

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"CARACTERISTICAS GENERALES DE VEINTE CEPAS DE Erysipelothrix
insidiosa AISLADAS EN MEXICO".

T E S I S

que para obtener el
título de

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

JAVIER OLIVARES CROZCO

MEXICO

1971



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.

A MIS PADRES.

A MIS MAESTROS.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
LABORATORIO CENTRAL NACIONAL DE
DIAGNOSTICO DEPENDIENTE DE LA --
D.G.S.A. (S.A.G.),BAJO EL ASESO-
RAMIENTO DE LOS M.V.Z. HECTOR CA
RRILLO MELGAR Y MARIO MARTELL --
DELGADO.

CAPITULOS .

- I.- INTRODUCCION.
- II.- MATERIAL.
- III.- METODOS.
- IV.- RESULTADOS.
- V.- DISCUSION.
- VI.- CONCLUSIONES.
- VII.- RESUMEN.
- VIII.- BIBLIOGRAFIA.

I.- INTRODUCCION.

La erisipela es una enfermedad infecto-contagiosa que ataca a varias especies animales pero principalmente al cerdo; tiene distribución mundial y es una enfermedad grave desde el punto de vista económico en toda Europa, Asia y la parte norte del Continente Americano, probablemente la mayor pérdida económica provenga de la forma crónica, la cual se encuentra muy difundida (13).

La erisipela porcina se manifiesta en tres formas clínicas distintas :

a).- En la forma septicémica o aguda, en donde se encuentran lesiones de los órganos internos, la mortalidad es alta pudiendo llegar al 80%, presentándose la muerte en 1-5 días.

b).- La forma subaguda o urticérmica, llamada también de "rombos" (debido a la presencia de bloques romboidales rojizos, purpúreos o necróticos en la piel) puede presentarse con afección visceral o sin ella; rara vez es mortal.

c).- La forma crónica, que se presenta bien como endocarditis vegetante con erosión sobre todo de la válvula mitral o en forma de artritis proliferativa.

El microorganismo Erysipelothrix insidiosa (E.I.) es el agente causal de la erisipela porcina, es una bacteria que pertenece a la familia Corynebacteriaceae; es un bacilo delgado, Gram positivo, no móvil, no forma esporas y mide alrededor de 1-2 micras de longitud; sobre medios artificiales sin embargo, aparece como una mezcla de cortos bacilos y de muchos filamentos largos alineados en 20 micras de longitud (14). E.I. es una bacteria cosmopolita capaz de llevar una existencia saprofítica o al menos de sobrevivir por largos períodos en el suelo, agua, sobre materia orgánica en descomposición, sobre el cuerpo de peces y en las canales de ani

males para consumo humano, aún después del ahumado, salazón o salmuera; es capaz, bajo ciertas condiciones, de invadir los tejidos de animales domésticos y de laboratorio, aves y el hombre con la producción de una entidad patológica distinta y un número de otras infecciones menos definidas. Es resistente a ciertos antisépticos comúnmente usados como son el formaldehído, agua oxigenada y alcohol, es sin embargo rápidamente destruido por la sosa cáustica y los hipocloritos. En general el organismo es muy sensible a la penicilina, menos a las tetraciclinas y estreptomycinina e insensible a la mayoría de las sulfas (14).

La enfermedad tomada por carbunco hasta 1880, fue estudiada primero por Pasteur y Dumas (1882) que no pusieron en claro su etiología y no fue sino hasta 1885 cuando Loeffler realiza una correcta investigación del bacilo de la erisipela. La investigación científica del organismo empieza con los estudios clásicos de Rosenbach en 1909 (19).

En México se encuentran las primeras observaciones desde la década de los cincuenta (9). En 1968 fue aislada por Esparza y Ramírez (7) quienes la enviaron a E.U.A. para su tipificación. A partir de esta fecha se han presentado verdaderas epizootias de esta enfermedad en el Distrito Federal (16), Edo. de México (16), Irapuato (1) y en Guadalajara (10).

Dentro de las características de aislamiento de E.I. se han llegado a elaborar varios medios selectivos - tanto líquidos como sólidos (2,3,5,8 y 18). Dentro de las características bioquímicas se ha admitido que las reacciones de fermentación de los medios con azúcares pueden ser variables (4,12 y 15). White y Shuman (17) mencionan que las diferencias pueden ser atribuidas al medio usado y al método empleado para su lectura. En cuanto a la tipificación, Roots y Venske (11) observaron que todas las cepas B tienen propieda

des hemaglutinantes y que las cepas A no poseen esta capacidad.

El propósito de esta tesis es el de conocer -- las características de aislamiento (realizando un estudio -- comparativo entre los medios selectivos), bioquímica, patogenicidad así como de realizar la tipificación de las 20 cepas -- aisladas en México.

II.- MATERIAL.

Para el cultivo de las cepas de E.I. se utilizaron 5 medios sólidos y 3 medios líquidos.

Medios sólidos :

- a).- Medio de Packer (8).
- b).- Variante del medio de Packer (5).
- c).- Variante del medio de Packer (2).
- d).- Variante del medio de Packer (3).
- e).- Medio de "Blood Agar Base". Medio comercial elaborado por la casa DIFCO.*

Medios líquidos :

- a).- Medio líquido de Packer (8).
- b).- Variante al medio líquido de Packer (3).
- c).- Medio de Wood (18).

Para la observación de la fermentación de los azúcares se utilizaron dos tipos de indicadores de pH :

- a).- Indicador a base de rojo de fenol.

Se usó como base el medio de la casa comercial DIFCO "Phenol Red Broth Base". A este se le agregó el 1% de los siguientes azúcares : Galactosa, sacarosa, glucosa, -- lactosa, sorbitol, rafinosa, maltosa, xilosa, manosa, rhamnosa, manitol, arabinosa, salicin, adonitol, inositol, fructosa, trehalosa, dulcitol, inulina y dextrina. Se distribuyeron en tubos y se esterilizó por autoclave a 15 libras durante 15 minutos.

- b).- Indicador de Andrade (6).

Para su preparación se siguió la técnica señalada en el Manual de Cowan (6). Se utilizaron los mismos azúcares señalados anteriormente.

III.- MÉTODOS.

Durante el año de 1970 llegaron al Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico dependiente de la D.G.S.A. (S.A.G.) situado en Palo Alto, D.F. 54 casos sospechosos de erisipela, de los cuales en 20 se identificó E.I., estos -- provenían de diversos lugares :

Cepa	Caso	Especie	Procedencia	Aislamiento a partir de:
1	422	Caprino	Querétaro	Líquido sinovial
2	1065	porcino	Distrito Federal	corazón
3	1162	porcino	Distrito Federal	líquido sinovial
4	1256	porcino	Edo. de México	líquido sinovial
5	1585	porcino	Edo. de México	líquido sinovial
6	1743	porcino	Guanajuato	riñón
7	1802	porcino	Distrito Federal	piel
8	2030	porcino	Edo. de México	hígado y bazo
9	2041	porcino	Edo. de México	líquido sinovial
10	2147	porcino	Distrito Federal	riñón
11	2242	porcino	Edo. de México	piel
12	2292	porcino	Edo. de México	riñón
13	2398	porcino	Hidalgo	riñón
14	2405	porcino	Hidalgo	riñón y bazo
15	2427	porcino	Puebla	líquido sinovial
16	2473	porcino	Durango	Riñón y cerebro
17	2578	porcino	Distrito Federal	riñón
18	2594	porcino	Edo. de México	riñón y bazo
19	2595	porcino	Edo. de México	riñón y bazo
20	2596	porcino	Edo. de México	riñón y bazo.

Inoculación de E.I. en ratones.-

Las 20 cepas se sembraron en caldo triptosa -- conteniendo 5% de suero de equino, se incubaron a 37°C durante 24 horas, se centrifugaron durante 10 minutos a 3,000 rpm

desechando el sobrenadante y agregando solución salina fisiológica estéril para ajustar al tubo No. 9 del nefelómetro de Mac Farland obteniendo así una cuenta aproximada de 2,700 por 10^6 de bacterias por ml. Estas suspensiones fueron inoculadas en dosis de 0.1 ml. vía intraperitoneal usándose dos ratones de 15-20 gr. por cepa.

Siembra en los diferentes medios.-

En cuanto sucumbieron, se dejó un ratón de cada cepa a temperatura ambiente durante 96 horas y el otro se sometió inmediatamente a la necropsia tomándose muestras de ganglios inguinales, ganglios axilares, ganglios retrofaríngeos, hígado, bazo, riñón, corazón, pulmón, ganglios mesentéricos y cerebro. Una vez cumplidas las 96 horas se hizo la necropsia -- del otro ratón tomándose las mismas muestras. Cada órgano se sembró en los 5 medios sólidos y en los 3 líquidos, se incubaron a 37°C en aerobiosis realizándose la lectura cada 24 horas durante 3 días. Los medios líquidos se resembraron en gelosa-sangre a las 48 y 72 horas.

Bioquímica.-

Las 20 cepas fueron sembradas en agar infusión de corazón (DIFCO) se incubaron a 37°C durante 24 horas en aerobiosis y se procedió a hacer el estudio bioquímico -- sembrando en los azúcares tanto del indicador de rojo de fenol como del indicador de Andrade, se sembró en triple azúcar hierro (TSI), leche tornasolada, medio de SIM y caldo nitrato (todos de la casa comercial DIFCO). En cada caso se colocó un tubo sin sembrar quedando como testigo y se procedió a incubar a 37°C en aerobiosis haciendo la lectura del TSI y SIM a las 48 horas, del caldo nitrato y leche tornasolada a los 14 días (6) mientras que la lectura de los azúcares se realizó cada 24 horas por un período de 10 días (3).

Tipificación.-

Se realizó la prueba de hemoaglutinación (12)

mezclando a partes iguales la suspensión bacteriana con gló-
bulos rojos de ganso al 0.5%, realizándose la lectura dentro
de los dos minutos siguientes.

IV. - RESULTADOS.

PATOGENICIDAD PARA RATONES DE 20 CEPAS
DE Erysipelothrix insidiosa AISLADAS
EN MEXICO (1970).

CEPAS	SUPERVIVENCIA POST- INOCULACION EN Hrs. (PROMEDIO)
-------	--

1	32 hrs.
2	79
3	72
4	49
5	72
6	43
7	74
8	58
9	75
10	33
11	96
12	74
13	98
14	68
15	116
16	72
17	72
18	76
19	33
20	81

ESTUDIO COMPARATIVO EN LOS MEDIOS SOLIDOS PARA Erysipelothrix
insidiosa (Después de 24 hrs. de incubación).

Medios de cultivo.	NECROPSIA INMEDIATA			NECROPSIA DEMORADA 96 hrs.		
	Cant. de crecimiento	Contaminación	Obsr. de las col.	Cant. de crecimiento	Contaminación	Obsr. de las col.
Gelosa sangre.	+++	+	F.O.S.V.	+	+++	D.O.S.V.
Med. Packer. (Sangre eq)	+++	O	D.O.S.V.	+++	+	D.O.S.V.
Med. Packer (Suero y Vit)	+++	O	D.O.S.V.	+++	+	D.O.S.V.
Med. Packer (Tween 80)	+++	O	D.O.S.V.	+++	+	D.O.S.V.
Med. de Connell	+++	O	F.O.S.V.	+++	+	F.O.S.V.

+++ = ABUNDANTE
++ = REGULAR
+ = ESCASO
O = NEGATIVO

F.O.S.V. = FACIL OBSERVACION A SIMPLE VISTA
D.O.S.V. = DIFICIL OBSERVACION A SIMPLE VISTA.

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION DE 20 CEPAS DE E.I. AISLADAS
EN MEXICO.

Cepa	Hemoaglutinación
1	positiva
2	positiva
3	positiva
4	positiva
5	positiva
6	negativa
7	positiva
8	negativa
9	positiva
10	negativa
11	positiva
12	negativa
13	negativa
14	negativa
15	positiva
16	negativa
17	negativa
18	negativa
19	negativa
20	negativa

En estos resultados se observó que los ratones morían de las 32 a las 116 horas post-inoculación con un término medio de 69 horas.

En el estudio comparativo de los medios selectivos se encontró lo siguiente:

En los ratones en los que se realizó la necropsia inmediata, se obtuvo crecimiento abundante a partir de todos los órganos sembrados, en todos los medios, siendo fácil la observación a simple vista de las colonias a las 24 horas en los medios de gelosa-sangre y medio modificado de Connell y Langford y en los restantes medios solamente hasta las 72 horas. En estos la observación a las 24 horas se realizó con microscopio estereoscópico ya que era difícil observarlas a simple vista. La contaminación fue escasa en el medio de gelosa-sangre y nula en los restantes. Después de 48 y 72 horas en medio líquido, se hizo un pase a gelosa-sangre y, a las 24 horas, se encontró un crecimiento regular, sin contaminantes.

En los ratones en los que se realizó la necropsia después de 96 horas de muertos se encontró lo siguiente:

A las 24 horas la cantidad de crecimiento de colonias fue escasa en el medio de gelosa-sangre y abundante en los restantes, siendo fácil la observación de las colonias en el medio modificado de Connell y Langford, observables solamente con microscopio estereoscópico en los restantes medios selectivos y difícil su observación en el medio de gelosa-sangre, siendo esto debido a la gran contaminación con Escherichia coli y Proteus sp. principalmente. En los medios selectivos la contaminación fue escasa y solamente producida por Streptococcus sp. En la resiembra de los medios líquidos a gelosa-sangre a las 48 horas, se encontró una gran contaminación con Escherichia coli, Proteus sp. y Streptococcus sp.,

siendo esta ligeramente menor a las 72 horas. La observación de las colonias de E.I. es difícil ya que la contaminación - lo impide.

En el estudio bioquímico, en la lectura de los azúcares se observó que la galactosa, glucosa, lactosa y fructosa fueron positivos, siendo esto variable en la xilosa y resultando negativos los demás azúcares; esto fue igual en los dos indicadores usados, aunque se observó que la fermentación fue más rápida en los azúcares que contenían el indicador de Andrade, observándose ya a las 48 horas, mientras que con el - indicador de rojo de fenol se vieron positivos hasta las 72 horas. Todas las cepas fueron negativas a la prueba de la catalasa, indol, reducción de nitratos y leche tornasolada, siendo variable la producción de ácido sulfhídrico.

En la prueba de hemoaglutinación se encontraron 11 cepas negativas y 9 cepas positivas por lo que basándose en los trabajos de Roots y Venske (12), se consideran -- por lo tanto 11 cepas tipo A y 9 cepas tipo B.

V.- DISCUSION.

La patogenicidad de estas cepas para los ratones es manifiesta aunque la muerte varió entre las 32 y las 116 horas. La patogenicidad en relación con el tipo de cepa empleada fue muy variable.

Por lo que respecta al estudio comparativo de los diferentes medios, se han encontrado variaciones en el crecimiento de las colonias, observándose un mejor y más rápido crecimiento en el medio modificado de Connell y Langford (5) en el que las colonias son observables ya a simple vista a las 24 horas siendo similares en tamaño a las observadas en el medio de gelosa-sangre, aunque teniendo la ventaja sobre este de las sustancias selectivas. En los restantes medios se observó un crecimiento similar al del medio modificado de Connell y Langford solamente hasta las 72 horas.

En el caso de los ratones dejados durante 4 días a temperatura ambiente, se vió una vez sembrados los órganos que las colonias de E.I. eran ya observables a simple vista a las 72 horas en los medios sólidos selectivos aunque en el medio modificado de Connell y Langford las colonias eran ya observables a simple vista a las 24 horas. En estos medios se encontró contaminación con Streptococcus sp. (siendo estos diferenciables por el color de la colonia, la cual es azul y por la observación del frotis). En cambio en los medios líquidos al sembrarse a los medios sólidos (gelosa-sangre, DIFCO) se observó una gran contaminación con Streptococcus sp., Escherichia coli y Proteus sp. Se vió que esta contaminación disminuía conforme pasaba el tiempo en que el órgano fue sembrado, pero siendo de cualquier forma difícil el separar las colonias de E.I.

En el estudio bioquímico se encontró que no todas las cepas produjeron ácido sulfhídrico concordando es-

to con los trabajos de Rowsell (13) y Byrne (4). Todas las --
cepas fueron negativas a la prueba de reducción de nitratos
y a la formación de indol en el medio de SIM, igualmente, nin
guna produjo cambios en la leche tornasolada; todas fueron ne
gativas a la prueba de la catalasa.

En la fermentación de azúcares no se encontra
ron diferencias entre los dos indicadores usados, siendo la --
única variación la prontitud de la fermentación en el indica
dor de Andrade. Los azúcares en los que hubo producción de á
cido fueron galactosa, glucosa, lactosa y fructosa; en la xilo
sa se encontró una variación en la producción de ácido. La ma
nose resultó negativa, lo cual difiere de lo observado por --
White (17) y Rowsell (13), pero en general, los resultados ob
tenidos concuerdan con lo observado por los investigadores --
ya mencionados.

En la prueba de hemoaglutinación se encontra
ron 11 cepas negativas y 9 cepas positivas por lo que usando
como criterio los trabajos de Roots y Venske (12), las cepas
estudiadas en México corresponden a los grupos A y B.

VI.- CONCLUSIONES.

Por las observaciones realizadas podemos decir lo siguiente :

1.- Se corrobora la existencia de erisipela en México.

2.- Los medios selectivos más eficaces fueron los medios sólidos, siendo el medio modificado de Connell y Langford con el que mejores resultados se obtuvieron en cuanto a rapidez de crecimiento se refiere.

3.- El indicador de Andrade es el más indicado para la fermentación de azúcares, pues el resultado de la prueba se puede leer más prontamente que en el indicador con rojo de fenol.

4.- En México existen tanto cepas A como cepas B.

VII.- RESUMEN.

Se estudiaron las características generales de 20 cepas de E.I. aisladas en México, observándose el crecimiento de cada una de estas en diferentes medios líquidos y sólidos, haciendo un estudio comparativo. Se estudiaron sus características bioquímicas comparándose la fermentación de azúcares con dos tipos de indicadores. Se realizó la tipificación mediante la hemoaglutinación y se encontraron tanto cepas A como cepas B.

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aguirre, R.F. (1970).- Comunicación personal. Laboratorio de Patología Animal de la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico (S.A.G.). Irapuato, Gto.
- 2.- Ando, K., Moriya, Y. and Kuwahara, S. (1959).- Studies on the effect of Tween 80 on the growth of Erysipelothrix insidiosa. Jap. Jour. Microbiol. 3(1) : 85.
- 3.- Ando, K. y Hashimoto, K. (1969).- Apuntes de Erysipelothrix insidiosa.
- 4.- Byrne, J.L., Connell, R., Frank, J.F. and Moynihan, I.W. ---- (1952).- Citado por Shuman, D.R. en : Erisipela porcina. Enfermedades del Cerdo. U.T.E.H.A. 1a. Ed. México, 1967. 441-488.
- 5.- Connell, R. and Langford, E.V. (1953).- Studies of swine erisipelas. V.- Presence of Erysipelothrix rhusiopathiae in apparently healthy pigs. Canad. Jour. C. Med. and Vet. Sci. 17:448-453.
- 6.- Cowan, S.T. (1966).- Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. London. 108 and 158-161.
- 7.- Esparza, B.H. y Ramírez, N.R. (1968).- Diagnóstico e identificación de la erisipela porcina en México. Boletín del Colegio Nacional de Médicos Veterinarios - Zootecnistas. 5(2):17 y 50.
- 8.- Packer, R.A. (1943).- The use of sodium azide (NaN₃) and crystal violet in a selective medium for Streptococci and Erysipelothrix rhusiopathiae. J. Bact. --- 46:343-349.
- 9.- Ramírez, V.M. (1970).- Comunicación personal. Depto. de Microbiología de la Facultad Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M.
- 10.- Rivera, S.P. (1970).- Comunicación personal. Laboratorio de Patología Animal de la Red Nacional de Laborato

- rios de Diagnóstico (S.A.G.).Guadalajara,Jal.
- 11.- Roots,E. y Venske,W. (1952).- Citado por Shuman,D.R. -- en : Erisipela porcina.Enfermedades del Cerdo. --- U.T.E.H.A. 1a. Ed. México,1967.441-488.
 - 12.- Rowsell,H.C. (1958).- Cultural and biocnemical study of strains of Erysipelothrix rhusiopathiae with special references to the carrier pig.Canad.Jour.C. - Med. and Vet.Sci. 22:82-86.
 - 13.- Shuman,D.R. (1967).- Erisipela porcina.Enfermedades del Cerdo.U.T.E.H.A. 1a. Ed. 441-488.
 - 14.- The Merck Veterinary Manual (1970).Third Edition.Merck and Co.Inc. Rahway,N.J. U.S.A. 411-415.
 - 15.- Tiffany,L.W. (1955).- Citado por Shuman,D.R. en : Erisipela porcina.Enfermedades del Cerdo.U.T.E.H.A. --- 1a. Ed. México,1967.441-488.
 - 16.- Torres,B.J. (1970).- Comunicación personal.Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico (S.A.G.).Palo Alto, D.F.
 - 17.- White,T.G. and Shuman,R.D. (1961).- Fermentation reactions of Erysipelothrix rhusiopathiae.Jour.Bact. 82:595-599.
 - 18.- Wood,R.L. (1965).- A selective medium utilizing antibiotics for isolation of Erysipelothrix insidiosa. -- Amer.Jour.Vet.Res. 26:1303-1308.
 - 19.- Woodbine,M. (1950).- Erysipelothrix rhusiopathiae bacteriology and chemotherapy.Bact.Rev. 14:161-178.