

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA

Aislamiento e Identificación de Treponemas en Cerdos

T E S I S

Que para obtener el título de:

Médico Veterinario y Zootecnista

p r e s e n t a :

MOISES MONTANO BERMUDEZ

Dedicatorias.

Con mi más profundo
sentimiento, que no
puedo explicar, a
mis Padres:

FERNANDO Y GERTRUDIS.

Con cariño a mis hermanos:

Luz María.

Blanca Julia y Patricio.

Carlos.

Fernando.

Jesús Jorge y Alejandrina.

Gustavo.

Armando.

Romualdo.

Guadalupe.

Con profundo respeto
y agradecimiento al:

Dr. Ramón Fernandez de Cevallos.

Con agradecimiento al:

M.V.Z. Javier Rivera Hernández.

por su valiosa ayuda al dirigirme
esta tesis.

Respetuosamente a todos
mis Maestros.

A mi amiga:

Irma.

A mis Compañeros.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Indice.

I n d i c e

Introducción	1
Material y Métodos	7
Resultados	10
Discusión	15
Conclusiones	22
Sumario	23
Bibliografía	25

Introducción.

La disentería porcina es una enfermedad - infecciosa, fácilmente transmisible y que no - ataca otras especies fuera del cerdo.

La disentería porcina es una enfermedad de mucha importancia desde el punto de vista económico , ya que en EE. UU. las pérdidas por esta enfermedad, para la Porcicultura, ascienden a - 34 millones de dólares anualmente (6). Francisco Orozco (1971) reporta que la disentería porcina produce retardo en el crecimiento, prolongando la salida al mercado de mes a mes y medio los cerdos alcanzan los 90 Kg. a los 7 meses, - a los 6 meses el peso alcanzado es de 71.960 - Kg. , las pérdidas ascienden a \$98.40 (Noventa- y ocho pesos cuarenta ctvs.) por cerdo a la salida al mercado (13).

Además de la importancia económica de esta enfermedad, podemos adjudicarle cierta importancia desde el punto de vista de Salud Pública, - ya que Blood-Henderson citan, textualmente:"La-

aparición de un síndrome entérico en el hombre - asociado con la presencia de un *Vibrio* análogo a *Vibrio coli* en las heces, ha permitido postular que esta enfermedad se transmite al hombre" (2).

Esta enfermedad ha sido reportada desde 1918 en Indiana y fué descrita por primera vez en 1921 por Whiting, Doyle y Spray. En 1944, Doyle aisló vibriones de la mucosa del intestino de cerdos afectados por disentería porcina. En 1947, el mismo autor intentó reproducir la enfermedad alimentando cerdos con cultivos puros de *Vibrio coli* y mucina gástrica, teniendo éxito en 50 cerdos de los 60 que fueron inoculados, los cerdos afectados desarrollaron síntomas de la enfermedad espontánea (10).

Posterior a estas investigaciones, algunos autores han tratado de reproducir la enfermedad por exposición experimental de cerdos a cultivos puros de *Vibrio coli*, y la enfermedad producida en estos casos ha sido diarrea transito-

ria, los cerdos afectados han sido menos del -- 50% de los cerdos expuestos.. Varios investiga- dores recientes han fracasado en la reproduc--- ción de la enfermedad, usando cultivos puros de Vibrio coli(7)(Deas, 1960; Davis, 1961; Andre~~as~~, Barnum y Moorhead, 1968; Terpstra, Akkermans y Ouwerkerk, 1969)(1). En 1969, Söderland cita en su trabajo, el aislamiento de Vibrio coli tanto a partir de cerdos afectados por disentería co- mo de cerdos sanos(14).

En 1968, Terpstra y col. (citados por Ale- xander y Taylor, 1969) sugiere que una espiro--- queta está involucrada como agente etiológico -- de la disentería porcina(1). Sin embargo, en -- 1970 Sorensen dice que la mayoría de los auto--- res aceptan a Vibrio coli como causa de la di--- sentería porcina(15), no queriendo decir con es to que otros factores secundarios no puedan in- fluir en la infección y determinar si la enfer- medad ocurre o no clínicamente. En 1972, García Flores cita, todavía, a Vibrio coli como agente

etiológico único en disentería porcina(4).

A partir de los trabajos de Terpstra, numerosos investigadores han reportado el aislamiento de espiroquetas a partir del colon y de las heces de cerdos afectados por disentería porcina, así como la producción de la enfermedad con cultivos de estas mismas espiroquetas, ya sea - en forma pura o mezclados con *Vibrio coli* (5) - (8) (9) (16) (17).

En 1972, Harris, Glock, Christensen y Kinyon efectuaron un experimento de inoculación - de cerdos en la forma siguiente: grupo 1.- es - piroquetas, VLO (organismos como *Vibrio*) y *Vi* - brio coli; grupo 2.- espiroquetas y VLO; grupo - 3.- espiroquetas únicamente; grupo 4.- VLO; y - grupo 5 .- testigo. Los resultados de este ex - perimento arrojan: aislamientos de espiroquetas de los grupos 1,2 y 3, aislamiento de *Vibrio* - coli de todos los grupos incluyendo el grupo - testigo, VLO no pudo aislarse del grupo número - 5. En este mismo trabajo se propone la clasifi -

000110

cación de la espiroqueta con el nombre de Treponema hyodysenteriae. En 1972, Glock y Harris - continuando el trabajo citado anteriormente, - observaron el desarrollo de síntomas de disentería porcina en cerdos inoculados con cultivos puros de Treponema hyodysenteriae o mezclados con VLO y Vibrio coli (5).

Parece que los autores están sugiriendo la hipótesis de que Vibrio coli y Treponema hyodysenteriae son agentes etiológicos primarios de la disentería porcina y que posiblemente estos agentes actúan en conjunción para producir los signos clínicos de la enfermedad (11).

Por lo expuesto anteriormente: las dudas - que existen dentro de la etiología de la disentería porcina y su importancia desde el punto de vista económico para la Porcicultura, consideramos oportuno la realización de este trabajo: "Aislamiento e Identificación de Treponemas en Cerdos", esperando aportar datos que ayuden directamente al mejor conocimiento de la etiolo -

(6)

gía de la disentería porcina e indirectamente -
a la economía de la Porcicultura.

Material y Métodos.

MATERIAL.

Frascos con tapadera, estériles.

Asa bacteriológica.

Portaobjetos.

Pipetas de 10 c.c.

Tubos de plástico para centrifuga.

Portafiltros.

Filtros Millipore de 0.65 micras de diámetro poral.

Matraz Kitasato de 500 c.c.

Cajas de Petri.

Cubreobjetos.

50 muestras de excremento de cerdos afectados por disentería porcina.

Solución peptonada al 1%.

Gelosa sangre de caballo al 10%.

Tinsión de Gram.

Tinsión de Giemsa.

Microscopio con cámara de campo oscuro.

METODOLOGIA.

Los cerdos muestreados procedían de 8 granjas, situadas en los Municipios de Ameca (1), - Arenal (1), El Salto (1), Sayula (1), Zapopan - (3) y Zapotlanejo (1). Los animales muestreados presentaban excremento diarréico y se presumía que padecían disentería porcina.

Las muestras se tomaron directamente del recto y en frascos con tapadera, estériles. Se tomó una asada del excremento y se suspendió en una gota de agua destilada sobre un portaobjeto, se fijó a la flama y se tiñó con el método de Gram, haciéndose la observación al microscopio de luz normal a 1250 X, para la confirmación de formas espirilares.

Un gramo de excremento se diluyó en 10 c.c. de solución peptonada al 1%, esta suspensión se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10' y el sobrenadante se pasó a través de un filtro Millipore de 0.65 micras de diámetro poral, del filtrado se tomó una asada y se sembró en gelosa sangre

de caballo al 10%. La incubación se efectuó a 37 grados C., en condiciones anaeróbicas. Después de 48 horas de incubación aparecen áreas de hemólisis sin crecimiento aparente en la superficie(9).

Se tomó una asada de las áreas de hemólisis y se suspendió en una gota de agua destilada sobre un portaobjeto, colocando un cubreobjeto se pasó a la observación con microscopio de campo oscuro a 400 X.

Otra asada de las mismas áreas de hemólisis se suspendió en una gota de agua destilada sobre un portaobjeto, fijándose a la flama y siguiendo el método de Giemsa para su tinsión, se pasó a la observación en el microscopio de luz normal a 1250 X, para verificar la presencia de las formas espirilares observadas con el microscopio de campo oscuro.

Resultados.

Tabla No. 1

Muestras No.	Formas espirila- res con tinsión de Gram.	Aislamiento de T. hyodysenteriae.
1	+++	-
2	++++	-
3	++	-
4	+++	+
5	+++	-
6	++++	-
7	++	-
8	+++	-
9	++++	-
10	+++	+
11	+++	+
12	++++	+
13	++++	-
14	+++	-
15	+++	+
16	++	-
17	++++	-
18	++++	+

Tabla No. 1

(continuación).

Muestras No.	Formas espirila- res con tinsión de Gram.	Aislamiento de T. hyodysenteriae..
19	++	-
20	++++	+
21	++++	+
22	++++	-
23	++++	+
24	++++	+
25	++++	+
26	+++	-
27	+++	+
28	+++	+
29	++++	+
30	+++	+
31	+++	+
32	++	+
33	+	-
34	+++	-
35	++++	+

Tabla No. 1
(continuación).

Muestras No.	Formas espirila- res con tinsión de Gram.	Aislamiento de T. hyodysenteriae.
36	++++	+
37	++++	+
38	++++	+
39	+++	+
40	++	-
41	++	-
42	+++	-
43	+++	-
44	+++	+
45	++	-
46	+++	+
47	++++	+
48	++++	+
49	+++	-
50	++++	+

En la tabla No.1 se reportan los resultados obtenidos en este experimento. Como puede observarse, todas las muestras fueron positivas, con mayor o menor grado, a formas espirilares con tinción de Gram. En cuanto al aislamiento de *Treponema hyodysenteriae*, de las 50 muestras trabajadas 27 resultaron positivas, representando el 54 % del total de muestras trabajadas. Observando con detenimiento podemos apreciar que las muestras positivas a aislamiento, corresponden a muestras que se clasifican con 3 ó 4 cruces en la observación de formas espirilares con tinción de Gram, con excepción de la muestra no. 32 que está clasificada con 2 cruces.

En la siguiente tabla se hace un resumen de los resultados obtenidos:

No. de muestras Positivas a for mas espirilares.	%	Aislamiento de T. hyodysenteriae.	%
20 con ++++	40	14	28
21 con +++	42	12	24
8 con ++	16	1	2
1 con +	2	0	0
Totales= 50	100	27	54

Discusión.

00018

Las muestras trabajadas procedían de animales en los cuales, por lo general, la diarrea - no había cedido al tratamiento con tylosina.

En nuestros resultados reportamos muestras positivas o negativas a formas espirilares, debido a que Howard W. Dunne recalca en su libro, que estas formas pertenecen a la familia Espirilacea y dentro de esa familia encontramos a Vibrio coli; por lo que, en formas de diagnóstico al reportar formas espirilares se piensa en Vibrio coli(3)(15).

Harris y Glock (1972) reportaron que la disentería porcina ha sido reproducida administrando filtrados de contenido intestinal, a través de filtros con 0.65 y 0.45 micras de diámetro - poral. En nuestro trabajo no intentamos reproducir la enfermedad, sino aislar el Treponema hyodysenteriae. En el presente trabajo utilizamos filtros de 0.65 micras debido a que en el mismo trabajo, citado anteriormente, se anota que en

los filtrados en los cuales se utilizan filtros de 0.45 micras la cantidad de Treponemas es muy baja(7).

Taylor y Alexander (1971) citan en su trabajo que *Treponema hyodysenteriae* se identifica por las áreas de hemólisis sin aparente crecimiento en la superficie, que aparecen después de 48 horas de incubación en condiciones anaeróbicas(16). Sin embargo, en las muestras no. 32 y 47 las áreas de hemólisis fueron indistinguibles, pero el crecimiento era poco aparente en la superficie y aparecieron Treponemas a la observación con el microscopio de campo oscuro.

No todas las muestras que nosotros reportamos como negativas deben considerarse como tales, ya que Tood, Hunter y Clark (1970) reportaron que los Treponemas nos son invariablemente detectables en casos de disentería porcina(18). Taylor y Alexander reportan casos de cerdos que al examen del contenido del colon mostraban algunas espiroquetas, sin embargo, no pudieron --

aislarse(16).

El agente etiológico de la enfermedad es susceptible al calentamiento a 60 grados C. durante 30' y se encuentra en filtrados de contenido intestinal, a través de filtros de 0.65 y 0.45 micras de diámetro poral, pero no se encuentra en filtrados en los que se utilizan filtros de 0.22 micras de diámetro poral(7). No fué posible encontrar en la literatura accesible las medidas de *Vibrio coli*, sin embargo, otros miembros del mismo género miden de 0.2 a 0.5 micras de diámetro y 1.5 a 5 micras de largo(12), considerando que la clasificación por géneros se hace, en cierta forma, basándose en la morfología, podemos considerar esas medidas como representativas de *Vibrio coli*. *Treponema hyodysenteriae* mide de 0.32 a 0.38 micras de diámetro y 6.0 a 8.5 micras de largo(9). Por lo tanto, los dos gérmenes pueden atravesar filtros de 0.65 y 0.45 micras y son retenidos por los de 0.22 micras. La diferenciación entre *Tre*

ponema hyodysenteriae y *Vibrio coli* puede hacerse basándose en la morfología de las colonias, que sobresalen de la superficie del medio en *Vibrio coli*, no siendo así en *Treponema hyodysenteriae* en el cual las colonias no son aparentes. Otra base para diferenciarlos es el número de espiras que presentan cada uno de ellos, en *Vibrio coli* se presentan 2 ó 4 espiras como máximo y en el género *Treponema* el número de espiras es de 6 a 12(3). Por lo expuesto anteriormente, quedan excluidos todo tipo de protozoarios (*Balantidium*) como agentes etiológicos, porque se eliminan usando filtros de 0.65 micras.

Kurtz y Sorensen (1972) sugieren la posibilidad de que un enterovirus juegue un papel sutil en la producción de disentería porcina, y los efectos sinérgicos de otros organismos produzcan los signos clínicos de la enfermedad. Este virus puede actuar solo, sin provocar los síntomas clínicos de la enfermedad, pero alterando las células epiteliales. Estas células al

teradas pueden proporcionar la oportunidad a otros agentes, tales como *Vibrio* o *Treponema* que comunmente están presentes en la enfermedad, a proliferar en las células epiteliales debilitadas(11).

Desde 1947, cuando Doyle logra reproducir la disentería porcina alimentando cerdos con -- cultivos puros de *Vibrio coli*(10), se consideró a éste como causa de la disentería porcina. Sin embargo, posteriormente otros investigadores -- han reportado, no haber logrado éxito total en sus intentos por reproducir la disentería porci na con cultivos puros de *Vibrio coli*. Más re--- cientemente, se han reportado fracasos comple-- tos en los intentos por reproducir la disente-- ría porcina con cultivos de *Vibrio coli*(7)(---- Deas, 1960; Davis, 1961; Andress, Barnum y Moor head, 1968; Terpstra, Akkermans y Ouwerkerk, -- 1969)(1). El hecho de que Söderland (1965) re-- porte el aislamiento de *Vibrio coli* a partir de cerdos sanos(14), permite a Kurtz y Sorensen --


ser cautelosos en la asignación de *Vibrio coli* como agente etiológico primario, por el hecho de ser un organismo saprofítico y posiblemente oportunista(11).

A partir de los trabajos de Terpstra y col. en 1968 (citados por Alexander y Taylor, 1969), en los que sugiere que una espiroqueta está involucrada como agente etiológico de disentería porcina; numerosos autores han publicado trabajos que refuerzan este punto de vista(5)(8)(9)-(16)(17). Glock y Harris (1972) hicieron experimentos de transmisión de la enfermedad, utilizando cultivos puros de *Treponema hyodysenteriae* y mezclados con VLO y *Vibrio coli*, llegando a la conclusión de que *Treponema hyodysenteriae* es capaz de inducir los síntomas y lesiones típicos de la enfermedad, en cerdos que tienen una flora intestinal normal antes de la inoculación(5).

Taylor y Blakemore (1971) reportan la presencia de grandes cantidades de espiroquetas --

dentro y entre las células del epitelio intestinal de cerdos afectados por disentería porcina en forma experimental, sugiriendo con esto una relación entre las lesiones y *Treponema hyodysenteriae* (17).

Taylor y Alexander (1971) y Harris y col. (1972) tuvieron éxito en la reproducción de la disentería porcina en cerdos SPF, inoculados oralmente con cultivos de *T. hyodysenteriae*. Harris y col. (1972) encontraron que *T. hyodysenteriae* no produce lesiones en cerdos libres de gérmenes, implicando con ello que otros organismos presentes normalmente en el intestino pueden ser esenciales para que *T. hyodysenteriae* se desarrolle y cause lesiones. Taylor (1972) reproduce la enfermedad en cerdos obtenidos por cesárea y libres de *Vibrio coli*, sugiriendo que este último no es necesario para la patogénesis (citados por Glock, 1972)(6).



Conclusiones.

1.- Se aisló *Treponema Hyodysenteriae* a partir de 27 muestras de excremento de cerdos que padecían disentería porcina, representando el 54% del total de muestras trabajadas.

2.- El 100% de las muestras resultaron positivas a formas espirilares en mayor o menor intensidad.

3.- Las muestras donde se observaron formas espirilares más abundantes fué donde se obtuvo el porcentaje más alto de crecimiento de *T. hyodysenteriae*.

Sumario.

La disentería porcina es una enfermedad infecciosa, fácilmente transmisible y que no afecta a otras especies fuera de los cerdos. Fué descrita por primera vez en 1921 por Whiting, Doyle y Spray. En 1944, Doyle aisló por primera vez, *Vibrio coli* a partir de colon de cerdos afectados por disentería porcina. En 1968, Terpstra sugiere la participación de una espiroqueta como agente etiológico de disentería porcina.

En el presente estudio se trabajaron 50 muestras de excremento de cerdos afectados por disentería porcina. Las muestras se diluyeron en solución peptonada al 1% y se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.65 micras de diámetro poral; del filtrado se sembró una asada en gelosa sangre de caballo al 10%, se incubó a 37 grados C. durante 48 horas, en condiciones anaeróbicas, con lo cual intentamos el aislamiento de *T. hyodysenteriae*.

Se aisló *T. hyodysenteriae* a partir de 27 muestras que representan el 54% del total de

muestras trabajadas. La identificación de Treponemas se hizo con microscopio de campo oscuro a 400 X y se confirmó con la observación de preparaciones teñidas con el método de Giemsa, en microscopio de luz normal a 1250 X.

Bibliografia.

- 1.- Alexander T. J. L., Ph.D., M.V.Sc., B.Sc., -
M.R.C.V.S. and Taylor D. J.
The Clinical Signs, Diagnosis and Control -
of Swine Dysentery.
Vet. Rec. 1969 85:59-63.
- 2.- Blood-Henderson.
Medicina Veterinaria.
Cap. 19 Pags. 433-44
Tercera Edición 1960.
Editorial Interamericana.
- 3.- Cruickshank Robert.
Medical Microbiology.
Caps. 21 y 29 Pags. 269 y 343.
Decimo Primera Edición 1969.
E & S Livingstone Limited.
- 4.- García Flores Felipe Arturo, M.V.Z.
Tesis, 1972
- 5.- Glock R.D., D.V.M., Ph.D. and Harris D.L., -
D.V.M., Ph.D.
Swine Dysentery II: Characterization of le-
sions in pigs inoculated with Treponema -

hyodysenteriae in pure and mixed culture.

V.M./S.A.C. January, 1972 65-68

6.- Glock R.D. D.V.M., Ph.D.

The Current Status of Swine Dysentery.

Feedstuffs Agosto 21, 1972 32-34

7.- Harris D.L., D.V.M., Ph.D. and Glock R.D.,
D.V.M., Ph.D.

Swine Dysentery.

J.A.V.M.A. 1972 160(4):561-5

8.- Harris D.L., Kinyon J.M., Mullin M.T. and -
Glock R.D.

Isolation and Propagation of Spirochetes -
from the Colon of Swine Dysentery Affected-
Pigs.

Can. J. comp. Med. 1972 36:74-6.

9.- Harris D.L., D.V.M., Ph.D., Glock R.D., -
D.V.M., Ph.D. Christensen C.R., and Kinyon-
J.M., B.S., M.T.

Swine Dysentery I: Inoculation of pigs with
Treponema hyodysenteriae (new species) and-
reproduction of the disease.

- V.M./S.A.C. January, 1972 61-4
- 10.- James H.D. and Doyle L.P.
Further Studies with a *Vibrio* as the
Etiologic Agent of Swine Dysentery.
J.A.V.M.A. 1947 111:47
- 11.- Kurtz H.J., D.V.M., Ph.D. and Sorensen
D.K., D.V.M., Ph.D.
Comments on Swine Dysentery.
J.A.V.M.A. 1972 160(4):566-7
- 12.- Merchant I.A. y Packer R.A.
Bacteriología y Virología Veterinarias.
Cap. 19 Pag. 310
Segunda Edición Española, 1965.
Editorial Acribia.
- 13.- Orozco Francisco , M.V.Z.
La Disentería Porcina en Cerdos de Abasto.
Porciraama 1971 No.2 9-12
- 14.- Söderland O.
The Isolation of *Vibrio Coli* from Pigs.
Vet. Rec. 1965 77:193.

- 25.- Sorensen D.K., D.V.M., M.S., Ph.D.
Desease of Swine by Howard W. Dunne.
Third Edition, 1970.
Cap. 22 Pag. 497-8
The Iowa State University Press.
- 16.- Taylor D.J. and Alexander T.J.L.
The Production of Dysentery in Swine by -
Feeding Cultures Containing a Spirochaete.
Br. Vet. J. 1971 127: 58-60
- 17.- Taylor D.J. and Blakemore W.F.
Spirochaetal Invasions of the Colonic Epi-
thelium in Swine Dysentery.
Res. Vet. Sci. 1971 12:177-9
- 18.- Tood J.M., Hunter D. and Clark A.
An Agent Possibly Associated with Swine -
Dysentery.
Vet. Rec. 1970 86(8):228.