que huevos para plato son más susceptibles a la penetración que huevos fértiles y embrionados.

Se utilizaron dos métodos conocidos, el de inmersión y de exposición localizada, el cual se comprobó como el más acertado.

Se encontró que a mayor concentración bacteriana, son mayores las posibilidades de penetración y que el tiempo de exposición, es también determinante de la penetración.

A pesar de tenerse reportes de zoonosis por esta causa, nuestro trabajo no implicó pruebas en humanos para determinar esta posibilidad.



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

B I B L I O G R A F I A



OFICINA DE
FUSIÓN CIENTÍFICA

- 1.- The Veterinary Bulletin
Abril 1964
Ewing W.H, Davis B.R y Montague
Vol. 34 N°4 Pag. 180 abstracto #1173
- 2.- Boletín Zoosanitario 1970
Dirección General de Sanidad Animal
- 3.- Estudio comparativo de las enfermedades reportadas
en el Laboratorio de Diagnóstico Central Regional
de Tlaquepaque en 7 años de diferencia (1965-1971)
Tesis presentada por Ricardo García Lozano.
- 4.-Estudio Experimental acerca de la transmisión de
Salmonella a través de cascarón intacto de huevo
fresco de gallina. 1970
Tesis presentada por Martha Alicia Acosta Padilla
- 5.- Boletín Informativo del Southeast Poultry Rese-
arch Laboratory Abril 1970
Salmonella Penetration of Fertile and Infertile
Chicken eggs at progressive stages of incubation.
J.E. Williams and L.H. Dillard.
- 6.- The Veterinary Bulletin
Marzo 1963. Vol. 33 N°3 Pag. 127, artículo 761
Bierer B.W. (1962)
The Veterinary Bulletin
Abril 1963, Vol.33, N°4, Pag.174, artículo 1081
Bierer B.W.
- 7.- Poultry Science (U.S.A)
1961, Vol.40, Pag. 1497-1502

Embryo and Baby Chick Mortality and Morbidity Induced by a Strain of Escherichia Coli
W. Malcolm Reid (et. Als)

- 8.- Boletín Informativo del Southeast Poultry Research Laboratory United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service 1967
A Method for studying Microbial Penetration Through the outer structures of the avian egg.
J.E. Williams and A.D. Whittemore (1967)
- 9.- The Veterinary Bulletin
Vol. 34, Nº 8, Pag. 446, abstracto 2756
A Study on 119 outbreaks of colisepticaemic in Broiler Flocks.
- 10.- Medical Microbiology
Cruickshank
11ava Edición Cap. 3
- 11.- Poultry Science 1973
The Effect of External Shell Treatments on Salmonella Penetration of Chicken Eggs.
J.E. Williams and L.H. Dillard
- 12.- Laboratory Division, Scientific Resources Branch,
Biological Reagents Section, Atlanta, Georgia (1969)
Recommended Method for use of Escherichia Coli.
- 13.- Avian Diseases
Vol XIII, Nº 1, Febrero 1969
Salmonella Penetration of the outer structures of White and Speckled shell turkey eggs.
J.E. Williams and L.H. Dillard