



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

PREPARACIÓN DE UN ANTIGENO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
ANTICUERPOS CONTRA *Erysipelothrix rhusiopathiae* EN SUERO DE  
CERDOS.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
P R E S E N T A :  
**MARIA LUISA PEREA CRUZ**

ASESORES: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO



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.

## **DEDICATORIAS**

### **A MIS PADRES**

Les doy las gracias a mis padres Ismael y María de Jesús por que me dieron la vida, por estar siempre a mi lado en los momentos que más los he necesitado, por el apoyo que me han brindado durante toda mi vida, por su cariño, motivación y amor que siempre nos han dado ya que son unos padres admirables, excepcionales y muy pacientes. Por habernos dado un hogar lleno de virtudes y por procurar que nada nos faltara, por toda la fortaleza que siempre han mostrado hasta en los momentos más difíciles de nuestra vida..

Este trabajo es dedicado con mucho cariño y admiración a ustedes mil gracias los amo mucho.

### **A MIS HERMANAS**

Moni, Ale, Viris y Ana por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas ya que me han demostrado su apoyo incondicional siempre las quiero mucho. Gracias.

### **A DONOVAN**

A mi sobrino que tanto quiero y que por él estoy tratando de alcanzar todas mis metas para salir adelante y luchar para que tenga una vida mejor.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS TIOS**

Gracias a mi tío Juan y a mi tía Alicia ya que ellos me han apoyado en todos los aspectos.

### **A MIS AMIGOS**

Aureola, Rocío, Eva y Adrián gracias por contar con su amistad, ya que me han demostrado que son unas grandes personas y que cuento con ellos siempre.

### **A LA DRA. SUSY**

Le doy las gracias por el apoyo que me dio y por la confianza que me tuvo para realizar este proyecto de tesis, por la amistad que me ha demostrado y por creer en mi.

### **AL SR. GABINO**

Gracias por su ayuda durante mi estancia en el laboratorio y porque sé que ahora cuento con su amistad.

### **AL DR. DAVID**

Gracias por su apoyo en todo lo relacionado con el trabajo de computación.

### **AL DR. ABEL**

Por su apoyo y asesorías en la realización de mi proyecto de tesis.

### **AL DR. ELISEO**

Gracia por sus enseñanzas y por su ayuda.

### **A MIS SINODALES**

Gerardo Cruz, Juan Chiu, Susana Mendoza, Azucena Lee y Raquel Gómez por su tiempo prestado a la revisión de esta tesis, por sus observaciones y sugerencias que me brindaron para lograr enriquecer este trabajo.

### **A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO**

Gracias a Moni, Ángeles, Alma, Ithzel, Vladimir, Argel, Karla, Fernando y Rocío por su ayuda durante mi estancia en el laboratorio.

## INDICE

RESUMEN.....	i
FIGURAS.....	ii
TABLAS.....	ii
GRÁFICAS.....	iii
DIAGRAMAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes históricos.....	1
1.2 Importancia y características del mar rojo.....	2
1.2.1 Signos y síntomas.....	4
1.2.2 Etiología.....	6
1.2.3 Transmisión.....	7
1.2.4 Factores de virulencia.....	8
1.2.5 Epidemiología.....	8
1.2.6 Características de crecimiento e identificación de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> ..	9
1.2.7 Cinética de crecimiento.....	10
1.2.8 Diagnostico de laboratorio.....	12
1.2.9 Diagnostico bacteriológico.....	13
1.2.10 Diagnostico serológico.....	15
1.2.11 Tratamiento.....	15
1.2.12 Prevención y control.....	16
1.2.13 Problemas de salud publica.....	16
1.2.14 Justificación del proyecto de tesis.....	17
1.2.15 Hipótesis.....	18

<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
2.1	Objetivo general.....	19
2.2	Objetivos particulares.....	19
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y METODOLOGÍA</b>	
3.1	Cepa.....	20
3.2	Sembrado y purificación de la cepa.....	20
3.3	Identificación.....	20
3.4	Cinética de crecimiento .....	21
3.5	Preparación de la biomasa .....	23
3.6	Preparación del antígeno colorido .....	24
3.7	Evaluación del antígeno.....	24
3.8	Aglutinación en placa.....	25
3.8.1	Interpretación.....	25
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	26
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	33
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	45

## FIGURAS

FIGURA 1: Cerdos enfermos con erisipela porcina.....	6
FIGURA 2: Manchas rojizas características de la enfermedad.....	12
FIGURA 3: Endocarditis vegetativa de un cerdo enfermo.....	12
FIGURA 4: Tinción de Gram.....	14
FIGURA 5: Pruebas de aglutinación.....	14
FIGURA 6: Antígeno M100 <sup>MR</sup> colorido de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .....	30
FIGURA 7: Material utilizado para realizar la prueba de aglutinación.....	30
FIGURA 8: Placa de látex utilizada.....	30
FIGURA 9: Sueros.....	30
FIGURA 10: Placa de látex con sueros.....	30
FIGURA 11: Placa de látex con sueros más el antígeno M100 <sup>MR</sup> colorido.....	30
FIGURA 12: Resultados de aglutinación de los sueros.....	32

## TABLAS

TABLA 1: Características bioquímicas.....	13
TABLA 2: Resultados de las pruebas bioquímicas.....	26
TABLA 3: Resultados de cinética de crecimiento D.O.....	27
TABLA 4: Resultados de cinética de crecimiento U.F.C.....	28
TABLA 5: Resultados de controles negativos.....	30
TABLA 6: Interpretación de la figura 12.....	31
TABLA 7: Resultados de evaluación de sueros.....	32

## GRAFICAS

GRAFICA 1: Cinética de crecimiento microbiano.....	11
GRAFICA 2: Cinética de crecimiento D.O.....	27
GRAFICA 3: Cinética de crecimiento U.F.C.....	28
GRAFICA 4: Comparación DO. Vs U.F.C.....	29
GRAFICA 5: Evaluación de los sueros.....	32

## DIAGRAMAS

DIAGRAMA 1: Cinética de crecimiento.....	22
DIAGRAMA 2: Preparación de antígeno M100 <sup>MR</sup> .....	24



## ABREVIATURAS

Ac.....	Anticuerpo
Ag.....	Antígeno
Ig.....	Inmunoglobulina
MR.....	Mal Rojo
ELISA.....	(Enzyme-Linked immunosorbent assay) Inmuno ensayo enzimático.
SSFF.....	Solución Salina Fisiológica Fenolada.
E.r.....	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
D.O.....	Densidad óptica
UFC.....	Unidad Formadora de Colonias
BHI.....	Bilis infusión corazón
AST.....	Agar soya tripticaseina
H <sub>2</sub> S.....	Ácido sulfhídrico
TSI.....	Agar hierro triple azúcar
FMVZ.....	Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnista
CST.....	Caldo soya tripticaseina

## RESUMEN

El presente trabajo experimental tiene como objetivo primordial la elaboración de un antígeno M100<sup>MR</sup> teñido el cual se utiliza para realizar pruebas de aglutinación en placa y como una prueba de diagnóstico rápido, preciso y confiable para determinar la presencia de anticuerpos específicos para la enfermedad denominada como mal rojo o erisipela porcina causada por una bacteria conocida como *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Mediante un ensayo Serológico utilizando sueros de cerdos y el antígeno M100<sup>MR</sup>.

Se realizó la identificación de la cepa de *Erysipelothrix rhusiopathiae* con pruebas primarias y secundarias, se realizó la cinética de crecimiento de la bacteria para poder determinar su comportamiento y así poder obtener el antígeno.

Se preparó la biomasa, la cual fue teñida con un colorante ácido. Este antígeno teñido M100<sup>MR</sup> fue utilizado para realizar pruebas de aglutinación en placa con sueros de cerdos. Donde la interpretación de una reacción positiva es la aparición de los grumos característicos aglutinados, esto nos ayuda a determinar si los cerdos han estado expuestos a *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Se trabajaron 50 sueros provenientes de diferentes granjas del valle de México. Los resultados muestran que un 90 % fueron positivos y 10 % negativos. Se utilizó suero de gallinas inoculadas con la bacteria como control positivo y como control negativo se utilizó agua desionizada, agua destilada, solución salina y buffer de lactatos donde se observó que el antígeno no aglutinara por sí solo. Evitando así la aparición de falsos positivos y negativos. Esta prueba diagnóstica es utilizada como una técnica de sondeo, que le permitirá al porcicultor llevar medidas preventivas como sería la vacunación y así poder erradicar la enfermedad, ya que nos ayuda a obtener resultados confiables en un mínimo de tiempo. Es el primer método rápido, confiable y económico.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1876, Robert Koch describió un bacilo que le dio el nombre de la "septicemia del ratón" debido a que fue aislado de ratones inoculados con carne en putrefacción. Para el año de 1882, Luis Pasteur descubrió un microorganismo delgado y curvo, aislado de cerdos con síntomas del "mal rojo". (Pijoan y Ramírez. 1982)

En 1885, Loeffler estableció que *Erysipelothrix rhusiopathiae* era el agente causal de la "erisipela porcina" que quiere decir piel roja. (Pijoan y Ramírez 1982; Koneman, 1999; Straw B. E. y cols. 1999; Fernández y cols, 1989)

En 1894 en Minnesota se dio un brote grave de "mal rojo" con mortalidad del 60% por lo que Smith dio a conocer un microorganismo aislado. (Straw B. E. y cols.1999; Merchat I. A. 1977)

Ya en 1909 Rosenbach describe un bacilo aislado de un caso de erisipeloide humana. (Pijoan y Ramírez 1982; Reboli, 1989; Straw B. E. y cols.1999).

La enfermedad del mal rojo en los cerdos se da a conocer en México en 1920, por el maestro José de la Luz Gómez, ya que él identifica al microorganismo (Pijoan y Ramírez 1982; Straw B. E. y cols.1999)..

En 1966, Esparza y Ramírez logran reaislar al microorganismo. De esta fecha a la actualidad se han reportado más casos de mal rojo en la Republica Mexicana, teniendo más incidencia los estados del centro. (Pijoan y Ramírez. 1982; Straw B. E. y cols. 1999)

## 1.2 IMPORTANCIA Y CARACTERÍSTICAS DEL MAR ROJO

El mal rojo del cerdo (MR) o erisipela porcina, es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial producida por la bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, que provoca grandes pérdidas económicas en las explotaciones porcinas. (Wood.1999) Se ha considerado que la erisipela porcina es la 2ª enfermedad más importante de los cerdos en Estados Unidos siendo la 1ª la fiebre porcina clásica. (Pelczar. 1977)

En México se llevo a cabo un cuestionario realizado por la FAO/OIE/OMS en el 2003 y 2004 se encontró que la erisipela porcina esta presente en México y es muy frecuente. En el 2003 el número de población fue de 17583863 y el número de explotaciones fue de 274917 de los cuales se encontraron 109 focos de la infección, y de 1387 casos hubo 395 muertes para erradicar esta infección se vacunaron 1580250 animales. No hubo casos humanos. (Del Valle. 2003)

Sin embargo en el 2004 de una población de 15122885 animales con un numero de 274917 explotaciones se encontró una frecuencia positiva de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en 12 focos pero en estos focos no se encontraron casos ni muerte de animales así como tampoco afecto a los humanos. (Del Valle. 2004).

El MR se caracteriza por producir un cuadro clínico-patológico de curso agudo, subagudo o crónico. La presentación crónica puede ser la secuela de las anteriores o el resultado de una infección subclínica. Se caracteriza por producir artritis, endocarditis y lesiones cutáneas.

*Erysipelothrix rhusiopathiae* ha sido aislada en diferentes países como Japón, Hungría, Estados Unidos, Australia y Chile a partir de animales clínicamente sanos, principalmente de tonsilas, o de cuadros clínicos agudos o crónicos y con lesiones de endocarditis y/o artritis. Los cerdos de cualquier edad son susceptibles, sin embargo, se presenta con mayor frecuencia en animales de más de tres meses y hasta el peso de faena. (Copes. 2001; Wood. 1999) Los cerdos portadores, clínicamente sanos, representan la fuente más importante de infección, siendo las tonsilas el lugar de colonización de *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Copes. 2001; Skoknic. 1981).

A pesar de que *Erysipelothrix rhusiopathiae* crece principalmente en un medio con materia muerta o en descomposición, también puede infectar a insectos, moluscos, peces, aves y mamíferos (De Diego. 1978). La gente suele infectarse después de una herida laboral, casi siempre una herida penetrante producida mientras se manipula materia animal (como carne, aves de corral, pescado, moluscos, huesos o conchas). El cerdo llega a ser un huésped susceptible en todas sus edades, pero siendo más en el primer año de vida, así como también lo son las cerdas gestantes, las cuales pueden abortar o parir lechones muertos, de los cuales podemos aislar al microorganismo (Pijoan y Ramírez 1982; Straw B. E. y cols.1999).

En la República Argentina *E. rhusiopathiae* ha sido aislada de corderos, terneros, pescados, baños antisépticos y de otras fuentes. Así mismo, lesiones cutáneas tipo erisipeloide fueron descritas en trabajadores de plantas faenadoras de cerdos (De Diego. 1978).

Sin embargo, al presente *Erysipelothrix rhusiopathiae* no había sido aislado de cerdos con lesiones sistémicas compatibles con las del MR.

### 1.2.1 SIGNOS Y SINTOMAS

En el curso agudo de la enfermedad la muerte ocurre en forma súbita en uno o más animales de la piara. La mortalidad es entre el 25 y 75 %. Los primeros síntomas que presentan los animales son la elevación de la temperatura (40 a 41° C), con escalofríos, los animales se apartan de los demás, pueden estar alertas o deprimidos y cuando se mueven ellos gimen por el dolor tan fuerte que les causa moverse, manifestando un paso sin flexión o bien una cojera. Su respiración es con dificultad y va acompañada por un flujo húmedo o seco, presentando manifestación de artritis la cual puede llegar a convertirse en algo crónico. (Pijoan y Ramírez. 1982).

Los animales también pierden el apetito hasta presentar una anorexia total y vomito, las heces pueden ser secas y duras o diarreicas con presencia de sangre, entre en 2º y 3º día de iniciados los síntomas, aparecen las manchas características de la enfermedad, las cuales son de color rosa o rojo púrpura en forma de diamante que desaparecen a los 4 o 7 días después de que se presentaron como se observan en la Fig. 1. Estas lesiones aparecen en el abdomen, el cuello, las orejas y las partes internas de los muslos. Las cuales pueden pasar al estado crónico y necrosarse (Pijoan y Ramírez. 1982; Fernández y cols. 1986).

En el curso subagudo del mal rojo, los signos clínicos se presentan de igual forma que en el curso agudo pero son menos severos durando más tiempo los síntomas. No presentan temperatura muy elevada, y el apetito puede llegar a desaparecer totalmente o no. (Pijoan y Ramírez. 1982)

El curso crónico del mal rojo se caracteriza por cambios de la piel en zonas costrosas y necróticas, manifestándose más en cola, orejas y patas. Los animales tienen mucha dificultad para levantarse y poder caminar, el ritmo cardíaco aumenta considerablemente y pulso se acelera, asociado a estos síntomas existe una artritis crónica con aumento en el volumen de las articulaciones, estas están calientes y provocan mucho dolor al tacto. (Pijoan y Ramírez. 1982)

Pasando 2 o 3 semanas el dolor desaparece y las articulaciones quedan endurecidas y aumentan de tamaño. Esta forma no es fatal para los animales pero ellos no sanan totalmente y por lo tanto no alcanzan el peso adecuado para su venta en el mercado. (Pijoan y Ramírez. 1982; Merchant. 1977; Straw B. E. y cols.1999)

Los cuadros clínicos agudos y subagudos de MR con manifestaciones cutáneas, son causados generalmente por los serotipos 1a y 2 (Wood, 1999). Donde las cepas de mayor virulencia (infección aguda) pertenecen al serotipo 1a y el 2 se ha encontrado principalmente en las infecciones crónicas (Jacques. 1986).

Existen reportados en la bibliografía hasta 22 serotipos de los cuales el 1a y el 2 que son los más patógenos y de mayor importancia ya que son los que afectan al cerdo (Wood, 1984). Sin embargo ha sido aislado de vísceras de cerdos muertos con lesiones de MR sistémicas y cutáneas en granjas con antecedentes de vacunación contra estos serotipos (Wood 1979).

Se debe realizar un diagnóstico oportuno debido a que esto lleva a una importante pérdida económica para los criadores de cerdos ya que en muchas ocasiones la enfermedad puede confundirse con otras y darse un tratamiento erróneo a los animales. (Pijoan y Ramírez. 1982).

Debido a que es una enfermedad muy común en los cerdos, en muchas ocasiones pueden ocurrir epizootias causando considerables pérdidas económicas. (Koneman. 1999)

**Figura 1:** Se observan las manchas rojizas sobre el lomo del animal, cerdos enfermos con erisipela porcina.



[www.pig\\_sertesorbanc\\_3](http://www.pig_sertesorbanc_3)



[www.pig\\_sertesorbanc\\_5](http://www.pig_sertesorbanc_5)

## 1.2.2 ETIOLOGÍA

El agente causal del "mal rojo" o erisipela porcina es una bacteria denominada *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Es un bacilo Gram. positivo, inmóvil, aerobio o anaerobio facultativo que ha sido aislado de sustancias nitrogenadas en descomposición y que coloniza las amígdalas y el tubo digestivo de numerosos animales, más frecuentemente en el cerdo, del cual se ha aislado la bacteria del tracto gastrointestinal ya que se supone que este es el principal reservorio. Este microorganismo es capaz de sobrevivir durante largos periodos fuera del organismo animal, en el suelo y así infectar a otros animales por medio de heridas o por la alimentación (Koneman. 1999).



También suele infectar a los humanos después de una herida laboral, casi siempre una herida penetrante producida mientras se manipula materia animal (como carne, aves de corral, pescado, moluscos, huesos o conchas) (Merck. 2005). Esta bacteria puede afectar al hombre de manera accidental por medio de los alimentos ya que no muere por el salado, ahumado o encurtido utilizado en el proceso de las carnes. (Koneman. 1999)

### **1.2.3 TRANSMICIÓN**

El agente penetra por el tracto digestivo o por la piel y se multiplica rápidamente produciendo una bacteremia en menos de 24 horas. La lesión urticarial se debe a una reacción inflamatoria aguda a nivel vascular que causa eritema, hemorragia y trombosis local y en casos graves necrosis. El curso de la enfermedad depende del grado de virulencia del agente y de la susceptibilidad del huésped.

Los microorganismos se excretan en cantidades abundantes con las heces y generalmente se cree que la infección natural se hace por vía bucal, no obstante que la ingestión experimental ha dado resultados irregulares. La infección se disemina en parte mediante portadores sanos y por animales enfermos; la alimentación de cerdos con desperdicios probablemente influya en casos aislados. La erisipela porcina es de mucha importancia para los porcicultores ya que si no la detecta a tiempo les provoca grandes pérdidas económicas. (Freeman. 1984)

#### 1.2.4 FACTORES DE VIRULENCIA

En relación a los factores específicos de virulencia se sabe poco. La enfermedad en los cerdos se ha asociado con la producción de hialuronidasa la que provoca invasión de los tejidos y de neuromidasa causante de la arteritis y trombositopenia en ratas de experimentación. En los cerdos infectados con la infección crónica se han comprobado anticuerpos contra la neuromidasa. (Jacques, 1986) (Shimoji, 2000)

#### 1.2.5 EPIDEMIOLOGIA Y PATOGENIA

Es una bacteria muy difundida en la naturaleza. Donde el cerdo es su principal huésped y a su vez la fuente de contagio más importante, pues alberga la bacteria frecuentemente en las tonsilas y elimina durante la infección las bacterias que son patógenas en las heces y en la orina eventualmente con secreciones nasofaríngeas. *Erysipelothrix rhusiopathiae* contamina frecuentemente el medio externo, particularmente las aguas superficiales, las residuales, el agua de estiércol, los cultivos forrajeros y el suelo. Es probable que esta no sobreviva ahí como saprofito, pero puede sobrevivir durante unos meses, gracias a que tiene una gran resistencia, sobre todo en condiciones de alcalinidad, de humedad elevada y de temperaturas bajas.

En los medios secos puede permanecer viva durante años y en los productos carnicos adobados, salados o ahumados puede vivir durante meses. La infección se produce por vía oral o a través de las heridas de la piel y las mucosas, llegando a sangre y una vez ahí produce una septicemia y con la liberación de toxinas hay lesiones en los vasos vasculares produciendo hemorragias en diferentes órganos y tejidos . Por otro parte hay asentamiento de las toxinas en la piel provocando las lesiones cutáneas características (Fernández y cols. 1989).

Para su desarrollo tiene un papel decisivo la virulencia de la cepa, el grado de inmunidad, la resistencia general del animal (edad, estado sanitario) y la acción de diversos factores predisponentes como son: el poliparasitismo, stress de traslado, cambios bruscos de temperatura, poca higiene, mala alimentación, etc(Fernández y cols.1989; Jacques, 1986).

### **1.2.6 CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Erysipelothrix rhusiopathiae*.**

La bacteria se desarrolla bien en agar sangre, en BHI y AST. Se incuba durante 24 horas a +/- 37°C. En agar sangre se desarrollan tanto colonias lisas como rugosas. Las colonias lisas son más pequeñas, miden de 0.5 a 1 mm de diámetro, son convexas, circulares y transparentes. Las colonias rugosas son más grandes, presentan una superficie mate, con bordes festonados. En las colonias lisas aparecen bacilos Gram. positivos cortos y delgados, pueden estar lisos o ligeramente curvos, miden entre 0.2 a 0.4 µm por 1.0 a 2.5 µm.

Es inmóvil, no produce catalasa, puede llegar a producir o no  $\alpha$ -hemólisis en agar sangre. Unas de las características importantes para la identificación son:

- Producción de  $H_2S$  en KIA o TSI
- La reacción de fermentación positiva para glucosa, dextrosa y lactosa con producción de ácido sin gas.

Se desarrolla en forma de cepillo o escobillón de tubo de ensayo en cultivos de gelatina sembrada por punción, apareciendo colonias globuliformes a lo largo de la línea de inoculación. Es microaereófilico, pero puede crecer en condiciones aerobias y anaerobias. (Koneman, 1999 y Zinsser, 1993).

### **1.2.7 CINETICA DE CRECIMIENTO**

Cuando las bacterias se colocan en un medio de cultivo fresco, existe un periodo conocido como fase de adaptación el cuál se caracteriza porque no existe división celular ya que los microorganismos durante esta etapa se adaptan a las nuevas condiciones ambientales; algunas células pueden morir mientras que otras continúan con los procesos metabólico. Después de este periodo de tiempo, comienza la división celular rápida conocida como fase exponencial, de forma que, cada célula crece y se divide en dos. El tiempo que una célula hija emplea para crecer hasta la madurez y dividirse, se le conoce como tiempo de generación y para algunas especies es tan solo de 20 min. en condiciones optimas.

Después de algún tiempo, se presenta la fase de adaptación conforme la fuente de alimento se va agotando, los metabolitos se van acumulando, el espacio se reduce, el pH se modifica y de otros factores no bien conocidos aun, el numero de células vivas es igual al numero de células muertas. La división celular se hace más lenta y, por ultimo, cesa. (Modigan, 2003).

Si se realiza un conteo de células vivas (viables) a intervalos de tiempo después de la siembra del cultivo y se tabulan los datos obtenidos, se obtiene la grafica 1, donde se muestra la fase de inicial, cuando la multiplicación aun no se realiza se le llama fase de adaptación.

Esta fase va seguida de la fase logarítmica o exponencial, en la cual el número de células se ha duplicado en cada intervalo de tiempo. El siguiente periodo es la fase estacionaria en ella ya no se observa multiplicación y finalmente llegamos a la fase de declinación; es aquella donde los microorganismos mueren. (Cohen, 1977; Modigan, 2003)



[www.modelomatematicodecrecimientodebacterias\\_monografias.com.htm](http://www.modelomatematicodecrecimientodebacterias_monografias.com.htm)

**Grafica 1:** Cinética de crecimiento microbiano.

## 1.2.8 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Puede hacerse por medio de cultivo del material aspirado o de una biopsia del margen de la lesión. Los bacilos se localizan en el tejido profundo de la lesión en la Fig. 2 observamos las manchas rojizas sobre el lomo del animal y en la Fig. 3 endocarditis vegetativa (Zinsser, 1993).



[www.pig\\_sertesorbanc\\_6](http://www.pig_sertesorbanc_6)

**Figura 2:** Manchas rojizas de la piel de forma romboidal y de varios centímetros de diámetro.



[www.pig\\_sertesorbanc\\_4](http://www.pig_sertesorbanc_4)

**Figura 3:** Endocarditis vegetativa, las válvulas del corazón están destruidas y cubiertas por fibrina a causa de la infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

## 1.2.9 DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO

*Erysipelothrix rhusiopathiae* no es un microorganismo exigente y crece en la mayoría de los medios de cultivo de laboratorio convencionales, principalmente en agar sangre.

El aislamiento bacteriológico se debe intentar a partir de sangre de corazón, de órganos viscerales y de ganglios linfáticos.

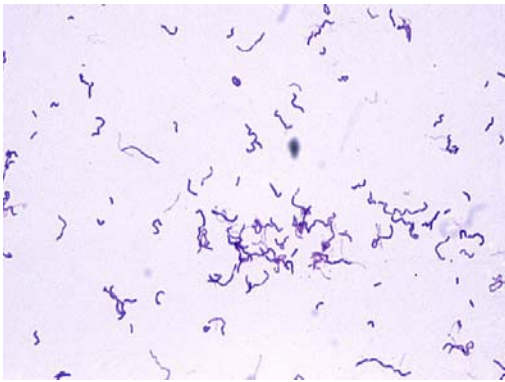
También se aísla de líquido pericárdico y articular cuando hay casos crónicos.

Se puede realizar la inoculación de animales de laboratorio como son ratones y palomas, inoculándolos con cultivo bacteriano. Si el ratón muere de las 48 a 72 horas de haber colocado él inculo la prueba es positiva. (Straw B. E. y cols, 1999; Collins, |969)

CRECIMIENTO	CARACTERÍSTICAS
agar sangre de carnero al 5%	colonias grandes y rugosas colonias pequeñas lisas y traslucidas Puede provocar alfa hemólisis por una incubación prolongada.
catalasa	Negativa
ureasa	Negativa
reducción de nitratos	Negativa
fermentación de carbohidratos	Glucosa positiva (la reacción puede ser débil o tardía) Maltosa negativa Manitol negativo Sacarosa negativa Xilosa negativo
gelatina	Crece en forma de escobillón
GLC	ALS (ác. Acético, ác. Láctico y ác. Succínico)
motilidad	Negativa
H <sub>2</sub> S	Positivo en la profundidad de TSI

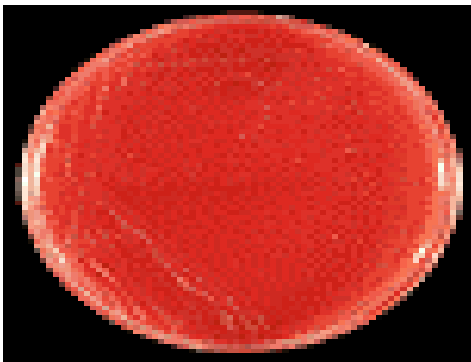
**TABLA 1:** Características bioquímicas de *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

(Collins, |969)



[www.medicinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterioweb/exa\\_microscopiques/bgp.htm](http://www.medicinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterioweb/exa_microscopiques/bgp.htm)

**FIGURA 4:** Tinción de Gram. *Erysipelothrix rhusiopathiae*



[www.medicinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterioweb/exa\\_microscopiques/bgp.htm](http://www.medicinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterioweb/exa_microscopiques/bgp.htm)

**FIGURA 5:** Agar sangre con crecimiento de *Erysipelothrix rhusiopathiae*

## 1.2.10 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO



Se realizan pruebas serológicas por aglutinación en placa, esta prueba es de considerable valor ya que nos ayuda a detectar la presencia de anticuerpos en los animales afectados con la forma crónica de la enfermedad. En la forma aguda no es muy recomendable realizar esta prueba ya que no se cuenta con la suficiente cantidad de anticuerpos. Reacción de aglutinación en tubo en donde una prueba positiva el líquido sobrenadante se aclara mientras que en una negativa permanece turbio. Se puede realizar la prueba indirecta de inmunofluorescencia ya que se detecta la presencia de anticuerpos en suero de los animales afectados y es una forma rápida y sencilla de diagnóstico. (Merchart, 1977).

### **1.2.11 TRATAMIENTO**

El tratamiento de la enfermedad se basa en la utilización principalmente de penicilina ya que es la droga de elección, y puede utilizarse eritromicina en pacientes alérgicos a la penicilina. Se recomienda administrar una dosis de penicilina que va de 11 a 22 mil unidades por Kg de peso. (Pijoan y Ramírez, 1982).

### **1.2.12 PREVENCIÓN Y CONTROL**

La prevención de esta enfermedad se realiza principalmente con la utilización de bacterinas, vacunas y sueros hiperinmunes, debido a que son de bajo costo, son confiables y disminuyen índices elevados de la presencia de la enfermedad.

Los cerdos deben de vacunarse a los 6 meses de edad y las hembras revacunarse cada 6 meses. En México se utilizan principalmente las bacterinas ya que protegen a cerdos recién nacidos hasta por 6 meses, a las hembras se les puede proteger a partir de la 2 o 3 semanas antes del parto y a los cerdos en engorda se les aplica a las 6-7 semanas de nacidos. Los que se utilizan para criar se les debe aplicar cada 6 meses (Pijoan y Ramírez, 1982)

### **1.2.13 PROBLEMA DE SALUD PUBLICA**

Esta enfermedad es considerada un problema de salud pública debido a que el hombre puede sufrir trastornos erisipeloides, con lesiones agudas y procesos inflamatorios dolorosos. Las que generalmente se presentan en las manos, es una enfermedad de tipo ocupacional, por el manejo de material contaminado y animales infectados (Pijoan y Ramírez 1982). En el estado de Jalisco, México, se llevo acabo un monitoreo de la incidencia de erisipela en humanos en los años de 1999 se encontró que por cada 100,000 habitantes el 9.21% y de ellos 603 casos son reportados de las diferentes instituciones de salud publica. (Anuario epidemiológico 1999).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Debido a que la erisipela porcina o mal rojo es una enfermedad muy común en el cerdo, puede llegar a ocurrir epizootias lo que provoca considerables pérdidas económicas. (Zinsser. 1993)

Ya que penetra en la piel a través de abrasiones menores, rasguños o picaduras provocando zonas eritematosas; además es capaz de sobrevivir durante largos periodos fuera del organismo animal en el suelo y no muere por el salado, ahumado o encurtido utilizado para la conservación de carnes. (Straw B. E. y cols.1999). Los cerdos de cualquier edad son susceptibles de infectarse con este microorganismo, sin embargo, se presenta con mayor frecuencia en animales de más de tres meses y hasta el peso de faena. Los cerdos portadores, clínicamente sanos, representan la fuente más importante de infección, siendo las tonsilas el lugar de colonización de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. (Copes. 2001) Se debe realizar un diagnóstico oportuno debido a que esto lleva a una importante pérdida económica para los productores de cerdos ya que en muchas ocasiones la enfermedad puede confundirse con otras y dar un tratamiento erróneo a los animales (Straw B. E. y cols.1999). Es una enfermedad común en los cerdos, y en muchas ocasiones no es tomada en cuenta. (Koneman 1999). En el mercado se realizan estudios principalmente bacteriológicos donde se realizan cultivos y tardan de 5 a 10 días en dar los resultados y es muy costoso, tomando en cuenta que se pudieran infectar grandes cantidades de animales, se estaría perdiendo mucho dinero y el tiempo que se tarda para dar un resultado también traería grandes pérdidas para el porcicultor.

En el mercado contamos con la técnica de ELISA la cual solo determina la presencia de los serotipos 1 y 2 de *Erysipelothrix rhusiopathiae* y como se sabe es una técnica cara y muy laboriosa aunque es muy confiable. Por tal motivo la problemática acerca de la erisipela porcina en México expuesta anteriormente, me motivo para llevar a cabo este trabajo experimental para desarrollar un sistema de diagnostico que permitirá realizar pruebas serológicas rápidas y confiables y así proponerles a los veterinarios y a los porcicultores tomar la decisión de lograr controlar y porque no hasta erradicar la enfermedad.

### **1.3 HIPÓTESIS**

Si el antígeno M100<sup>MR</sup> es específico para detectar anticuerpos contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* entonces se podrá detectar si los cerdos se encuentran vacunados o infectados con esta bacteria.

# 1. OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GENERAL

- Preparación de un antígeno específico a partir de *Erysipelothrix rhusiopathiae* para la determinación de la presencia de anticuerpos en sueros de cerdos.

## 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 2.2.1 Purificar e identificar la bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae*.
- 2.2.2 Realizar cinética de crecimiento microbiano.
- 2.2.3 Obtener una cantidad de biomasa suficiente para su acondicionamiento a la tinción con un colorante ácido.
- 2.2.4 Emplear la biomasa teñida como un antígeno colorido M100<sup>MR</sup> para pruebas de aglutinación en placa.
- 2.2.5 Evaluar el antígeno M100<sup>MR</sup> con muestras de sueros de cerdos provenientes de diferentes granjas , mediante la técnica de aglutinación en placa.
- 2.2.6 Determinar la presencia de anticuerpos contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* utilizando el antígeno M100<sup>MR</sup> con sueros de cerdos.
- 2.2.7 Utilizar la prueba como una forma de diagnóstico serológico para determinar la presencia de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cerdos.

## 4 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que se logro un crecimiento óptimo de la *Erysipelothrix rhusiopathiae*, a este crecimiento se le realizaron las pruebas bioquímicas para su posterior identificación, obteniendo los siguientes resultados:

CRECIMIENTO	Bibliográfico	Experimental
agar sangre de carnero al 5%	colonias grandes y rugosas colonias pequeñas lisas y traslucidas Puede provocar alfa hemólisis por una incubación prolongada.	Colonias pequeñas lisas y traslucidas.
catalasa	Negativa	Negativa
ureasa	Negativa	Negativa
reducción de nitratos	Negativa	Negativa
fermentación de carbohidratos	Glucosa positiva (la reacción puede ser débil o tardía) Maltosa negativa Manitol negativo Sacarosa negativa Xilosa negativo	Glucosa positiva ----- ----- Manitol negativo Sacarosa negativa ----- -----
gelatina	Crece en forma de escobillón	Creció en forma de escobillón
GLC	ALS (ác. Acético, ác. Láctico y ác. Succínico)	-----
motilidad	Negativa	Negativa
H <sub>2</sub> S	Positivo en la profundidad de TSI	Positivo en TSI

**TABLA 2:** Pruebas bacteriológicas de identificación de la bacteria donde los datos obtenidos coinciden con los reportados en la bibliografía. (Straw B. E. y cols.1999; Collins 1969)

## CINÉTICA DE CRECIMIENTO

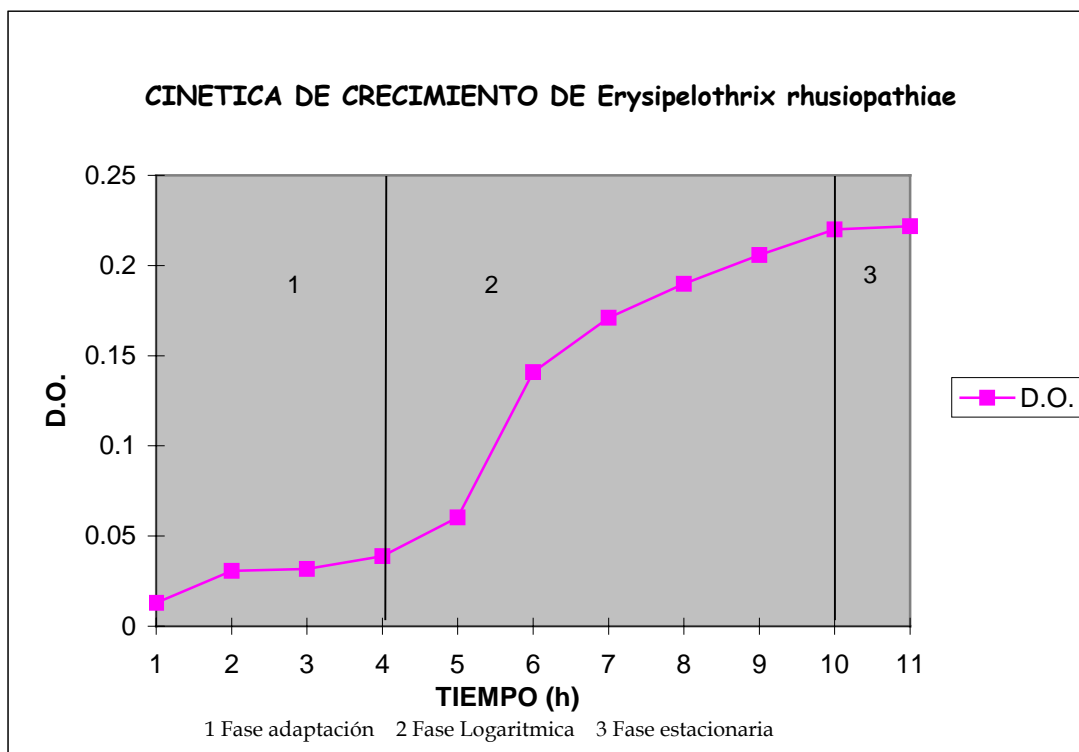
En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento microbiano por el método turbidimétrico.

**TABLA 3**

HORA	D.O. 540 NM
0	0.0130
1	0.0280
2	0.0307
3	0.0318
4	0.0388
5	0.0604
6	0.1409
7	0.1710
8	0.1898
9	0.2058
10	0.2200
11	0.2217

Grafica 2 obtenida en la Cinética de crecimiento microbiano relación entre densidad óptica respecto al tiempo de maduración de la bacteria.

**GRAFICA 2**



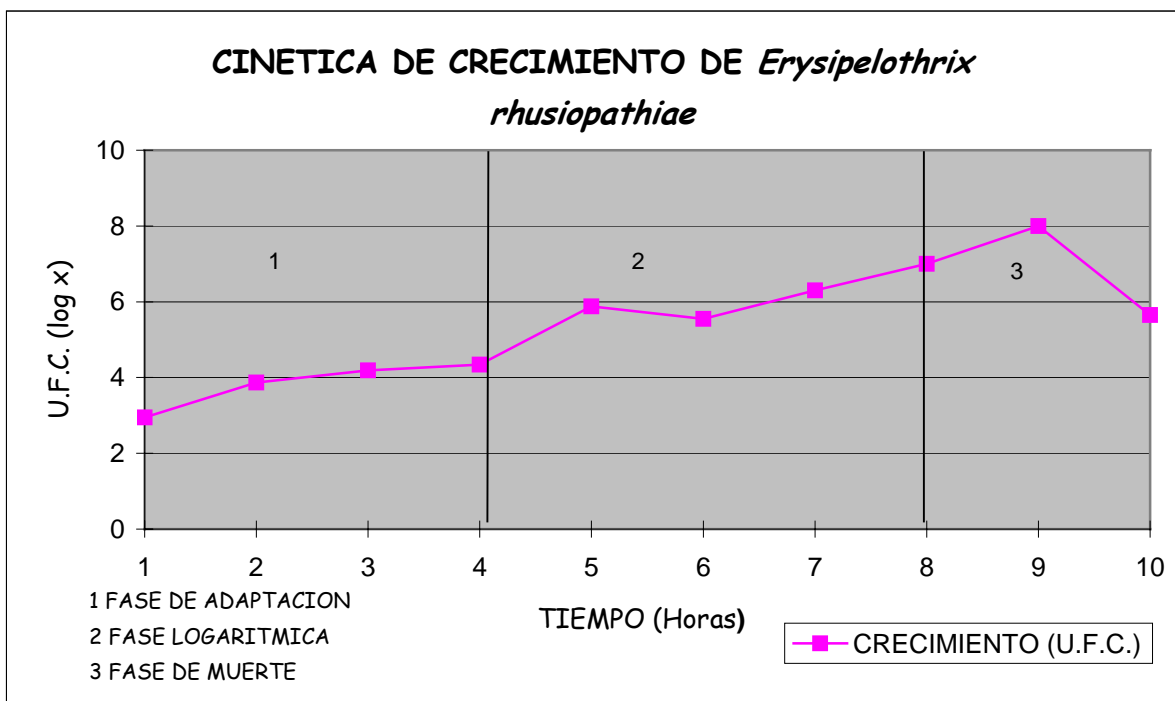
En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento microbiano por el método de recuento en placa.

**TABLA 4**

TIEMPO (HORAS)	CRECIMIENTO (U.F.C.)
0	$2.9488 \times 10^3$
1	$3.8653 \times 10^4$
2	$4.1918 \times 10^4$
3	$4.3374 \times 10^4$
4	$5.8750 \times 10^5$
5	$5.5509 \times 10^5$
6	$6.3010 \times 10^6$
7	$7.0000 \times 10^7$
8	$8.0000 \times 10^8$
9	$5.6478 \times 10^5$

En la gráfica 3 se muestra la unidad formadora de colonias en base logarítmica con relación al tiempo y a la concentración del inoculo.

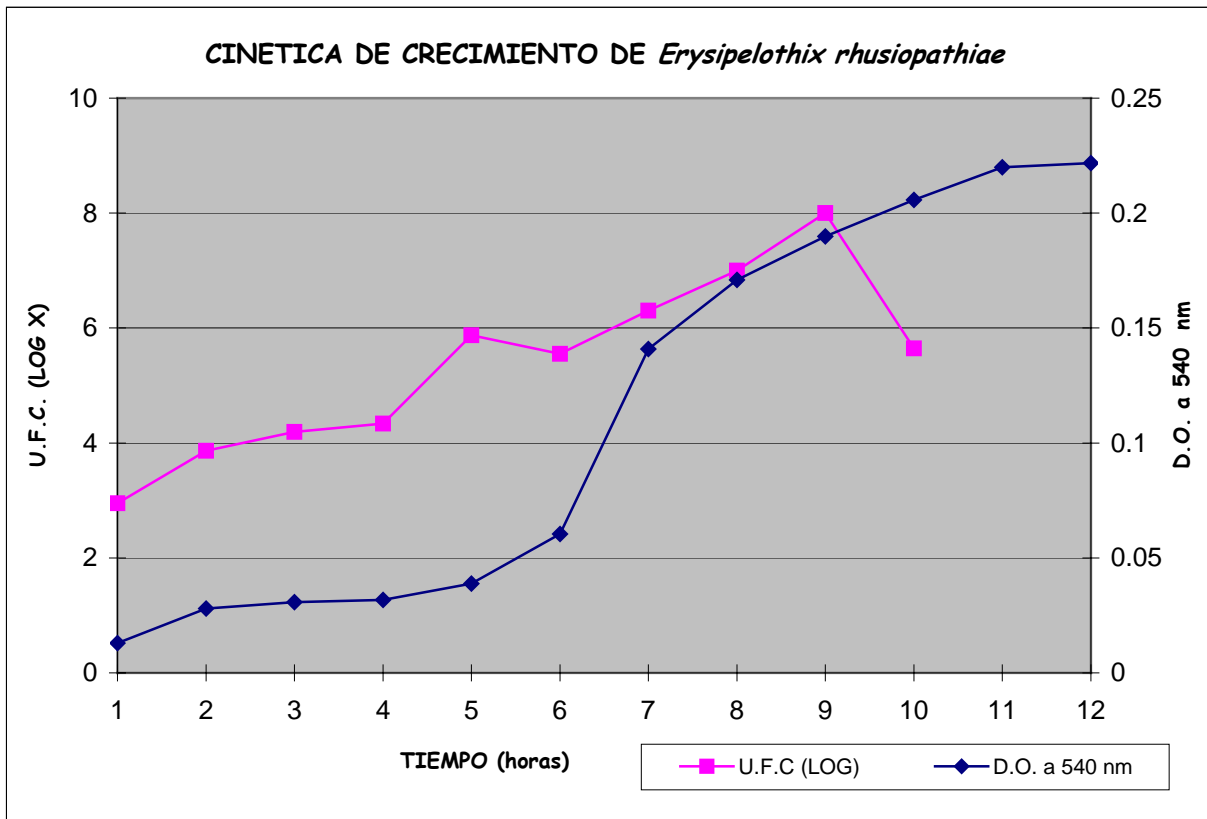
**GRÁFICA 3**





## GRAFICA 4

En la grafica 4 se muestra comparación del crecimiento microbiano por el método de recuento en placa y por el método turbidimetrico.



## RESULTADOS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

La prueba de aglutinación en placa realizada a los diferentes sueros en estudio se muestran a continuación en las siguientes fotos:



FIGURA 6: Antígeno colorido de *Erysipelothrix rhusiopathiae* M100<sup>MR</sup>



FIGURA 7: Material utilizado para la realización de la prueba de aglutinación.



FIGURA 8: Placa de látex donde se lleva a cabo la aglutinación.



FIGURA 9: Sueros de cerdos.



FIGURA 10: Placa de látex con sueros de cerdos.



FIGURA 11: Placa de látex con los sueros de los cerdos mas el antígeno M100<sup>MR</sup>.

### CONTROLES NEGATIVOS

AGUA DESTILADA	NEGATIVA
AGUA DESIONIZADA	NEGATIVA
SOLUCION SALINA	NEGATIVA
BUFFER DE LACTATOS	NEGATIVA
BUFFER DE FOSFATOS	NEGATIVA

**TABLA 5:** Resultados de las pruebas de aglutinación realizados a controles negativos para verificar que no existiera autoaglutinación del reactivo utilizado.

**TABLA 6**  
**SUEROS MUESTREADOS MÁS EL ANTIGENO**

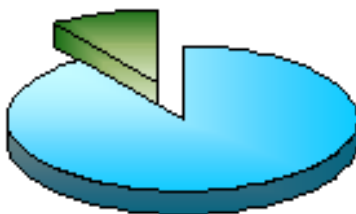
SUEROS	RESULTADOS	SUEROS	RESULTADOS
1	+	26	+
2	+	27	+
3	+	28	+
4	+	29	-
5	+	30	+
6	+	31	+
7	+	32	-
8	-	33	+
9	+	34	+
10	+	35	+
11	+	36	+
12	-	37	+
13	+	38	+
14	+	39	+
15	+	40	+
16	+	41	+
17	+	42	+
18	+	43	+
19	+	44	+
20	+	45	+
21	+	46	+
22	+	47	+
23	+	48	+
24	+	49	+
25	+	50	-

En 50 sueros muestreados se encontró que: Con la prueba de aglutinación con el antígeno teñido M100<sup>MR</sup> se obtuvo que un 90% de los sueros dieron aglutinación positiva y que solo un 10% fueron negativos.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la prueba de aglutinación en placa con el antígeno teñido M100<sup>MR</sup> en la cual se trabajaron con 50 sueros provenientes de diferentes granjas de México.

## GRAFICA 5

**NEGATIVOS**  
5/10%



**POSITIVOS**  
45/90%

En la grafica 5 se muestran los resultados de la prueba de aglutinación en placa de los sueros muestreados más el antígeno M100<sup>MR</sup>.



FIGURA 12: Controles negativos, positivos y resultados de sueros fotografía tomada en el laboratorio.

	FILA 1	FILA 2	FILA 3	FILA 4
CONTROLES NEGATIVOS	AGUA DESIONIZADA NEG.	AGUA DESTILADA NEG.	SOLUCION SALINA NEG.	SOLUCION DE HARTMANN NEG.
SUEROS	SUERO DE GALLINA POS.	SUERO DE GALLINA POS.	SUERO DE CERDO POS.	SUERO DE CERDO POS.
	SUERO DE CERDO POS.	SUERO DE CERDO NEG.	SUERO DE CERDO POS.	SUERO DE CERDO POS.

TABLA 7: Descripción de la placa mostrada en la figura 12.

## 5. DISCUSION

A pesar de la gran evolución técnica, científica y genética el área de la porcicultura a nivel mundial, se mantienen latentes algunos agentes infecciosos difíciles de erradicar, con los cuales hemos convivido durante largo tiempo y se han tratado de controlar y prevenir lo más posible, tal es el caso de la erisipela porcina, que es una enfermedad bacteriana infecto-contagiosa de los cerdos que ocasiona grandes pérdidas en la porcicultura mundial. (González. 2003)

El cerdo es la única especie que ha sido objeto de transformaciones biológicas, como resultado de los avances en la ingeniería genética y en la medicina veterinaria, y a pesar de que algunos parámetros como el período de gestación no se han podido alterar. El cerdo ofrece un gran número de ventajas a comparación de los bovinos de engorda, como por ejemplo: el período de engorda y el peso al mercado; los cerdos son sacrificados con un peso promedio de 100 Kg. entre los 4.5 y 6 meses de edad, mientras que los vacunos requieren pesar 400 Kg. y tener de 28 a 30 meses de edad, en el cerdo el rendimiento de la canal es casi del 100%, que es el más alto de las especies ganaderas. Por tal motivo la clave del éxito de los poricultores es aumentar los índices de ganancia de peso y disminuir la conversión alimenticia. Estos parámetros se ven seriamente afectados cuando los animales se encuentran enfermos y esto es debido a que en las granjas de México se tiene un gran problema de infecciones bacterianas que atacan a los cerdos ya sean de tipo respiratorias o del tracto digestivo y en este caso de enfermedades como el "mal rojo" o "erisipela porcina" ya que la gente al observar que la carne del cerdo esta manchada de color rojo no la consumen. (Ciprián-Mendoza,2001)

Este tipo de problemas que se presentan en las granjas es debido a que son lugares donde se tienen gran cantidad de animales concentrados en una misma área, por tal motivo se vuelven más susceptibles los cerdos a contraer enfermedades de origen infeccioso ya que ellos se encuentran estresados, el lugar es muy caliente, no alcanzan a alimentarse bien y no beben la suficiente cantidad de agua. Por tal motivo se debe poner en practica un control de seguridad, tomar medidas de higiene y una concentración de animales más adecuada para evitar que todos se infecten, con el fin de poder eliminar las enfermedades mortales que provocan grandes perdida de animales y así lograr tener una mejor calidad y producción de animales, para que exista un mayor consumo de su carne en el país, esto se va ha ver reflejado en las ganancias de los porcicultores.

La erisipela es una enfermedad infecto contagiosa que afecta principalmente a los cerdos, en tres formas principales que son: Aguda, subaguda y crónica; dejando secuelas de artritis y endocarditis.(Straw y cols. 1999; Pijoan y Ramírez. 1982)

Esta bacteria afecta además a casi 80 especies de animales y al hombre, por lo que ha tomado importancia en salud publica. Se ha observado que muchos cerdos son portadores del microorganismo (más del 50% de los animales sanos son positivos). Muchos de los animales que logran curarse del "mal rojo" quedan permanentemente inmunes, aunque pueden seguir albergando y difundiendo el germen. Los cerdos de más de 18 meses de edad son relativamente resistentes, probablemente a causa de ataques anteriores. Se ha demostrado que de cerdos sanos se ha logrado aislar el microorganismo y ellos no presentan síntoma alguno. (Merchant. 1977)

En las granjas donde *Erysipelothrix rhusiopathiae* es endémica, los cerdos son expuestos naturalmente cuando estos son pequeños. El microorganismo es excretado por los cerdos infectados y puede llegar a sobrevivir durante periodos cortos en la mayoría de los suelos. Los cerdos que llegan a sanar pueden llegar a ser portadores durante toda su vida. (González. 2003)

Por eso es necesario desarrollar técnicas de diagnóstico que sean rápidas y confiables para dar un tratamiento adecuado al cerdo y evitar la propagación de la infección.

Para determinar la fase de crecimiento de *Erysipelothrix rhusiopathiae* se prosiguió a realizar la cinética de crecimiento microbiano (ver hoja 16), la cual nos ayudo a evaluar el tiempo en el que la bacteria alcanza su máxima etapa de crecimiento en las condiciones establecidas, como es la temperatura, el tiempo, los cuales son óptimos para el desarrollo de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Esto se estableció experimentalmente midiendo las variaciones de la biomasa bacteriana en función del tiempo. Los datos obtenidos se pueden observar en: grafica 2,3 y 4.

Para observar el desarrollo bacteriano se tuvo que medir la biomasa bacteriana y para ello se utilizaron dos métodos el turbidimétrico y el método de recuento en placa:

En el método turbidimétrico se mide la D.O. el cual es un sistema que se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. Esta depende de la biomasa en suspensión y, por tanto, este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio.

Los resultados se muestran en la tabla 3, grafica 2 en donde se observa la D.O. la cual nos muestra dos fases de crecimiento de la cinética, la fase de adaptación en la cual las bacterias se están preparando para la división celular que tarda 3 horas, posteriormente se inicia a la 4ta hora la fase de crecimiento o fase logarítmica alcanzando el máximo desarrollo a las 8 horas de haber iniciado la incubación de *Erysipelothrix rhusiopathiae* nótese que hasta las 10 horas todavía se alcanza a observar la fase logarítmica, no se llega a observar la fase de muerte ya que todavía la D.O. esta variando, lo cual se debe a que la bacteria se sigue creciendo o a la presencia de partículas que se encuentran suspendidas en el CST.

En el método de recuento en placa lo que se determina es la unidad formadora de colonias (UFC) la que se denomina como una célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo logrando así una buena biomasa. Una UFC también puede corresponder a más de una célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente ya que cada grupo formará una sola colonia. También se tomo en cuenta un recuento viable el cual consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una UFC. O bien se realizan diluciones para observar un mejor desarrollo y poder contar mejor a las colonias. (Mateos, 2005; Microsoft Corporation 2001)



Los resultados de este método se muestran en la grafica 3 en la que también se presentan 3 fases, aquí tomamos en cuenta las diluciones realizadas del medio para obtener la U.F.C. en fase logarítmica vs. el tiempo de maduración. Nótese que a las 8 horas de incubación la bacteria alcanza su máximo desarrollo y una producción de células el cual fue de  $8 \times 10^8$ .

Esta grafica nos permite determinar la viabilidad de la bacteria. Se alcanza a observar que los tiempos se dan al igual que en la grafica 2, aunque en estos datos la fase de muerte se alcanza a observar mucho mejor y empieza a partir de la novena hora de iniciar la incubación.

En la gráfica 4 se muestra una comparación entre la D.O. y la U.F.C. con respecto al tiempo de incubación de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en ella se observa que siguen un comportamiento muy similar con los dos métodos realizados. Cabe recordar que por el método turbidimétrico se cuenta con las siguientes ventajas; es muy rápido, es sencillo de realizar y es económico aunque presenta como desventaja que no es muy exacto ya que puede medir tanto células vivas como muertas y en el método de recuento en placa es muy exacto debido a que solo se determinan células vivas. Aunque también presenta ciertas desventajas como son: es muy lento, complicado y muy caro ya que se utiliza una gran cantidad de material.

El crecimiento bacteriano puede considerarse como el desarrollo de poblaciones en muchos millones de células cuyas características son esencialmente estadísticas, y el comportamiento de la célula individual es tomado como una frecuencia. Las condiciones del medio que le impusimos a la bacteria fueron las adecuadas para su desarrollo y estabilidad lo que nos permitió buenos resultados al obtener la biomasa. (Mateos. 2005; Microsoft Corporation 2001).

La cinética de crecimiento se realizó con el fin de establecer las condiciones de óptimas de desarrollo de *Erysipelothrix rhusiopathiae* para obtener el tiempo máximo de crecimiento en el cual se obtiene la mayor cantidad de biomasa la que nos va a servir en la elaboración del antígeno M100<sup>MR</sup> el cual va a ser utilizado como una prueba de diagnóstico para determinar la presencia de anticuerpos contra esta bacteria.

Mediante pruebas serológicas como es la técnica de aglutinación en placa. La cual es una técnica de serotipificación en la cual se forma un inmunocomplejo por el entrelace entre células o partículas por anticuerpos específicos esto es conocido como reacción de aglutinación, donde el anticuerpo responsable es una aglutinina. Las reacciones de aglutinación suelen formar agregados que son visibles o grumos (aglutinados) que se observan a simple vista. Estas reacciones son conocidas como de aglutinación directa y son muy útiles para el diagnóstico de varias enfermedades ya que en ellas se producen anticuerpos específicos contra la bacteria. (Rojas. 2001)

En estas reacciones el antígeno forma parte de la superficie de algún material particulado como suelen ser los eritrocitos, las bacterias o quizá una partícula inorgánica (partículas de látex) que son recubiertas por él. El anticuerpo agregado es una suspensión de partículas que se combinan con el antígeno de superficie. (Weir. 1999)

Cuando se sospecha que un cerdo se encuentra infectado con *Erysipelothrix rhusiopathiae* se va a utilizar esta prueba de aglutinación directa donde se añade el antígeno M100<sup>MR</sup> teñido con un colorante ácido el cual favorece considerablemente la expresión del componente aglutinante de los anticuerpos presentes en el suero contra esta bacteria específica. (Cardenal, 2004)

Teniendo así que los resultados que se obtuvieron son cualitativos y solamente vamos a detectar anticuerpos de la clase IgG ya que son los que se encuentran en gran cantidad en el suero al momento de la infección, en las placas con los sueros de los animales infectados es donde se presentara la aglutinación indicándonos un resultado positivo.

Seria necesario poder diferenciar si los anticuerpos que están aglutinando son de clase IgM o IgG y para ello se debe de disponer de más información acerca de la evolución de la enfermedad en los animales, así como realizar otro tipo de pruebas diagnosticas; como seria la 2-mercaptoetanol ya que esta prueba solo nos detecta los anticuerpos de clase IgG por que los de la clase IgM son inactivos y realizar la técnica de ELISA ya que ella nos detecta anticuerpos de clase IgA.

En un estudio realizado para salmonella se encontró que una reacción positivas eran la formación de grumos, después de cierto tiempo, al llevarse a cabo la reacción de Ag-Ac; la interpretación de esta prueba se toma como positivos cuando los sueros de los animales presentan cualquier grado de aglutinación y son negativos aquellos que no muestren aglutinación lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente señalados ya que nos indican que en las granjas de donde se obtuvieron los sueros existe o no existe la presencia de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. (Castillo. 2002)

Se ha demostrado que esta prueba de aglutinación tiene una sensibilidad del 84% y una especificidad de 95 % ya que solo los sueros que tienen la presencia de anticuerpos específicos contra esta bacteria se aglutinan descartando así dar falsos positivos. (Castillo y cols. 2002)

Para lograr establecer los perfiles serológicos en el ámbito de campo es recomendable contar con pruebas rápidas de diagnóstico que nos permitan obtener resultados confiables para que el médico veterinario pueda establecer las medidas preventivas adecuadas. (Castillo. 2002)

El antígeno M100<sup>MR</sup> preparado de *Erysipelothrix rhusiopathiae* presenta ciertas ventajas sobre otro tipo de pruebas de laboratorio ya que nos permite obtener resultados confiables en un mínimo de tiempo, no requiere de personal altamente calificado que pueda realizar esta prueba y así poder determinar si la infección por esta bacteria está presente en las granjas para lo que se debe llevar a cabo una forma de control contra esta enfermedad, como sería la vacunación y poder erradicar la enfermedad. (Ciprián-Mendoza. 2002)

Se muestrearon 50 sueros de los cuales un 90% fueron positivos y un 10% negativos lo cual nos esta indicando que los animales se encuentran enfermos o infectados con la bacteria, en muchas ocasiones se ha llegado a confundir las manchas rojas presentes en los animales con golpes o con la presencia de otro tipo de bacterias a lo cual no se le da importancia y esta prueba le ayuda al porcicultor o al veterinario a tomar mejores medidas de bioseguridad en las granjas.

En la tabla 5 se realizan pruebas con controles negativos, ellas se realizan para observar que el antígeno no aglutine por si solo o con otras sustancias y así poder descartar falsos positivos, se tomo como control positivo suero de gallinas inoculadas con *Erysipelothrix rhusiopathiae* si se observa aglutinación pero no se observa de igual manera que la aglutinación formada por los sueros de los cerdos. Se dice que muchas aves son susceptibles a la infección con esta bacteria, por lo que se presupone que por eso no se forma la aglutinación de igual forma que en los sueros de los cerdos.

(Mechart. 1977)

Los resultados se muestran en la tabla 6. en la erisipela porcina o mal rojo los anticuerpos aparecen a los 10-14 días después de iniciada la infección y persisten por meses. La técnica de ELISA puede titular la presencia de dichos anticuerpos, pero la interpretación es difícil. (Balesga. 2005)

El antígeno preparado de *Erysipelothrix rhusiopathiae* presenta ciertas ventajas sobre otras pruebas de laboratorio ya que nos permite obtener resultados confiables en un mínimo de tiempo, no se requiere personal altamente calificado para realizar la prueba, ni equipo sofisticado, permitiéndonos así conocer si en las granjas esta presente la infección y poder establecer programas de control como es la vacunación contra la erisipela porcina.

Esta técnica de diagnóstico es rápida, sencilla, específica y sensible para *Erysipelothrix rhusiopathiae*, además de que es económica ya que al estar al lado de otras pruebas como es el caso de ELISA es muy barata; aunque los resultados podrían ser muy parecidos. (Salvatierra y cols 2002.)

La prueba de aglutinación en placa con el antígeno M100<sup>MR</sup> de *Erysipelothrix rhusiopathiae* necesita más estudio, ya que necesitamos infectar cerdos y así obtener resultados de manera experimental para lograr una validación de la prueba y obtener resultados 100% confiables.

Este método sirve para comprobar si un cerdo se encuentra infectado con *Erysipelothrix rhusiopathiae* ya que comprende la preparación de un reactivo que contiene el cuerpo completo de la bacteria que es específico del cerdo y que nos ayuda a identificar la presencia de anticuerpos. Los resultados obtenidos son cualitativos ya que las celdas presentan aglutinación que se observa a simple vista indicándonos que el cerdo se encuentra enfermo y en los cerdos sanos no se presenta la aglutinación.

Por lo que podemos decir que la bacteria está frecuente en las granjas del Estado de México o valle de México pero en muchas ocasiones no es diagnosticada como se debe hacer y se confunde la sintomatología de los animales.

Por el momento esta prueba de aglutinación en placa puede utilizarse como una alternativa ya que se trata de una técnica cualitativa a la cual se le necesitan hacer más pruebas para lograr hacer la técnica más satisfactoria.

En el mercado se realizan estudios principalmente bacteriológicos donde se realizan cultivos y tardan de 5 a 10 días en dar los resultados y es muy costoso, tomando en cuenta que se pudieran infectar grandes cantidades de animales, se estaría perdiendo mucho dinero y el tiempo que se tarda para dar un resultado también traería grandes pérdidas para el porcicultor.

En el mercado contamos con la técnica de ELISA la cual solo determina la presencia de los serotipos 1 y 2 de *Erysipelothrix rhusiopathiae* que son los que están presentes en los cerdos y como se sabe es una técnica cara y muy laboriosa aunque es muy confiable.

Por eso el motivo de llevar a cabo la preparación de este antígeno M100<sup>MR</sup> ya que es un método: económico, rápido y es confiable.

Esta técnica de diagnóstico no es confirmatoria solamente es de sondeo, que le permitirá al porcicultor medidas preventivas.

## 4 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que se logro un crecimiento óptimo de la *Erysipelothrix rhusiopathiae*, a este crecimiento se le realizaron las pruebas bioquímicas para su posterior identificación, obteniendo los siguientes resultados:

CRECIMIENTO	Bibliográfico	Experimental
agar sangre de carnero al 5%	colonias grandes y rugosas colonias pequeñas lisas y traslucidas Puede provocar alfa hemólisis por una incubación prolongada.	Colonias pequeñas lisas y traslucidas.
catalasa	Negativa	Negativa
ureasa	Negativa	Negativa
reducción de nitratos	Negativa	Negativa
fermentación de carbohidratos	Glucosa positiva (la reacción puede ser débil o tardía) Maltosa negativa Manitol negativo Sacarosa negativa Xilosa negativo	Glucosa positiva ----- ----- Manitol negativo Sacarosa negativa ----- -----
gelatina	Crece en forma de escobillón	Creció en forma de escobillón
GLC	ALS (ác. Acético, ác. Láctico y ác. Succínico)	-----
motilidad	Negativa	Negativa
H <sub>2</sub> S	Positivo en la profundidad de TSI	Positivo en TSI

**TABLA 2:** Pruebas bacteriológicas de identificación de la bacteria donde los datos obtenidos coinciden con los reportados en la bibliografía. (Straw B. E. y cols.1999; Collins 1969)



## CINÉTICA DE CRECIMIENTO

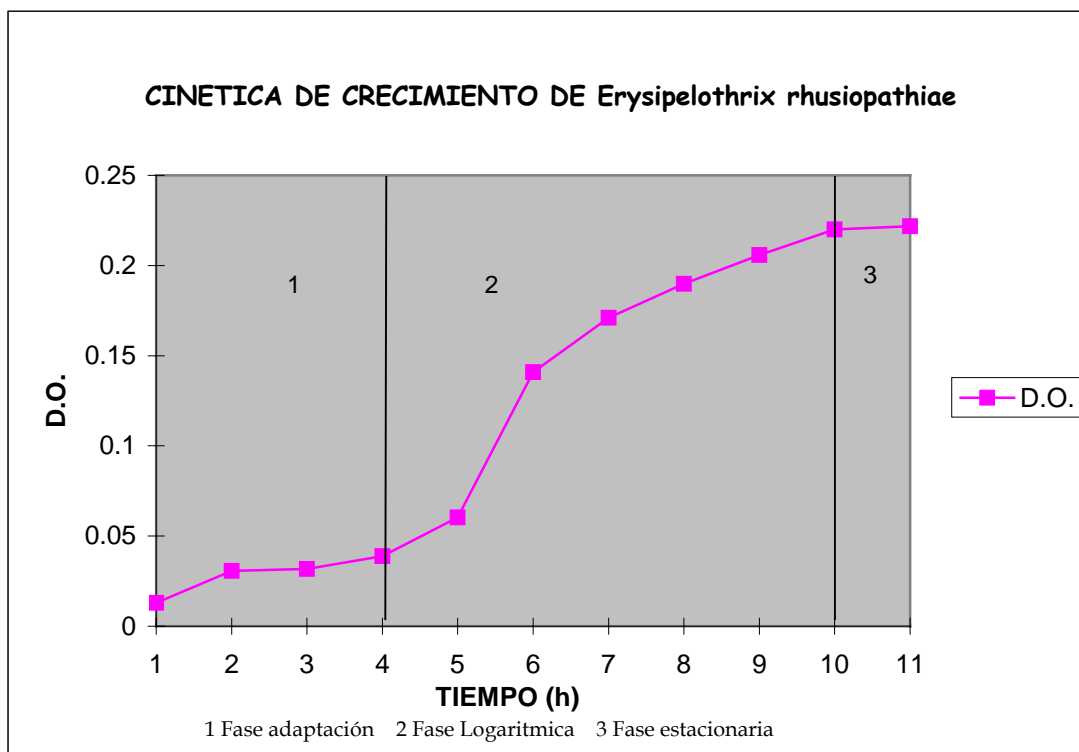
En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento microbiano por el método turbidimétrico.

**TABLA 3**

HORA	D.O. 540 NM
0	0.0130
1	0.0280
2	0.0307
3	0.0318
4	0.0388
5	0.0604
6	0.1409
7	0.1710
8	0.1898
9	0.2058
10	0.2200
11	0.2217

Grafica 2 obtenida en la Cinética de crecimiento microbiano relación entre densidad óptica respecto al tiempo de maduración de la bacteria.

**GRAFICA 2**



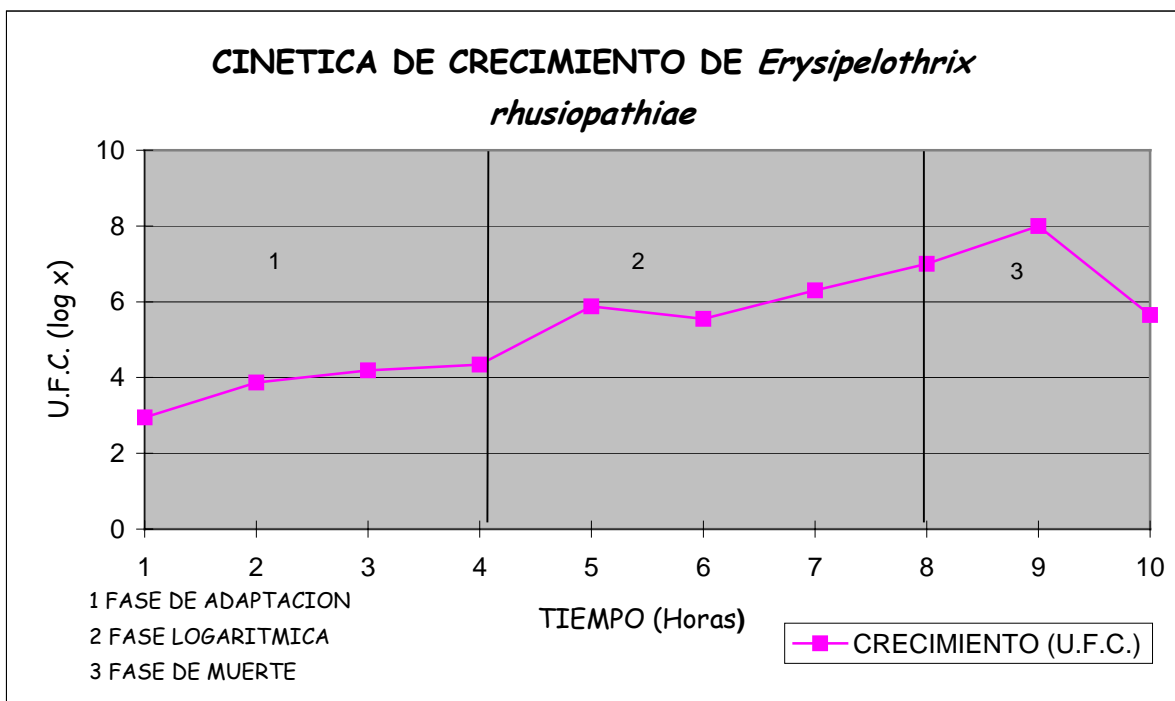
En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento microbiano por el método de recuento en placa.

**TABLA 4**

TIEMPO (HORAS)	CRECIMIENTO (U.F.C.)
0	$2.9488 \times 10^3$
1	$3.8653 \times 10^4$
2	$4.1918 \times 10^4$
3	$4.3374 \times 10^4$
4	$5.8750 \times 10^5$
5	$5.5509 \times 10^5$
6	$6.3010 \times 10^6$
7	$7.0000 \times 10^7$
8	$8.0000 \times 10^8$
9	$5.6478 \times 10^5$

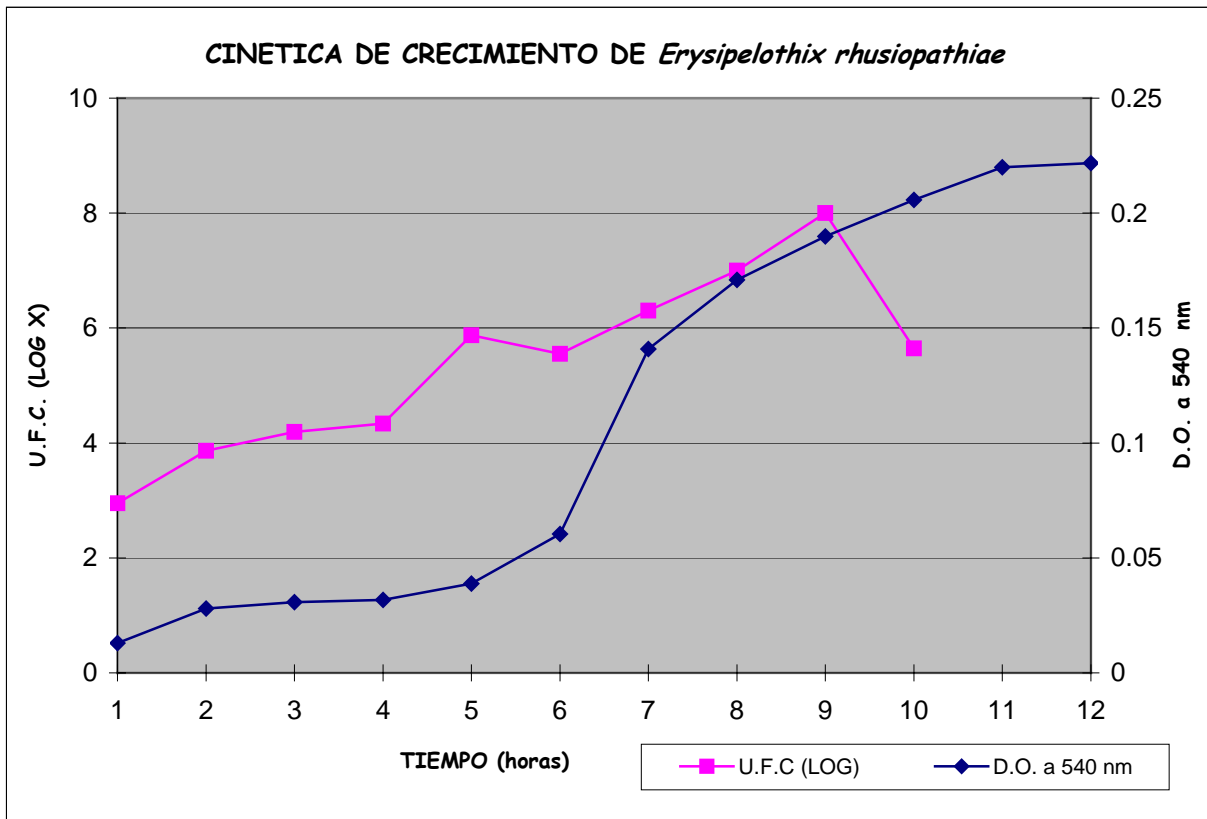
En la gráfica 3 se muestra la unidad formadora de colonias en base logarítmica con relación al tiempo y a la concentración del inoculo.

**GRÁFICA 3**



## GRAFICA 4

En la grafica 4 se muestra comparación del crecimiento microbiano por el método de recuento en placa y por el método turbidimetrico.



## RESULTADOS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

La prueba de aglutinación en placa realizada a los diferentes sueros en estudio se muestran a continuación en las siguientes fotos:



FIGURA 6: Antígeno colorido de *Erysipelothrix rhusiopathiae* M100<sup>MR</sup>



FIGURA 7: Material utilizado para la realización de la prueba de aglutinación.



FIGURA 8: Placa de látex donde se lleva a cabo la aglutinación.



FIGURA 9: Sueros de cerdos.



FIGURA 10: Placa de látex con sueros de cerdos.



FIGURA 11: Placa de látex con los sueros de los cerdos mas el antígeno M100<sup>MR</sup>.

### CONTROLES NEGATIVOS

AGUA DESTILADA	NEGATIVA
AGUA DESIONIZADA	NEGATIVA
SOLUCION SALINA	NEGATIVA
BUFFER DE LACTATOS	NEGATIVA
BUFFER DE FOSFATOS	NEGATIVA

**TABLA 5:** Resultados de las pruebas de aglutinación realizados a controles negativos para verificar que no existiera autoaglutinación del reactivo utilizado.

**TABLA 6**  
**SUEROS MUESTREADOS MÁS EL ANTIGENO**

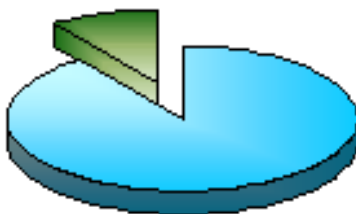
SUEROS	RESULTADOS	SUEROS	RESULTADOS
1	+	26	+
2	+	27	+
3	+	28	+
4	+	29	-
5	+	30	+
6	+	31	+
7	+	32	-
8	-	33	+
9	+	34	+
10	+	35	+
11	+	36	+
12	-	37	+
13	+	38	+
14	+	39	+
15	+	40	+
16	+	41	+
17	+	42	+
18	+	43	+
19	+	44	+
20	+	45	+
21	+	46	+
22	+	47	+
23	+	48	+
24	+	49	+
25	+	50	-

En 50 sueros muestreados se encontró que: Con la prueba de aglutinación con el antígeno teñido M100<sup>MR</sup> se obtuvo que un 90% de los sueros dieron aglutinación positiva y que solo un 10% fueron negativos.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la prueba de aglutinación en placa con el antígeno teñido M100<sup>MR</sup> en la cual se trabajaron con 50 sueros provenientes de diferentes granjas de México.

## GRAFICA 5

**NEGATIVOS**  
5/10%



**POSITIVOS**  
45/90%

En la grafica 5 se muestran los resultados de la prueba de aglutinación en placa de los sueros muestreados más el antígeno M100<sup>MR</sup>.



FIGURA 12: Controles negativos, positivos y resultados de sueros fotografía tomada en el laboratorio.

	FILA 1	FILA 2	FILA 3	FILA 4
CONTROLES NEGATIVOS	AGUA DESIONIZADA NEG.	AGUA DESTILADA NEG.	SOLUCION SALINA NEG.	SOLUCION DE HARTMANN NEG.
SUEROS	SUERO DE GALLINA POS.	SUERO DE GALLINA POS.	SUERO DE CERDO POS.	SUERO DE CERDO POS.
	SUERO DE CERDO POS.	SUERO DE CERDO NEG.	SUERO DE CERDO POS.	SUERO DE CERDO POS.

TABLA 7: Descripción de la placa mostrada en la figura 12.

## 5. DISCUSION

A pesar de la gran evolución técnica, científica y genética el área de la porcicultura a nivel mundial, se mantienen latentes algunos agentes infecciosos difíciles de erradicar, con los cuales hemos convivido durante largo tiempo y se han tratado de controlar y prevenir lo más posible, tal es el caso de la erisipela porcina, que es una enfermedad bacteriana infecto-contagiosa de los cerdos que ocasiona grandes pérdidas en la porcicultura mundial. (González. 2003)

El cerdo es la única especie que ha sido objeto de transformaciones biológicas, como resultado de los avances en la ingeniería genética y en la medicina veterinaria, y a pesar de que algunos parámetros como el período de gestación no se han podido alterar. El cerdo ofrece un gran número de ventajas a comparación de los bovinos de engorda, como por ejemplo: el período de engorda y el peso al mercado; los cerdos son sacrificados con un peso promedio de 100 Kg. entre los 4.5 y 6 meses de edad, mientras que los vacunos requieren pesar 400 Kg. y tener de 28 a 30 meses de edad, en el cerdo el rendimiento de la canal es casi del 100%, que es el más alto de las especies ganaderas. Por tal motivo la clave del éxito de los poricultores es aumentar los índices de ganancia de peso y disminuir la conversión alimenticia. Estos parámetros se ven seriamente afectados cuando los animales se encuentran enfermos y esto es debido a que en las granjas de México se tiene un gran problema de infecciones bacterianas que atacan a los cerdos ya sean de tipo respiratorias o del tracto digestivo y en este caso de enfermedades como el "mal rojo" o "erisipela porcina" ya que la gente al observar que la carne del cerdo esta manchada de color rojo no la consumen. (Ciprián-Mendoza,2001)

Este tipo de problemas que se presentan en las granjas es debido a que son lugares donde se tienen gran cantidad de animales concentrados en una misma área, por tal motivo se vuelven más susceptibles los cerdos a contraer enfermedades de origen infeccioso ya que ellos se encuentran estresados, el lugar es muy caliente, no alcanzan a alimentarse bien y no beben la suficiente cantidad de agua. Por tal motivo se debe poner en practica un control de seguridad, tomar medidas de higiene y una concentración de animales más adecuada para evitar que todos se infecten, con el fin de poder eliminar las enfermedades mortales que provocan grandes perdida de animales y así lograr tener una mejor calidad y producción de animales, para que exista un mayor consumo de su carne en el país, esto se va ha ver reflejado en las ganancias de los porcicultores.

La erisipela es una enfermedad infecto contagiosa que afecta principalmente a los cerdos, en tres formas principales que son: Aguda, subaguda y crónica; dejando secuelas de artritis y endocarditis.(Straw y cols. 1999; Pijoan y Ramírez. 1982)

Esta bacteria afecta además a casi 80 especies de animales y al hombre, por lo que ha tomado importancia en salud publica. Se ha observado que muchos cerdos son portadores del microorganismo (más del 50% de los animales sanos son positivos). Muchos de los animales que logran curarse del "mal rojo" quedan permanentemente inmunes, aunque pueden seguir albergando y difundiendo el germen. Los cerdos de más de 18 meses de edad son relativamente resistentes, probablemente a causa de ataques anteriores. Se ha demostrado que de cerdos sanos se ha logrado aislar el microorganismo y ellos no presentan síntoma alguno. (Merchant. 1977)



En las granjas donde *Erysipelothrix rhusiopathiae* es endémica, los cerdos son expuestos naturalmente cuando estos son pequeños. El microorganismo es excretado por los cerdos infectados y puede llegar a sobrevivir durante periodos cortos en la mayoría de los suelos. Los cerdos que llegan a sanar pueden llegar a ser portadores durante toda su vida. (González. 2003)

Por eso es necesario desarrollar técnicas de diagnóstico que sean rápidas y confiables para dar un tratamiento adecuado al cerdo y evitar la propagación de la infección.

Para determinar la fase de crecimiento de *Erysipelothrix rhusiopathiae* se prosiguió a realizar la cinética de crecimiento microbiano (ver hoja 16), la cual nos ayudo a evaluar el tiempo en el que la bacteria alcanza su máxima etapa de crecimiento en las condiciones establecidas, como es la temperatura, el tiempo, los cuales son óptimos para el desarrollo de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Esto se estableció experimentalmente midiendo las variaciones de la biomasa bacteriana en función del tiempo. Los datos obtenidos se pueden observar en: grafica 2,3 y 4.

Para observar el desarrollo bacteriano se tuvo que medir la biomasa bacteriana y para ello se utilizaron dos métodos el turbidimétrico y el método de recuento en placa:

En el método turbidimétrico se mide la D.O. el cual es un sistema que se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. Esta depende de la biomasa en suspensión y, por tanto, este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio.

Los resultados se muestran en la tabla 3, grafica 2 en donde se observa la D.O. la cual nos muestra dos fases de crecimiento de la cinética, la fase de adaptación en la cual las bacterias se están preparando para la división celular que tarda 3 horas, posteriormente se inicia a la 4ta hora la fase de crecimiento o fase logarítmica alcanzando el máximo desarrollo a las 8 horas de haber iniciado la incubación de *Erysipelothrix rhusiopathiae* nótese que hasta las 10 horas todavía se alcanza a observar la fase logarítmica, no se llega a observar la fase de muerte ya que todavía la D.O. esta variando, lo cual se debe a que la bacteria se sigue creciendo o a la presencia de partículas que se encuentran suspendidas en el CST.

En el método de recuento en placa lo que se determina es la unidad formadora de colonias (UFC) la que se denomina como una célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo logrando así una buena biomasa. Una UFC también puede corresponder a más de una célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente ya que cada grupo formará una sola colonia. También se tomo en cuenta un recuento viable el cual consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una UFC. O bien se realizan diluciones para observar un mejor desarrollo y poder contar mejor a las colonias. (Mateos, 2005; Microsoft Corporation 2001)

Los resultados de este método se muestran en la grafica 3 en la que también se presentan 3 fases, aquí tomamos en cuenta las diluciones realizadas del medio para obtener la U.F.C. en fase logarítmica vs. el tiempo de maduración. Nótese que a las 8 horas de incubación la bacteria alcanza su máximo desarrollo y una producción de células el cual fue de  $8 \times 10^8$ .

Esta grafica nos permite determinar la viabilidad de la bacteria. Se alcanza a observar que los tiempos se dan al igual que en la grafica 2, aunque en estos datos la fase de muerte se alcanza a observar mucho mejor y empieza a partir de la novena hora de iniciar la incubación.

En la gráfica 4 se muestra una comparación entre la D.O. y la U.F.C. con respecto al tiempo de incubación de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en ella se observa que siguen un comportamiento muy similar con los dos métodos realizados. Cabe recordar que por el método turbidimétrico se cuenta con las siguientes ventajas; es muy rápido, es sencillo de realizar y es económico aunque presenta como desventaja que no es muy exacto ya que puede medir tanto células vivas como muertas y en el método de recuento en placa es muy exacto debido a que solo se determinan células vivas. Aunque también presenta ciertas desventajas como son: es muy lento, complicado y muy caro ya que se utiliza una gran cantidad de material.

El crecimiento bacteriano puede considerarse como el desarrollo de poblaciones en muchos millones de células cuyas características son esencialmente estadísticas, y el comportamiento de la célula individual es tomado como una frecuencia. Las condiciones del medio que le impusimos a la bacteria fueron las adecuadas para su desarrollo y estabilidad lo que nos permitió buenos resultados al obtener la biomasa. (Mateos. 2005; Microsoft Corporation 2001).

La cinética de crecimiento se realizó con el fin de establecer las condiciones de óptimas de desarrollo de *Erysipelothrix rhusiopathiae* para obtener el tiempo máximo de crecimiento en el cual se obtiene la mayor cantidad de biomasa la que nos va a servir en la elaboración del antígeno M100<sup>MR</sup> el cual va a ser utilizado como una prueba de diagnóstico para determinar la presencia de anticuerpos contra esta bacteria.

Mediante pruebas serológicas como es la técnica de aglutinación en placa. La cual es una técnica de serotipificación en la cual se forma un inmunocomplejo por el entrelace entre células o partículas por anticuerpos específicos esto es conocido como reacción de aglutinación, donde el anticuerpo responsable es una aglutinina. Las reacciones de aglutinación suelen formar agregados que son visibles o grumos (aglutinados) que se observan a simple vista. Estas reacciones son conocidas como de aglutinación directa y son muy útiles para el diagnóstico de varias enfermedades ya que en ellas se producen anticuerpos específicos contra la bacteria. (Rojas. 2001)

En estas reacciones el antígeno forma parte de la superficie de algún material particulado como suelen ser los eritrocitos, las bacterias o quizá una partícula inorgánica (partículas de látex) que son recubiertas por él. El anticuerpo agregado es una suspensión de partículas que se combinan con el antígeno de superficie. (Weir. 1999)

Cuando se sospecha que un cerdo se encuentra infectado con *Erysipelothrix rhusiopathiae* se va a utilizar esta prueba de aglutinación directa donde se añade el antígeno M100<sup>MR</sup> teñido con un colorante ácido el cual favorece considerablemente la expresión del componente aglutinante de los anticuerpos presentes en el suero contra esta bacteria específica. (Cardenal, 2004)

Teniendo así que los resultados que se obtuvieron son cualitativos y solamente vamos a detectar anticuerpos de la clase IgG ya que son los que se encuentran en gran cantidad en el suero al momento de la infección, en las placas con los sueros de los animales infectados es donde se presentara la aglutinación indicándonos un resultado positivo.

Seria necesario poder diferenciar si los anticuerpos que están aglutinando son de clase IgM o IgG y para ello se debe de disponer de más información acerca de la evolución de la enfermedad en los animales, así como realizar otro tipo de pruebas diagnosticas; como seria la 2-mercaptoetanol ya que esta prueba solo nos detecta los anticuerpos de clase IgG por que los de la clase IgM son inactivos y realizar la técnica de ELISA ya que ella nos detecta anticuerpos de clase IgA.

En un estudio realizado para salmonella se encontró que una reacción positivas eran la formación de grumos, después de cierto tiempo, al llevarse a cabo la reacción de Ag-Ac; la interpretación de esta prueba se toma como positivos cuando los sueros de los animales presentan cualquier grado de aglutinación y son negativos aquellos que no muestren aglutinación lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente señalados ya que nos indican que en las granjas de donde se obtuvieron los sueros existe o no existe la presencia de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. (Castillo. 2002)

Se ha demostrado que esta prueba de aglutinación tiene una sensibilidad del 84% y una especificidad de 95 % ya que solo los sueros que tienen la presencia de anticuerpos específicos contra esta bacteria se aglutinan descartando así dar falsos positivos. (Castillo y cols. 2002)

Para lograr establecer los perfiles serológicos en el ámbito de campo es recomendable contar con pruebas rápidas de diagnóstico que nos permitan obtener resultados confiables para que el médico veterinario pueda establecer las medidas preventivas adecuadas. (Castillo. 2002)

El antígeno M100<sup>MR</sup> preparado de *Erysipelothrix rhusiopathiae* presenta ciertas ventajas sobre otro tipo de pruebas de laboratorio ya que nos permite obtener resultados confiables en un mínimo de tiempo, no requiere de personal altamente calificado que pueda realizar esta prueba y así poder determinar si la infección por esta bacteria está presente en las granjas para lo que se debe llevar a cabo una forma de control contra esta enfermedad, como sería la vacunación y poder erradicar la enfermedad. (Ciprián-Mendoza. 2002)

Se muestrearon 50 sueros de los cuales un 90% fueron positivos y un 10% negativos lo cual nos esta indicando que los animales se encuentran enfermos o infectados con la bacteria, en muchas ocasiones se ha llegado a confundir las manchas rojas presentes en los animales con golpes o con la presencia de otro tipo de bacterias a lo cual no se le da importancia y esta prueba le ayuda al porcicultor o al veterinario a tomar mejores medidas de bioseguridad en las granjas.

En la tabla 5 se realizan pruebas con controles negativos, ellas se realizan para observar que el antígeno no aglutine por si solo o con otras sustancias y así poder descartar falsos positivos, se tomo como control positivo suero de gallinas inoculadas con *Erysipelothrix rhusiopathiae* si se observa aglutinación pero no se observa de igual manera que la aglutinación formada por los sueros de los cerdos. Se dice que muchas aves son susceptibles a la infección con esta bacteria, por lo que se presupone que por eso no se forma la aglutinación de igual forma que en los sueros de los cerdos. (Mechart. 1977)

Los resultados se muestran en la tabla 6. en la erisipela porcina o mal rojo los anticuerpos aparecen a los 10-14 días después de iniciada la infección y persisten por meses. La técnica de ELISA puede titular la presencia de dichos anticuerpos, pero la interpretación es difícil. (Balesga. 2005)

El antígeno preparado de *Erysipelothrix rhusiopathiae* presenta ciertas ventajas sobre otras pruebas de laboratorio ya que nos permite obtener resultados confiables en un mínimo de tiempo, no se requiere personal altamente calificado para realizar la prueba, ni equipo sofisticado, permitiéndonos así conocer si en las granjas esta presente la infección y poder establecer programas de control como es la vacunación contra la erisipela porcina.

Esta técnica de diagnóstico es rápida, sencilla, específica y sensible para *Erysipelothrix rhusiopathiae*, además de que es económica ya que al estar al lado de otras pruebas como es el caso de ELISA es muy barata; aunque los resultados podrían ser muy parecidos. (Salvatierra y cols 2002.)

La prueba de aglutinación en placa con el antígeno M100<sup>MR</sup> de *Erysipelothrix rhusiopathiae* necesita más estudio, ya que necesitamos infectar cerdos y así obtener resultados de manera experimental para lograr una validación de la prueba y obtener resultados 100% confiables.

Este método sirve para comprobar si un cerdo se encuentra infectado con *Erysipelothrix rhusiopathiae* ya que comprende la preparación de un reactivo que contiene el cuerpo completo de la bacteria que es específico del cerdo y que nos ayuda a identificar la presencia de anticuerpos. Los resultados obtenidos son cualitativos ya que las celdas presentan aglutinación que se observa a simple vista indicándonos que el cerdo se encuentra enfermo y en los cerdos sanos no se presenta la aglutinación.

Por lo que podemos decir que la bacteria está frecuente en las granjas del Estado de México o valle de México pero en muchas ocasiones no es diagnosticada como se debe hacer y se confunde la sintomatología de los animales.

Por el momento esta prueba de aglutinación en placa puede utilizarse como una alternativa ya que se trata de una técnica cualitativa a la cual se le necesitan hacer más pruebas para lograr hacer la técnica más satisfactoria.



En el mercado se realizan estudios principalmente bacteriológicos donde se realizan cultivos y tardan de 5 a 10 días en dar los resultados y es muy costoso, tomando en cuenta que se pudieran infectar grandes cantidades de animales, se estaría perdiendo mucho dinero y el tiempo que se tarda para dar un resultado también traería grandes pérdidas para el porcicultor.

En el mercado contamos con la técnica de ELISA la cual solo determina la presencia de los serotipos 1 y 2 de *Erysipelothrix rhusiopathiae* que son los que están presentes en los cerdos y como se sabe es una técnica cara y muy laboriosa aunque es muy confiable.

Por eso el motivo de llevar a cabo la preparación de este antígeno M100<sup>MR</sup> ya que es un método: económico, rápido y es confiable.

Esta técnica de diagnóstico no es confirmatoria solamente es de sondeo, que le permitirá al porcicultor medidas preventivas.

## 6. CONCLUSIONES

- ❖ La cinética de crecimiento realizada a *Erysipelothrix rhusiopathiae* permitió establecer las diferentes fases de crecimiento a los diferentes tiempos siendo su tiempo optimo de desarrollo a las 8 horas.
- ❖ Se obtuvo suficiente biomasa de *Erysipelothrix rhusiopathiae* la cual fue acondicionada para una obtención exitosa del antígeno M100<sup>MR</sup>.
- ❖ La utilización de este antígeno M100<sup>MR</sup> en la técnica de aglutinación en placa es un método satisfactorio como prueba serológica para su utilización en campo.
- ❖ Los resultados obtenidos para él diagnostico de anticuerpos presente contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* realmente nos sorprendieron ya que no esperábamos encontrar tantos sueros positivos.
- ❖ El antígeno M100<sup>MR</sup> obtenido presenta buenas expectativas para lograr un diagnostico rápido de la erisipela porcina .
- ❖ Es recomendable seguir el estudio más a fondo sobre él diagnostico de la erisipela porcina para lograr la optimización y/o la validación del método.

## 6. REFERENCIAS

- ❖ [www.Anuarioepidemiologico1999](http://www.Anuarioepidemiologico1999).
- ❖ Balesga Rafael. 2005. Toma de muestra en reproductivo y otras patologías de porcino. [exopol@exopol.com](mailto:exopol@exopol.com) España.
- ❖ Cardenal Ariza Javier. 2004. Control de calidad SEIMC. Servicio Enfermedades Infecciosas, C. S. U. de Bellvitge.
- ❖ Castillo C. J. 2002. Preparación de un antígeno de *Salmonella choleraesuis* para el diagnóstico de salmonelosis en cerdos. Tesis Licenciatura. FES- Cuautitlán. Pp. 1 - 38.
- ❖ Castillo C. J.; Ciprián C. A.; Alonso H. R.; Domínguez A. M.; Olivia M. D.; Vargas S.A. 2002. Preparación de un antígeno de *Salmonella choleraesuis* para el diagnóstico de salmonelosis en cerdos. Memorias XXXVI Congreso AMVEC de Querétaro. Pp. 49
- ❖ Ciprián Abel - Mendoza Susana. 2001. Tercer ciclo nacional; Enfermedades respiratorias del cerdo. Edit. UNAM FES-C.
- ❖ Cohen Georges. 1977. Microorganismos y biología molecular. Edit. Omega. España. Pp. 13-27.
- ❖ Collins M. I. 1969. Métodos Microbiológicos. Edit. Acribia. España. Pp. 354-361.
- ❖ Copes Julio; Nievas Victorio; 2001. Aislamiento e identificación serológica de *Erysipelothrix rhusiopathiae* de cerdos con lesiones sistémicas compatibles con las del mal rojo en la República Argentina. Vol. 12 no. 4. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Pp.244-248.
- ❖ De Diego A. Norrung V. 1978, *Erysipelothrix rhusiopathiae* en la República Argentina. Aislamientos. Gaceta Veterinaria; 40:771-4.

- ❖ Del Valle Molina José Ángel. 2003. Cuestionario FAO/OIE/OMS México [dir.dgsa@senasica.sagarpa.gob.mx](mailto:dir.dgsa@senasica.sagarpa.gob.mx) pp. 1- 26
- ❖ Del Valle Molina José Ángel. 2004. Cuestionario FAO/OIE/OMS. México [dir.dgsa@senasica.sagarpa.gob.mx](mailto:dir.dgsa@senasica.sagarpa.gob.mx) pp. 1 - 27
- ❖ Fernández L. Hugo y Cols. 1989. Manual de salud del cerdo. Edit. ISCAH. Cuba. Pp. 329-337.
- ❖ Freeman A. Bob. 1984, Tratado de microbiología de Burrows, 21ª edición, Edit. Interamericana, España. Pp. 666-667.
- ❖ Freeman A. Bob. 1986. Tratado de Microbiología de Burrows. 22ª Edición, Edit. Interamericana, España Pp. 57-62.
- ❖ González Alonso. 2003. La importancia de prevenir activamente la erisipela porcina. *Cerdos-swine/* no. 30. Laboratorios Sanfer, S.A de C.V.
- ❖ Jacques Nicolet. 1986, Compendio de Bacteriología Medica Veterinaria, Edit. Acribia. España, pp. 170-175.
- ❖ Juárez I. M. 2002. Obtención de un antígeno de *Pasteurella Multocida* de tipo "A" de conejo. Tesis Licenciatura. FES-Cuautitlán. Pp. 26 - 30.
- ❖ Koneman W. Elmer. 1999. Diagnóstico microbiológico. 5a edición. Edit. Médica panamericana. Argentina. Pp. 649-650.
- ❖ Mateos F. Pedro. 2005. Crecimiento microbiano. Departamento de microbiología y genética. Facultad de farmacia. Universidad de Salamanca. WWW. Crecimiento microbiano.htm
- ❖ Merck Sharp & Dohme de España. 2005. España.

- ❖ Merchant I. A. 1977. Bacteriología y virología veterinarias. 2ª Edición, Edit. Revolucionaria. España. Pp. 48-50 y 561-571.
- ❖ Microsoft Corporation, Enciclopedia CD-ROM Microsoft Encarta Básica 2001, Estados Unidos 2000.
- ❖ Modigan T. Michael. 2003. Biología de los Microorganismos, Brock. 10ª Edición. Edit. Pearson Prentice may. España. Pp. 142-151.
- ❖ Pelczar J. Michael, Jr. 1977. Microbiología. 4ª Edición. Edit. Mc Graw-Hill. México. Pp. 579
- ❖ Pijoan Aguadé Carlos y Ramírez N. R. 1982. Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. 1ª edición. Edit. Litografía cultural S.A. FES. Cuautitlán México. Pp. 559-564.
- ❖ Reboli C. Annette and W. Edmund Farrar. *Erysipelothrix rhusiopathiae* : An occupational Pathogen. Clinical Microbiology Reviews. Oct. 1989. vol. 2 no. 4 Medical University of South Carolina. pp.354-359.
- ❖ Rojas Espinosa Oscar. 2001. Inmunología de memoria. 2ª edición. Edit. Medica panamericana. México. Pp.157-163.
- ❖ Salvatierra R. M. E.; Milo, A. R.; Castillo C. J.; Mendoza E. S. 2002. Seroprevalencia de *Salmonella choleraesuis* en sueros de traspatio en Chiapas, México. Memorias, XXXVII Congreso AMVEC de puerto Vallarta. Pp.106-107.
- ❖ Sánchez M. 1991, Erisipela: Estudio sobre su patógenia y características epidemiológicas en Chile. Monografías. 13: 3-7.
- ❖ Skoknic A, Díaz I, Urcelay S, Duarte R, González O. 1981, Estudio de la erisipela en Chile III *Erysipelothrix rhusiopathiae* utilizando tonsilas para su diagnóstico. Arch Med Vet. 13:13-6.

- ❖ Straw E. Barbara., D'Allaire S., Mengeling W. L., Taylor J. D., 1999. Diseases of swine. 8ª edición. Edit. Iowa state university press/ames, iowa U.S.A. pp. 419-430.
- ❖ Shimoji Y.,2000. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. Microbes and infection, 2. Elsevier. Pp. 965-972.
- ❖ Weir Donald. 1999. Inmunología. 3ª edición. Edit. Manual moderno. México pp. 283-285.
- ❖ Wood RL. 1999, Erysipelas. In: Ed. Straw, BE, D'Allaire S, Mengeling EL, Taylor DJ editors. Diseases of Swine 8<sup>th</sup> edition. Ames: Iowa State University Press. p. 419-30.
- ❖ Wood RL. 1984; Swine erysipelas- a review of prevalence and research. JAVMA , 184:944-9.
- ❖ Wood RL. 1979; Specificity in response of vaccinated swine and mice to challenge exposure with strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* of various serotypes. Am J Vet Res, 40:795-801.
- ❖ Zinsser Wolf Gang K. Joklik. 1993. Microbiología. 18a edición. Edit. Panamericana. Argentina. Pp. 614-621.