

Factores que pueden alterar una prueba de hemoaglutinación en el diagnóstico de pullorosis

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS
 QUE REACCIONAN INESPECIFICAMENTE CON EL ANTIGENO PULLORUM¹

Enrique Bergqvist A.², Sergio Rosende³ y Ruth Bauer⁴

INTRODUCCION

El crecimiento de la industria avícola en los últimos años no ha ido paralela al mejoramiento sanitario de los planteles, por lo que una serie de enfermedades infecciosas siguen siendo aún un problema limitante. En este caso se encuentra la pullorosis que, a pesar de ser conocida en el país desde hace tiempo, su estudio no ha sido abordado en forma integral y satisfactoria.

Para terminar con esta infección es necesario considerar varios factores, ya sea de manejo a nivel del plantel, de coordinación entre las autoridades encargadas de llevar la campaña de control de la enfermedad, de estandarización de los antígenos que permiten detectar las aves portadoras y una investigación constante y actualizada.

El presente trabajo tiene por finalidad aportar un estudio bacteriológico de microorganismos, que al poseer antígenos similares al de la *Salmonella pullorum* dan resultados falsamente positivos a la hemoaglutinación.

Se hace necesario conocer la mayor o menor incidencia de estos microorganismos, a fin de abordar el problema que corrientemente desorienta al personal que debe realizar las pruebas serológicas en terreno.

REVISION DE LITERATURA

Varios factores pueden alterar el análisis serológico practicado a las aves con el objeto de detectar a los portadores de *Salmonella pullorum*. Estos se conocen en la literatura como reacciones "atípicas", "inespecíficas", "oscuras", "cruzadas" o "no pullorum" (Garrard y Burton, 1948) (Papageorgiu et al., 1968) (July e Hipólito, 1970).

Modificaciones de la temperatura o cambios en el pH del antígeno (Casman, Valley y Rottger, 1930) (Holm et al., 1940) y la precipitación de ciertas proteínas constituyentes del suero de las aves (Mathews, 1926) (Valley y Casman, 1930), son causas de dificultades en la interpretación de la reacción de aglutinación.

Además, la especificidad de la referida prueba se reduce mucho si en la preparación del antígeno no se toma en cuenta que las aves están infectadas con un tipo variante y/o estándar de *S. pullorum* (Gwatkin, 1945 y 1947) (Edwards et al., 1948) (Brunner, 1959).

Reacciones inespecíficas entre *S. pullorum* y *S. gallinarum* y otras *Salmonellas* se producen debido al componente antigénico común (Papageorgiu et al., 1968). En esta categoría se encuentran reacciones cruzadas por antígenos relacionados de *S. pullorum*, *S. typhimurium*, *S. derby* (Hinshow y Mc Neil, 1944), *S. reading*, *S. paratífus A* y *Paratífus B* (Edwards y Brunner, 1946) y de *S. enteritidis* (Stoenescu, Vior y Sandulescu, 1966).

Se han observado estas mismas reacciones frente al antígeno pullorum en aves infectadas con *Escherichia coli* o con *Aerobacter* (Schiff, Bornstein y Sophra, 1941) (Wheeler et al., 1943) (Garrard y Burton, 1948) (Papageorgiu et al., 1968) (July e Hipólito, 1970) con *Paracolón* (Stuart et al., 1943) (Garrard y Burton, 1948) con *Proteus* sp. (Edwards y Brunner, 1946) (Gwatkin, 1947) (July e Hipólito, 1970) y con *Alcaligenes* sp. y *Lactobacillos* (Olm et al., 1940) (July e Hipólito, 1970). Estas reacciones ocurren especialmente entre antígenos somáticos (polisacáridos) de *Salmonellas*, *Escherichia*, *Arizona* y *Citrobacter*, según Westphal et al. (1960), citado por Mäkelä (1964).

Johnson y Anderson (1936), citados por Hurt y Mc Culloch (1940); Holm et al. (1940), Hurt y Mc Culloch (1940), observaron una marcada reacción cruzada entre cocos gram positivos y *S. pullorum*. Las cocáceas fueron aisladas del corazón, hígado y ovario. Se pudo observar además, que estas cocáceas no eran patógenas para las aves.

¹Parte de la tesis de grado, del autor principal para optar al título de Magister Scientiae en la Universidad de Chile.

Recepción originales: 11 de diciembre de 1972.

²Médico Veterinario, M. S., Proyecto Cerdos y Aves, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³Médico Veterinario, profesor auxiliar, grupo de Patología Aviaria, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Casilla 5539, Santiago, Chile.

⁴Médico Veterinario, Laboratorio de Diagnóstico del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Casilla 5539, Santiago, Chile.

Por su parte Garrard *et al.* (1946), Garrard *et al.* (1947), Edwards *et al.* (1948), July e Hipólito (1970), señalan principalmente a los *Estafilococcus* como causa de reacciones inespecíficas frente al antígeno pullorum en la prueba de aglutinación con sangre entera.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron 71 aves de ambos sexos, de 19 a 26 semanas de edad y de diferentes razas, de 7 planteles ubicados en distintos lugares del país. Todas las aves fueron seleccionadas de entre aquellas gallinas "positivas dudosas" a la reacción de aglutinación rápida con sangre entera, usando un antígeno polivalente elaborado en el Laboratorio de Diagnóstico y Análisis del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

De cada plantel se seleccionaron entre 10 y 12 aves.

El suero anti-*Salmonella pullorum*, utilizado en este trabajo, se obtuvo del Laboratorio de Diagnóstico y Análisis del SAG.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Agar sangre, oveja.

Agar sal, para aislamiento de *Estafilococcus*.

Agar Mc Conkey para aislar enterobacteriáceas.

Caldo selenito y/o tetratonato, medios de enriquecimiento y selectivo para *Salmonella*.

Agar SS para aislamiento de *Salmonellas*.

Caldo verde brillante, como medio indicador de la presencia de coliformes.

Todas las aves seleccionadas para la experiencia fueron sacrificadas y de inmediato se realizó la necropsia de ellas, extrayéndoles los ovarios o testículos, en un ambiente de máxima esterilidad. Las muestras de gonadas se homogenizaron en morteros estériles y luego fueron sembradas en los medios de cultivos señalados (Cuadro I).

Cada colonia aislada fue repicada en agar corriente y examinada mediante la tinción de gram; posteriormente se aglutinaron con suero anti-*Salmonella pullorum* (este suero proviene de aves con pullorosis).

Se identificaron aquellos gérmenes que aglutinaron el suero anti-salmonella pullorum; los negativos fueron eliminados.

La identificación de los gérmenes aislados se hizo de acuerdo a la clasificación de Bergey.

En la identificación de los gérmenes gram negativos, se siguió la pauta de fermentación de la lactosa:

Las bacterias lactosa positivo franca, se consideraron coliformes y se identificaron por la clase IMVOC (Indol, Rojo Metilo, Voges Proskauer y Agar Citrato).

Las bacterias lactosa negativas se identificaron por las siguientes pruebas bioquímicas: IMVOC, H₂S, Movilidad, Urea, Malonato, Manita, y Lisina decarboxilasa.

Con el objeto de diferenciar la cepa sapró-

Cuadro I — Examen bacteriológico y aglutinación de las muestras analizadas y colonias aisladas.

Cultivos primarios	MUESTRA			
	Agar Sangre	Agar Sal	Agar Mc Conkey	Selenito o Tetratonato
	24 hrs. 37°C	24 hrs. 37°C	24-48 hrs. 37°C	18-20 hrs. 37°C
				Agar Mc Conkey o Agar SS 24-48 hrs. 37°C
	Repicaje Agar corriente	Repicaje Agar corriente	Repicaje Agar corriente	Repicaje Agar corriente
	GRAM	GRAM	GRAM	GRAM
	Aglutinación	Aglutinación	Aglutinación	Aglutinación
Gérmenes	Posi- tivos Identi- ficados	Nega- tivos Elimi- nados	Posi- tivos Identi- ficados	Nega- tivos Elimi- nados

fita de la cepa patógena de *Estafilococcus*, se estudiaron una serie de propiedades que posee sólo la cepa patógena: capacidad de coagular el plasma de conejo citratado; fermentación de la manita y hemólisis de los glóbulos rojos de cordero.

RESULTADOS Y DISCUSION

De un total de 71 aves examinadas, se aislaron en 34 de ellas (47,88%), microorganismos que no siendo *Salmonella pullorum* dieron reacción inespecífica con el suero anti-*Salmonella pullorum*. De un ave (macho), se aisló *S. pullorum*.

El porcentaje de especies de microorganismos aislados de estas aves fue de un 37,1% de bacilos gram negativos (incluyendo *S. pullorum*) y un 71,4% de cocáceas gram positivos. Hay que señalar que en 3 aves se aislaron 2 tipos de gérmenes asociados.

Es interesante hacer notar el alto porcentaje de cocos gram positivos, lo que coincide con lo manifestado por Holm *et al.* (1940) y por Hurt y Mc Culloch (1940).

De estos gérmenes gram positivos (25 cepas), el porcentaje mayor corresponde a los *Estafilococcus* (80%), lo que concuerda con lo señalado por Garrard *et al.* (1946) y por July e Hipólito (1970). Estas cepas aisladas fueron negativas a la prueba de la coagulasa, lo que nos indica, de acuerdo con Johnson y Anderson (1936), citados por Hurt y Mc Culloch (1940), que estos gérmenes aislados y causantes de reacciones inespecíficas son apatógenos. En menor porcentaje se encuentran los *Micrococcus spp.* (20%).

En los bacilos gram negativos (13 cepas), pertenecientes a la familia enterobacteriaceae y clasificados según Edwards y Ewing, 1962, de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, se encontró un 15,3% de *Escherichia coli* y un 30,6% de *Aerobacter aerogenes*. Estas bacterias poseen antígenos comunes a varios tipos de *Salmonellas*, y como lo señalan Schiff *et al.* (1941) y Wheeler *et al.* (1943), son causa de estas aglutinaciones inespecíficas al antígeno pullorum.

Se aisló además en un 23% *Proteus sp.* Este germen, según Edwards y Brunner (1946), posee toda o una fracción del antígeno XII₂ y de acuerdo con July e Hipólito (1970), es también causa de reacciones "no pullorum" en los test de aglutinación.

Se encontró que estas mismas reacciones fueron debidas a la presencia de gérmenes tales como *Arizona*, *Citrobacter sp.* y *Providence sp.* aislados cada uno en un 7,7% del total de bacilos gram negativos. Estas reacciones cru-

zadas existen especialmente entre los antígenos somáticos de estos microorganismos con la *Salmonella*, según Westphal *et al.* (1960), citado por Mäkela (1964).

Del total de aves con reacciones inespecíficas (47,88%), se encontraron cocáceas gram positivas y bacilos gram negativos que se distribuyen (Figura 1) en los siguientes microorganismos.

Se puede apreciar de este resultado que el germen que se presenta en mayor porcentaje en aves con reacciones inespecíficas es el *Estafilococcus epidermidis*, lo que concuerda con los trabajos efectuados por Edwards *et al.* (1948) y por July e Hipólito (1970).

A la necropsia de las 71 aves examinadas se encontró un 54,9% de ovarios atróficos y un 31,0% de ovarios congestivos o hemorrágicos; los restantes fueron normales. A similares resultados llegó Garrard *et al.* (1946).

De los machos analizados, los testículos se presentaron atróficos en un 40%; en uno de ellos que se encontró abscedado, pudo aislarse *S. pullorum*.

Por otra parte, al examen *post-mortem* de estas aves, el 40,8% reveló condiciones patológicas, como bazo e hígado hipertrofiado, algunos con tumoraciones; además se constató alteraciones renales y pericarditis.

CONCLUSIONES

Del total de aves examinadas (71), el 47,88% presentó reacciones atípicas o inespecíficas al antígeno pullorum.

El 31% de estas aves mostró lesiones ováricas, el 54,9% de los ovarios se encontró atróficos, siendo el resto normal. De los machos un 40% presentó testículos atróficos, en

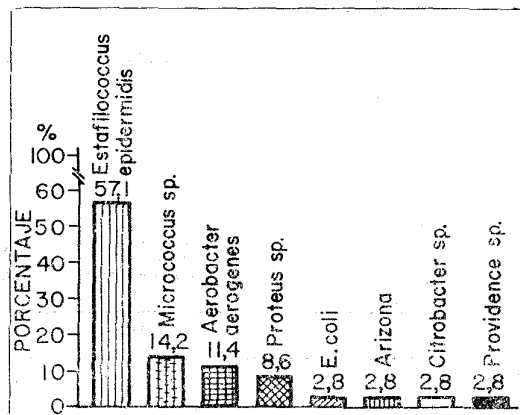


Figura 1 — Distribución porcentual de los gérmenes aislados de aves con reacciones inespecíficas al antígeno pullorum (de tres aves se aislaron dos tipos de gérmenes).

uno de los cuales y que se presentó abscedado, se aisló *S. pullorum*.

De los ovarios y testículos se aislaron: un 57,1% de *Estafilococcus epidermidis*; un 14,2% de *Micrococcus* spp., un 11,4% de *Aerobacter aerogenes*; un 8,6% de *Proteus* sp., un 5,7% de *E. coli* y un 2,8% de *Citrobacter* sp., *Arizona* y *Providencia* sp., respectivamente.

En dos hembras se aislaron dos tipos de gérmenes: *Estafilococcus-Citrobacter*; *Estafilococcus-Micrococcus* spp. y de un mismo macho se aisló *Aerobacter-Proteus* sp.

Todos estos gérmenes aislados son uno de los factores más importantes de las reacciones inespecíficas al antígeno pullorum.

RESUMEN

Con el objeto de determinar aquellos factores que alteran la prueba de hemaglutinación para pullorosis (*Salmonella pullorum*), se examinaron 71 aves positivas al test, de ambos sexos y de 19 a 26 semanas de edad. Estas aves procedían de 7 plantales de diversos lugares del país.

Un total de 47,88% de ellas presentó reacciones atípicas al antígeno pullorum. Su análisis bacteriológico permitió identificar los siguientes microorganismos: un 2,8% de *Salmonella pullorum*; un 57,1% de *Estafilococcus epidermidis*; un 14,2% de *Micrococcus* spp.; un 11,4% de *Aerobacter aerogenes*; un 8,6% de *Proteus* sp., y un 5,7% de *Escherichia coli*. Además se identificó un 2,8% de cada una de las siguientes bacterias: *Arizona*, *Providencia* sp. y *Citrobacter* sp.

Al examen *post-mortem* de las hembras se encontró un 31% de ovarios congestivos o hemorrágicos, el 54,9% atróficos y el resto normales. De los machos, un 40% presentó testículos atróficos.

Considerando estos resultados se concluye que estos gérmenes aislados de ovarios y testículos de las aves con reacciones atípicas, podrían ser los factores más importantes que alteran la prueba de hemaglutinación rápida con sangre entera frente al antígeno pullorum.

SUMMARY

In order to determine those factors disturbing the hemagglutination test pullorum (*Salmonella pullorum*) seventy one positive chickens to this test of both sexes and from 19 to 26 weeks age, were examined.

The birds were sampled from seven poultry farms located in different areas of the country.

A total of 47.88% of the birds presented atypical reactions to pullorum antigen and its bacteriological analysis permitted to identify the following microorganisms: *Salmonella pullorum* in 2.8% of them; *Stafilococcus epidermidis* in 57.1%; *Micrococcus* spp. in 14.2%; *Aerobacter aerogenes* in 11.4%; *Proteus* sp. in 8.8%, and *Escherichia coli* in 5.7%. It was also determined a 2.8% of each of the following bacterias; *Arizona*, *Providencia* sp. and *Citrobacter* sp.

A post-mortem examination of the females showed a 31% of congested or hemorrhagic ovaries; 54.9% of them were atrophic and the rest, normal.

Forty percent of the males presented atrophic testicles and the rest of them was normal.

Considering the results obtained, it is concluded that the microorganisms found in the ovaries and testicles of the birds presenting atypical reactions could be the most important factors altering the whole blood test of agglutination to the pullorum antigen.

LITERATURA CITADA

BRUNNER, D. W. 1959. Typing of *Salmonella pullorum*. The influence of methods on results. Avian Diseases 3 (4): 373-376.

CASMAN, E. P., VALLEY, G. and ROTTGER, L. F. 1930. The serologic diagnosis of pullorum disease in domestic fowls. I. Variation in agglutinability of bac-

- terium pullorum and elimination of the so-called "cloudy" reaction. J. Immun. 18: 353-377.
- CHIFF, F., BORNSTEIN, S. and SOPHRA, I. 1941. The occurrence of *Salmonella* o-antigens in coliform organism. J. Immunol. 40: 365-372.
- EDWARDS, P. R. and BRUNNER, D. W. 1946. Form variation in *Salmonella pullorum* and its relation to X strains. Cornell Vet. 36 (4): 318-324.
- , BRUNNER, D. W., DOLL, E. R. and HERMANN, G. I. 1948. Further notes on variation in *Salmonella pullorum*. Cornell Vet. 38: (3): 255-262.
- and EWING, W. H. 1962. Identification of enterobacteriaceae. Minneapolis, Minnesota. Burgess. 340 p.
- GARRARD, E. H., MC DERMOTT, L. A., BURTON, W. H. and CARPENTER, Y. A. 1946. Non specific pullorum agglutination reactions. I. preliminary observation on fowl exhibiting non-specific reactions over on extended period. Can. J. Com. Med. 10 (12): 342-347.
- , BURTON, W. H., CARPENTER, L. A. and DERMOTT, L. A. 1947. Non specific pullorum agglutination reactions. II. post-mortem studies on fowl exhibiting non-specific reactions over on extended period. Can. J. Comp. Med. 11 (4): 102-107.
- and ———. 1948. Reactions with pullorum antigen from fowl inoculated with coliform types. Can. J. Com. Med. 12 (1): 20-25.
- GWATKIN, R. 1945. Studies in pullorum disease. V. Efficiency of homologous and heterologous antigens in detecting reacting birds in a variant-infected flock. Can. J. Com. Med. 9 (7): 183-193.
- . 1947. Studies in pullorum disease. XII. Antigenic differences in strains of *Salmonella pullorum*. Amer. J. Vet. Res. 8 (27): 204-208.
- HINSHOW, W. R. and MC NELL, E. 1944. The importance of group agglutination in pullorum disease testing programs. Proc. 48th. U.S. Livestock. San. Ass. 165-170.
- HOLM, G. C., WILLIAMS, I. K., CALLAHAN, B. F. and HALVERSEN, W. V. 1940. Some causes for false reactions with whole blood pullorum disease testing. Vet. Med. 35: 511-513.
- HURT, R. H. and MC CULLOCH, E. C. 1940. The occurrence of a gram positive coccus in birds positive to the serum plate test for pullorum disease. J. Am. Vet. Med. Ass. 46: 503-508.
- JULY, Y. R. and HIPÓLITO, O. 1970. Bactérias dos géneros *Escherichie* e *Staphylococcus* como principais causas de reações "não-pullorum" na prova da soro aglutinação rápida aplicada a pullorose. Arq. Inst. Biol. S. Paulo 37 (4): 261-268.
- MÄKELÄ, P. M. 1964. Genetic homologies between flagellar antigens of *Escherichie coli* and *Salmonella abony*. J. General Microbiology 35: 503-510.
- MATHEWS, F. P. 1926. Obscured reactions in the agglutination test for bacillary white diarrhea. J. Immunol. 11: 499-504.
- PAPAGEORGIU, C., VALETTE, L., BERENGER, G. et YOUTBERT, L. 1968. Spécificité fidélité et sensibilité des antigènes pulloriques de déspistage. Bull. Acad. Vet. Fr. 41 (3): 107-177.
- STOENESCU, VIOR, C. and SANDULESCU, S. T. 1966. Non-specific positive reactions to pullorum antigen in the rapid wholeblood agglutination test. Arhiva Vet. 1 (11): 81-94.
- STUART, C. A., WHEELER, K. M., RUSTIGIAN, R. and ZIMMERMAN. 1943. Biochemical and antigenic relationship of the paracolon bacteria. J. Bact. 45 (2): 101-119.
- VALLEY, G. and CASMAN, E. P. 1930. The serologic diagnosis of pullorum disease in domestic fowls. II. The chemical nature and the mechanism of the "cloudy" reactions. J. Immunol. 18: 379-392.
- WHEELER, K. M., STUART, C. A., RUSTIGIAN, R. and BORMAN, E. K. 1943. *Salmonella* antigens of coliform bacteria. J. Immunol. Virus Res. and Exp. Chemother 47 (1): 59-66.