

---

## AISLAMIENTO DE *Corynebacterium* DE GANGLIOS LINFATICOS DE CERDO

---

O. VALDÉS ORNELAS y O. FERNÁNDEZ  
ALDAMA  
Laboratorio de Bacteriología de  
la Escuela Nac. de Ciencias  
Biológicas.

### INTRODUCCION

Al practicarse la inspección sanitaria de carnes en los diversos rastros del país, con frecuencia se encuentran en los animales sacrificados, lesiones similares a las que han sido descritas por numerosos autores extranjeros como producidas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. pyogenes* y *C. equi*. A pesar de esta frecuencia, muy pocos estudios han sido realizados para determinar por métodos bacteriológicos la presencia de dichos microorganismos, por lo que, dada la importancia del tema, consideramos conveniente iniciar una serie de trabajos para el estudio por métodos bacteriológicos de los difteroides causantes de enfermedades en los animales de abasto, limitándonos en esta breve investigación a los gérmenes del género *Corynebacterium* presentes en ganglios linfáticos con lesiones hemorrágicas o congestivas procedentes de cerdos.

En el trabajo de Merchant (1935) y en su libro "Veterinary Bacteriology" (1946), encontramos una descripción completa de las investigaciones realizadas por diversos investigadores y por el mismo Merchant acerca de las características y patogenicidad para los animales del *Corynebacterium pyogenes* y del *C. pseudotuberculosis*. Con respecto a este último germen, debemos citar especialmente los trabajos de Cameron (1940), Hammersland (1941) y Sheggetti (1941).

Desde la publicación del trabajo de Magnusson en 1932, citado por Bruner, Dimock y Edwards (1939), sobre el aislamiento del *C. equi*, en la literatura encontramos gran número de reportes sobre infecciones causadas por este germen, pero en la mayor parte de ellas se le ha confundido con el *C. pyogenes*, llegándose a proponer en varias ocasiones fuera cambiado el nombre de *C. equi* por el de *C. pyogenes* var. *equi* por considerarlo como una variante del *C. pyogenes*. Los trabajos de Magnusson (1938) rectificaron los hechos y pusieron fin a esta confusión, encontrándose en la actualidad descripciones adecuadas de este germen como las de Merchant, (*loc. cit.*), Rajagopalan y Gopalakrishnan (1937), Feldman y Karlson (1940), Bruner y Edwards (1941), McDonald (1942) y Valdés (1944). Las características morfológicas y de cultivo del *C. equi* de acuerdo con las opiniones de Plum (1938) y algunos de los autores citados, no son suficientes para su identificación plena, y teniendo en consideración que estos microorganismos no producen ácido ni gas en los medios azucarados comúnmente empleados, las reacciones serológicas adquieren preponderancia en su clasificación.

La nomenclatura y clasificación de las distintas especies de microorganismos del género *Corynebacterium* patógenas para los animales, ha carecido de firmeza y aun en la clasificación de Bergey *et al.* (1939), encontramos datos insuficientes para el reconocimiento de las especies anteriormente citadas y en cuanto al *C. equi* sólo es mencionado en el apéndice sin indicar sus características de fermentación.

La clasificación de Barrat (1924-1925) (1933) hecha en el estudio de 150 cepas de difteroides aisladas utilizando el medio de Hoyle (1941), es tomada en consideración por muchos investigadores que trabajan con estos gérmenes y, basándose en ella Bray (1944) sugiere la investigación de la presencia de fosfatasa empleando el reactivo fosfato de fenoltaleína, como un medio útil para la diferenciación de *C. diphtheriae* de los difteroides.

Considerando la descripción hecha por Merchant (1946) como una de las más completas, ha sido utilizada como tipo en este trabajo para la clasificación bioquímica de *C. equi*, *C. pseudotuberculosis* y *C. pyogenes*.

### MATERIAL Y METODOS

**MEDIOS DE CULTIVO.** Medios de telurio número 1 y 2. Basándonos en los trabajos realizados por Horgan y Marshall (1932), en los que se demuestra la máxima concentración de telurito de potasio en los medios de cultivo, que permite el crecimiento de *C. diphtheriae* sin inhibir por completo a los difteroides es de 0.16%, concentración

suficiente para inhibir el desarrollo de *Staphilococcus* y *Streptococcus*, y en las publicaciones de Fleming (1942) y Schaub (1943), las que señalan la inhibición del crecimiento de algunas especies de la familia Enterobacteriaceae y de los géneros *Brucella*, *Hemophilus* y *Pseudomonas* en medios de cultivo adicionados de telurito de potasio aun en proporciones pequeñas como 1:50,000 y 1:100,000; previa comprobación de que las cepas tipo elegidas para nuestro estudio se desarrollaban correctamente en ellos, se utilizaron para el aislamiento los medios números 1 y 2 preparados en la forma siguiente: a 940 c.c. de gelosa previamente esterilizada, fundida y enfriada a 45 ° C., se le agregaron 50 c.c. de sangre de conejo y 10 c.c. de solución acuosa estéril de telurito de potasio, para el medio número 1 con una concentración de 2:100 y para el medio número 2 con una concentración de 10:100, obteniéndose respectivamente concentraciones finales de 1:5,000 y 1:1,000, repartiéndose el medio en cajas de Petri.

**Gelosa.** Este medio fue utilizado tanto para algunas fases del aislamiento como para la conservación de las cepas, habiéndose preparado en la forma siguiente: Proteosa-peptona Difco 10 g., extracto de carne Difco 3 g., cloruro de sodio 5 g., agar 24. Se completó el volumen a un litro con agua destilada y el pH fue llevado a 7.4 - 7.6.

Medios de cultivo para el estudio de fermentación de carbohidratos. Proteosa-peptona Difco 10 g., cloruro de sodio 5gr, carbohidrato en estudio 10 g. y agua destilada hasta completar un litro. pH 7.4, añadiéndose como indicador Bromotimol azul y repartiéndose en tubos de Beson.

Caldo nitrado. Peptona difco 10 g., nitrato de sodio 1 g., agua destilada hasta completar un litro y pH 7.4 - 7.6.

**MUESTRAS EMPLEADAS.** El material empleado para el aislamiento de los gérmenes, fueron ganglios linfáticos (mediastinales) de cerdos sacrificados en el Rastro General de la ciudad y en el Rastro de Tacuba, seleccionándose los ganglios hemorrágicos o congestionados sin utilizarse en ningún caso los aparentemente normales.

Las determinaciones se hicieron en 46 muestras procedentes de animales diferentes, recogidas asépticamente en recipiente de vidrio previamente esterilizado e individuales para cada muestra. En todos los casos, los ganglios fueron transportados con rapidez al laboratorio y su tratamiento iniciado antes de 3 horas después de haberse obtenido.

**TECNICAS DE AISLAMIENTO Y METODOS EMPLEADOS.** De la parte central del ganglio se tomaron asépticamente pequeñas porciones para ser trituradas en un mortero con arena, emulsionando el triturado con solución salina al 9:1,000 estéril, sembrándose con esta emulsión media placa del medio de telurito núm. 1 y la otra mitad de la placa fue sembrada con la misma emulsión después de tratada en la siguiente forma: se tomaron de ella 0.9 c.c. y 0.1 de ácido oxálico al 10:100 y se pusieron en un tubo estéril durante 15 minutos, transcurridos éstos se hizo la siembra. Después de incubar 48 hrs. a 37° C., fueron escogidas 10 de las colonias de cada placa entre las que por sus características de crecimiento fueran similares a las de los gérmenes en estudio y previa bacterioscopia se sembraron en tubos de gelosa para nueva incubación por 24 - 48 hrs., anotando las que procedían del material tratado con ácido oxálico. Los cultivos obtenidos de cada una de estas diez colonias fueron pasadas a placas de gelosa para anotar sus características de crecimiento después de ser incubados 24 y 48 hrs. a 37 ° C. y hacer nueva selección de colonias, pasarlas a tubos de gelosa y luego resembrar, a partir de los cultivos obtenidos en éstos, en placas del medio de telurito núm. 2, más selectivo aún que el primero.

De las 10 cepas procedentes de cada muestra, mediante el procedimiento descrito, fueron seleccionadas sólo 5 entre aquellas que mostraron mayor semejanza con cualquiera de las cepas tomadas como tipo y resembradas del medio de telurito núm. 2 a tubos de gelosa inclinada para practicar nueva bacterioscopia usando como en los casos anteriores la técnica de coloración de Gram, modificación de Hucker, así como la de Albert modificada por Laybourn (citadas por Kolmer y Boerner) para la tinción de gránulos metacromáticos.

Para determinar las características bioquímicas de las cepas de gérmenes aisladas, fueron sembradas en medios conteniendo cada uno de los siguientes hidratos de carbono: dextrosa, lactosa, xilosa, dulcitol, galactosa, levulosa, dextrina, manitol, inulina, sacarosa, arabinosa, manosa y glicerol, siendo incubados a 37° C., durante 30 días y observados diariamente para buscar la producción de ácido o de gas. Las cepas tipo fueron sembradas como control comparativo simultáneamente en los mismos azúcares que las demás cepas. Antes de darse como positiva la fermentación de su sustrato determinado, se comprobaba bacterioscopicamente la pureza del cultivo.

Las pruebas de reducción de nitratos se realizaron haciendo siembras en caldo nitrado, incubando 3 días a 37° C., y determinando la presencia o ausencia de nitritos en el medio por el método del ácido sulfanílico-alfa-naftilamina recomendado por Levine (1939) y por Lewis (1945).

Una vez determinadas las características bioquímicas de las cepas aisladas, a pesar de las estimaciones acerca de la escasa seguridad que presentan las reacciones de aglutinación en el estudio del género *Corynebacterium*, hechas por Brown y Orcutt (1920), intentamos hacer un estudio serológico utilizando las reacciones de aglutinación y de fijación del complemento.

Para la preparación de antisueros que nos sirvieran como tipos, utilizamos las siguientes cepas recibidas de la N. T. C. C., mismas usadas como control en las pruebas anteriores: *C. equi* 9769, *C. pseudotuberculosis* 8666, *C. pseudotuberculosis* 8666, *C. pseudotuberculosis* 10139, *C. pyogenes* 9730, y *C. pyogenes* 10138. Los antisueros para cada una de estas cepas fueron preparados mediante inoculaciones a conejos de dosis crecientes de suspensiones en solución salina 9:1,000 formulada al 3:1,000, de gérmenes obtenidos de cultivos en gelosa inclinada. La concentración de las suspensiones era equivalente en turbidez a la del tubo número 3 del nefelómetro de McFarland y se inyectaron en total a cada conejo, por vía endovenosa, 66.5 c.c. repartidos en doce dosis aplicadas cada cuarto día en la forma siguiente: 1 c.c., 1 c.c., 1.5 c.c., 3 c.c., 4 c.c., 5 c.c., 6 c.c., 7 c.c., 8 c.c., 9 c.c., 10 c.c. y 11 c.c., sangrándose en blanco los conejos 10 días después de aplicada la última dosis y una vez separado el suero se le añadió a cada 10 c.c., de suero, 1 c.c. de "solución núm. 45 de mertiolato al 1:1,000" y 9 c.c. de glicerina q.p., conservándose hasta su uso en refrigeración.

Para preparar los antígenos y en la realización de las reacciones de aglutinación en tubo, seguimos la técnica descrita por Cameron y McOmie (1940), en tanto que para las pruebas de aglutinación en placa de vidrio, la técnica usada fue la descrita por Merchant (*loc. cit.*).

De los diferentes y repetidos ensayos practicados con ambos tipos de reacciones de aglutinación (en tubos y en placa) utilizando las cepas tipo y 37 seleccionadas de entre las aisladas por presentar caracteres de cultivo, morfológicos y bioquímicos más semejantes a los de las cepas tipo, no fue posible obtener resultados de valor, ya que la aglutinación se presentaba con toda claridad y a títulos hasta de 1:360 entre los antisueros y los antígenos preparados con cepas homólogas pero no con cepas de la misma especie o con alguna de las aisladas en este trabajo.

Para las reacciones de fijación del complemento se utilizó la técnica descrita por Bruner y Edwards (*loc. cit.*), preparando con cada cepa un antígeno del que se tituló, antes de verificarse la reacción, su actividad anticomplementaria usando la técnica de Kolmer y Boerner (1943). Todas las cepas que no fermentaban ningún carbohidrato de los citados anteriormente, fueron tratadas en esta forma con el objeto de determinar si eran capaces de fijar el complemento frente al antisuero preparado con *C. equi*. Mediante estas reacciones fue posible catalogar definitivamente como *C. equi* el grupo de cepas que se indica en "Resultados".

Se hizo un ensayo para utilizar la misma técnica de la reacción de fijación del complemento utilizando antígenos preparados con cepas que por sus características de cultivo y bioquímicas fueron identificadas como *C. pseudotuberculosis*, frente a los antisueros preparados con las cepas tipo de *C. pseudotuberculosis*, sin obtener reacciones positivas con ninguna de las nueve cepas empleadas.

## RESULTADOS

El número de cepas aisladas inicialmente fue de 460 y de ellas fueron seleccionadas por sus características morfológicas y de cultivo 230. De estas últimas se estudió su comportamiento bioquímico desechándose 45 por apartarse sensiblemente en sus reacciones de las comunes al género de estudio.

De las 185 cepas estudiadas finalmente, 121 presentaron características morfológicas, de cultivo y bioquímicas que permitieron clasificarlas como *C. pseudotuberculosis*; 14 presentaron caracteres morfológicos, de cultivo, bioquímicos y serológicos similares a los descritos para *C. equi* y 50 no pudieron ser clasificadas en este trabajo, continuándose su estudio, por presentar características no comprendidas entre las descritas para las especies de *Corynebacterium* patógenas para los animales.

Al analizar las características de fermentación de carbohidratos y la actividad reductora de nitratos a nitritos que presentaban 121 cepas consideradas como pertenecientes a *C. pseudotuberculosis*, las agrupamos en 7 grupos cuyas variantes se expresan en el cuadro siguiente:

## CUADRO I

REACCIONES DE FERMENTACION Y DE REDUCCION DE NITRATOS A NITRITOS PRESENTADAS POR LAS  
CEPAS CLASIFICADAS COMO *C. pseudotuberculosis*

Grupo	Núm. de cepas	Dextrosa	Manosa	Levulosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Glicerol
1	53	+	+	+	+	+	---	+
2	49	+	+	+	+	+	+	+
3	12	+	+	+	+	+	+	---
4	2	+	+	+	+	+	---	+
5	2	+	+	+	+	+	---	---
6	1	+	+	+	+	+	+	---
7	2	+	+	+	+	+	---	---

Grupo	Red. nitratos	Lactosa	Xilosa	Dulcitol	Manitol	Dextrina	Arabinosa	Insulina
1	---	---	---	---	---	---	---	---
2	---	---	---	---	---	---	---	---
3	---	---	---	---	---	---	---	---
4	+	---	---	---	---	---	---	---
5	+	---	---	---	---	---	---	---
6	+	---	---	---	---	---	---	---
7	---	---	---	---	---	---	---	---

NOTAS: + Producción de ácido o reducción de nitratos.

— No hubo producción de ácido ni de gas o no hubo reducción de los nitratos a nitritos.

Las 14 cepas aisladas y clasificadas como *C. equi* presentaron caracteres morfológicos y de cultivo similares a los descritos para este germen, no fermentaron ningún hidrato de carbono de los utilizados, redujeron los nitratos a nitritos y dieron fijación del complemento frente al antisuero preparado en conejos con *C. equi*.

Como ya se ha mencionado en párrafo anterior, el grupo de 50 cepas atípicas será motivo de estudio más detenido. Comprende algunas cepas que no fermentaron ningún hidrato de carbono, pero que no dieron reacción positiva de fijación del complemento frente al antisuero *C. equi*, además de otras que fermentaron algunos azúcares que no permitieron su clasificación definitiva.

De los 46 ganglios linfáticos estudiados, se logró el aislamiento de gérmenes del género *Corynebacterium* con los resultados siguientes:

De 2 ganglios se aisló únicamente *C. equi*.

De 29 ganglios se aisló únicamente *C. pseudotuberculosis*.

En 8 se aislaron las dos especies anteriores.

En 7 no se demostró la presencia de ninguna de ellas.

## DISCUSION

De entre las múltiples lesiones anatomopatológicas que es posible encontrar en los ganglios linfáticos de cerdo, seleccionamos las de tipo hemorrágico o la simple congestión por ser en nuestro concepto las más frecuentes, sin embargo, es conveniente hacer notar que al iniciar este trabajo, en ninguna ocasión intentamos interpretar dichas lesiones como una manifestación o posibilidad de que dichos órganos estuvieran infectados por microorganismos del género *Corynebacterium*. Posiblemente en lesiones de tipo purulento, caseosas o

pseudotuberculosas sea más factible encontrar en los cerdos estos microorganismos y quizá los resultados, en lo que se refiere a especies aisladas, difieran ampliamente de los obtenidos en esta investigación.

El pleomorfismo que presenta el género de microorganismos en estudio es muy marcado y en ocasiones, durante el trabajo con las cepas aisladas, llegó a causarnos dudas acerca de la identidad o pureza de los cultivos. Las formas cocoides, cocobacilares o bacilares diferían frecuentemente tanto en su tamaño como en su afinidad por los colorantes, siendo frecuente el hallazgo de gránulos metacromáticos.

Una de las principales dificultades en el estudio de estos gérmenes y con la cual hemos tenido tropiezos hasta finalizar este trabajo, al grado de tener que dejar para estudio posterior 50 de las cepas aisladas, es la que se refiere a las descripciones hechas hasta la fecha sobre la actividad bioquímica de las diferentes especies de *Corynebacterium* y las discrepancias son frecuentes: según Mitchell (1944) y Seghetti (1941), el *C. ovis* (que nosotros interpretamos como *C. pseudotuberculosis*) no fermenta la sacarosa; el *C. pyogenes* según Brown (1920) fermenta la xilosa y según Bergey *et al.* (1939) fermenta la xilosa y el glicerol.

Un reporte de Merchant (1935) cita como no fermentado al glicerol por el *C. pseudotuberculosis* y al encontrar en este trabajo gran número de cepas que lo fermentaban, además de presentar otros caracteres que hacían presumir se trataba de cepas pertenecientes a esta especie, nos hizo repetir las pruebas de fermentación para obtener resultados iguales y confrontar la fermentación del glicerol que el mismo Merchant (1946) acepta al hacer la recopilación de trabajos de otros investigadores y de los suyos propios.

Brooks y Hucker en 1944 intentaron sin buenos resultados usar un sistema-clave para la diferenciación de los difteroides de origen animal, tomando como base los caracteres morfológicos, de cultivo y fisiológicos de estos gérmenes.

La formación de 7 grupos con las cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas en este trabajo es netamente artificial y tiene sólo por objeto señalar las variaciones que puede presentar esta especie.

Los resultados obtenidos con las técnicas de aglutinación y lo señalado por diferentes investigadores, nos lleva a considerarlas como inseguras para fines de clasificación en este género de microorganismos, lo que parece ser debido a que se presentan tipos serológicos individuales dentro de una misma especie. En cuanto al *C. equi*, diferentes trabajos han demostrado que posee antígenos especie-específicos, grupo-específicos y tipo-específicos, permitiendo los primeros, su clasificación definitiva mediante la reacción de fijación del complemento, cubriendo la inseguridad existente en su clasificación debida a su inactividad bioquímica.

## RESUMEN

Basándose en sus características morfológicas, de cultivo, bioquímicas y serológicas, se hace un estudio de 185 cepas de *Corynebacterium* aisladas de 46 ganglios linfáticos de cerdos sacrificados en el Rastro General de la ciudad y en el Rastro de Tacuba y procedentes de diversos lugares de la República.

De las 185 cepas estudiadas 121 correspondieron a *C. pseudotuberculosis*, 14 a *C. equi* y 50 a especies de *Corynebacterium* no determinadas. De los 46 ganglios estudiados, en 2 se encontró únicamente *C. equi*, en 29 únicamente *C. pseudotuberculosis*, en 8 se demostró la presencia de ambas especies y en 7 no se encontraron ninguna de ellas.

## BIBLIOGRAFIA

BARRAT, M. M. 1924-1925. *Jour. Hyg.* 23:741-299.

BARRAT, M. M. 1933. *Jour. Path. and Bact.* 36:369-397.

BERGEY, D. A. *et al.* 1939. *Manual of Determinative Bacteriology.* The William & Wilkins Co. Baltimore 5th Ed.

BRAY, J. 1944. Phosphatase reaction as aid in classification of *Corynebacteria.* *Jour Path. and Bact.* 497-506.

BROOKS, R. F. and G. J. HUKER. 1944. A study of certain members of the genus *Corynebacterium.* *Jour. Bact.* 48: 295-312.

- BROWN, J. and M. L. ORCUTT. 1920. A study of *Bacillus pyogenes*. *Jour. Expt. Med.* 32: 219-248.
- BRUNER, D. W., W. W. DIMOCK and P. R. EDWARDS. 1939. Serological classification of *Corynebacterium equi*. *Jour. Inf. Dis.* 65: 92-90.
- BRUNER, D. W. and P. R. EDWARDS. 1941. Classification of *Corynebacterium equi*. *Kentucky Agric. Exp. Sta. Bull.* 414: 89-108.
- CAMERON, H. S. and W. A. McOMIE. 1940. Agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. *Cornell Vet.* 30: 41-46.
- FELDMAN, MOSES and KARLSON. 1940. *Corynebacterium equi* as a possible cause of tuberculosis-like lesions in swine. *Cornell, Vet.* 30: 465-481.
- FLEMING, A. 1942. A simple method of using penicillin, tellurite and gentian violet for differential culture. *Brit. Med. Jour.* (4243) 547-548.
- FLEMING, A. and M. Y. YOUNG. 1940. The inhibitory action of potassium tellurite on coliform bacteria. *Jour. Path. and Bact.* 51: 29-35.
- HAMMERSLAND, H. and H. F. WILKINS. 1941. Pseudotuberculosis in horses and cattle. *Jour. Amer. Vet. Med. Ass.* 99: 290-291.
- HOYLE, L. 1941. A tellurite blood-agar medium for the rapid diagnosis of diphtheria. *Lancet* 240: 175-176.
- HORGAN and MARSHALL. 1932. A simple blood tellurite medium for the isolation of *C. diphtheriae*. *Jour. Hyg.* 32: 549.
- KOLMER, J. A. y F. BOERNER. 1943. *Methods de Laboratory Clinic*. The University Society, N. Y.
- LEVINE, MAX. 1939. *Laboratory Technique in Bacteriology*. The Mc. Millan Co. N. Y. 2nd Ed.
- LEWIS, I. M. 1945;. *A Laboratory Manual of General Bacteriology*. Texas Book Store. Austin Texas.
- MAGNUSSON H. 1938. Pyaemia in foals caused by *Corynebacterium equi*. *Vet. Rec.* 50: 1459.
- Mc. DONALD. 1942. A note in the occurrence in Australia of *Corynebacterium equi* in pigs. *Aus. J. Exp. Biol. & Med. Sci.* 20: 27-29.
- MERCHANT. 1935 I. A. study of the *Corynebacteria* associated with diseases of domestic animals. *J. Bact.* 30. 95-116.
- MERCHANT. 1946. I. A. *Veterinary Bacteriology*. The Iowa State College Press. 3 ed: 475-493.
- MITCHELL. 1944. CHARLES A. and R. V. L. WALKER. Preisz-Nocard disease. *Canadian Jour. Comp. Med.* 6: 3-10.
- PLUM, N. 1938. Undersoegelse over Svinetuberculosen paa Holback Svines lagteri. Paavisning of syrefaste Kokkobsciller i tuberkulose selignende Prócesser hos Svin. *Maanedsskr, for Dyrlaeger.* 49: 653.
- RAJAGOPALAN, V. R. and GOPALAKRISHNAN. 1937. Pneumonía in foals due to *Corynebacterium equi*. *Indian Jour. Vet. Sci. and Animal Husb.* 7. 38-57.
- SCHAUB, G., A. B. ISABELLE and M. KATHLEEN FOLEY A. B. 1943. *Methods for diagnostic bacteriology*. 117-119.
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. 1942. *Manual of methods for pure culture study of Bacteria*. Leaflet V. 8th ed. 9-10.
- SEGHETTI, LEE and FRANK D. Mc. KENNY. 1941. Caseous lymphadenitis of deer in Washington. *Jour. Vet. Med. Ass.* 98: 129-131.
- VALDÉS O.O. 1944. *Apuntes de Bacteriología Veterinaria*. México, Tomo I, 46-54.