

CARACTERISTICAS GENERALES DE VEINTE CEPAS DE *Erysipelothrix insidiosa* AISLADAS EN MEXICO

M.V.Z. JAVIER OLIVARES O.¹

M.V.Z. MARIO A. MARTELL D.¹

M.V.Z. JORGE TORRES B.¹

M.V.Z. HÉCTOR FLORES A.¹

Resumen

Se estudiaron las características generales de 20 cepas de *Erysipelothrix insidiosa* aisladas en México, observándose el crecimiento de cada una de estas en diferentes medios líquidos y sólidos. Se determinaron sus características bioquímicas comparando la fermentación de azúcares con dos tipos de indicadores. Se tipificaron por hemoaglutinación.

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 (Shuman, 1967).

En México las primeras observaciones corresponden a la década de los cincuenta (Ramírez, 1970). En 1968 fue aislada por Esparza y Ramírez, quienes la enviaron a los Estados Unidos de América para su tipificación. A partir de esta fecha se han presentado verdaderas epizootias de esta enfermedad en el Distrito Federal, Edo. de México (Torres, 1970), Guadalajara (Rivera, 1970) y en Irapuato (Aguirre, 1970).

Dentro de las características de aislamiento de la *Erysipelothrix insidiosa* (EI) se han llegado a elaborar varios medios selectivos, tanto líquidos como sólidos (Packer, 1943; Connell y Langford, 1953; Ando, Moriya y Kurwahara, 1959; Wood, 1965 y Ando y Hashimoto, 1969). En las características bioquímicas se ha admitido que las reacciones de fermentación de los medios con azúcares, pueden ser variables (Byrne *et al.*, 1952; Tiffany, 1955 y Rowsell, 1958). White y Shu-

man (1961) 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 (1952) observaron que todas las cepas B tienen propiedades hemoaglutinantes y que las cepas A no poseen esta capacidad.

El propósito del presente trabajo es el de conocer las características de aislamiento, a través de un estudio comparativo entre los medios selectivos, la bioquímica, la patogenicidad y la tipificación de las 20 cepas aisladas en México.

Material y métodos

De 54 casos sospechosos de EI, que llegaron al LCND durante el año de 1970, en 20 se identificó EI. Los casos provenían de diversos lugares.

Para el cultivo de las cepas se usaron 5 medios semisólidos; a) Medio de Packer (1943), b) Connell y Langford (1953), c) Ando, Moriya y Kuwahara (1959), d) Ando y Hashimoto (1969) y e) Medio de Base Agar Sangre.² También se utilizaron 3 medios líquidos: a) Medio líquido de Packer (1943), b) Variante al medio líquido de Packer (1969), y c) Medio de Wood (1965).

En la observación de la fermentación de los azúcares se aplicaron dos tipos de indicadores de pH: a) Indicador a base de rojo de fenol y b) Indicador de Andrade.

¹ Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico (LCND). Dirección General de Sanidad Animal, SAG, Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

² DIFCO.

Cepa	Especie	Procedencia	Aislamiento
1	caprino	Querétaro	Líquido sinovial
2	porcino	Distrito Federal	Corazón
3	porcino	Distrito Federal	Líquido sinovial
4	porcino	Edo. de México	Líquido sinovial
5	porcino	Edo. de México	Líquido sinovial
6	porcino	Guanajuato	Riñón
7	porcino	Distrito Federal	Piel
8	porcino	Edo. de México	Hígado y bazo
9	porcino	Edo. de México	Líquido sinovial
10	porcino	Distrito Federal	Riñón
11	porcino	Edo. de México	Piel
12	porcino	Edo. de México	Riñón
13	porcino	Hidalgo	Riñón
14	porcino	Hidalgo	Riñón y bazo
15	porcino	Puebla	Líquido sinovial
16	porcino	Durango	Riñón y cerebro
17	porcino	Distrito Federal	Riñón
18	porcino	Edo. de México	Riñón y bazo
19	porcino	Edo. de México	Riñón y bazo
20	porcino	Edo. de México	Riñón y bazo

Para el primero se usó como base el medio, Caldo Base Rojo de Fenol,² al cual se le agregó el 1% de los siguientes azúcares: galactosa, sacarosa, glucosa, lactosa, sorbitol, raffinosa, maltosa, xilosa, mannososa, 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.

La preparación del Indicador de Andrade se hizo de acuerdo a la técnica indicada por Cowan y Steel (1966), utilizándose los mismos azúcares señalados anteriormente.

Las 20 cepas aisladas en el LCND que sirvieron como base para este estudio 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 $2,700 \times 10^6$ de bacterias por ml. Estas suspensiones fueron inculadas en dosis de 0.1 ml. vía intraperitoneal, usándose 2 ratones de 15 a 20 gr por cepa.

En cuanto sucumbieron, se dejó un ratón de cada cepa a temperatura ambiente durante 96 horas y el otro se sometió a la necropsia, tomándose muestras de ganglios inguinales, axilares, mesentéricos y retrofaríngeos e hígado, bazo, riñón, corazón, pulmón y cerebro. Una vez cumplidas las 96 horas se hizo la necropsia de los otros ratones tomándose las mismas muestras. Cada órgano se sembró en los 5 medios semisólidos y en los 3 líquidos indicados anteriormente. 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.

Las 20 cepas fueron sembradas en agar infusión de corazón,² se incubaron a 37°C durante 24 horas en aerobiosis y se procedió a hacer el estudio bioquímico sembrando en los azúcares, tanto con el indicador de rojo de fenol como con el indicador de Andrade. Se sembró en triple azúcar hierro² (TSI), leche tornasolada,² medio de azufre, indol y motilidad² (SIM) y caldo nitrato.² En cada caso se colocó un tubo 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 (Cowan y Steel 1966) mientras que la lectura de los azúcares se realizó cada 24 horas por un periodo de 10 días (Ando y Hashimoto, 1969).

Se realizó la prueba de hemoaglutinación (Roots y Venske, 1952) mezclando, a partes iguales, la suspensión bacteriana con glóbulos rojos de ganso al 0.5%, realizándose la lectura dentro de los dos minutos siguientes.

Resultados y discusión

Los resultados se encuentran resumidos en los cuadros del 1 al 5.

ciones en el crecimiento de las colonias, observándose que es mejor y más rápido en el medio modificado de Connell y Langford, en el que las colonias son observables a simple vista a las 24 horas, siendo similares en tamaño a las observadas en el medio de gelosa-sangre, aunque el medio de Connell y Langford tiene la ventaja de las sustancias inhibidoras de contaminantes. 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 que permanecieron durante 4 días a temperatura ambiente, se apreció que en los medios selectivos de las colonias de EI eran observables a simple vista

CUADRO 1

Periodo de incubación y resultados de las pruebas de hemaglutinación de 20 cepas de *Erysipelothrix insidiosus* aisladas en México

Cepa Núm.	Incubación promedio horas	Hemaglutinación	Serotipo
1	32	positiva	B
2	79	positiva	B
3	72	positiva	B
4	49	positiva	B
5	72	positiva	B
6	43	negativa	A
7	74	positiva	B
8	58	negativa	A
9	75	positiva	B
10	33	negativa	A
11	96	positiva	B
12	74	negativa	A
13	98	negativa	A
14	68	negativa	A
15	116	positiva	B
16	72	negativa	A
17	72	negativa	A
18	76	negativa	A
19	33	negativa	A
20	81	negativa	A

En las cepas de EI de este estudio la patogenicidad para los ratones se manifiesta, teniendo periodos de incubación entre las 32 y las 116 horas.

Por lo que respecta al estudio comparativo de los diferentes medios, se encontraron varia-

a las 72 horas y en el medio modificado de Connell y Langford, eran observables a simple vista a las 24 horas. En estos medios se encontró contaminación con *Streptococcus sp.*, siendo diferenciables por la coloración azul de la colonia y por la observación del frotis. En

CUADRO 2

Resultados del estudio comparativo en los medios semisólidos para *Erysipelothrix insidiosa*
(Después de 48 horas de incubación)

Medios de cultivo	NECROPSIA INMEDIATA			NECROPSIA DEMORADA 96 h		
	Cant. de crecimiento	Contaminación	Obsv. de las col.	Cantidad de crecimiento	Contaminación	Obsv. de las col.
Gelosa	+++	+	F	+	+++	D
Sangre						
Med. Packer (Sangre eq.)	+++	0	D	+++	+	D
Med. Packer (Suero y Vit.)	+++	0	D	+++	+	D
Med. Packer (Tween 80)	+++	0	D	+++	+	D
Med. de Connell	+++	0	F	+++	+	F

+++ Abundante
++ Regular
+ Escaso
0 Negativo

F Fácil observación a simple vista
D Difícil observación a simple vista

cambio, en los medios líquidos al sembrarse en gelosa-sangre se observó una gran contaminación con *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli* y *Proteus sp.* Esta contaminación disminuía conforme pasaba el tiempo en que el órgano fue sembrado, lo que hizo difícil el aislamiento de EI.

En el estudio bioquímico se encontró que no todas las cepas produjeron ácido sulfhídrico lo que concordó con los trabajos de Rowsell (1958) y Byrne *et al.* (1952). Todas las cepas fueron negativas a la prueba de reducción de nitratos y a la formación de indol en el medio de SIM, igualmente ninguna produjo cambios en la leche tornasolada y todas fueron negativas a la prueba de la catalasa.

En la fermentación de azúcares no se encontraron diferencias entre los dos indicadores de pH usados, siendo la única variación, la rapidez con que viraron los azúcares con el indicador de Andrade. Los azúcares en los que hubo producción de ácido fueron: galactosa, glucosa, lactosa y fructosa; en la xilosa se encontró una variación en la producción de ácido. La manosa resultó negativa, lo cual difiere de lo observado por White y Sherman (1961) y Rowsell (1958), pero en general, los resultados obtenidos concuerdan con los indicados por los investigadores ya mencionados.

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 (1952), en el que observaron que todas las cepas B tienen propiedades hemoaglutinantes y que las cepas A no poseen esta capacidad, se consideran por lo tanto, 11 cepas tipo A y 9 cepas tipo B.

Conclusiones

Por las observaciones realizadas podemos decir que:

1. Se corrobora la existencia de erisipela en México.
2. Los medios de cultivo selectivos más eficaces, fueron los medios sólidos, siendo el medio modificado de Connell y Langford con el que mejores resultados se obtuvieron.
3. El indicador de Andrade fue el más apropiado para la fermentación de azúcares ya que el resultado de la prueba se puede leer más rápidamente que con el indicador con rojo fenol.
4. En México existen cepas de EI de los tipos A y B.

CUADRO 3

Resultados del estudio bioquímico de 20 cepas de E.I. aisladas en México utilizando el indicador rojo de fenol

Lectura de los azúcares a los 10 días

AZUCARES	C E P A S																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Mannosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CUADRO 4

Resultado del estudio bioquímico de 20 cepas de E.I. aisladas en México usando el indicador de Andrade

Lectura de los azúcares a los 10 días

AZUCARES	C E P A S																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Mannosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CUADRO 5

Resultados de las características bioquímicas de 20 cepas de E.I. aisladas en México

REACTIVOS	C E P A S																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Catalasa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LECTURA A LAS 48 HORAS																				
H ₂ S	—	+	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—
Indol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LECTURA A LOS 14 DIAS																				
Red. de nitratos	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Leche tornasol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Summary

The general characteristics of 20 strains of *Erysipelothrix insidiosa* isolated in Mexico were studied. The growth of each strain was observed in several liquid and solid culture media. The biochemical patterns were determined by comparing sugars fermentation with two indicators. The strains were typified by haemoagglutination.

Literatura citada

- ANDO, K., Y. MORINA and S. KUWAHARA, 1959, Studies on the effect of Tween 80 on the growth of *Erysipelothrix insidiosa*. *Jap. Jour. Microbiol.*, 3(1):85.
- BYRNE, J. L., R. CONNELL, J. F. FRANK and I. W. MOYNIHAN, 1952, Citado por Shuman, D. R. en: Erisipela porcina. Enfermedades del cerdo, *UTEHA*, 1a. Ed. México, 1967. 441-488.
- CONNELL, R. and E. V. LANGFORD, 1953, Studies of seine erisipelas V. Presence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in apparently healthy pigs. *Canad. Jour. C. Med. and Vet. Sci.*, 17:448-453.
- COWAN, S. T. and K. J. STELL, 1966, Manual for the identification of Medical Bacteria. *Ed. Cambridge University Press. London*, 108 and 158-161.
- ESPARZA, B. H. y N. R. RAMÍREZ, 1968, Diagnóstico e identificación de la erisipela porcina en México, *Boletín del Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas*, 5(2):17 y 50.
- PACKER, R. A., 1943, The use of sodium azide (NaN_3) and crystal violet in a selective medium for Streptococci and *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Bact.*, 46: 343-349.
- ROOTS, E. y W. VENSKE, 1952, Citado por Shuman, D. R. en: Erisipela porcina. Enfermedades

del cerdo, *UTEHA* 1a. Ed. México, 1967. 441-488.

ROWSSELL, H. C., 1958, Cultural and biochemical study of strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* with special references to the carrier pig. *Canad. Jour. C. Med. and Vet. Sci.*, 22:82-86.

SHUMAN, D. R., 1967, Erisipela porcina. Enfermedades del cerdo, *UTEHA* 1a. Ed. 441-488.

TIFFANY, L. W., 1955, Citado por Shuman, D. R. en: Erisipela porcina. Enfermedades del cerdo, *UTEHA* 1a. Ed. México 1967. 441-488.

WHITE, T. C. and R. D. SHUMAN, 1961, Fermentation reactions of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Jour. Bact.*, 82:595-599.

WOOD, R. L., 1965, A selective medium utilizing antibiotics for isolation of *Erysipelothrix insidiosa*, *Amer. Jour. Vet. Res.*, 26:1303-1308.

Comunicaciones personales

RAMÍREZ, V. N., 1970, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

TORRES, B. J., 1970, Laboratorio Central Nacional de Diagnóstico de Patología Animal, Dirección General de Sanidad Animal, SAG, Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

RIVERA, J., 1970, Laboratorio de Diagnóstico de Patología Animal de Tlaquepaque, Jal. Km. 832.5 Carretera Tampico-Barra de Navidad (Renaldi, SAG).

AGUIRRE, F., 1970, Laboratorio de Diagnóstico de Patología Animal de Irapuato, Gto. Km. 336 Carretera Panamericana (Renaldi, SAG).

ANDO, K. y K. HASHIMOTO, 1969, Apuntes del curso de Sanidad Animal del National Institute of Animal Health de Kodaira Tokio, Japón, mayo-noviembre.