

Universidad de Guadalajara



Universidad de Guadalajara

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Elaboración de un Antígeno de Trisipela
para Prueba de Aglutinación en Tubo

T e s i s

que para obtener el Título de

Médico Veterinario Zootecnista

presenta

Antonio Zapién Solís

Generación 65 - 70

Guadalajara, Jal., Junio de 1972

Con todo cariño y respeto a:

A mi segunda madre

Susan I. Hardyman

A mi madre

María

A mi esposa

Jill

A mi hijo

Ivan

A mis hermanos

Los alumnos del Centro
Escolar Eusebio García

Con mi agradecimiento
Al C. Director de la Escuela
Dr. Ramón Fernández de Cevallos

Con especial reconocimiento
al Dr. Javier Rivera Hernández
por su valiosa ayuda
en mi formación profesional
y dirección de esta tesis

A mis maestros, compañeros
y amigos de generación

Este trabajo fue realizado
en el laboratorio de Bacteriología
de la Escuela de Medicina
Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad de Guadalajara

CONTENIDO

I.- Introducción - - - - -	1
II.- Material y Métodos - - - - -	5
III.- Resultados - - - - -	13
IV.- Discusión - - - - -	33
V.- Conclusiones - - - - -	36
VI.- Resumen - - - - -	37
VII.- Referencias Bibliograficas - - - - -	38

INTRODUCCION

La erisipela es una enfermedad infecto-contagiosa - que ataca a varias especies animales, pero principalmente al cerdo. Tiene distribución mundial y es una enfermedad grave, - desde el punto de vista económico en todo 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. (3)

La historia del llamado mal rojo porcino se inicia en 1878 con Koch, quien aislo un microorganismo a partir de un ratón, ahora clasificado como idéntico al del mal rojo - - -- (3, 23)

Pasteur y Thuillier en 1882-1883 describen breve--- mente un organismo aislado de lechones con mal rojo. (3, 7, - 21, 24)

En 1885 Loeffler presenta la primera descripción -- precisa del agente causal del mal rojo y describe la enfermedad en el cerdo. (3)

En los EE. UU. Smith en 1885 aisla el germen a - -- partir de un riñon de cerdo. (3) Moore en 1892 lo obtiene a - partir de bazo. (3)

Smith en 1895 lo aisla a partir de tejidos porcinos procedentes del estado de Minnesota. (3, 23) Tembroeck en - - 1920 lo aisla a partir de amígdalas de cerdos. (3, 23) Ward - en 1922 lo halla en gran número de articulaciones con - - -- artritis, procedentes de un matadero. (3, 23)

Parker y Col en 1924 muestran la relación directa - del microorganismo con las lesiones de la "piel diamantina", - dermatitis necrótica, poli-artritis y signos de septicemia en cerdos para venta. (3)

En 1930 se registra una septicemia aguda en zonas - muy alejadas entre sí en los EE. UU. (23)

En 1937-1938, Breed informa la identificación de la infección como causante de procesos porcinos en 28 de 48 - -- estados confederados, y estima que el mal rojo comprende del- 10 al 17 % de las infecciones porcinas dominantes. (3, 23)

La oficina de Industrias Animales de los EE. UU. en 1940 en un estudio sobre 472 articulaciones con lesiones - -- artríticas, el agente etiológico del mal rojo, se aislo en un 75% de las muestras. (23)

En Canada, los decomisos de canales de cerdo debi-- dos a artritis ha aumentado en forma marcada en los últimos - años. (24). De acuerdo a Connell et.al. (1952) en 1928 fueron decomisados 1695 canales de 2,453,704 examinadas, debido a -- artritis. (2)

En cerdos juvenes, Jones (1969) describe múltiples- inflamaciones de las articulaciones en todas las edades - - - arriba de ocho semanas como ocurencia común. (30)

En nuestro país, las primeras observaciones - - - corresponden a la década de los cincuenta. En 1968 fue aisla-- do por Esparza y Ramírez, quienes la enviaron a los EE. UU. de América para su tipificación. (5)

A partir de esta fecha se han presentado verdaderas epizootias de esta enfermedad en el Distrito Federal (Ramírez 1970), Estado de México (Torres 1970), Guadalajara (Rivera - - 1970), y en Irapuato (Aguirre 1970). (Comunicaciones Personales, 1. 2. 3. 4).

Dentro de los diferentes aspectos que el estudio -- de la erisipela porcina presenta, el aspecto de su diagnósti- co por medio de pruebas serológicas rápidas y eficaces ha - - ocupado un campo muy importante en la investigación. Ya en -- 1932 Schoening et. al. elaboran una prueba de aglutinación en tubo como medio auxiliar en la identificación de organismos - recobrados a partir de casos en que se sospechaba de erisipe- la. (12)

En 1941 C.G. Grey et.al. trabajan una prueba rápida en placa, utilizando una técnica de elaboración del antígeno, similar a la anterior (6)

Christine Rice et.al. en 1952 desarrollan una - - - nueva técnica en la elaboración del antígeno y prueba hacien- do modificaciones a la técnica de Shoening. (11)

En 1959 E.A. Lozano et.al. efectúan un nuevo inten- to sobre este campo con modificaciones muy marcadas en la - - técnica de elaboración y prueba. (8)

En 1965 Dennis Sikes trabaja sobre algunas propie-- dades bioquímicas de colonias lisas de Erisipelothrix insi--- diosa usadas en la elaboración de antígeno para pruebas de -- aglutinación en tubo. (16)

El mismo autor en 1967 efectúa nuevos estudios so-- bre prueba de aglutinación en tubo para Erisipelothrix insi--- diosa. (18)

Finalmente en Holanda en 1968 Albert van der Schaaf et.al. elaboran un antígeno susceptible de conservar en - - - refrigeración por varios meses. (25)

Como es facil observar, las investigaciones en torno del mal rojo porcino, datan de muchos años a la fecha, ha sido tema de interes para numerosos investigadores en todos aque-- llos paises en que la porcicultura constituye una rama - - -

importante de la riqueza pecuaria.

Tales investigaciones sin duda alguna, han sido -- motivadas por los resultados de estudios económicos efectua-- dos para tratar de cuantificar los daños ocasionados por la -- erisipela porcina.

En nuestro país, como ya se mencionó la historia de la erisipela porcina es breve y reciente. Las investigaciones en torno a este problema son escasas pero valiosas, las que -- corrahoran la existencia del problema en nuestro país, -- -- -- efectúan su tipificación, y se estudian algunos medios selec-- tivos para su cultivo, usando diversos indicadores.

Quedan aun numerosas interrogantes a resolver para-- obtener un conocimiento claro y completo de la magnitud del -- problema ocasionado en nuestro país por la erisipela porcina, tales como distribución, grado de incidencia etc.

De estas interrogantes, la necesidad de contar con-- un método serológico de diagnóstico rápido y eficaz, se hace-- patente sobre todo si tomamos en cuenta la variedad de -- -- -- cuadros clínicos en que Erisipela Insidiosa puede estar pre-- sente, ocasionando esto, como resultado lógico confusión y -- error en el diagnóstico clínico, además la relativa dificul-- tad de su cultivo, variación que presenta a la tinsión, -- -- -- crecimiento lento etc.

Es propósito final del presente trabajo a -- -- -- -- -- desarrollar, el obtener un antígeno susceptible de usar en el diagnóstico de la erisipela en cerdos, por medio de una prue-- ba de aglutinación en tubo, que venga a constituirse en un -- auxiliar valioso en el conocimiento y control de la erisipela en nuestro país.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

- 1.- Agujas hipodérmicas B-D ACE 27 x 13.
- 2.- Jeringas desechables Plastipac B-D 1 ml.
- 3.- Cajas de Petri.
- 4.- Matraces Erlenmeyer 125-250 ml. aprox.
- 5.- Estufa bacteriológica.
- 6.- Centrifuga.
- 7.- Fotocolorimetro.
- 8.- Mechero de Bunsen.
- 9.- Cristalería de laboratorio (tubos, pipetas, asas -- bacteriológicas, gradillas, etc.)
- 10.- Reactivos:
 - A.- Acido Sulfúrico.
 - B.- Cloruro de Bario.
 - C.- Cloruro de Sodio.
 - D.- Merthiolate (Timerosal, Lilly) blanco.
 - E.- Agua bidestilada.
- 11.- Medios de Cultivo:
 - A.- Caldo de Infusión de carne (1000 ml.):
 - 1.- Bacto extracto de carne 454 grs.
 - 2.- Bacto peptona 10 grs.
 - 3.- Cloruro de Sodio 5 grs.
 - 4.- Agua destilada 1000 ml.
 - 5.- Sol. Hidroxido de sodio al 4 %.

Preparación:

Añadir el extracto de carne al agua destilada, -- disolver perfectamente, y filtrar a través de gasa. Añadir -- 10 gramos de bacto-peptona y 5 gramos de Cloruro de Sodio.-- Ajustar el pH a 7.6 con solución de Hidroxido de sodio.

Autoclavear. Filtrar a través de papel filtro, - - -
distribuir en matraces y autoclavear nuevamente.

B.- Medio Triple Azúcar Hierro T.S.I. (1000 Ml.):

- 1.- 3 grs. de extracto de carne.
- 2.- 3 grs. de extracto de levadura.
- 3.- 15 grs. de Bacto peptona.
- 4.- 10 grs. de Lactosa.
- 5.- 10 grs. de sacarosa.
- 6.- 1 gramo de dextrosa.
- 7.- 0.2 grs. de sulfato ferroso.
- 8.- 5 grs. de cloruro de Sodio.
- 9.- 12 grs. de Agar.
- 10.- 0.024 grs. de rojo fenol.
- 11.- 0.3 grs. de thiosulfato de sodio.
- 12.- 5 grs. de proteosa peptona.

Preparación:

Suspenda 65 grs. de Triple Azúcar en 1000 mls. de --
agua destilada fría, caliente hasta hervir para disolver --
completamente el medio. Esterilizar en autoclave durante --
15 minutos a 15 libras de presión (121 grados C.). Distribuya
en tubos, deje enfriar de manera inclinada y guarde en - - -
refrigeración.

C.- Medio Gelosa Sangre (1000 ml.)

- 1.- 40 grs. de Agar sangre (base)
- 2.- 5 % de sangre.
- 3.- 1000 ml. de agua destilada.

Preparación:

Suspender el agar-sangre en el agua, calentar hasta-
disolver completamente, esterilizar en autoclave a 15 libras
de presión por 15 minutos. Enfriar y a temperatura ambiente-
se le agrega 5 % de sangre. Vertir en cajas de petri - - - -
esteriles.

D.- Azucares diferenciales por 1010 mls.

- 1.- 5 grs. de extracto de carne.
- 2.- 10 grs. de peptona.
- 3.- 5 grs. de ClNa.
- 4.- 0.5 grs. de Fuccina acida.
- 5.- 16 mls. de solución de NaOH al 4 %.
- 6.- 100 mls. de suero equino estéril.
- 7.- 10 grs. de carbohidrato deseado.

Preparación:

Disuelva 5 grs. de extracto de carne, 10 grs. de peptona, 5 grs. de ClNa en 900 ml. de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH. Autoclavear por 30 minutos y filtrar a través de papel filtro. Añadir 10 ml. de solución indicadora de Andrade. Autoclavear por 20 minutos.

A 100 ml. de agua destilada que ha sido autoclaveada durante 30 minutos, añada 10 grs. del carbohidrato deseado y autoclavee durante 12 minutos (Arabinosa y Xilosa deben ser esterilizadas por filtración). Añada los 100 mls. de solución estéril de carbohidrato y 100 mls. de suero equino estéril, asepticamente a los 900 mls. de caldo.

Distribuir asepticamente en tubos estériles.

E.- Medio Solido de Packer por 1000 mls.

- 1.- 1.5 % de Bacto-tryptosa.
- 2.- 0.3 % de extracto de carne.
- 3.- 0.5 % de ClNa.
- 4.- 1.8 % de Agar.
- 5.- 4 ml. de solución de cristal violeta al 0.25 %.
- 6.- 25 ml. de solución de Azida de sodio al 4 %.
- 7.- 50 ml. de suero estéril o sangre desfibrinada.

Preparación:

Preparar tryptosa agar base conteniendo 1.5 % de -- Bacto-tryptosa, 0.3 % de extracto de carne, 0.5 % de ClNa -- y 1.8 de Agar. Caliente para disolver y filtre atravez de -- papel filtro o algodón, autoclavee y añada 4 ml. de solu--- ción previa de cristal violeta, 25 ml. de solución previa -- de azida de sodio y 50 ml. de suero equino o sangre - - - - desfibrinada por litro. Distribuyase en cajas o tubos.

12.- Material Biológico.

- A.- 7 cepas de Erysipelothrix rhusiopathiae -- (insidiosa)
- B.- 10 cerdos inmunizados con vacuna comercial (EVA)
- C.- 5 cerdos APN, sin datos anamnesicos que -- nos indiquen problemas anteriores cauzados por E. rhusiopathiae.
- D.- 5 conejos, (3 inmunizados con bacterina -- comercial, 2 sin inmunizar--testigos).

Se trabajaron siete cepas de Erysipelothrix - - - - rhusiopathiae (insidiosa) obtenidas a partir de diferentes-casos: 4 presentados en el Laboratorio Central de Diagnósti-co de Tlaquepaque, 2 presentados en el Laboratorio Regional de Tepatitlán, y una cepa obtenida a partir de vacuna - - - - comercial (EVA).

Individualmente, cada cepa se trabajo en la siguien-te forma:

1.- Producción de H₂S: Se procedió a sembrar en TSI por punsion. En general se considera que E. rhusiopathiae -- produce H₂S (acido sulfhidrico en este medio. (3, 9, - - -- Comunicación Personal 5).

En el inculo con el germen, la producción de H₂S -- empieza a formarse despues de 6-36 horas de incubación a -- 37'C, a lo largo de la linea de punsion. La formación se --

nota primeramente como una pequeña mancha que se extiende a lo largo de la línea en pocas horas. (Comunicación Personal 5).

2.- Producción de ácido a partir de carbohidratos:- Por muchos años, la variación en la fermentación de carbohidratos por diferentes cepas de *E. rhusiopathiae*, dió lugar a dudas en cuanto a su valor como ayuda para su identificación. White y Shuman reportaron que el modelo varia de acuerdo con el medio, indicador y método de medir la producción de ácido. Encontraron que la base de Andrade con 10% de suero, era el medio mas confiable porque este permitía la mínima variación en el modelo. (Comunicación personal 5).

3.- Crecimiento en el medio de Packers: Se observaron las características de las colonias en el medio de packers, en el cual, el crecimiento consiste en pequeñas colonias menores de 1 mm. ligeramente convexas y translúcidas. Cuando se observaron bajo el microscopio de disecciones, a 7-30 diámetros, con luz transmitida difusa, muestran apariencia opaca o de "escarcha" debido a su superficie rugosa y a que no acumulan el cristal violeta del medio. (Comunicación personal 5).

4.- Tinción de Gram: A continuación se hicieron extensiones en porta-objetos y se efectuó la tinción de Gram para observar su morfología. La morfología celular de *E. rhusiopathiae* se asocia con el tipo de colonias. A partir de colonias lisas el organismo aparece como un bastoncillo, a menudo curvo, aislado o en cadenas cortas (1, Comunicación personal 5).

Tiende a ser agudamente curvo o angular, sugiriendo la división y formación de palizadas de los difteroides. A partir de colonias rugosas, predominan las formas largas filamentosas, pueden aparecer solos, o definitivamente en forma de cadenas. Las formas filamentosas semejan actinomicetos, pero no se ha observado ramificación. A menudo se observan granulos, que pueden sugerir difteroides. (1 - Comunicación personal 5).

Modelo Típico de Producción de Acido en 48 horas por E. - - -
rhysiopathiae insidiosa a partir de carbohidratos fermentables
en la base de Andrade con 10% suero.

<u>Carbohidrato</u>	<u>Reacción</u>	<u>Carbohidrato</u>	<u>Reacción</u>
Arabinosa	-	Maltosa	-
Dextrina	+	Manitol	-
Dulcitol	-	Manosa	+'
Fructuosa	"	Rafinosa	-
Galactosa	+	Ramnosa	-
Glucosa (Dextrosa)	+	Salicina	-
Glicerol	-	Sorbitol	-
Inositol	-	Sucrosa	±"
Inulina	-	Trehalosa	-
Lactosa	+	Xilosa	-

- Negativa

+ Positiva

' Producción lenta de acido (5 a 10 días)

±" En ocasiones se produce ligera acides.

(Comunicación personal 5)

Efectuadas las anteriores pruebas, se procedió a la elaboración del antígeno en la siguiente forma:

- 1.- En matreces Erlenmeyer de 150 cc. aproximadamente que contengan 100 cc. de caldo de infusión de carne sin suero, previamente preparado, se efectúa la siembra de las cepas, previamente identificadas. Se cultivan en la estufa bacteriológica a 37' C por 24 horas.
- 2.- Se inactiva el cultivo, previa siembra en gelosa sangre (comprobar crecimiento); añadiendo formol a la concentración de 1% (0.4% formaldehído). Se deja reposar a temperatura ambiente durante la noche.
- 3.- Se recupera el cultivo por centrifugación a 3300 R.P.M. por una hora. Se desecha el líquido sobrenadante. Se lava el sedimento (cultivo) con solución salina fisiológica que contenga 1% de formol; se centrifuga nuevamente a 3300 R.P.M. por una hora.
- 4.- Se desecha el líquido sobrenadante. Se resuspende el sedimento en 1:10 del volumen del cultivo original en solución salina que contenga 1:10,000 de Merthiolate (thimerosal Eli Lilly Co.). Se agita hasta obtener disolución de los grumos. Se filtra a través de una doble capa de algodón.

Esto se puede conservar en refrigeración como existencia constante. ("Stock").

Para su uso en la prueba de aglutinación, se diluye la suspensión con solución salina merthiolatada (1:10,000 de merthiolate) hasta obtener la densidad correspondiente al número uno de la escala de Mcfarland (58-60% T a 600 milimicrones en el colorímetro).

Los sueros a ser probados, se diluyen 1: 10 con -- solución salina estéril y pipeteados en cantidades de 0.4,- 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 ml. En tubos de ensayo, a los -- cuales se les agrega 1 cc. de antígeno a cada uno de ellos. Se usan cantidades iguales de solución salina fisiológica - en tubos como control.

Los tubos son colocados en la estufa bacteriológica para incubar por 30 minutos a 37.5'C despues de lo cual - - son sacados y puestos a centrifugar por 4 minutos a - - - - 1800 R.P.M.

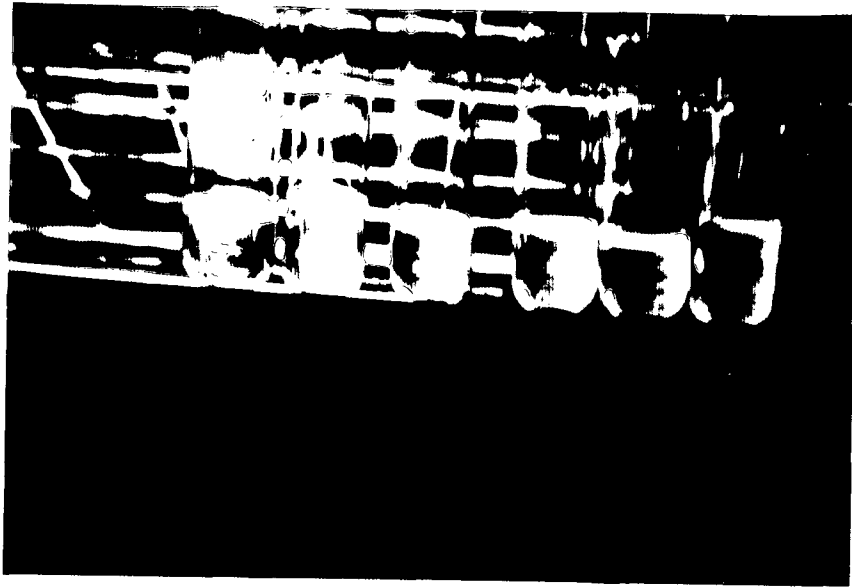
La lectura de los tubos se hace frente a buena - -- fuente de luz y en caso de reacción positiva, se observa -- aglutinación típica en el fondo del tubo y claridad en el - liquido superior. En los casos considerados como reacción - negativa, el liquido en el tubo se conserva turbio.

El muestreo sanguíneo se efectuó a los 30 días - -- posteriores a la inmunización de los animales.

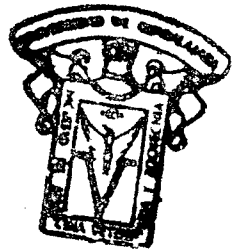
En cerdos, la muestra sanguínea se obtuvo por - - - punción en la vena cava.

En conejos, el muestreo se efectuó por punción - -- directa en corazón. En este caso, los conejos inmunizados - permanecieron en jaulas separadas y aisladas de los no - -- inmunizados.

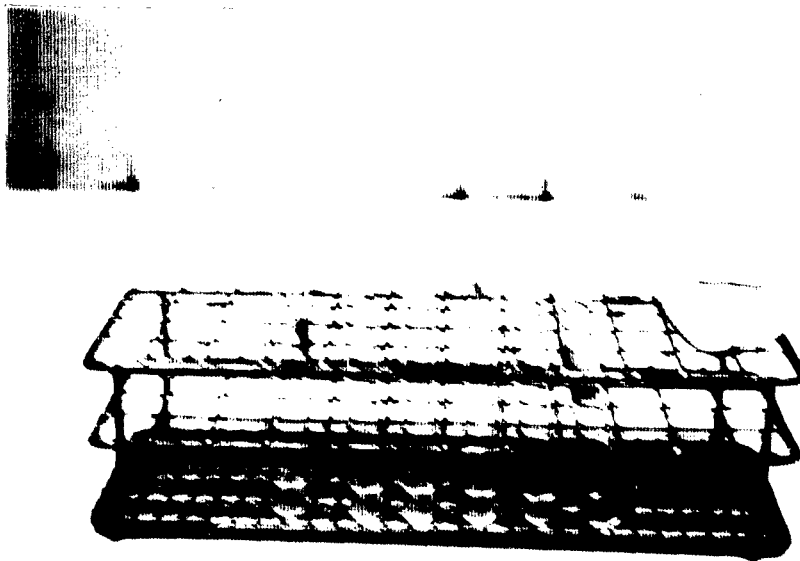
RESULTADOS



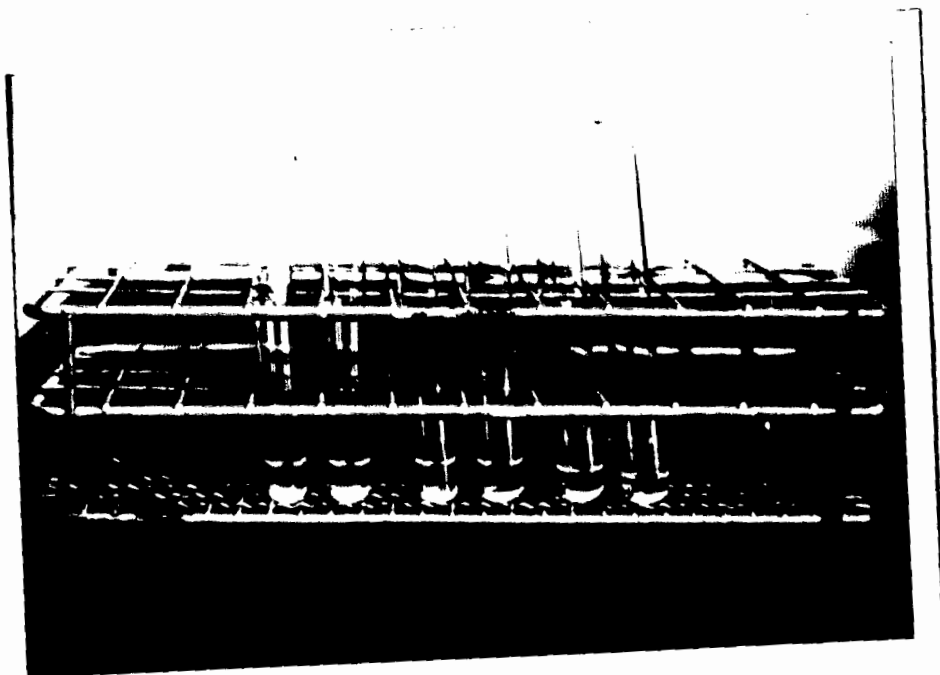
Reacción típica, con aglutinación completa
en todas las diluciones.



OFICINA DE
DIVISION CIENTÍFICA



Reacción negativa típica. Observese la turbidez uniforme en todos los tubos.



Se comparan 3 tubos correspondientes a una
reaccion negativa, y el mismo número de --
tubos correspondientes a una reacción - --
positiva.

Lecturas de pruebas de aglutinación en tubo efectuadas con muestras de suero provenientes de cerdos inoculados con vacuna comercial.

Las cepas utilizadas para la obtención del antígeno, se encuentran numeradas del 1-7 en la parte superior de los cuadros.

En la parte inferior se indican los signos para la interpretación de las lecturas, así como la procedencia de las cepas.

CEPA # 1.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Suero 1	+	+	+	+	+	-
Suero 2	+	+	+	+	+	-
Suero 3	+	+	+	+	+	+
Suero 4	+	+	+	+	+	+
Suero 5	+	+	+	+	+	+
Suero 6	+	+	+	+	+	+
Suero 7	+	+	+	+	+	+
Suero 8	+	+	+	+	+	+
Suero 9	+	+	+	+	+	+
Suero 10	+	+	+	+	+	-

+ Positivo a la dilución

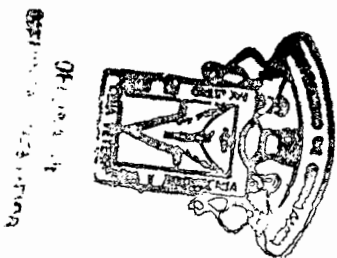
- Negativo a la dilución

VACUNA COMERCIAL.

<u>Dilución:</u>	<u>CEPA # 2.</u>					
	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Suero 1	+	+	+	+	+	+
Suero 2	+	+	+	+	+	+
Suero 3	+	+	+	+	+	+
Suero 4	+	+	+	+	+	+
Suero 5	+	+	+	+	+	-
Suero 6	+	+	+	+	+	+
Suero 7	+	+	+	+	+	+
Suero 8	+	+	+	+	+	+
Suero 9	+	+	+	+	+	+
Suero 10	+	+	+	+	+	+

+ Positivo a la dilución
 - Negativo a la dilución

CEPA OBTENIDA DEL LABORATORIO DE TEPATITLAN, JAL. (1)



CEPA # 3.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Suero 1	+	+	+	+	+	+
Suero 2	+	+	+	-	-	-
Suero 3	+	+	+	-	-	-
Suero 4	+	+	+	+	+	-
Suero 5	+	+	+	+	-	-
Suero 6	+	+	+	+	+	+
Suero 7	+	+	+	-	-	-
Suero 8	+	+	+	+	+	+
Suero 9	+	+	+	+	+	+
Suero 10	+	+	+	+	+	+

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

CEPA OBTENIDA DEL LABORATORIO DE TEPATITLAN, JAL. (2)

CEPA # 4.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Suero 1	+	+	+	+	+	+
Suero 2	+	+	+	+	+	-
Suero 3	+	+	+	+	-	-
Suero 4	+	+	+	+	+	+
Suero 5	+	+	+	+	+	-
Suero 6	+	+	+	+	+	+
Suero 7	+	+	+	+	+	+
Suero 8	+	+	+	+	+	-
Suero 9	+	+	+	+	+	+
Suero 10	+	+	+	+	+	+

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

CEPA OBTENIDA DEL LABORATORIO DE TLAQUEPAQUE, JAL. (1)

CEPA # 5.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Suero 1	+	+	+	+	+	+
Suero 2	+	+	+	+	+	+
Suero 3	+	+	+	+	+	-
Suero 4	+	+	+	+	+	+
Suero 5	+	+	+	+	+	+
Suero 6	+	+	+	+	+	+
Suero 7	+	+	+	+	+	-
Suero 8	+	+	+	+	+	+
Suero 9						
Suero 10						

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

CEPA OBTENIDA DEL LABORATORIO DE TLAQUEPAQUE, JAL. (2)

CEPA # 6.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Suero 1	+	+	+	+	+	+
Suero 2	+	+	+	+	=	-
Suero 3	+	+	+	+	+	+
Suero 4	+	+	+	+	+	+
Suero 5	+	+	+	+	+	+
Suero 6	+	+	+	+	-	-
Suero 7	+	+	+	+	-	-
Suero 8	+	+	+	+	+	-
Suero 9	+	+	+	+	+	-
Suero 10	+	+	+	+	+	+

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

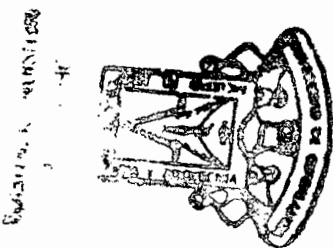
CEPA OBTENIDA DEL LABORATORIO DE TLAQUEPAQUE, JAL. (3)

CEPA # 7.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Suero 1	+	+	+	+	+	+
Suero 2	+	+	+	+	+	+
Suero 3	+	+	+	+	-	-
Suero 4	+	+	+	+	+	-
Suero 5	+	+	+	+	+	-
Suero 6	+	+	+	+	+	+
Suero 7	+	+	+	+	+	-
Suero 8	+	+	+	+	+	+
Suero 9	+	+	+	+	+	+
Suero 10	+	+	+	+	+	+

+ Positivo a la dilución
 - Negativo a la dilución

CEPA OBTENIDA DEL LABORATORIO DE TLAQUEPAQUE, JAL. (4)



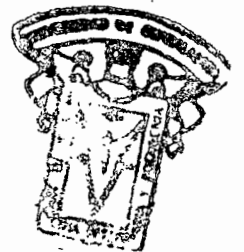
Lecturas de pruebas de aglutinación efectuadas con-
muestras de suero proveniente de 5 cerdos aparentemente - -
normales, probados con antígeno elaborado a partir de - - -
cepas # 1 a 5.

CEPA # 1.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Cerdo # 1	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 2	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 3	-	-	-	-	-	?
Cerdo # 4	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 5	-	-	-	-	-	-

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución



INSTITUTO DE
DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
EPIDEMIOLÓGICA

CEPA # 2.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Cerdo # 1	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 2	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 3	-	-	-	-	+	+
Cerdo # 4	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 5	-	-	-	-	-	-

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

CEPA # 3.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Cerdo # 1	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 2	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 3	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 4	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 5	-	-	-	-	-	-

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

CEPA # 4.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Cerdo # 1	-	-	-	-	-	-
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cerdo # 2	-	-	-	-	-	-
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cerdo # 3	-	-	-	-	-	-
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cerdo # 4	-	-	-	-	-	-
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cerdo # 5	-	-	-	-	-	-
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

CEPA # 5.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Cerdo # 1	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 2	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 3	-	-	-	-	-	?
Cerdo # 4	-	-	-	-	-	-
Cerdo # 5	-	-	-	-	-	-

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

Lecturas de pruebas de aglutinación efectuadas con -
muestras de suero obtenidas de 5 conejos. Los conejos - - - -
números 1-2 no fueron inmunizados.

Los conejos 3-4-5 fueron inoculados con bacterina --
comercial.

CEPA # 1.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Conejo # 1	-	-	-	-	-	-
Conejo # 2	-	-	-	-	-	-
Conejo # 3	+	+	+	+	+	-
Conejo # 4	+	+	+	+	+	+
Conejo # 5	+	+	+	+	-	-

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

CEPA # 3.

<u>Dilución:</u>	<u>1/25</u>	<u>1/50</u>	<u>1/100</u>	<u>1/250</u>	<u>1/500</u>	<u>1/1000</u>
Conejo # 1	-	-	-	-	-	-
Conejo # 2	-	-	-	-	-	-
Conejo # 3	+	+	+	+	+	+
Conejo # 4	+	+	+	+	+	+
Conejo # 5	?	?	?	?	?	?

+ Positivo a la dilución

- Negativo a la dilución

DISCUSION

El resultado obtenido con la técnica descrita, --- es un antígeno, cuya efectividad se estudia y resume en -- los cuadros 1 a 14; mismos que muestran los resultados de -- efectuar pruebas de aglutinación en tubo con el antígeno --- elaborado y diversas muestras de suero.

Al efectuar el cultivo de las cepas en gelosa-sangre, se observa crecimiento entre 36 a 48 horas posteriores a la siembra. Se encuentran abundantes colonias de tamaño pequeño, translúcidas y de bordes nítidos y lisos.

La formación de H_2S en el medio Triple-Azucar - - - Hierro, a partir del punto y línea de punsión, se observó -- después de 8 a 36 horas de incubación. En algunos casos, - - la producción de H_2S fue escasa. (1, 26 Comunicación - - - Personal 5). Se observó viraje de color rojo típico del - - medio a amarillo en todos los tubos, en un período que vario entre 24 a 36 horas posteriores a la inoculación de los - -- medios (1, Comunicación Personal 5).

En el medio de Packers, el crecimiento se observo -- en forma de pequeñas colonias (menores de 1 m.m.). Ligera- mente convexas y translúcidas. En observación bajo el - - - microscopio de disecciones (7 a 30 aumentos) con luz - - - transmitida difusa, las colonias presentan una apariencia -- opaca o de hielo (escarcha), debido a que presentan superfi- cie rugosa y no acumulan el cristal violeta del medio. (1,- Comunicación Personal 5).

Siendo *E. rhusiopathiae* (insidiosa) un germen Gram - positivo, presenta grandes variantes, con cierta tendencia - a la decoloración. (1, 3, 7, 9, 26, Comunicación Personal - 5). Además de la morfología de *E. rhusiopathiae* (insidiosa), está asociada con el tipo de colonias. A partir de colonias- lizas, el organismo aparece como un bastoncillo delgado, - -

a menudo curvo, aislado o en cadenas muy cortas. (1, 9, --
Comunicación Personal 5).

Tomando en consideración los datos y observaciones --
anteriores se consideró estar trabajando con cepas de -- --
colonias lisas.

Durante la parte central del presente trabajo, al --
desarrollar la técnica descrita para la obtención del -- --
antígeno, el manejo del cultivo en matraces Erlenmeyer se --
torna difícil especialmente al efectuar la centrifugación --
por lo cual se recomienda efectuar la siembra directamente --
en tubos de centrifuga de material más resistente que el --
cristal de los tubos ordinarios. (6, 11, 12, 16, 18, 25). --

El crecimiento en el medio de cultivo líquido, se --
observó como una ligera turbidez al agitar el medio circular
mente. Las siembras en gelosa-sangre, posteriores a la -- --
inactivación del cultivo, paso previo para la centrifugación
resultaron negativas, es decir no se observó crecimiento.

El proceso para la ejecución de las pruebas de -- --
aglutinación fué el recomendado y usual para otras pruebas --
(6, 11, 12, 16, 18, 25 Comunicación Personal 5) y se -- --
efectuó la lectura de las reacciones frente a buena fuente --
de luz.

Es de hacer notar, que las lecturas de las reaccion-
es fueron fácilmente efectuadas, aun sin la previa introduc-
ción a la centrifuga que se indica en la técnica de la -- --
prueba.

Cuando una muestra de suero se encuentra desconpues-
ta o marcadamente hemolítica, se puede observar la aparición
de algunos grumos en el primer y segundo tubo. Esto de -- --
ninguna forma presenta el aspecto de una verdadera aglutina-
ción.

Se considera reacción positiva, aquella reacción que
presente aglutinación completa en el primer tubo (1:25) --
(6, 11, 12, 16, 18, 25, Comunicación Personal 5).

Las lecturas obtenidas de las reacciones efectuadas con las diferentes muestras de suero y el antígeno elaborado, fueron uniformemente positivas o negativas respectivamente, según se tratase de muestras de suero provenientes de animales inmunizados o no inmunizados previamente. (cuadros 1 -- a 14).

Así mismo, se observaron algunas lecturas bajas con las muestras de suero provenientes de los cerdos numero -- 2-3-7 al reaccionar con el antígeno elaborado con la cepa -- numero II procedente del laboratorio Regional de - - - - - Tepatitlán, Jal.

En general, la difusión final en la cual la aglutinación ya no se presenta, no fué determinada.

En el uso de la prueba en el diagnóstico, es importante efectuar una correcta evaluación de los resultados; -- ya que dicha prueba detecta anticuerpos, la presencia de --- estos no necesariamente indica que el cerdo está o estuvo -- clinicamente afectado por *E. rhusiopathiae* (insidiosa), el -- cerdo puede ser un portador asintomatico del germen.

Se debe tener en mente que la forma cronica de la -- enfermedad puede existir en una piara, y que simultaneamente esté afectada por alguna otra enfermedad aguda.

Así, la reacción positiva a la prueba de aglutina--- ción en tubo, no indica de ninguna manera el que no este - - presente alguna otra enfermedad en la piara.

En síntesis, se considera que el antígeno elaborado para la prueba de aglutinación en tubo, tiene su mejor uso -- en el diagnóstico de grupo más aun que individual, lo cual -- viene a constituirlo, en un medio auxiliar en el diagnóstico de *E. rhusiopathiae* (insidiosa) para su control.

CONCLUSIONES

- 1.- Se elaboró un antígeno para el diagnóstico de *E. rhusiopathiae* (insidiosa) para su uso en prueba de aglutinación en tubo.
- 2.- Para la obtención de dicho antígeno, se usó la técnica desarrollada por Denis Sikes (16) con modificaciones (Richard L. Wood correspondencia y Comunicación personal 5). Dicha técnica se considera eficaz y aplicable en nuestro medio.
- 3.- Se efectuaron pruebas de aglutinación con el antígeno elaborado, haciendo reaccionar con muestras serológicas conocidas previamente como positivas y negativas. Los resultados se consideran satisfactorios.
- 4.- Se considera la prueba como un valioso auxiliar en el diagnóstico y control de *E. rhusiopathiae* (insidiosa), mencionando sus limitaciones, como son: Su relativa aplicación en el diagnóstico individual, y ser necesario efectuarla en el laboratorio.



RESUMEN

Se efectua breve resumen histórico mundial de E. rhusiopathiae (insidiosa) en relación a su conocimiento inicial, aislamientos, y se mencionan algunos datos que dan idea de la magnitud del problema ocasionado por este germen.

Igualmente se hace una relación de la investigación efectuada en nuestro país sobre el tema, se hace notar la necesidad de efectuar nuevos estudios que permitan conocer y cuantificar los daños que E. rhusiopathiae produce en nuestro país.

Se hace notar la necesidad de contar con un método-auxiliar rápido de diagnóstico por medio de una prueba de aglutinación en tubo. Para lo cual se describe la técnica para la obtención del antígeno necesario para dicha prueba.

Se realizan pruebas de aglutinación en tubo, haciendo reaccionar el antígeno elaborado con muestras serológicas provenientes de cerdos y conejos inmunizados previamente (positivos) y muestras serológicas obtenidas de cerdos sin datos anamnesicos que nos hagan suponer contacto previo con E. rhusiopathiae (insidiosa) asi como muestras serológicas obtenidas de conejos sin inmunizar.

Finalmente, se discuten los resultados obtenidos, los cuales se consideran satisfactorios. Se mencionan las limitaciones de la prueba y se recomienda su uso en el laboratorio, como un auxiliar para el diagnóstico y control de E. rhusiopathiae (insidiosa) en nuestro país.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Breed R.S., Murray E.G. D., Smith, N.R., Bergery's --
Manual of Determinative Bacteriology, 7a. Edition, --
Williams and Wilkson Co., Baltimore, Maryland, EE. UU.
1957.
- 2.- Cornell R., Moynihan Irwin W., Frank J.F., "Studies --
of Swine Erysipelas, 1. Literature Review Survey of --
E. rhusiopathiae Infection in Canada," Journal of --
Comparative Medicine, 16, 1952: 104-128.
- 3.- Dunne, H.W., Enfermedades del Cerdo, Unión Tipográfica
Editorial Hispana Americana, México, 1967, 441-448.
- 4.- Difco Laboratories, Difco Manual of Dyhydrates Culture,
Media and Reagentes for microbiological and Clinical -
Laboratories Inc., Detroit Michigan EE. UU.
- 5.- Esparza B.H., Ramirez N.R., "Diagnostico e Identifica-
ción de Erisipela Porcina en México", Boletín del --
Colegio Nacional de Medicos Veterinarios Zootecnistas,
5 (2), 1968: 17.
- 6.- Grey, C.G. et.al., "Swine Erysipelas, The Agglutina---
tion Test for its Diagnosis and a Report on the Study
of Arithritis in Swine", American Journal of Veterina-
ry Research, Vol. II No. 2 January 1941: 74-76.
- 7.- Hutyra, F., et.al., Patología y Terepéuticas Especiales
de los Animales Domésticos, Segunda Edición Española,-
Editorial Labor S. A., 1968, Tomo 1: 50-66.
- 8.- Lozano E.A., et.al., "An Erysipelas Serum Culture --
Agglutination (ESCA) Test", American Journal of --
Veterinary Research Vol. 2, No. 75 March 1959: 394-397.

- 9.- Merchant I.A., Parker R.A., Bacteriología y Virología Veterinarias, Segunda Edición Española, Editorial - - Acribia, Zaragoza, España: 561-571.
- 10.- Nielson, N.C., "The Use of Selective Medium in the --- Growth Agglutination Test for chronic Erysipelothrix-- Insidiosa Infections in Swine", Acta Veterinaria - --- Scandinavica, Vol. 10, No. 2, 1969: 127-136.
- 11.- Rice, Christine, et.al., "Studies of swine Erysipelas", Canadian Journal of Comparative Medicine, Vol. 16, --- No. 5, May 1952: 195-204.
- 12.- Schoening G.T. et.al., "A Laboratory Tube Test and a-- whole Blood rapid Agglutination Test for the Diagno--- sis of Swine Erysipelas", North American Veterinarian, Vol. 13, No. 12, December 1932: 19-25.
- 13.- Schuman R.D., et.al., "Sensitization by Erysipelothrix Rhusiopathiae (Insidiosa) with Relation to Arthritis- in Pigs, 1. Pretreatment and Challenge with Dead Cells of Serotype B in A Homologous System", The Cornell --- Veterinarian Vol. LV, No. 3, July 1965: 378-386.
- 14.- Sikes, Dennis, The Pathological Effects on the - - - Bacteria E. rhusiopathiae on Swine, PhD thesis, - - Purdue University, Lafayette, Indiana, August 1954.
- 15.- Sikes, Dennis, et.al., "Studies on Arthritis in Swine, 1.- Experimental Erysipelas and Chronic Arthritis in- Swine", American Journal of Veterinary Research, Vol. 16, No. 60, July 1955: 349-366.
- 16.- Sikes, Dennis, "Some Biochemic Properties of a Smooth Colony of Erysipelothrix insidiosa used for Antigen - Production in the Tube Test", American Journal of - - Veterinary Research, Vol. 26, No. 112. 1965: 636-640.

- 17.- Sikes, Dennis, Crimmins, L.T., "The Physiopathological Changes in Synovial Fluid in Arthritic Swine", - Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science, Vol. 29, No.12, December 1965: - 312-316.
- 18.- Sikes, Dennis, Tumlin, T.J., "Further Studies on the Erysipelothrix Insidiosa Tube Agglutination Test", - American Journal of Veterinary Research, Vol.28 - -- No. 125, July 1967: 1177-1182.
- 19.- Sikes, Dennis, "Experimental Production of Rheumatoid Arthritis of swine: Physiopathologic Changes of Tissues", Journal of Veterinary Research, Vol. 29, - No. 9, September 1968: 1719-1731.
- 20.- Sikes, Dennis, et.al., "Agglutinating Factor Eluted From the Erythrocytes of Swine with Rheumatoid - - - - Arthritis" American Journal of Veterinary Research, - Vol. 31, No. 12, December 1970: 2191-2195.
- 21.- Stableforth A.W., Galloway, I.A., Infectious - - - - Diseases of Animals, Diseases Due to Bacteria - - - - "Swine Erysipelas", Butterworths Scientific - - - - Publications, London, 1959: 651-670.
- 22.- Torres, Jorge B., et.al., "Características Generales de Veinte Cepas de Erysipelothrix Insidiosa Aisladas en México", Técnica Pecuaria en México, Instituto -- Nacional de Investigaciones Pecuarias, Secretaría de Agricultura y Ganadería, No. 18, Julio 1971: 32-39.
- 23.- Udall, D.H., Practica de la Clinica Veterinaria, --- Tercera Edición Española, Salvat Editores S.S., - -- 1968: 540-550.
- 24.- Uruchurtu, Marraquin, A Study of the comparative - - Pathology of Arthritis in Animals with special - - - - References to Porcine Arthritis, M. Phiel Thesis, -- London University 1970. 8: 1411-1421.

- 25.- Van der Schaaf, Albert, Kramer-Zeeuw, Antje, " A - --
Stable Antigen for the tube Agglutination Test in - -
Chronic Swine Erysipelas"; American Journal of - - --
Veterinary Research, Vol. No.1, January 1962: 205-207.
- 26.- Vickers, C.L., Bierer, B.W., "Triple Sugar Iron Agar-
as an Aid in the Diagnosis of Erysipelas", Journal --
American Veterinary Association, December, 1958, - --
543-544.
- 27.- Wood, Richard, L., "A Selective Liquid Medium - - - -
Utilizing Antibiotics for Insolation of Erysipelothrix
Insidiosa"; American Journal of Veterinary Research; -
Vol. 26, No.115 1303-1308.

Comunicaciones personales.

- 1.- Aguirre, F., 1970, Laboratorio de Diagnóstico de - --
Patología Animal de Irapuato, Gto., Km.336 Carretera-
Panamericana (Renaldi, SAG).
- 2.- Ramírez, U.N., 1970, Departamento de Microbiología, -
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- 3.- Rivera, J. 1970, Laboratorio de Diagnóstico de - - --
Patología Animal de Tlaquepaque, Jal., Km. 832.5 - --
Carretera Tampico-Barra de Navidad (Renaldi SAG).
- 4.- Torres, B.J., 1970, Laboratorio Central Nacional de -
Diagnóstico de Patología Animal, Dirección General de
Sanidad Animal SAG, Km. 15 1/2 Carretera - - - - -
México-Toluca Palo Alto, D. F.
- 5.- Wood, Richard, L., Erysipelothrix rhusiopathiae, - --
Insolation and Identification, National Animal - - --
Disease Laboratory A D P Research Division, Agricultu
ral Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, - --
Ames, Iowa.