

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**RESISTENCIA Y VIABILIDAD DEL MICOPLASMA MICOIDES VARIEDAD CAPRI
(CEPA PUEBLA) A DIFERENTES AGENTES FISICOS DEL MEDIO AMBIENTE**

T R A B A J O E S C R I T O

**QUE PARA PRESENTAR
EXAMEN PROFESIONAL DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
FUE DESARROLLADO POR:**

JESUS ALFREDO SANCHEZ PACHECO

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL

- 1 9 7 0 -



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 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

RESISTENCIA Y VIABILIDAD DEL MICOPLASMA MICOIDES
VAR. CAPRI "cepa PUEBLA" A DIFERENTES AGENTES FI
SICOS DEL MEDIO AMBIENTE.

TESIS

JESUS ALFREDO SANCHEZ PACHECO

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MI TIA

A MI ASESOR

M.V. RICARDO MORENO CHAN

AL

M.V.Z. CARLOS GUTIERREZ M.

INTRODUCCION

La Pleuropneumonía Contagiosa Caprina es una entidad clínica descrita en México desde 1964, la cual es producida -- por el *Micoplasma micoides* var. *capri* (8).

Esta entidad patológica fue conocida desde 1873, por los trabajos de Thomas en Argelia (5); sin embargo, no es sino hasta el año de 1949 en que Shirlow y posteriormente en 1951 - Longley que establecen en forma definitiva la naturaleza etiológica de esta enfermedad (8).

Esta afección se presenta en algunos países Europeos como Alemania, Italia, Grecia, Bulgaria, Oeste de Francia y España, Este y Oeste del Continente Africano, así como países -- del Medio Oriente como la India, Pakistán y Turquía en donde -- tiene considerable importancia económica (4-5-12).

En la República Mexicana, Aluja de S.A. en una granja en el Estado de Puebla en febrero de 1964, describe clínica y patológicamente un caso de Micoplasmosis (1).

De este caso clínico R. M. Chan aisló un agente que patológica y serológicamente fue identificado como *Micoplasma micoides* var. *capri*, utilizando pruebas diferenciales de Fijación de Complemento (7). Esta cepa, es la "cepa Puebla" objeto del presente estudio y cuyo nombre obedece a razones de su -- procedencia.

En México la Pleuropneumonía Contagiosa Caprina ha -- tomado una gran importancia debido a que es una infección que se encuentra ampliamente diseminada en varios estados de la -- República (3).

En esta consideración, y para contribuir al estudio de la naturaleza biológica de esta cepa, el propósito de este-

trabajo experimental es el de conocer cuales son los posibles efectos que distintos agentes físicos podrían ejercer sobre el *Mycoplasma micoides* var. capri "cepa Puebla", cuando éstos son inducidos bajo condiciones de laboratorio sobre él mismo.

Los agentes experimentados cuyos efectos sobre la -- "cepa Puebla" se escribirán; fueron, la temperatura en distintos grados, deshidratación y la congelación a -80°C y descongelación a 37°C .

MATERIALES Y METODOS

Los medios sintéticos enriquecidos con suero de caballo en que se propagó la "cepa Puebla" de *Mycoplasma micoides* var. capri fueron los siguientes:

Caldo Infusión de Corazón ★ C.I.C.- Este medio de cultivo consistió en Caldo Infusión de Corazón con 1% de proteosa peptona No. 3 y 1% de extracto de Levadura. Todos estos ingredientes fueron disueltos en agua destilada estéril, el pH -- ajustado a 7.9 con solución 10/N de NaOH, envasados en tubos -- con tapón de baquelita de 20 ml. de capacidad y esterilizados en la autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos, manteniéndose en refrigeración hasta el momento de su uso en que fueron enriquecidos con un 10% de suero estéril de caballo, inactivado a 56°C. durante 30 minutos y luego adicionados de 500 U.I. de penicilina G. sódica cristalina por ml. de medio y una solución de acetato de talio en la proporción de 1 a 4000.

Agar Infusión de Corazón ★ A.I.C.- Este medio de cultivo consistió en Agar Infusión de Corazón con 1% de proteosa peptona No. 3 y 1% de extracto de levadura. Los ingredientes -- anteriores fueron disueltos en agua destilada estéril, y ajustado el pH a 7.9 con una solución de NaOH 10/N; que luego se -- esterilizó en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos, y enfriado a 56°C. fue adicionado de un 10% de -- suero estéril de caballo, 500 U.I. de penicilina G sódica -- cristalina por ml. de medio y acetato de talio en la proporción de 1 a 4000. El medio se distribuyó en cajas de Petri de 40mm de diámetro dejándose a la temperatura de 23°C durante 6 u 8 -- horas después de las cuales, se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

★ Todos los reactivos utilizados en estos medios fueron de los Labs. Difco.

Estos medios antes de ser utilizados en los experimentos fueron rigurosamente probados por su capacidad para promover el crecimiento del *Mycoplasma* en estudio.

Cepa Puebla de *Mycoplasma micoides*.- Esta cepa fue obtenida de un caso de Pleuropneumonía Caprina Contagiosa que se presentó en el Estado de Puebla (1) por lo cual recibe ese nombre.

Después de ser comprobada su virulencia en una cabra susceptible de la que se recuperó de exudado pleural en forma pura, fue envasada en ampollitas de 1 ml. liofilizada y guardada así en condiciones de refrigeración hasta el momento oportuno de su uso de acuerdo como fue requerida en cada uno de los experimentos conducidos.

Diseño Experimental.- Puede decirse que éste varió - en cada uno de los cuatro experimentos realizados en este estudio.

EXPERIMENTO No. 1.- Se investigó el efecto de la temperatura que consistió en exponer al microorganismo en estudio a la temperatura constante de 56°C en "baño maría" y a diferentes tiempos de exposición, como fueron 0, 15, 30, 45 y 60 minutos, tiempos precisos en los que se exploró el número de microorganismos que fueron inactivados, utilizando la técnica de la cuenta de colonias en medio de agar; y en el que se consideró el crecimiento de una colonia de *Mycoplasma* como un microorganismo viable. Esta exploración fue posible mediante el procedimiento de diluciones decimales en caldo infusión de corazón, practicada en cada una de las muestras expuestas a la temperatura en diferentes tiempos. Cada una de las diluciones practicadas hasta 10^{-6} , fueron exploradas por el número de microorganismos utilizando 2 cajas de agar por dilución.

El efecto de la temperatura en este experimento fue rigurosamente controlado por una muestra testigo evaluada a la 0 horas de estudio.

EXPERIMENTO No 2.- En este experimento se estudió el posible efecto de la liofilización sobre el *Micoplasma micoides* var. capri "cepa Puebla".

Para el efecto de un cultivo de 48 hrs. en caldo infusión de corazón se envasó 1 ml. del mismo en 10 ampolletas - de 5 ml. de capacidad. De estas ampolletas una fue inmediatamente explorada por la técnica de las diluciones decimales en serie, y su cultivo subsiguiente en cajas de agar, para conocer el número de microorganismos viables existentes en el momento de realizar el envasado, y sirvió así como testigo de referencia de la cantidad de micoplasma utilizado. Las otras 9 ampolletas conteniendo exactamente la misma cantidad de cultivo -- que la ampolleta testigo fueron inmediatamente liofilizadas -- utilizando una liofilizadora VirTis Freeze-Mobile pequeña de laboratorio. Inmediatamente después de que la liofilización se logró en estas 9 ampolletas experimentales, una de ellas fue -- separada para investigar exactamente igual que como en la testigo, la cantidad de microorganismos presentes, buscando en -- cualquier diferencia posible el efecto directo de la liofilización. Las 8 ampolletas restantes se almacenaron en condiciones de refrigeración para luego ser exploradas también por la cantidad de microorganismos presentes a 24 horas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 semanas en que se dió por concluida la exploración. Esto -- último fue una pequeña introducción en la exploración de la estabilidad de la "cepa Puebla" en condiciones de deshidratación.

EXPERIMENTO No. 3.- Este experimento se hizo para estudiar el efecto del medio ambiente sobre la "cepa Puebla" del *Micoplasma micoides*; y para este fin, un cultivo de 48 hrs. en

caldo infusión de corazón se distribuyó en cantidades de 1 ml. en 8 ampolletas de 5 ml. de capacidad. De estas ampolletas una fue inmediatamente explorada por la técnica de las diluciones decimales en serie y su cultivo en cajas de agar, para conocer el número de microorganismos viables existentes en el momento de realizar el envasado, y servir así como testigo de referencia de la cantidad de *Micoplasma* en el cultivo utilizado. Las otras 7 ampolletas conteniendo la misma cantidad de cultivo - que la ampolleta testigo fueron cerradas a temperatura ambiente de 22°C, para después ser estudiadas por la cantidad de - - microorganismos viables a los distintos periodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 semanas en que se dio por terminada la exploración.

Todos los cultivos exploratorios en agar infusión de corazón fueron evaluados hasta después de 72 hrs. de incubación a 37°C.

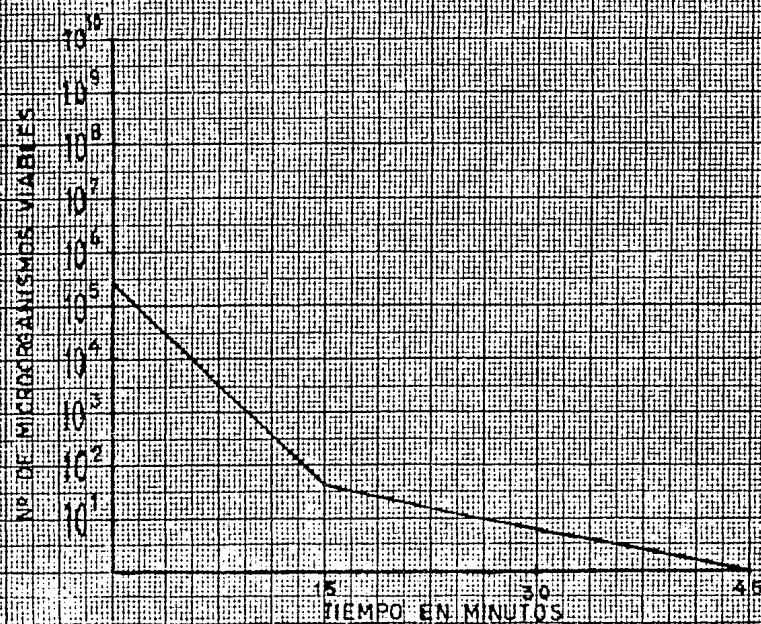
EXPERIMENTO No. 4.- Este fue diseñado para explorar el posible efecto de la congelación y descongelación sobre la "cepa Fuebla" de *Micoplasma micoides*. De un cultivo joven de - 48 hrs. en caldo infusión de corazón, se tomaron 10 ml. del -- mismo, que fueron colocados en un tubo de vidrio con tapón de baquelita donde se sometieron a la acción de varios ciclos rápidos de congelación a -80°C, obtenidos con una mezcla de hielo seco y alcohol atílico, y de descongelación rápida también lograda por la inmersión del cultivo congelado en "baño maría" a 37°C. Después de cada ciclo de congelación y descongelación que tomaron periodos experimentales de 3 minutos de tiempo, se exploraron las cantidades de microorganismos habiéndose efectuado estudios exploratorios hasta después de 5 ciclos de congelación y descongelación. Como referencia de la cantidad original de microorganismos que contenía el cultivo usado en este experimento, e inmediatamente antes de recibir los tratamientos -- respectivos se practicó la titulación correspondiente en cajas de agar donde se calculó la concentración original de *Micoplasma micoides* var. *capri*.

RESULTADOS

Los efectos que sobre la viabilidad del *Mycoplasma micoides* var. capri "cepa Puebla" tuvieron algunos agentes -- físicos como la temperatura a 56°C, temperatura ambiente, liofilización, refrigeración en forma liofilizada y varios ciclos de congelación y descongelación, se muestran claramente en las tablas I, II, III y IV y también en las gráficas 1, 2, 3, 4 y 5 donde se trató de representar en forma fácil el efecto que -- sobre la viabilidad del microorganismo tuvieron en este experimento los agentes físicos ya mencionados.

TABLA 1. Efecto de la temperatura de 56°C. a distintos periodos de tiempo sobre la viabilidad del *Micoplasma micoides* var. capri "cepa Puebla"

Nº INICIAL DE MICRO - ORGANISMOS.	Microorganismos viables a distintos tiempos de exposición (min.)			
	1 5	3 0	4 5	6 0
4.1 X 10 ⁵	6.1 X 10	7	0	0

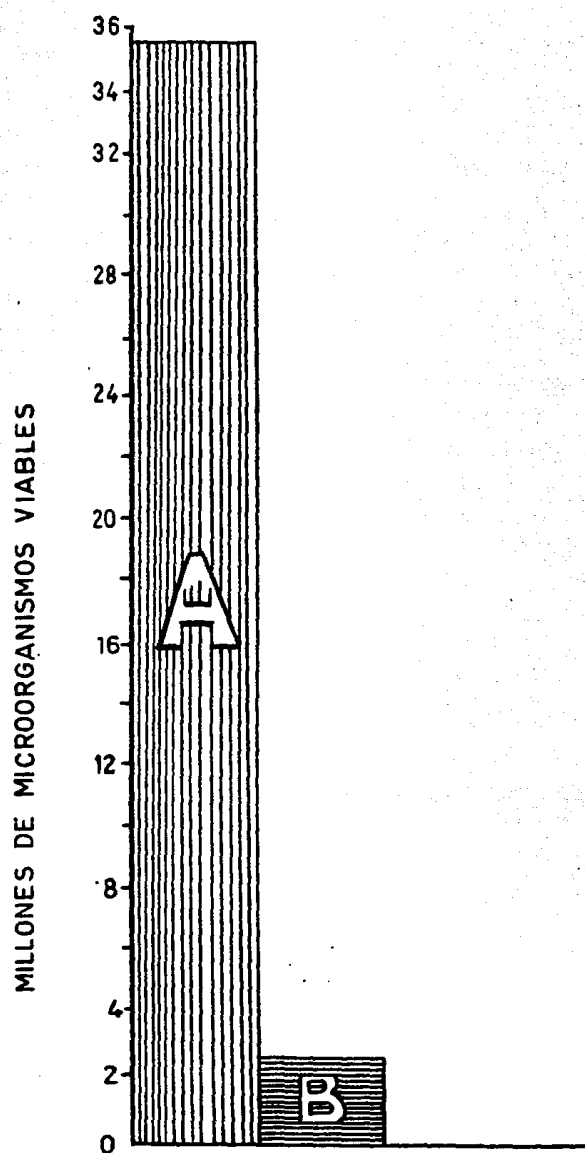


GRAFICA 3.- Viabilidad del *Mycoplasma micoides* var. *capri* "cepa Puetta" a diferentes tiempos de exposición a 56°C. de temperatura.

TABLA II Efecto de la liofilización sobre *Mycoplasma micoides* var capri "cepa Puebla" y estabilidad del mismo en refrigeración y en forma liofilizada.

Nº INICIAL DE MICOPLASMA VIABLE.	Microorganismos viables inmediatamente después de la liofilización y a distintos periodos.							
	0 hrs. ^(a)	24 hrs.	1 sem.	3 sem.	4 sem.	5 sem.	6 sem.	7 sem.
3.58×10^7	2.3×10^6	2.48×10^6	2.36×10^6	2.59×10^6	2.75×10^6	2.43×10^6	2.43×10^6	2.39×10^6

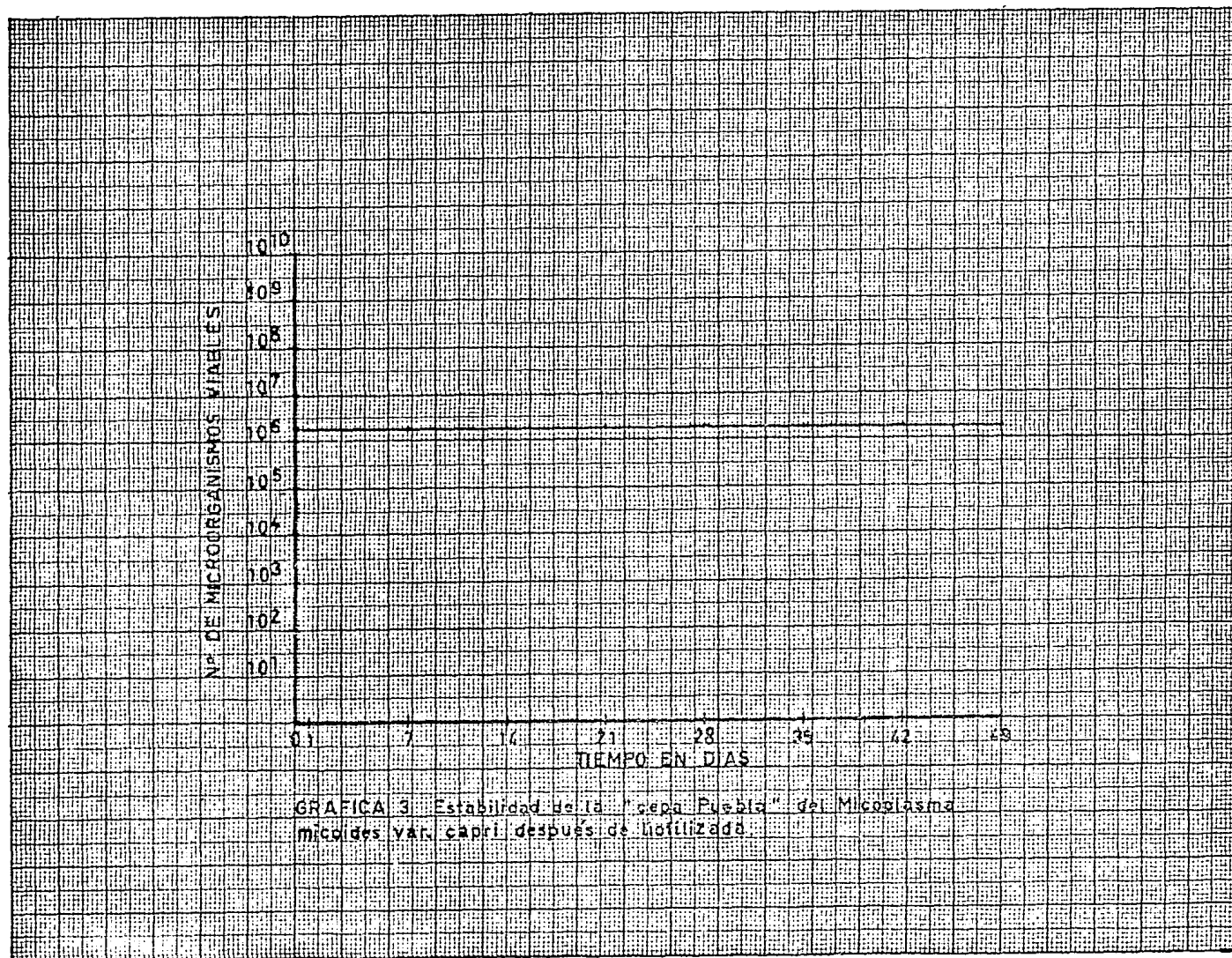
a) Inmediatamente después de haber sido liofilizado.

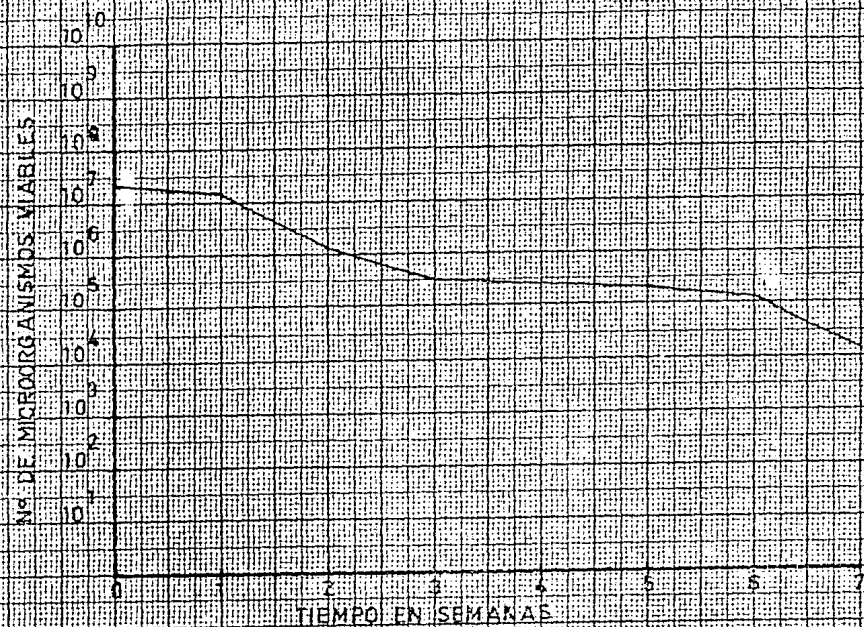


GRAFICA 2.- Efecto de la liofilización sobre la -
"cepa Puebla" del *Mycoplasma micoides* var. capri.
A.- Antes de liofilizar.
B.- Después de liofilizar.

TABLA III. - Estabilidad del *Mycoplasma micoides* var. *capri* "cepa Puebla " a temperatura ambiente de 22°C. en medio líquido de Caldo Infusión de Corazón.

Nº INICIAL DE MICO- PLASMA VIABLE.	MICROORGANISMOS VIABLES A DISTINTOS PERIODOS DE ESTUDIO.					
	1 sem.	2 sem.	3 sem.	5 sem.	6 sem.	7 sem.
3.58×10^7	1.6×10^7	1.36×10^6	5.02×10^5	3.12×10^5	1.33×10^5	1.58×10^4



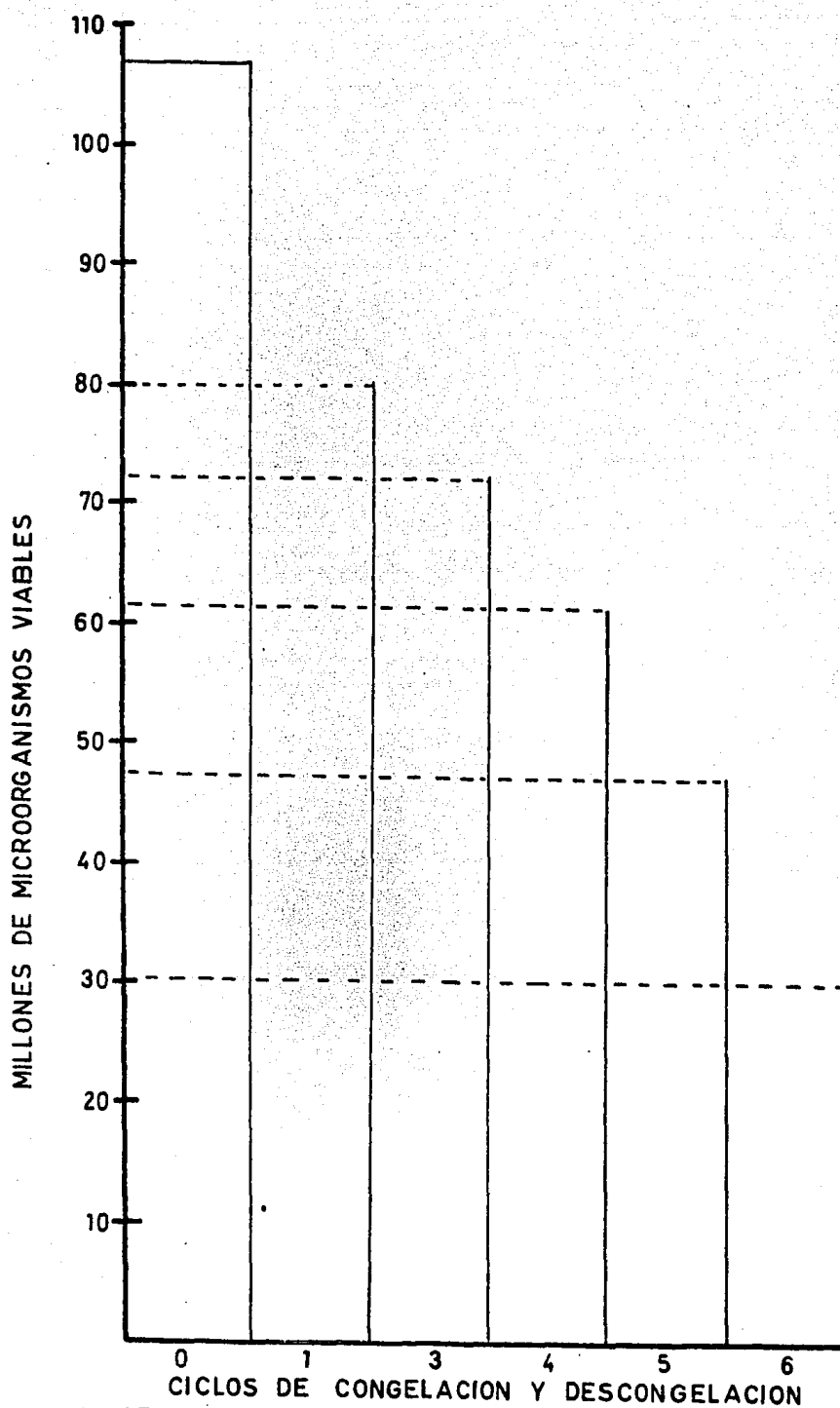


GRAFICA 4.- Estabilidad del *Mycoplasma Inco dos var. capri*, "cepa Puebla" a temperatura ambiente de 22°C , en medio líquido de caldo infusión de corazón.

TABLA IV.- Efecto de la congelación rápida a $-80^{\circ}\text{C}.$ y descongelación inmediata con "baño - maria" a $37^{\circ}\text{C}.$ sobre el micoplasma micoides var. capri "cepa Puebla".

Nº INICIAL DE MICROOR - GANISMOS.	MICROORGANISMOS VIABLES DESPUES DE CADA CICLO DE CONGELA - CION Y DESCONGELACION. ^(a)				
	1	3	4	5	6
1.07×10^8	8.015×10^7	7.245×10^7	6.175×10^7	4.645×10^7	3×10^7

(a) La duración de cada ciclo fué de aproximadamente 3 minutos.



GRAFICA 5.- Efecto de la Congelación rápida a -80°C . y descongelación inmediata a 37°C . sobre *Mycoplasma micoides* var. capri "cepa Puebla".

DISCUSION

1.- La "cepa Puebla" del *Micoplasma micoides* expuesta a 56°C en "baño maría", fue afectada en forma drástica en el primer periodo de exposición de 15 minutos, quedando unos cuantos microorganismos, los cuales fueron inhibidos en los dos siguientes periodos que fueron de 30 y 45 minutos. Por lo tanto, la inhibición total se obtuvo a los 45 minutos de exposición, siendo estos resultados semejantes a los obtenidos por otros autores (12).

2.- La liofilización afectó a la "cepa Puebla" del *Micoplasma micoides* en 93.5%, sin embargo, los microorganismos sobrevivientes permanecieron viables y en cantidades constantes durante el tiempo en que se realizó este experimento. En los resultados obtenidos se observa que el número de microorganismos en 0 horas es menor que en los demás tiempos, lo cual nos indica que tal vez hubo un error en el conteo de microorganismos.

3.- El *Micoplasma micoides* var. capri "cepa Puebla" expuesto a la temperatura ambiente en medio líquido de caldo - infusión de corazón, fue inhibido lentamente. Este efecto pudo ser debido tal vez a un agotamiento en el medio de principios nutritivos, cambio en el pH, que hicieron que las condiciones de supervivencia de los microorganismos no fueran ideales.

4.- La congelación rápida y la descongelación inmediata afectó en un 72% la viabilidad de la "cepa Puebla" en los 6 ciclos efectuados. Como se puede observar en la gráfica 5, el efecto alcanzó en el primer ciclo hasta un 24% de inactivación, para luego experimentar en los siguientes ciclos, como se pueda observar en la gráfica más inactivación pero de menor valor -- hasta la terminación del experimento.

CONCLUSIONES

1.- La temperatura de 56°C fue capaz de inactivar a la "cepa Puebla" del *Mycoplasma micoides* var. capri en un -- periodo de 45 minutos de exposición.

2.- La liofilización tuvo un efecto inactivante sobre la "cepa Puebla" hasta de un 93%.

3.- Los microorganismos que sobreviven a la acción de la liofilización permanecen viables durante largo tiempo -- sin experimentar inactivación aparente.

4.- La "cepa Puebla" del *Mycoplasma micoides* var. -- capri en medio líquido de caldo infusión de corazón se inactiva en forma lenta y progresiva a la temperatura ambiente de -- 22°C.

5.- Los ciclos rápidos de congelación y descongelación inmediata de la "cepa Puebla" estudiada, tuvieron un efecto de inactivación sobre el microorganismo hasta de un 72% experimen tado después de 6 ciclos practicados.

El primer ciclo de congelación y descongelación tuvo un efecto inactivante de un 25%, después del cual, el promedio de inactivación progresiva que sufrieron los microorganismos -- entre cada ciclo de los 6 practicados, fue de 13% aproximada-- mente.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALUJA DE S.A. 1964. Un brote de Pleuropneumonía en Cabras. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Vol. III No. 3.77 - 87.
- 2.- BELTRAN, J.R. 1966. Estudio de la Patología de la Infec -- ción de Micoplasma micoides var. capri "cepa Puebla" en -- diferentes animales de laboratorio. Tesis Profesional. -- Biblioteca Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- 3.- CARMONA, O.H.L. 1970. Patogenicidad del Micoplasma micoi -- des var. capri "cepa Puebla" en cabras expuestas por di -- ferentes rutas de inoculación. Tesis Profesional. Bibliote -- ca Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- 4.- CORDY, D.R. and ADLER, H.E. Patterns of reaction in infec -- tion with a virulent from goats. Annals of the New York -- Academy of Sciences. Vol. 79 : 686.
- 5.- HUTYRA, MAREK, MANNINGER. 1960. Patología y Terapéutica -- Especiales de los Animales Domésticos. Sava. Edición Labor. 354.
- 6.- KELTON, H.W. 1960. Growth Curve studies of Pleuropneumo -- nialike Organisms. Academy of Sciences N.Y. Vol. 79 Article 10. 422.
- 7.- LEACH, R.H. 1964. Comunicación personal escrita dirigida al Dr. R.M. Chan. The Welcom Research Laboratories. Longley -- Court, Beckenham. Kent. Inglaterra. Julio 23.
- 8.- LONGLEY, E.O. Feb. 14, 1942. Contagious Pleuropneumonitis of goats. The Veterinary Record. Vol. 54:83.
- 9.- OLIVERA, O.L. 1967. Estudio de las Curvas de Crecimiento de Micoplasma micoides var. capri "cepa Puebla" en diferentes Medios de Cultivo. Tesis Profesional. Biblioteca Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- 10.- SMITH, P.F. 1956. Quantitative Measurement of the Growth of PPL0. Appl. Microbiol. 4:254.

- 11.- SOLANA, M.P. y UDAVE, L.M. 1965. "Estudios epizootioló --
gicos de la Pleuropneumonía Contagiosa de las Cabras". --
Técnica Pecuaria en México. 6: 16 - 24.
- 12.- STABLEFORTH, A.W. and GALLOWAY I.A. 1959. Pleuropneumonia
Group of Diseases. "Infections Diseases of Animals. Disea
ses due to bacteria". London Butterworths Scientific Publi
cations: 463.