

Aislamiento, cultivo e identificación de bacterias en lesiones pulmonares macroscópicas de cerdos de rastro

Isolation, culture and identification of bacteria in gross pulmonary lesions of slaughterhouse pigs

Alva Román Sandra Jocelyne¹, Arteaga Barajas Karla Paulina¹, Hernández Morales María Clarissa¹, Pineda Martínez Adela¹, Anaya Rojas Diana Monserrat¹, Ordaz Domínguez Jocelin Aidee¹, Pérez Guiot Alfredo¹, Gutiérrez Chávez Abner Josué¹.

¹Departamento de Veterinaria y Zootecnia, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca; Universidad de Guanajuato.
aperez@ugto.mx¹; ajgutierrez@ugto.mx¹

Resumen

El objetivo del presente estudio fue el aislamiento, el cultivo y la identificación de las bacterias procedentes de lesiones macroscópicas pulmonares en cerdos de rastro. Las enfermedades respiratorias generalmente son asociadas con complejos respiratorios, es decir, incluyen una gran variedad de agentes infecciosos que actúan sinérgicamente, entre los que se encuentran virus y bacterias; además de condiciones ambientales y del hospedero que favorecen su presentación. El estudio se desarrolló en el Rastro municipal de Irapuato. Se realizaron dos muestreos en la línea de faenado de la matanza de cerdos procedentes de granjas comerciales intensivas. Se seleccionaron 19 muestras de lesiones pulmonares macroscópicas y se tomaron muestras con hisopo estéril del exudado para su cultivo, aislamiento e identificación bacteriana. El 74% (14/19) de los agentes Gramnegativos identificados pertenecieron géneros: *Pasteurella* spp; *Bordetella* spp; *Actinobacillus* spp; *Moraxella* spp, y *Neisseria* spp; mientras que el 26% (5/19) de los aislados se clasificaron como bacterias Grampositivas, cuyos géneros identificados fueron *Corynebacterium* spp; *Staphylococcus* spp; *Streptococcus* spp, y *Listeria* spp.

Palabras clave: Neumonía; Cerdos; Bacterias; Resistencia.

Introducción

La producción porcina representa una actividad de importancia en México, ya que la carne de cerdo es la segunda fuente de proteína más consumida en el país, después del pollo (SIAP, 2021). En 2019, el consumo per cápita de carne de cerdo a nivel nacional, fue de 18 kg (SENASICA, 2020). El sector porcino participa con el 6.9% de la producción pecuaria nacional y a nivel mundial, México ocupa el lugar 15 en la producción de carne porcina. Durante el 2021, México contó con un inventario de 18.9 millones de cabezas de porcino, siendo el estado de Guanajuato, el sexto lugar a nivel nacional con 1.1 millones de cabezas y aportó 7.7% en la producción nacional de carne de cerdo (SIAP, 2021).

La eficiencia en la producción porcina se ve afectada por la presencia de enfermedades infecciosas en el hato; donde una economía viable y sustentable depende del desarrollo de técnicas de diagnóstico oportuno. Las enfermedades respiratorias en cerdos están comúnmente asociadas con pérdidas económicas importantes y es considerado uno de los mayores obstáculos en la industria porcina (Opriessnig et al., 2011) ya que representa del 10 al 14% del gasto total generado por enfermedades (Vibeke, S. et al., 2009). Las pérdidas económicas por enfermedades respiratorias son alrededor de 5.42 USD por animal por año y están asociadas con mortalidad (Boessen, C. et al., 1988), pérdidas por disminución en ganancia de peso, aumento del consumo de alimento y gastos asociados con el control (vacunación, tratamiento, limpieza y mano de obra extra) (Vibeke, S. et al., 2009).

Las enfermedades respiratorias generalmente son asociadas con complejos respiratorios, es decir, incluyen una gran variedad de agentes infecciosos que actúan sinérgicamente, entre los que se encuentran virus y bacterias; además de condiciones ambientales y del hospedero que favorecen su presentación. Las enfermedades bacterianas han tomado relevancia debido a la variedad de manifestaciones clínicas, gravedad de las lesiones y la reemergencia de cepas resistentes (López, A. y Martinson, SA, 2022). Los patógenos involucrados en el complejo respiratorio porcino varían significativamente dependiendo de la granja, sitio de

producción, región y país, lo que dificulta su tratamiento y control. Además, en algunas regiones del mundo, la disponibilidad de herramientas para el diagnóstico es limitada (Opriessnig et al., 2011).

Los agentes patógenos respiratorios se pueden dividir en patógenos primarios y secundarios, o también llamados oportunistas. Dentro de los agentes primarios, se encuentran: *Influenzavirus* (SIV), *Arterivirus* (PRRSV), *Circovirus porcino tipo 2* (PCV-2) y *Mycoplasma hyopneumoniae*. Dentro de los agentes oportunistas se engloban bacterias como: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Glaesserella parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, entre otros (Gómez-Gómez, SD. Et al., 2021).

Materiales y Métodos

Lugar de muestreo

La recolección de muestras del estudio se desarrolló en el Rastro municipal de Irapuato, ubicada en la carretera Abasolo-Irapuato Km. 2, Villas de Irapuato, Guanajuato.

Se realizaron dos visitas en el rastro municipal de Irapuato. Las visitas se programaron con base en los horarios locales del faenado de los animales. De los cerdos que iniciaron el proceso de faenado, se registró su procedencia y se les dio seguimiento hasta el área de eviscerado; momento en el cual, se realizó una inspección macroscópica para identificar lesiones pulmonares, y de forma aleatoria se seleccionaron aquellos órganos que cumplían con los criterios para la investigación. Las muestras se colocaron en una hielera con refrigerantes para su traslado al Laboratorio de Anatomía y Patología Veterinaria de la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato, en donde se procesaron para el análisis microbiológico correspondiente, así como para la preservación y fijación de tejidos para estudios posteriores.

Lugar de experimentación

Los ensayos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Anatomía y Patología Veterinaria de la División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato (DICIVA-UG), ubicado en la Ex Hacienda El Copal, Km. 9 de la carretera Irapuato-Silao, en el municipio de Irapuato, Guanajuato (Figura 1), cuyas coordenadas son 20°44'43.1"N y 101°19'50.2" W

Toma de muestras

Las muestras se tomaron de pulmones de cerdo con lesiones correspondientes con neumonía, de acuerdo con su apariencia macroscópica se clasificaron en neumonía supurativa, fibrinosa, intersticial, granulomatosa o tromboembólica. Además, las lesiones se clasificaron de acuerdo su distribución en leve, moderada o grave; y de acuerdo con su distribución en focal, multifocal, zonal o difusa. Las muestras se tomaron con un hisopo estéril directamente de la lesión correspondiente y se colocaron en medio de cultivo en refrigeración a 4°C.

Aislamiento y cultivo de las muestras

Se atemperaron las muestras del medio de cultivo con el hisopado y se homogeneizaron utilizando un vórtex marca Benchmark, modelo BV1000 para después tomar 100 µL de cada tubo para una primera siembra en cajas Petri con agar MacConkey y agar sangre, rotulándolas con el número de identificación de la muestra, la fecha de siembra y el nombre del agar. Los 100 µL de cada muestra se dispersaron sobre las superficies de los agares con una varilla de vidrio. Después, las cajas se dejaron secar en campana de flujo laminar y se incubaron en un rango de temperaturas de $36 \pm 1^\circ\text{C}$; posteriormente, se observaron a las 24 y 48 h para identificar el crecimiento de colonias bacterianas (CLSI, 2021).

Identificación morfológica

El diagnóstico se realizó evaluando las características de las colonias y la morfología de las bacterias vistas al microscopio. Posteriormente, se realizaron tinciones de Gram para observar la morfología para determinar las características de las bacterias y clasificar en dos grupos: gramnegativos y grampositivos.

Identificación bioquímica

La identificación bioquímica bacteriana se realizó mediante pruebas que incluyeron: la prueba de indol, la utilización de citratos, la motilidad, la producción de ácido sulfhídrico (H_2S), la producción de gas, la fermentación de hidratos de carbono (lactosa, glucosa y sacarosa) y la hidrólisis de la urea (Osbaldiston, G., 1975; Sykes, JE. y Rankin, SC., 2014).

Evaluación de susceptibilidad a antibióticos convencionales

Se realizaron pruebas de susceptibilidad con los aislados obtenidos, mediante la técnica de Kirby-Bauer (1966), que ha sido modificada y actualizada por The Clinical and Laboratory Standards Institute (2021). Se utilizaron discos de la marca "PT_35 Multibac I.D. para bacterias gramnegativas y grampositivas, según correspondiera. En el cuadro 1 se muestra la concentración de cada antibiótico, así como los patrones estándar de los halos de inhibición para la interpretación y determinación de la susceptibilidad de los aislados a los antibióticos.

Para inocular las placas para las pruebas de susceptibilidad, se tomó una colonia bacteriana con un asa de nicromo y se suspendió en 10 mL de caldo LB a $36 \pm 1^\circ C$; se incubó durante la noche y se diluyó hasta obtener una turbidez correspondiente al tubo de 0.5 de la escala de McFarland (1907), o una densidad óptica (DO) de 0.1 a 600 nm, lo cual corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^8 UFC/mL. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro (Jenway, modelo 7305).

Una vez que se alcanzó la turbidez descrita, se tomaron 100 μL de la suspensión de bacterias con una micropipeta y se esparcieron sobre la superficie del agar Mueller-Hinton contenido en cajas Petri, y se distribuyeron homogéneamente mediante el uso de hisopos de algodón; después, se dejaron secar las cajas para finalmente colocar los multidiscos y sellarlas para su posterior incubación durante 18 a 24 h a $36 \pm 1^\circ C$. Transcurrido ese tiempo, se midieron los halos de inhibición utilizando un calibrador Vernier y se interpretaron de acuerdo con los niveles de sensibilidad de cada antibiótico: Susceptible (S), Intermedio (I) y Resistente (R), utilizando los datos contenidos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Concentraciones de los antibióticos y patrones estándar del diámetro del halo de inhibición para aislados.

Antibiótico	Abreviatura	Concentración (μg)	Zona de inhibición (mm)		
			R ($\leq$)	I	S ($\geq$)
Amikacina	AK	30	14	15-16	17
Ampicilina	AM	10	13	14-16	17
Carbenicilina	CB	100	19	20-22	23
Cefalotina	CF	30	14	15-17	18
Cefotaxima	CTX	30	14	15-22	23
Ceftriaxona	CRO	30	13	14-20	21
Ciprofloxacino	CPF	5	15	16-20	21
Cloranfenicol	CL	30	12	13-17	18
Dicloxacina	DC	1	14	15-17	18
Eritromicina	E	15	13	14-17	18
Gentamicina	GE	10	12	13-14	15
Netilmicina	NET	30	12	13-14	15
Nitrofurantoína	NF	300	14	15-16	17
Norfloxacino	NOF	10	12	13-16	17
Pefloxacina	PEF	5	18	19-21	22
Penicilina	PE	10 U	11	12-21	22
Sulfametoxazol/trimetoprima	SXT	25	10	11-15	16
Tetraciclina	TE	30	14	15-18	19
Vancomicina	VA	30	9	10-11	12

Resultados

Hallazgos macroscópicos

Las lesiones pulmonares en el 100% de los casos fueron correspondientes con bronconeumonía supurativa, caracterizada por zonas de consolidación con distribución cráneo-ventral. En 18 casos (94.7%), los pulmones no colapsaron, presentaron impresiones costales en la superficie dorsal y eran de aspecto carnososo, lo que sugiere neumonía intersticial. 9 casos (47.4%) fueron clasificados como leves, en 6 casos (31.6%) fue moderada y en 4 (21.1%) grave (Figura 1). La distribución en todos los casos fue multifocal. En 10 casos (52.6%) la lesión predominante se apreció en el lóbulo craneal derecho.



Figura 1. A) Neumonía supurativa leve. B) Neumonía supurativa moderada. C) Neumonía supurativa grave.

Aislamiento bacteriológico

De las 19 muestras de lesiones seleccionadas para la identificación bacteriana, se obtuvo un 100% de aislamientos positivos, de los cuales, el 74% (14/19) correspondieron a bacterias Gramnegativas, identificando géneros como *Pasteurella* spp; *Bordetella* spp; *Actinobacillus* spp; *Moraxella* spp, y *Neisseria* spp. Mientras que el 26% (5/19) de los aislados se clasificaron como bacterias Grampositivas, cuyos géneros identificados fueron *Corynebacterium* spp; *Staphylococcus* spp; *Streptococcus* spp, y *Listeria* spp (Cuadro 2).

Cuadro 2. Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes bacterianos aislados de lesiones pulmonares en cerdos.

Agente	AK	CB	CL	NET	NF	NOF	SXT	AM	CF	CFX	CPF	GE	CLM	DC	E	PE	TE	VA
<i>Pasteurella</i> spp	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Pasteurella</i> spp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Pasteurella</i> spp	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Pasteurella</i> spp	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Pasteurella</i> spp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Pasteurella</i> spp	S	R	R	I	S	R	R	R	R	I	R	R						
<i>Pasteurella</i> spp	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S			n.d.			
<i>Bordetella</i> spp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Actinobacillus</i> spp	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R						
<i>Moraxella</i> spp	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	S						
<i>Pasteurella</i> spp	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S						
<i>Pasteurella</i> spp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R						
<i>Pasteurella</i> spp	R	R	S	S	I	R	I	R	R	I	I	I						
<i>Neisseria</i> spp	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	I	I						
<i>Streptococcus</i> spp							R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Listeria</i> spp				n.d.			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus</i> spp							R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
<i>Corynebacterium</i> spp							R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Corynebacterium spp

R R R R R R R R R R R R R

AK: amikacina, AM: ampicilina, CB: carbenicilina, CF: cefalotina, CTX: Cefotaxima, CRO: ceftriaxona, CL: cloranfenicol, GE: gentamicina, NET: netilmicina, NF: nitrofurantoina, *PEF: pefloxacin, NOF: norfloxacin, SXT: sulfametoxazol/trimetoprima, CLM: clindamicina, DC: dicloxacilina, E: eritromicina, PE: penicilina, TE: tetraciclina, VA: vancomicina, n.d.: No determinado, S: sensible, I: intermedio, R: resistente, spp: sub-especie.

Susceptibilidad a antibióticos

Los resultados obtenidos de las pruebas de susceptibilidad de los aislados ante los 12 antibióticos convencionales tanto para bacterias Gramnegativas como Grampositivas se muestran en el cuadro 2. Al respecto, en términos generales se registró un patrón de resistencia (R) del 88% a los antibióticos utilizados en este estudio.

Se observó un 100% de resistencia a lincosamidas, macrólidos, tetraciclinas y glucopéptidos; seguidos por un 93% para betalactámicos, fenicoles y quinolonas. Finalmente, se registró un rango de resistencia entre 89 y 61% para sulfonamidas, nitrofuranos y aminoglucósidos (Figura 2).

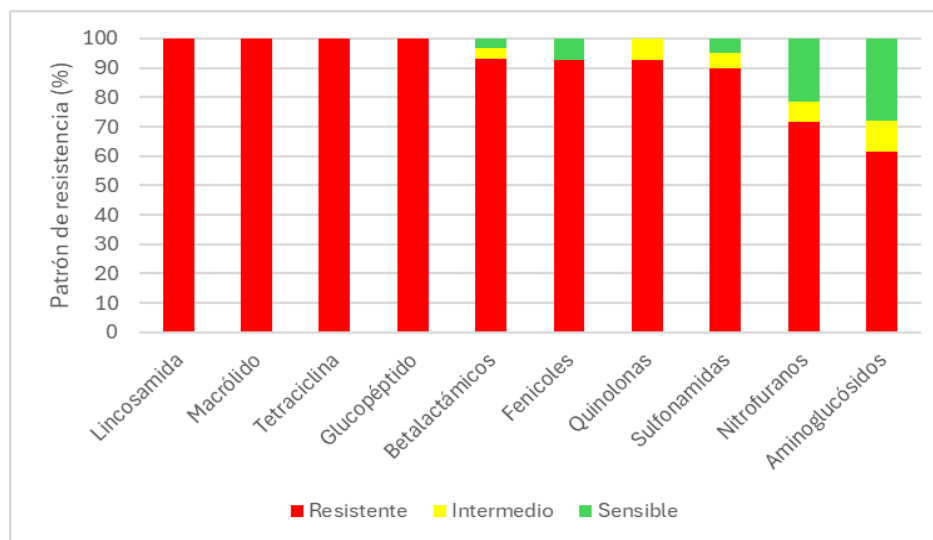


Figura 2. Resultados de patrón de susceptibilidad antimicrobiana de aislados bacterianos de lesiones pulmonares con base en el grupo de antibióticos.

Conclusiones

Un estudio realizado en el 2000 en Mérida, Yucatán, señaló que el 90.3% de los pulmones inspeccionados en un rastro municipal presentaron algún tipo de lesión pulmonar, siendo la pleuroneumonía la lesión más frecuente (37.1%), seguido de bronconeumonía (28.9%) y neumonía (28%) (Williams, JJ., et al., 2000). En el presente trabajo se identificó a la bronconeumonía supurativa como las más común (100%), así como lesiones sugerentes de neumonía intersticial en el 94.7%. No se identificaron lesiones sugerentes de bronconeumonía fibrinosa (pleuroneumonía). Esto indica que debemos visualizar las enfermedades neumónicas de los cerdos como un complejo respiratorio, en el que intervienen diferentes agentes infecciosos.

En cuanto a la identificación de los agentes bacterianos, éstos coincidieron con los hallazgos anatomopatológicos, dado que la mayoría de éstos correspondieron a los géneros de *Pasteurella* spp, *Corynebacterium* spp, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, entre otros. Por lo anterior, es importante el

registro de lesiones, así como el monitoreo de los microorganismos involucrados a nivel de rastro para el control de las enfermedades respiratorias de los cerdos. En este estudio se encontró alta resistencia bacteriana a distintos grupos de antibióticos, por lo que es importante concientizar sobre el uso indiscriminado de dichos fármacos y sus consecuencias futuras sobre la salud pública y animal.

Referencias

Aguayo, AO. (2016). Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico de agentes virales involucrados en el complejo respiratorio porcino en casos de campo [Tesis de licenciatura]. Cdmx (Mex): Universidad Nacional Autónoma de México.

Boessen C, Kliebenstein J, Cowart R, Moore K, Brurbee C. (1988). Effective use of slaughter checks to determine economic loss from morbidity in swine. *Acta Veterinaria Scandinava*. 84:436-438.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2021). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, trigésimo primera edición. Wayne, P. A. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/>

Gómez-Gómez, SD, López-Valencia, G, Herrera-Ramírez, JC, Trasviña-Muñoz, E, Monge-Navarro, FJ, Moreno-Torres, K, et al. (2021). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome in porcine herds of Baja California, Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*. 12(4):1317-1325.

Juárez, RM. (2019). Localización de virus de influenza mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con cepas de virus de influenza H1N1 [Tesis de doctorado]. Cdmx (Mex): Universidad Nacional Autónoma de México.

López, A, Martinson, SA. (2022). Respiratory System, Thoracic Cavities, Mediastinum, and Pleurae. In: Zachary JF, editor. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 7th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier. p. 547-642.

Opriessnig, T, Giménez-Lirola, LG, Halbur, PG. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*. 12(2):133-148.

Osbaldiston, G. W. (1975). Técnicas de laboratorio para bacteriología clínica veterinaria. Acribia. Disponible en https://www.editorialacribia.com/libro/tecnicas-de-laboratorio-para-bacteriologia-clinica-veterinaria_54236/

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Inventario 2021 porcino. Población ganadera, Gobierno de México; 2021. <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera-136762>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Estudio para determinar el Impacto Económico de la PPC en México. 2020. [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/enero/An%C3%A1lisisSocioecon%C3%B3micoFPC_876a8d25-0d1b-4fa8-94e4-18d59e932257.pdf](https://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/enero/An%C3%A1lisisSocioecon%C3%B3micoFPC_876a8d25-0d1b-4fa8-94e4-18d59e932257.pdf)

Sykes, J. E., Rankin, S. C. (2014). Isolation and identification of aerobic and anaerobic bacteria. En Sykes, J. E. (Ed.), *Canine and Feline Infectious Diseases*. Pp. 17-28. Saunders [http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-](http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-0)

Vibeke, S, Jorsal, SE, Mousing, J. (2009). Diseases of the Respiratory System. In: *Diseases of Swine*. 9na ed. Iowa: Blackwell Publishing. 149-177.

Williams, JJ, Torres-León, MA, Sansor-Nah, R. (2000). Prevalencia, caracterización y extensión de lesiones en pulmones de cerdos sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán, México. *Rev Biomed*. 11:2525-32.