



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

" I Z T A C A L A "

**FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE Klebsiella
Y OTRAS ENTEROBACTERIAS PATOGENAS
NO CLASICAS EN LECHONES**

T E S I S

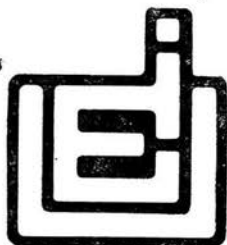
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA GABRIELA VALDES HERRERA

México, D. F.

1989



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	14
Objetivos	16
Material y métodos	17
Resultados	26
Análisis de resultados (Discusión)	32
Conclusiones	34
Bibliografía	36

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. bajo la asesoría de la Q.B.P. Graciela Castro Escarpulli y el Q.B.P. José Nazario Félix Soto.

RESUMEN

La porcicultura en México ha tenido grandes progresos, pero al exigir un mayor rendimiento económico, se han descuidado las condiciones óptimas para su desarrollo; por lo que, en las primeras etapas de vida de los cerdos aumenta el número de enfermedades infecciosas, lo que provoca un alto índice de mortalidad de estos animales. Esto es debido principalmente a *Escherichia coli*, coccidiosis, rotavirus, etc.

Se consideraba a *E. coli* como la única bacteria coliforme capaz de elaborar una enterotoxina, pero se ha descubierto que otras especies, como *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* comparten esta capacidad. La toxina de *K. pneumoniae* es termoestable, acidorresistente y dializable, su peso molecular es aproximadamente de 5000 D, se produce en anaerobiosis total, a una dosis de 0.5 µg/ml ya induce secreción de agua en el intestino. Esta toxina es muy similar a la ST de *E. coli*.

El problema de la colibacilosis es poco comprendido, ya que a veces no es detectado; por ello, este trabajo intenta demostrar la presencia de otras enterobacterias patógenas no clásicas en diarreas de lechones.

Se lograron aislar de las heces diarreicas, géneros como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, etc.; las cuales produjeron metabolitos cuyo comportamiento es comparable a la actividad LT y LT/ST, para ello se utilizó el modelo de asa ligada en rata.

INTRODUCCION

La familia Enterobacteriaceae se compone de un gran número de especies bacterianas que habitan en el intestino grueso del hombre y animales, suelos, agua y materia en descomposición. (14)

Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, todos son fermentativos, oxidasa positivos, catalasa negativos y la mayoría son móviles. (4)

En este grupo se incluye a los patógenos intestinales más importantes. Muchos bacilos entéricos no causan enfermedad al estar en el tracto intestinal de un huésped normal, pero en un huésped alterado o frente a una oportunidad de invadir otros sitios del cuerpo, pueden tener la capacidad de producir enfermedad. Esta familia de microorganismos se ha dividido en patógenos intestinales y patógenos oportunistas; como patógenos intestinales se han considerado los géneros *Salmonella* y *Shigella*, mientras que los oportunistas son aquellos géneros como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Ernterus*, *Escherichia*, etc. Todos estos bacilos en particular son capaces de producir enfermedad similar, pero la epidemiología, frecuencia, severidad y tratamiento varía según la especie. (13)

Las enterobacterias son organismos facultativos, bioquímicamente diversos y complejos. En condiciones anaerobias y/o de microaerofilia, atacan fermentativamente a los carbohidratos; pero con oxígeno suficiente, utilizan el ciclo del ácido tricarboxílico y sistema de transporte de electrones para la producción de energía. (21)

Las colonias seleccionadas de un medio de aislamiento primario, se clasifican mediante pruebas bioquímicas, en las cuales se determinan una variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. Para muchos aislamientos, las pruebas básicas son suficientes para establecer la tribu y el género; pero otros sustratos adicionales, se requieren para precisar la diferenciación de especies que corresponden a géneros particulares; ocasionalmente algunos cultivos pueden dar reacciones atípicas en una o más pruebas; con ésto, puede ser necesario ejecutar todas las pruebas bioquímicas conocidas para tener la certeza de la especie a la cual pertenecen. (21)

La porcicultura en México ha progresado en cuanto a instalaciones, nutrición y mejoramiento genético de los pies de cría. Sin embargo, esto no ha sido totalmente aprovechado, ya que al exigir mayor rendimiento económico, se han descuidado los requerimientos mínimos nutricionales, sanitarios, de instalaciones y manejo, lo que refleja un bajo número de crías destetadas y además, esto ocurre a muy temprana edad. (1) Lo anterior, lleva a un aumento de enfermedades infecciosas, sobre todo en las primeras fases de vida, ya que la protección del tracto gastrointestinal ocurre en forma activa en el intestino del cerdo y en forma pasiva a través del calostro y la leche de la madre (25); su principal componente es la inmunoglobulina secretora A (IgSA), sintetizada dentro de la glándula mamaria. En el intestino del cerdo de aproximadamente 3 días de edad, la inmunoglobulina secretora M (IgM), es la más importante en la secreción intestinal pero después de este tiempo, el nivel de IgSA se incrementa rápidamente hasta que se convierte en la

clase predominante, esta inmunoglobulina tiene propiedades únicas conferidas por una proteína covalentemente unida llamada componente secretor.

La IgSA opera en presencia de acidez y de enzimas proteolíticas; la distribución de células secretoras de IgSA en el intestino no es uniforme y se ha demostrado que estas células tienden a acumularse preferentemente a lo largo del intestino en sitios donde fue administrada la dosis original de antígenos con la cual se estimuló. También actúa la inmunoglobulina G (IgG), la cual contiene factores para inhibir la multiplicación y capacidad de proteger contra la enteritis experimental. (13)

A causa de lo anterior, el porcentaje de mortalidad va de un 20 a un 30 % tanto en México como en otros países. (1)

La colibacilosis es un término generalmente usado para indicar una enteritis de tipo agudo, a menudo fatal, que se caracteriza por una gastroenteritis en lechones lactantes, con diarrea acuosa blanca amarillenta, acompañada por una toxemia o una septicemia. Esta enfermedad se conoce también con el nombre de diarrea neonatal o diarrea del recién nacido. (6)

La diarrea infecciosa se presenta cuando uno o más gérmenes enteropatógenos, los más constantes son *Escherichia coli* y virus, infectan al intestino produciendo lesiones anatómicas y alteraciones químicas de una severidad tal que permite la evacuación de heces muy fluidas. (23,24,26)

La diarrea se define como un incremento de los líquidos en el lumen intestinal, aunado a un aumento de descargas fecales; las características de la diarrea dependerán de manera importante de la edad, dieta, época del año, etc. (20)

La mayoría de las diarreas en lechones son el resultado de una alteración del intestino delgado, existiendo 4 mecanismos principales responsables de la diarrea:

- Hipersecreción
- Mala absorción
- Permeabilidad intestinal
- Aumento de motilidad

- Hipersecreción: Es el resultado de un aumento neto de fluidos y electrolitos de la luz intestinal y por lo general se presentan pocas alteraciones de la mucosa. Funcionalmente, la secreción por la mucosa excede a la capacidad de absorción del intestino. (26)

- Mala absorción: La destrucción de las células de absorción ocasionan atrofia de las vellosidades, disminuyendo su capacidad de absorción, junto con otros productos de fermentación intensifican la presión osmótica y atraen fluidos a la luz intestinal, produciendo la diarrea y cambiando el pH. (26)

- Permeabilidad intestinal incrementada: Las lesiones inflamatorias o necróticas del intestino, pueden causar el movimiento de exudados y fluidos hacia el lumen, reduciendo la capacidad de absorción intestinal. (26)

- Aumento de motilidad: Se creía que un aumento en la intensidad y frecuencia de movimientos peristálticos no permitía la permanencia adecuada de contacto entre la mucosa y el contenido intestinal alterándose la ingestión y absorción, impidiendo la colonización del agente infeccioso. Por el contrario, lo que se ha demostrado es que en la diarrea se presenta hipomotilidad, permitiendo la colonización. (26)

Además de lo anterior, existen factores dietéticos y de manejo asociados a diarrea en lechones, como son:

- Nivel de proteínas y sal en la dieta.
- Presencia de grasas rancias en el alimento.
- Alimentos viejos o con exceso de humedad.
- Medio ambiente: cambio de temperatura, aumento de humedad, alto nivel de amoníaco.
- Edad al destete.
- Métodos de alimentación. (3)

Estos factores son importantes, ya que el hecho de evidenciar la presencia de un agente bacteriano en un problema diarreico no garantiza que éste sea el causante del problema, dado que sólo tiene un tercio de la responsabilidad en la manifestación del mismo, los otros dos tercios están en el cerdo y en el ambiente. (27)

Como se mencionó anteriormente, entre los agentes causales de diarrea en lechones, se encuentran las bacterias, de estas *E. coli* es la más estudiada. *Salmonella* sp. y *Klebsiella pneumoniae* son potentes patógenos en otros sistemas o en animales viejos, pero de significancia desconocida en el intestino de cerdos neonatales con diarrea. (1,29)

Se han hecho investigaciones con el fin de encontrar otras bacterias tales como *Klebsiella* sp., que puedan agravar el problema diarreico, habiéndose demostrado en estudios bacteriológicos de alimentos destinados al consumo de lechones, la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en cantidad comparable a la de *E. coli* enteropatógena. Posteriormente se efectuaron pruebas para el estudio de la patogenia:

- Citoadherencia por "formación de película" y
- Producción de toxinas mediante asa ligada,

con esto se encontró la capacidad enteropatógena de *K. pneumoniae*. (1)

Las klebsiellas son a menudo encontradas en el intestino humano y en el medio ambiente; además últimamente han llegado a ser importantes patógenos oportunistas en pacientes de hospital (7), particularmente en pacientes quemados, traumatizados o inmunocomprometidos (19) y se han asociado frecuentemente con enfermedades animales como la mastitis de bovinos (7). Sin embargo, los mecanismos precisos por los cuales *K. pneumoniae* causa infección es poco comprendida (19). Algunas investigaciones previas sugieren que las klebsiellas aisladas de infecciones humanas y animales son fenotípicamente indistinguibles de las cepas medioambientales, son genéticamente más diversas que las cepas de origen clínico (7). Factores de virulencia, tales como cápsulas, antígenos termolábiles y pili juegan un papel importante en infecciones causadas por *K. pneumoniae* (19). En 1978 se demostró que las klebsiellas de origen clínico pueden ser distinguidas de las cepas medioambientales por pruebas de la respuesta así llamada "coliformes fecales" (CF), (que es la producción de ácido y gas en el caldo de lactosa y sales de bilis a 44.5 °C), crecimiento en caldo nutritivo a 10 °C, producción de indol y licuefacción de pectina (7).

Dada la importancia de este patógeno oportunista, es conveniente tener un medio diferencial, selectivo, específico para la rápida detección y recuperación eficiente de *Klebsiella* sp. Este medio diferencial es llamado MC1K, ya que contiene agar Mac Conkey-Inositol Telurito de potasio, sustancia que se ha descrito como un inhibidor en el transporte de fosfato en *E. coli* y de la resistencia plasmídica mostrada por miembros de la familia Enterobacteriaceae. *Klebsiella* mostró un al-

to grado de resistencia al probarse en medios para varias enterobacterias, esta resistencia fue de origen cromosómico. Por lo tanto, se demuestra que el telurito de potasio es un buen agente selectivo para la identificación de *Klebsiella* (28).

En lo referente a las toxinas, se había considerado a *E. coli* como la única bacteria coliforme capaz de elaborar una enterotoxina, otros estudios indican que especies tales como *K. pneumoniae* y *Enterobacter rickiae*, comparten esta capacidad y son igualmente potentes a la de *E. coli*; aunque se observa diferencia entre las cepas productoras de enterotoxinas, estando ésta relacionada con la potencia de las enterotoxinas producidas. (16,18)

En particular, sobre la toxina de *K. pneumoniae*, se sabe que es una sola enterotoxina, termoestable, acidorresistente y dializable; su peso molecular es aparentemente del rango de los 5000 D. La condición óptima para la producción de ella parece ser la de anaerobiosis completa, la cual prevalece en el intestino delgado; se sabe que no está asociada a un complejo endotóxico. (15,17) A una dosis de 0.5 µg/ml, ya induce secreción neta de agua. (16) Se han aislado cepas de *K. pneumoniae* que producen tanto toxina termoestable (ST) como toxina termolábil (LT) en enfermos con psilosis tropical y en infecciones experimentales con cerdos. (17,29)

En el modelo de asa ligada en rata, tanto en el yeyuno como en el ileon, aunque en menor cantidad, la perfusión de la toxina en una solución electrolítica produjo una secreción de agua, sodio (Na^+) y cloro (Cl^-), y el transporte de bicarbonato (HCO_3^-) permaneció sin cambio; ésto no es claro, pero es posible que sea un reflejo del modelo animal empleado. El uso de la glucosa revierte el agua y sodio (Na^+) de secreción a absorción, tanto en el yeyuno como en el ileon y el transporte de cloro (Cl^-) fue revertido en el ileon. (16)

Esta toxina es muy similar a la ST de *E. coli*, también ácido-resistente, cuyo peso molecular está en el rango de los 6000 D, (17) ambas actúan muy rápidamente, provocan una respuesta de fluido detectable en el asa ileal de conejo a las 2 h; a diferencia de las toxinas de mayor peso molecular, como la LT de *E. coli* o la enterotoxina de *Vibrio cholerae*. (15,16) La ST de *K. pneumoniae* no es afectada por el calor en todas sus fracciones de filtración, mientras que la ST de *E. coli* a una temperatura de 100 °C por 30 minutos reduce, pero no suprime su actividad. Estas dos toxinas al igual que la producida por *E. coli* representan una sola toxina, química y físicamente homogénea. (17)

La cantidad de toxina producida in vitro que ha sido encontrada necesaria para producir un resultado positivo en otro sistema ha dependido de la pureza de la preparación de toxina probada y de la sensibilidad del sistema de ensayo probado. (18)

El comienzo de la acumulación neta de fluido en respuesta a ST y LT es rápida y quizá inmediata. El valor inicial de la acumulación neta de fluido de LT parece ser más baja que la de ST. En asas inoculadas con ST el volumen máximo ocurre a las 6 h de la inyección y declina posteriormente; en contraste, la acumulación de fluido a LT continúa incrementándose por al menos 18 h; por lo tanto, la respuesta neta superior observada a las 7 h (respuesta temprana) es predominantemente una función de ST, mientras que después de las 7 h (respuesta tardía) es una función de LT. Las preparaciones conteniendo actividades ST y LT pueden parecer predominantemente termostables cuando se ensayan después de 6 h y totalmente LT cuando se ensaya después de 18 h. (9)

En general, respecto a las toxinas de las bacterias coliformes, el transporte neto lumen a sangre o absorción, es señalado con un signo (+), mientras que un signo (-), se refiere al transporte neto sangre a lumen o secreción. Se ha reportado que mientras la perfusión con grandes dosis de enterotoxina de coliformes induce secreción de agua durante todo el periodo entero de recolección, concentraciones marginales más pequeñas producen secreción solamente durante algunos periodos.

Un efecto positivo de la enterotoxina se define como la presencia de secreción de agua, y la concentración mínima efectiva como la concentración de toxina preparada (en peso seco/ml) que induce secreción.

El comienzo de la acumulación neta de fluido en respuesta a ST y LT es rápida y quizá inmediata. El valor inicial de la acumulación neta de fluido de LT parece ser más baja que la de ST. En asas inoculadas con ST el volumen máximo ocurre a las 6 h de la inyección y declina posteriormente; en contraste, la acumulación de fluido a LT continúa incrementándose por al menos 18 h; por lo tanto, la respuesta neta superior observada a las 7 h (respuesta temprana) es predominantemente una función de ST, mientras que después de las 7 h (respuesta tardía) es una función de LT. Las preparaciones conteniendo actividades ST y LT pueden parecer predominantemente termostables cuando se ensayan después de 6 h y totalmente LT cuando se ensaya después de 18 h. (9)

En general, respecto a las toxinas de las bacterias coliformes, el transporte neto lumen a sangre o absorción, es señalado con un signo (+), mientras que un signo (-), se refiere al transporte neto sangre a lumen o secreción. Se ha reportado que mientras la perfusión con grandes dosis de enterotoxina de coliformes induce secreción de agua durante todo el periodo entero de recolección, concentraciones marginales más pequeñas producen secreción solamente durante algunos periodos.

Un efecto positivo de la enterotoxina se define como la presencia de secreción de agua, y la concentración mínima efectiva como la concentración de toxina preparada (en peso seco/ml) que induce secreción.

Para la determinación de enterotoxinas se han utilizado ensayos "in vitro" e "in vivo", los modelos de asas de intestino ligado de conejo y de cerdo, se utilizan para ello; con éstos modelos se obtiene información sobre los posibles efectos fisiológicos y los mecanismos de acción de las toxinas. En este ensayo se pueden emplear suspensiones bacterianas vivas, filtrados de cultivo, preparaciones de toxinas en varios estados de pureza y también puede medirse la neutralización por anticuerpos específicos. (12)

Este sistema de perfusión "in vivo" ejecutado en rata, tiene la ventaja de que responde igualmente bien a preparaciones tanto de LT como de ST y a toxinas de varias enterobacterias. Este sistema responde en forma cuantitativa al gradiente de concentraciones de las toxinas y produce una medición directa de la anomalía patofisiológica y transporte de agua alterado, por medio de las cuales las toxinas producen manifestaciones clínicas. (18)

Otra metodología que se sigue es la prueba del ratón lactante, el cual es usado ampliamente para la detección de las enterotoxinas ST de *E. coli*; aquí se observa una dilatación en el intestino del mismo a las 3 h de haber administrado un filtrado crudo de la cepa problema y además ocurre un incremento en la relación peso del intestino y peso del cuerpo. (2) La temperatura medioambiental en la cual se mantiene al ratón después de la inoculación puede influir grandemente en los resultados; los animales deben mantenerse a una temperatura de 25 °C, una temperatura de 37 °C provoca falsos resultados negativos o resultados dé-

bilmente positivos.

Los estudios indican que este ensayo es un sistema simple, rápido y reproducible; además de que correlaciona con el ensayo de asa ligada de conejo "in vivo" por 6 h para ST. (11)

ANTECEDENTES

Dentro de las diarreas de origen bacteriano, la de *E. coli* ha sido la más estudiada, otras investigaciones se han encaminado a estudiar otras bacterias enteropatógenas como *Klebsiella* sp. que agravaran el problema diarreico, y se ha encontrado que *K. pneumoniae* se presenta en cantidades comparables a la de *E. coli* enteropatógena. (Alvarez, 1985)

Se ha establecido que la colonización fugaz del intestino delgado por cepas de *E. coli* que producen enterotoxinas LT y ST es comúnmente responsable de incidentes de diarrea aguda entre niños y adultos en los trópicos. *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* se aíslan también a menudo del tracto intestinal de tales individuos y en estudios en los cuales fue examinada la enterotoxigenicidad de estas especies, algunas se fueron toxigénicas. También personas con psilosis tropical tuvieron contaminación yeyunal crónica con bacterias coliformes y cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Las cepas aisladas de estos pacientes, han demostrado ser enterotoxigénicas. (Klipstein, 1977)

Al igual que *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp., se ha aislado en epidemias esporádicas de diarrea en cerdos neonatales; ambas son patógenos potentes en otros sistemas o en animales viejos, pero de significancia desconocida en el intestino de cerdos neonatales con diarrea; a pesar de ésto, la salmonelosis es una enfermedad principal en cerdos destetados. (Wilcock, 1979)

El problema de la colibacilosis estriba en que no se ha evaluado debidamente, ni en condiciones de campo ni a nivel experimental y en muchas ocasiones no es ni siquiera detectada.

Hay diversidad de puntos de vista en torno a lo anterior, lo que muestra la complejidad del síndrome entérico y mortalidad neonatal en ganado porcino, además de la confusión reinante a nivel de campo, como de investigación derivada del conocimiento incompleto del problema.

OBJETIVOS

- Aislar e identificar *Klebsiella* sp. y otras enterobacterias patógenas no clásicas de heces diarreicas de lechones.
- Realizar pruebas de patogenicidad "in vivo".
- Demostrar la producción de toxina(s) en las cepas aisladas.
- Establecer el papel enterotoxigénico de otras enterobacterias no clásicas en el síndrome diarreico en lechones.

MATERIAL Y METODOS

Se colectaron 100 muestras de heces diarreicas de lechones procedentes de 10 granjas diferentes situadas en el Valle de Mexico; los animales muestreados fueron: recién nacidos con 26 muestras, lactantes con 52 y destetados con 22.

Las muestras se recolectaron en frascos estériles y se les adicionó agua destilada estéril con la finalidad de diluirlas. Estas fueron sembradas en placas de agar Mac Conkey y EMB por estria cruzada e incubadas durante 24 h a 37 °C. (8)

Al término de este tiempo, se seleccionaron de 3 a 5 colonias de morfología semejante, descartando aquéllas que la morfología semejava a *E. coli*. Diagrama I

Las colonias seleccionadas se sembraron en tubos y placas de BHI, incubándose a 37 °C durante 24 h, los tubos se guardaron en refrigeración (método de conservación a corto plazo), posteriormente, se realizó la identificación hasta grupo y/o género. (5) Diagrama II

Para la identificación de especie se realizaron pruebas bioquímicas diferenciales de acuerdo al criterio de King. (10) Diagramas III y IV (4,5,21,22)

Posteriormente, con las cepas obtenidas y conservadas en refrigeración, se realizaron las pruebas de determinación de toxinas ST/LT, utilizando el modelo de asa ligada en rata. (2) Diagrama V

Como material biológico se utilizaron ratas Wistar y la cepa de referencia fue *Aeromonas hydrophila* (testigo positivo), donada por el laboratorio de Bacteriología Médica de la E.N.C.B.

DIAGRAMA I
FLUJO DE TRABAJO



DIAGRAMA II
 Criterio de Cowan para la identificación de
 Enterobacterias

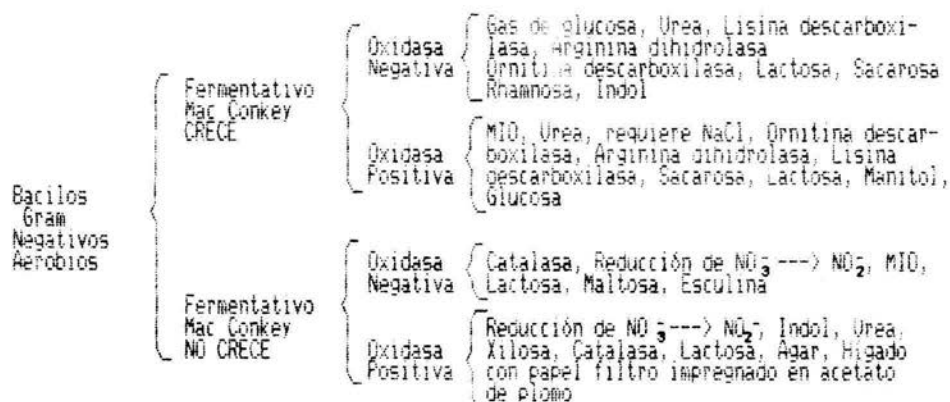
Forma	R (bastón)
Movilidad	D (reacciones diferentes)
Crecimiento aeróbico	+ (85-100 % positivas)
Crecimiento anaeróbico	+
Catalasa	+
Oxidasa	- (0-15 % positivas)
Glucosa (ácido)	+
Carbohidratos (F/O/-)	F (fermentación)

Tomado de Cowan 1979. (5)

DIAGRAMA III

Identificación de especies de Enterobacterias

Criterio de King



Tomado de Farmer, 1985 (10)

DIAGRAMA IV

PRUEBAS BIOQUÍMICAS ADICIONALES PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

LIA	Superficie		Fondo		Gas		H ₂ S		E. aerogenes		E. coli		E. aggluticans	
	R	A	R	A	-	+	-	+	K	Ø	N	K	Ø	N
Avililidad			+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol			-	+	- (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina			d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Urea	+	-	d	d	- (+)	-	+ Ø	-	-	-	-	-	-	d
Royo de metilo			+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+ Ø
Voges-Proskauer			-	-	+	-	+	+	+	+	d	d	+	Ø
Esculina			-	d	+	-	+	+	+	+	-	-	d	d
Citrato de Simmons	d	d	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	d
KCN			+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	- Ø	+
TSI	Superficie		d	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-
	Fondo		A	A	A	+	+	+	A	A	A	A	A	A
H ₂ S		+		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa			d	-	d	- Ø	+	+	+	+	-	-	+	- d
Leche tomosolada	A		A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A
	R						C	C	C	C	C	C	C	C
	C													

Simbolos empleados en las tablas

- R rojo (determinación oxidativa)
- A ácido
- K alcalino
- 0 - 15 % de las cepas son positivas
- d 16 - 84 % de las cepas son positivas
- + 85 - 100 % de las cepas son positivas
- () reacción retardada en una prueba o crecimiento tardío

Tomado del: Cowan (1979), Joklik (1983), Lennette (1974) y Mac Faddin (1980)

Determinación de presencia de toxinas LT

Técnica de asa ligada en rata: se utilizan ratas Wistar de 2-3 meses de edad, con un peso aproximado de 275-325 g; éstas se mantienen en ayuno de 24 a 36 h antes de la intervención. Se anestesian con pentobarbital sódico (Anestesal, laboratorio Norden) a una concentración de 325 mg/ml, a una dosis de 0.25 ml, administrando intraperitonealmente. Una vez anestesiada se sujeta a una rejilla de metal y se le aplica en el abdomen una solución de yodo al 10 %, posteriormente se le hace un corte longitudinal en la línea alba, se separan los músculos para exponer las vísceras abdominales y se liga el intestino delgado con sutura quirúrgica "Curex" 3/0; se ligan varios segmentos de intestino con una longitud de 2-3 cm, dejando entre ellos segmentos ligados con una longitud de 0.5 cm; los cuales se dejan en blanco. El primer segmento se deja sin inocular y posteriormente se inocula el testigo negativo; en los siguientes segmentos se inocula 0.3 ml del sobrenadante de cada cepa problema, dejando siempre entre ellos un segmento en blanco. El testigo positivo se inocula en el penúltimo segmento.

En cada rata se inoculan de 8 a 10 cepas más los testigos; la prueba se realiza por duplicado para cada cepa.

Posteriormente, se sutura primero la capa muscular y después la piel, y se les aplica un poco de yodo sobre la sutura, depositando a la rata nuevamente en su jaula suministrándole solamente agua; el sacrificio para realizar las lecturas se realiza a las 6 y 24 h respectivamente.

Después de este tiempo se cortan las uniones tanto de piel como del músculo, se localiza la porción ligada de intestino y se separa del resto del cuerpo colocándolo en cajas Petri en 15 x 150 mm las que contienen solución salina, realizando la lectura por acumulación de líquido y aumento de tamaño de las asas ligadas. (2)

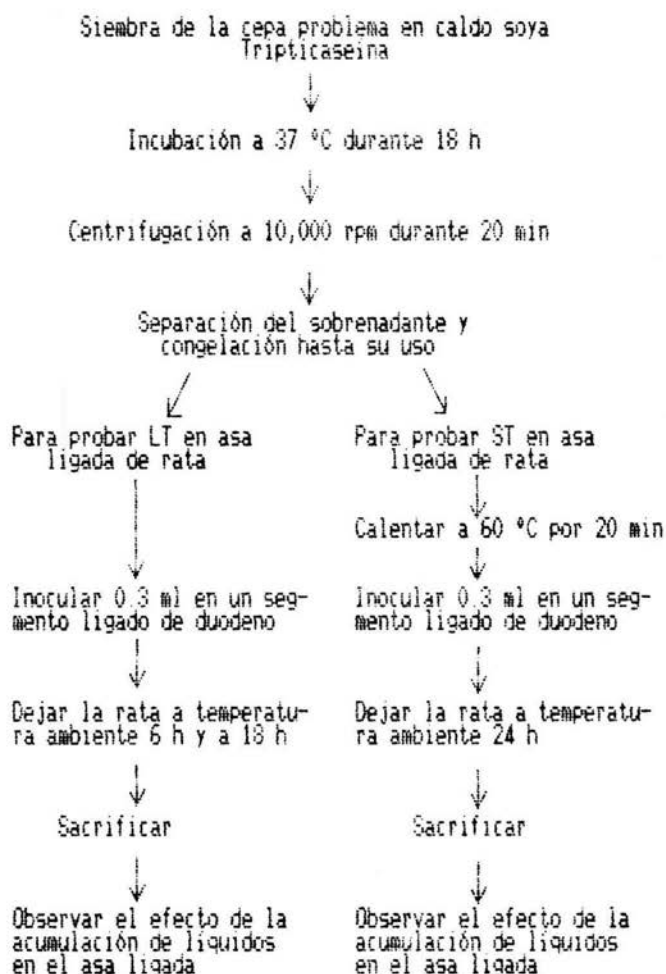
Determinación de toxinas ST

Se siguió el mismo procedimiento anterior, únicamente que los sobrenadantes se sometieron a un tratamiento con calor a 60 °C durante 20 minutos y se realizó únicamente con las cepas positivas de la técnica anterior, leyéndose los resultados a las 24 h. (2) Diagrama V

Todas las cepas positivas se conservan a corto plazo (gelosa especial), y a largo plazo (liofilización), para realizar trabajos posteriores.

DIAGRAMA V

Obtención del sobrenadante para probar ST/LT



Tomado de Angulo (1983) (2)

RESULTADOS

El mayor número de cepas aisladas se obtuvo en el grupo de lactantes con 54, en neonatos 39 y en destetados solamente 31.

El total de muestras positivas fue de 76, y de estas, el 46.05 % correspondió a las muestras de lactantes, 31.58 % a neonatos y el 22.37 % a destetados; el número de muestras negativas fue de 24.

De las muestras trabajadas, se obtuvo de neonatos 92.31 % de muestras positivas, de destetados un 77.27 % y 67.31 en lactantes. (Tabla 1)

En cuanto a las especies aisladas, fue *Enterobacter agglomerans*, la que con mayor frecuencia se encontró con 63 cepas, correspondiendo a un 50.81 %, seguida de *Klebsiella pneumoniae* con 15 cepas y un 12.10 % y *Enterobacter aerogenes* con 13 cepas y un 10.48 %. El resto de especies identificadas se encontraron en porcentajes bajos. El grupo de cepas no identificadas fue de 18, que representan un 14.52 %. (Tabla 2)

Respecto a la distribución de las cepas aisladas en los distintos grupos estudiados, como se mencionó anteriormente, la mayoría se presentó en lechones lactantes, en donde también hubo una mayor variedad de especies aisladas (9 diferentes), y en neonatos se encontró una variedad menor (5 especies diferentes). (Tabla 3)

Al estudiarse la toxicidad de las cepas, se obtuvo un resultado negativo en 77 de 124; 27 correspondieron solamente a LT y 20 tanto a LT como a ST, respecto a ST no se obtuvo ninguna cepa positiva. (Tabla 4)

TABLA 1. Clasificación de muestras y distribución de cepas aisladas.

	Total muestras	Muestras positivas	Muestras negativas	cepas aisladas
Neonatos	26	24	2	39
Lactantes	52	35	17	54
Destetados	22	17	5	31
Total	100	76	24	124

TABLA 2. Porcentaje de cepas aisladas

	Total cepas	Porcentaje de aislamiento
<u>Enterobacter agglomerans</u>	63	50.81
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	15	12.10
<u>Enterobacter aerogenes</u>	13	10.48
<u>Proteus vulgaris</u>	4	3.23
<u>Proteus mirabilis</u>	3	2.42
<u>Providencia sp.</u>	3	2.42
<u>Edwardsiella tarda</u>	2	1.61
<u>Enterobacter cloacae</u>	1	0.81
<u>Enterobacter hafniae</u>	1	0.81
<u>Proteus morganii</u>	1	0.81
No identificadas	18	14.52
T o t a l	124	100.02

TABLA 3. Distribución de las cepas aisladas e identificadas en los diferentes grupos estudiados.

	Neonatos	Lactantes	Destetados
<u>Enterobacter agglomerans</u>	19	32	12
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	10	4	1
<u>Enterobacter aerogenes</u>	6	3	4
<u>Proteus vulgaris</u>	1	1	2
<u>Proteus mirabilis</u>	0	3	0
<u>Providencia sp.</u>	0	0	3
<u>Edwardsiella tarda</u>	1	1	0
<u>Enterobacter cloacae</u>	0	0	1
<u>Enterobacter hafniae</u>	0	1	0
<u>Proteus morganii</u>	0	1	0
No identificadas	2	8	8
T o t a l	39	54	31

TABLA 4. Distribución de toxina LT y ST en las cepas aisladas.

	LT	LT/ST	Negativas
<u>Enterobacter agglomerans</u>	16	8	39
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2	5	8
<u>Enterobacter aerogenes</u>	2	2	9
<u>Proteus vulgaris</u>	0	0	4
<u>Proteus mirabilis</u>	2	1	0
<u>Providencia sp.</u>	0	0	3
<u>Edwardsiella tarda</u>	0	1	1
<u>Enterobacter cloacae</u>	0	1	0
<u>Enterobacter hafniae</u>	1	0	0
<u>Proteus morganii</u>	0	1	0
No identificadas	4	1	13
T o t a l	27	20	77

ANÁLISIS DE RESULTADOS

(Discusión)

La utilización de las pruebas bioquímicas siguiendo los criterios de Cowan y King, fue adecuada para lograr una óptima identificación de las enterobacterias. Diagramas II y III

El hecho de que de lechones lactantes se dispusiera de un mayor número de muestras y por lo tanto se obtuvieran la mayoría de las cepas, es porque en esta etapa, estos animales son más susceptibles al ataque de microorganismos, y en consecuencia, padecen más enfermedades.

Del total de muestras tratadas por grupo, las positivas representan un porcentaje muy alto, lo que refleja un buen manejo de las muestras (toma y transporte), un adecuado aislamiento y una buena conservación de las cepas. (Tabla 1)

De las muestras trabajadas, se logró aislar una buena cantidad de enterobacterias patógenas no clásicas, a pesar del abundante desarrollo de coliformes en los medios de cultivo utilizados. (Tabla 1)

Las cepas consideradas como no identificadas, fueron debidas a que no se recuperaron en las resiembras, y aquellas que estaban contaminadas desde el principio no se pudieron purificar a pesar de que se resembraron en medios selectivos por su crecimiento mucoso. (Tabla 2)

No se puede tener la certeza de que se obtuvieran las toxinas de estas enterobacterias, debido a que no se utilizaron las técnicas para la purificación de ellas, lo cual da pie a que se realicen estudios

posteriores, por lo tanto, solo se puede hablar de metabolitos cuyo comportamiento es similar a una toxina en cuanto a pruebas de patogenicidad en el modelo animal utilizado.

La mayoría de las cepas que presentaron toxicidad se comportaron como LT, y en menor número como LT/ST, esto puede deberse a que las toxinas generalmente responden a LT de acuerdo al tiempo de ensayo y a la pureza del producto. (Tabla 4)

Posiblemente de haberse utilizado caldo CASOY en vez de caldo soya tripticaseína para el crecimiento de las cepas en las pruebas de patogenicidad, el número de cepas positivas a la prueba sería mayor, ya que el caldo CASOY se ha considerado más adecuado para estos estudios.

(11) Diagrama V

El modelo de asa ligada en rata demostró ser de gran utilidad para poner de manifiesto la toxigenicidad de las cepas probadas, además demostró ser un modelo accesible respecto a su obtención y mantenimiento, económico y fácil de manejar, aunado a que los resultados de él son confiables y reproducibles.

CONCLUSIONES

Los criterios de identificación usados fueron muy precisos para establecer las especies a las que pertenecían estas enterobacterias.

El síndrome diarréico se presenta con más frecuencia en lechones lactantes (2 a 6 semanas de edad).

La época del año junto con las condiciones medioambientales y otros factores, influyen en la presencia de diversos enteropatógenos no clásicos en las muestras trabajadas. (3)

Es necesario considerar que en los trabajos de frecuencias de aislamiento de microorganismos, es difícil llegar a identificar el 100 % de las cepas:

- a) algunas de las cepas son muy sensibles a las condiciones de conservación a corto plazo.
- b) otras cepas, debido a su consistencia, son muy difíciles de purificar y permanecen contaminadas aún después de varios intentos de purificación.

El porcentaje de aislamiento de *K. pneumoniae* en lechones neonatos y lactantes, pone de manifiesto que ésta no solo se puede encontrar en cerdos adultos y en otros sistemas de los mismos, como se indica en algunos reportes.

Principalmente se obtuvo una actividad LI en las "toxinas" probadas, lo cual pudo deberse al tiempo de ensayo de las pruebas.

La técnica de asa ligada en rata resultó ser un método fácil, económico, confiable y reproducible para probar la toxigenicidad.

En las diarreas de lechones participan otras enterobacterias de las que tradicionalmente se consideran no patógenos.

Es necesario purificar las "toxinas" obtenidas para posteriores investigaciones y para poderlas caracterizar completamente.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alvarez, M.C. 1985. Patogenia de la *Klebsiella pneumoniae* (sensu lato) en la diarrea de lechones. Avances en enfermedades del cerdo. AMVEC. México. 353-355.
- 2) Angulo, B.G. 1983. Determinación de antígeno K 99 y enterotoxinas LT y ST en cepas de *Escherichia coli* aisladas de terneros con diarrea. Tesis profesional (Q.B.P.) E.N.C.B. I.P.N. México. 19-22.
- 3) Bravo, O.F. 1985. Diarreas por nutrición y mal manejo. Avances en enfermedades del cerdo. AMVEC. México. 335-338.
- 4) Carter, G.R. 1979. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology. 3rd. ed. Charles, C. Thomas publisher. Illinois, U.S.A. 83-98.
- 5) Cowan, S.T. y Steel, K.J. 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. CECSA. México. 154,156,157.
- 6) Dunne, H.W. 1975. Colibacillosis and edema disease en: Diseases of Swine. 4rt. ed. Ed. by Lemon, A.D. The Iowa State University Press, U.S.A. 650.

- 7) Edmonson, A.S., Cooke, R.M., Wilcock, A.P.D. y Shinebaum, R. 1980. A comparison of the properties of *Klebsiella* strains isolated from different sources. *Journal Medical Microbiology*. 13:541-550.
- 8) Estrada, C.A. y Enríquez, E.C. 1983. Diagnóstico simplificado de las diarreas infecciosas más comunes en lechones. *Veterinaria Mexicana*. Mexico. 14(2):93-102.
- 9) Evans, D.G., Evans, D.J. y Pierce, N.F. 1973. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 7(6):873-880.
- 10) Farmer, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner, F.W. y otros. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical species. *Journal of Clinical Microbiology*. 21(1):1-22.
- 11) Gianella, R.A. 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infection and Immunity*. 14(1):95-99.
- 12) Herrera, M.A.P. 1987. Determinación de enterotoxina termolábil (LT), citotoxinas VERO (VT) y semejante a shiga (SLT) en cepas de *E. coli* aisladas de niños con y

sin diarrea. Tesis profesional (Q.B.P.) E.N.C.B. I.P.N. Mexico. 7-11.

- 13) Husband, A.J. y Bennell, M.A. 1980. Intestinal immunity in pigs. Pig news and information. 1(3):211-213.
- 14) Joklik, W. K., Willet, H.P. y Amos, D.B. 1983. Microbiología Zinsser. Ed. Médica Panamericana. 17a. ed. Argentina. 673-693.
- 15) Klipstein, F.A. y Engert, R.F. 1975. Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue III. Preliminary characterization of *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin. Journal of Infectious Diseases. 132(2):200-203.
- 16) Klipstein, F.A., Horowitz, I.R., Engert, R.F. y Schenk, E.A. 1975. Effect of *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin on intestinal transport in the rat. Journal of Clinical Investigation. 56(3):799-807.
- 17) Klipstein, F.A. y Engert, R.F. 1976. Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat stable enterotoxin. Infection and Immunity. 13(2):373-381.
- 18) Klipstein, F.A., Engert, R.F. y Short, H.B. 1977. Relative enterotoxigenicity of coliform bacteria. Journal of Infectious diseases. 136(2):205-215.

- 19) Koo, F.C.W. y Stein, M.D. 1986. Detection of an extracellular toxin produced by burn isolates of *Escherichia pneumoniae* enterotoxin. *Current Microbiology*, 13(1):23-27.
- 20) Larios, G.F. 1985. Patología del sistema digestivo: diarreas del cerdo. *Avances en enfermedades del cerdo*. AMVEC. México. 327-329.
- 21) Lennette, E.H., Spaulding, E.H. y Truant, J.P. 1974. *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd. ed. American Society for Microbiology. U.S.A. 189, 198, 200-203.
- 22) Mac Faddin, J.F. 1980. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Panamericana. México. 18, 31-32, 45-47, 112-117, 121-125, 134-136, 178-181, 184-187, 190-193.
- 23) Martell, D.M. y Pérez, H.F. 1985. Consideraciones sobre las diarreas de los lechones. *Avances en enfermedades del cerdo*. AMVEC. México. 321-322.
- 24) Martínez, M.A. editor. 1986. *Colibacilosis*. *Avances en medicina veterinaria*. México. 1(5):199-206.

- 25) Morilla, G.A. 1985. Inmunidad del tracto gastrointestinal. Avances en enfermedades del cerdo. AMVEC. México. 331-333.
- 26) Ocampo, C.L., Sumano, L.H. - 1985. Fisiología de la diarrea. Avances en enfermedades del cerdo. AMVEC. México. 323-326.
- 27) Ramirez, N.R. 1985. Diarreas del cerdo producidas por bacterias. Avances en enfermedades del cerdo. AMVEC. México. 339-344.
- 28) Tomás, J.M., Ciurana, B. y Jofre, J.T. 1986. New, simple medium for selective, differential recovery of *Klebsiella* sp. Applied and Environmental Microbiology. 51(6):1361-1363.
- 29) Wilcock, B.P. 1979. Experimental *Klebsiella* and *Salmonella* infection in neonatal swine. Canadian Journal of Comparative Medicine. 43:200-206.