

IMPORTANCIA DEL CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM COMO AGENTE PATOGENO PARA LOS ANIMALES DOMESTICOS

LA ENFERMEDAD EN CERDOS (1)

Por el Doctor GERARDINO MEDINA H.

Chromobacterium violaceum, es considerado corrientemente como una bacteria del agua y del suelo no patógena. Sin embargo, Sneathlne-thal, presenta una lista de trece casos de enfermos causada por este organismo en el hombre, desde 1927 a 1953; nueve casos se registraron en Malaya, tres en Estados Unidos y uno en Europa. Ocho de estos casos fueron fatales, dos se recobraron y los tres restantes no fueron reportados. Los autores del presente reporte no han encontrado ningún récord de casos naturales en animales desde el último reporte de Woolley's 2,3 en su descripción original aislada de 3 búfalos de agua, que murieron con un cuadro agudo, dicho brote tuvo lugar en la isla de Filipinas en 1904. El propósito de este reporte preliminar es nuevamente llamar la atención de la importancia del *Chromobacterium violaceum* como agente patógeno para los animales.

En septiembre de 1952 fueron recibidos por este laboratorio pedazos de ganglios y pulmón en formalina enviados por el Dr. B. E. Carlisle de Camilla, Georgia, donde pedía se hiciera exámenes para tuberculosis. Había varios nódulos blanquecinos en el tejido pulmonar. Estas estructuras al hacer el corte a través de estos tejidos daba la sensación de la existencia de nódulos calcificados que contenían pús caseoso.

Un poco más tarde el mismo dueño trajo algunos cerdos afectados al laboratorio para hacer la autopsia y otros exámenes. Los datos anamnésicos indicaban que los cerdos habían sido vacunados contra el Cólera porcino a los que se les aplicó una vacuna de virus modificado en la primavera próxima pasada. Ellos habían estado en un predio de maíz todo el verano y habían hecho buenas ganancias en peso hasta mediados de agosto cuando el primer cerdo murió. El 1º de septiembre estos cerdos fueron trasladados a un campo de maní y las muertes continuaron, ellos recibían también tan-kage y minerales en comederos automáticos. El agua la tomaban los

(1) Este trabajo de investigación se llevó a cabo en Georgia Costal Plain Experimental Station, Tifton, Georgia, E. U. A., bajo la dirección del Dr. William L. Sippel, y la cooperación del Dr. Max B. Atwood.

cerdos de una pequeña laguna. En los días en que el dueño visitó el laboratorio en septiembre 25 de 1952, sesenta de ciento veinticinco cerdos habían muerto y veinticinco estaban enfermos.

El dueño hacía la observación que la mayor parte de los cerdos morían dos ó tres días después de haberse notado enfermos, aunque algunos seguían un curso crónico. Los síntomas descritos, eran depresión, anorexia, respiración dificultosa y tos.

El dueño observó también que los cerdos más gordos se afectaban más frecuentemente y morían más rápidamente que los que se encontraban en condiciones más pobres. En ese tiempo sólo habían casos crónicos disponibles para el estudio.

Al examinar los animales presentados para la autopsia revelaban un estado pobre, se observan deprimidos, disnea y tosían frecuentemente. Un animal autopsiado al momento de llegar al laboratorio tenía una temperatura de 102,8°F. (39,4°C), el recuento de glóbulos blancos fue de 38.200 por milímetro cúbico; tomada la muestra de sangre inmediatamente antes de la autopsia. Los ganglios linfáticos, mandibular y

parótidos estaban agrandados y contenían numerosos abscesos caseosos y encapsulados. El contenido caseoso era de color ligeramente amarillo. Al corte dejaba la sensación de una sustancia granulosa. Se encontró un absceso en la epiglotis que contenía sustancia similar a las lesiones anteriores. Además habían pequeños abscesos diseminados por los tejidos adyacentes.

En los pulmones se observaron abscesos que variaban en tamaños desde cinco milímetros hasta dos centímetros de diámetro. Al corte, estos abscesos daban la sensación similar a las lesiones previamente descritas. Los pulmones estaban adheridos a la caja torácica en distintos puntos. La figura N° 1 ilustra el tipo de lesiones vistas en los casos traídos del campo. Se observaron dos abscesos en el bazo, de dos centímetros de diámetro, que se levantaban de la superficie cerca de cuatro milímetros, eran similares al de los pulmones. El hígado tenía unos cuantos nódulos blanquecinos diseminados debajo de la cápsula los cuales contenían pús más fluido que los previamente descritos. Los riñones estaban congestionados, pero no

Figura 1—Nódulos pulmonares típicos de los casos crónicos vistos en el campo.



hemorrágicos, ni se observaron abscesos sobre éstos. Se observaron áreas congestionadas en las mucosas del ciego y el colon. No se notaron cambios en los ganglios linfáticos, mesentéricos o inguinales. Cultivos en caldo de infusión de corazón, de sangre extraída del corazón, riñones e hígado fueron negativos. Se recobró un bacilo de los abscesos del pulmón y del bazo. En placas de agar de sangre se observó después de veinticuatro horas a 37°C. en la estufa, colonias desde color púrpura hasta negras lisas y brillantes de 3 milímetros de diámetro. Una zona ancha de hemólisis beta incompleta se produjo. El organismo tenía las siguientes características:

Bacilo - 0.5 a 1.0 por 1.5 a 3.0 micrones.

Movil con un solo flagelo polar (figura 2).

Indol - negativo.

Nitrato - reducido a nítritos.

Papel tornasol en caldo peptonizado - alcalino.

H₂S - negativo.

Voges - Proskauer - negativo.

Producía ácido pero no gas en: dextrosa, trehalosa, sacarosa, levulosa y mannose.

No produce fermentación en: inositol, maltose, solicin, raffinose, xylose, dulcitol, arabinosa, galactose, rhamnose, mannitol, sorbitol, lactose, esculin, inulin y glycerol.

El organismo es gran negativo, no es ácido resistente, no es esporulado, no tiene cápsula y crece aeróbicamente. En medio sólido se forma un pigmento violeta pálido que toma un color púrpura oscuro. Una película granular pigmentada se forma en la superficie cuando se cultiva en caldo y un crecimiento tenue no pigmentado se desarrolla en el fondo del tubo. El medio se vuelve turbio y más oscuro, algunas veces desarrolla un tinte ligeramente azulado. Este organismo se ha clasi-

ficado tentativamente como miembro del grupo 4, *Chromobacterium violaceum*, aunque no se conforma completamente esta clasificación.

Más tarde la hacienda fue visitada y se trajeron 10 cerdos aparentemente afectados al laboratorio. El examen y la autopsia de estos animales revelaron síntomas similares a los ya descritos. Cultivos de las lesiones de los pulmones, bazo, hígado y absceso de los ganglios constantemente dieron el mismo organismo y generalmente en cultivo puro.

Casos en experimentación:

La tabla N° 1 indica los resultados obtenidos de la inoculación en ratones, cobayos y cerdos por varias rutas con el organismo recobrado de cerdos.

Experimento de Exposición Natural

La frecuencia con que se encontraron abscesos en los ganglios parótidos y el tejido tonsilar en los casos naturales sugirió la idea de la vía oral como ruta de infección. En un esfuerzo para determinar si la infección podría ser por esta vía, 6 litros de agua de laguna fueron inoculados con 5 cc. de cultivo de veinticuatro horas y se suministró al cerdo N° 29, en un recipiente de metal, como única agua de bebida. Esta agua se cultivó diariamente por 4 días y después de este período de tiempo contenía cerca de la mitad de los organismos con los cuales fue inoculada. Dos litros de agua de laguna fueron agregados al quinto día. Al final del séptimo día cerca de 2 litros de agua permanecían en el recipiente de metal. Esta vez el recipiente de metal fue cubierto en toda su parte interna de parafina y se agregaron 6 litros de agua estancada. Cinco milímetros de cultivo de caldo de 24 horas se agregó cada día durante la segunda semana. El animal permaneció bien,

no demostró reacción febril y el experimento se terminó al final de las dos semanas.

El cerdo en experimento (Nº 29) se sacaba de su corral dos veces al día para darle agua. Otro cerdo (Nº 28) fue traído al mismo corral de piso de concreto juntamente con el cerdo Nº 29 y se le dio agua del grifo cada vez que el cerdo Nº 28 se le daba agua contaminada. No se suministró otra agua excepto la que se le daba dos veces diarias. El cerdo Nº 28 parecía saludable al finalizar el periodo de dos semanas. Cinco días después de terminado el experimento el cerdo Nº 28 que había recibido agua del grifo se notó con falta de apetito, respiración rápida y con una temperatura de 105.8°F. (41° C.). Este fue nuevamente aislado y observado. Su temperatura se mantuvo sobre 104°F. (40°C.) por cinco días, después de los cuales la temperatura retornó a la normalidad y el cerdo aparentemente se recuperó. Cultivos de sangre de la vena yugular durante el segundo y cuarto día de la enfermedad fueron negativos. El cerdo Nº 28 se sacrificó ocho días después de su mejoría o sean treinta y dos días después de haber comenzado el experimento. Los ganglios cervicales y mediastí-

nicos rojos. Nódulos observados en los pulmones algunos de los cuales contenían pús caseoso dieron cultivos de *Chromobacterium violaceum*. Otros nódulos que contenían pús más fluida contenían otros organismos además de *Chromobacterium violaceum*. La manera de cómo el cerdo Nº 28 se infectó no pudo ser determinada.

Exposición Artificial:

Cerdo Nº 21 se le dio oralmente 0.1 centímetro cúbico de cultivo de veinticuatro horas en caldo de una cepa de *Chromobacterium violaceum* obtenida de cerdos. Este cerdo tuvo temperatura de 104°F. (40°C.) por seis días y se recuperó. El cerdo Nº 23 fue colocado en el mismo corral del cerdo Nº 21 para determinar si había contagio por contacto; pero dicho cerdo permaneció sin adquirir la enfermedad. El cerdo Nº 21 fue autopsiado veinte días después de la inoculación. Se encontraron nódulos en los pulmones de los cuales *Chromobacterium violaceum* fue recuperado.

Los cerdos experimentales Nº 2, 20 y 26 murieron después de la inoculación oral de 8.0, 1.0 y 0.2 cc. respectivamente de cultivo en caldo

Figura 2 — Fotomicrografía electrónica del *Chromobacterium violaceum* agente causante de la enfermedad.



de veinticuatro horas de una cepa de *Chromobacterium violaceum* procedente de cerdos. Al cerdo N° 6 se inoculó cuatro cc. en cada fosa nasal, estos cerdos murieron de dos a seis días después de la inoculación con un cuadro agudo de la enfermedad.

La sangre, orina, heces del cerdo N° 26 fueron cultivadas inmediatamente antes de la inoculación y durante los días 2º, 3º y 6º (día de la muerte), siguientes a la inoculación. Todos los cultivos fueron negativos para *Chromobacterium violaceum*. Después de la autopsia se hizo cultivo en caldo del hígado, vesícula biliar, pulmones y sangre del corazón. El cultivo de los pulmones fue positivo para el *Chromobacterium violaceum*, todos los demás fueron negativos sin ningún crecimiento bacteriológico. Considerando la pequeña cantidad de la dosis oral (0.2 cc), parecía que este organismo tiene cierta predilección por los pulmones.

Lesiones encontradas en autopsias en los cerdos bajo experimentación:

Los cerdos en experimentación que murieron después de un curso agudo de la enfermedad presentaron hemorragias periféricas y profundas difusas en los ganglios linfáticos de la cabeza, cuello y mediastino.

Las lesiones de los ganglios linfáticos de la garganta que se observaron en casos naturales no se presentaron en los cerdos en experimentación aunque se observaron algunos abscesos en estos órganos en ciertos casos. Las lesiones principales se observaron en los pulmones lo cual incluía congestión y edema, hepatización roja lobar, coágulos de sangre en los bronquios, edema gelatinoso en los mediastinos y fluido seroso sanguíneo en la cavidad torácica. El cerdo N 20 tuvo numerosas áreas localizadas de hepatización gris que daban a los pulmones una sensación

granular a la palpación. Infartos hemorrágicos se encontraron en el bazo. El hígado y los riñones estaban congestionados, la mucosa gastrointestinal tenía áreas de inflamación.

Como se anotó arriba, abscesos nodulares caseosos similares a los observados en casos naturales se observaron en los cerdos (Nos. 21, y 28.).

Ocho de los trece ratones inoculados por vía intraperitoneal ó intranasal murieron. Dos de los cuatro cobayos murieron después de una inyección intraperitoneal. El *Chromobacterium violaceum* fue recuperado de la mayoría de éstos animales.

Histopatología:

Los casos de campo todos revelaron un tipo de reacción crónica que consistía en focos de necrosis caseosa rodeados por una cápsula de tejido conectivo. Se observaron células epitelioides frecuentemente en áreas inmediatas al tejido necrótico. Esta área estaba rodeada a su vez por una cápsula de tejidos fibrosos conectivos maduros. (fig. 3).

Las lesiones más sobresalientes en los casos agudos experimentales se observaron en los pulmones y consistían en congestión, edema y hemorragia. El tabique interlobular era prominente debido al edema. La reacción celular se caracterizaba por la presencia de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.

Pruebas Serológicas:

Se hicieron pruebas de aglutinación en tubos con los cerdos inoculados experimentalmente y con unidades seleccionadas al azar de la piara infectada. Las pruebas se llevaron a cabo usando como antígeno tanto organismos vivos como organismos formalizados al 0.1% de cultivo de veinticuatro horas en caldo de muestra de cepa de *Chromobacterium violaceum* procedente de cer-

dos. Los mejores resultados se obtuvieron usando cultivos formolizados como antígeno. Las pruebas se mantuvieron durante la noche a 5°C. Los títulos obtenidos variaron desde negativos hasta aquellos positivos a dilusiones tan altas como 1 x 1.280 en cerdos procedentes de la piara afectada. Un pequeño perro y una vaca de la misma hacienda reaccionaron negativamente. Una gallina tuvo un título de 1 x 640.

Los animales inoculados experimentalmente reaccionaron al test de aglutinación en forma negativa antes de ser inoculados; pero reaccionaron positivamente después de ésta.

Discusión:

Chromobacterium violaceum se encontró en este laboratorio por lo menos en una ocasión previa, en un caso de neumonía aguda en cerdos y en esta ocasión el germen fue adicionado a la colección de stock de cultivos precisamente por la novedad de su producción de pigmentos.

El *Chromobacterium violaceum* fue tomado erróneamente como un germen de contaminación en esta

ocasión. El tipo de neumonía nodular vista en los casos de campo se había encontrado ocasionalmente por el servicio de diagnósticos y posiblemente la verdadera causa de esta neumonía fue pasada por alto. *Chromobacterium violaceum* se ha recuperado recientemente en este laboratorio de una vaca que murió con lesiones de una septicemia. Esta enfermedad está bajo estudios más extensos actualmente.

Cuando el organismo fue inicialmente aislado de la piara en estudio, se pensó que éste fuera un agente de contaminación como se había pensado en la ocasión citada. Se supuso que toda bacteria patógena de los animales estaban bien descritas y como este raro organismo era desconocido por nuestro personal técnico como un agente patógeno éste no podía ser la causa de la enfermedad. No fue hasta cuando el organismo se aisló repetidamente de la piara afectada y uno de nosotros (G. M.) probó que este germen era patógeno para los animales de laboratorio, fue cuando la etiología de la enfermedad se sospechó.

A esta cepa de *Chromobacterium violaceum* se le probó su sensibilidad



Figura 3 — Apariencia Histopatológica de los nódulos pulmonares en casos crónicos.

para la penicilina, estreptomina, aureomicina y terramicina. Se constató que diez unidades de penicilina por cc. no inhibían el crecimiento mientras que dos gamas de aureomicina por cc.; cuatro gamas de estreptomina por cc. y treinta y nueve gamas de terramicina por cc. inhibían el crecimiento en caldo trífido. Wheat (5), indica que el aumento reciente de casos humanos de infección con *Chromobacterium prodigiosum* (*Serratia marcescens*) puede deberse a que los antibióticos inhiben algunos organismos y permiten el crecimiento de los *Chromobacterium* altamente resistentes a los antibióticos y a la sulfa. Sneath (1), asevera, "Todas las cepas (*Chromobacterium violaceum*) que nosotros hemos estudiado, son sensibles a la estreptomina, chloramphenicol, aureomicina y terramicina a concentraciones que son posibles obtener en la sangre. Ellos son resistentes a la penicilina y a la sulfadiazina".

En cuanto a la ruta de infección, Sneath encontró que los cobayos, ratones y conejos fueron susceptibles a la inoculación intraperitoneal con su cepa de *Chromobacterium violaceum*. El también asegura: "Los animales no son afectados cuando se les suministra cultivo en su comida". En contraste con estos experimentos un cerdo de 40 lbs. fué muerto con una dosis de 0.2 cc. de cultivo en caldo de veinticuatro horas dado oralmente.

Se encontró dificultad en producir la enfermedad en forma crónica como se observa en el campo. La consistencia con que los ganglios linfáticos y el tejido tonsilar estaban afectados en nuestros casos de campo, nos sugirió la vía oral o nasal como ruta natural de infección de cerdos. Los casos humanos en este país parecen originarse de infeccio-

nes de la piel. Schattenberg (6), infectó conejos fatalmente introduciendo en los plantares de los pies astillitas previamente empapadas en un cultivo de *Chromobacterium violaceum*.

Y finalmente una aseveración de Soule (7), con referencia a los casos humanos dice así: "En consideración a las observaciones previamente hechas, la abundante distribución del *B. violaceus* en el aire, suelo y agua debe considerarse como potencialmente peligroso. Si se encuentra en el proceso de alguna enfermedad, este organismo debe investigarse cuidadosamente en vez de considerarse como un agente de contaminación".

Resumen:

1. Un brote de una nueva enfermedad en cerdos se ha descrito. Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo en "Animal Disease Laboratory de Georgia Coastal Plain Experimental station, Tifton Georgia E. U. A.
2. Un organismo similar al *Chromobacterium violaceum* Manilla (Woolley) fué repetidamente aislado de casos naturales de la enfermedad.
3. Casos crónicos que se asemejan a aquellos que ocurren naturalmente como también formas agudas de la enfermedad, fueron producidos experimentalmente con cultivos de *Chromobacterium violaceum* recobrados de casos naturales.
4. Se llama de nuevo la atención a este grupo de organismos como posibles agentes patógenos para los animales y el hombre.

RESULTADOS EN LOS CASOS BAJO EXPERIMENTACION

ANIMAL	DOSIS	ROUTA	RESULTADO	C. VIOLACEUM RECOBRADO	LESIONES
Cobayo	1.0 cc. suspensión pulmonar de casos naturales.	i. p.	Supervivió	0	
Cobayo	1.0 cc. suspensión pulmonar de casos naturales.	i. p.	Supervivió	0	
Cobayo	0.5 cc. suspensión pulmonar de casos naturales.	i. p.	Murió	+	
Cobayo	0.5 cc. suspensión pulmonar de casos naturales.	i. p.	Murió	+	
3 Ratones	—	sobre incisiones de la piel	Supervivió	0	
5 Ratones	—	i. p.	3 murieron	+	
2 Ratones	0.5 cc.	i. p.	Murieron en pocas horas	+	
3 Ratones	2 a 3 gotas		1 murió a los 2 días	-	
			1 murió a los 5 días	+	
			1 murió a los 16 días	+	
CASOS BAJO EXPERIMENTACION:					
Cerdo Nº 2	8.0 cc.	oral	Murió a las 54 horas	+	Neumonía aguda
Cerdo Nº 6	8.0 cc.	i. n.	Murió a las 44 horas	+	Neumonía aguda
Cerdo Nº 20	1.9 cc.	oral	Murió a los 4 días	+	Neumonía aguda
Cerdo Nº 21	0.1 cc.	oral	Enfermó y recobró	+	Abscesos encapsulados
Cerdo Nº 28	Testigo en el corral con el cerdo Nº 29 que recibía agua contaminada	agua pura	Enfermó y recobró	+	Abscesos encapsulados
Cerdo Nº 26	0.2 cc.	oral	Murió a los 6 días	+	Neumonía
Cerdo Nº 29	Agua contaminada diariamente por 14 días.	oral	Ningún efecto	0	No autopsiado
Cerdo Nº 23	En el corral con el Nº 21	—	Ningún efecto	0	No autopsiado

i. p. — intraperitoneal
i. n. — intranasal
+ — Chromobacterium violaceum recuperado.
— — Chromobacterium violaceum no recuperado.

Reconocimiento:

1. La colaboración técnica de Hughie J. Godwin es gratamente reconocida.
2. Apreciamos la colaboración de Mr. J. W. Dietrich del Colegio de Agricultura y Mecánica de Texas, como también reconocemos la contribución del Laboratorio Microscópico Electrónico de este Colegio por la toma de fotografías del organismo.
3. Nueva gratitud al Dr. Hilton A. Smith por la fotomicrografía de la figura N° 2.

Referencias:

1. SNEATH, P. H., BHAGWAN SINGH, R., WHELAN, J. F., and EDWARD, D.: Fatal infection by *Chromobacterium Violaceum*. *Lancet*, 265, (1953): 276-277.

2. WOOLLEY, PAUL G.: *Bacillus Violaceus Manilae* (A Pathogenic Organism). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 16, (1905): 89-93.
3. WOOLLEY, PAUL G.: *Philippine Islands, Bureau of Government Laboratories Bull.* 15, 1904.
4. FORD, W. W.: *Systematic Bacteriology*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, (1927): 468-475.
5. WHEAT, R. P., ZUCKERMAN, A., and RANTZ, L. A.: Infection Due to *Chromobacteria*: Report of II Cases. *Arch. Int. Med.*, 88, (1942): 509-521.
6. SCHATTENBERG, H. J., and HARRIS W. H.: *Chromobacterium Violaceum* Var. *Manilae* as a Pathogenic Microorganism. *J. Bact.*, 44, (1942): 509-521.
7. SOULE, M. H.: A Study of Two Strains of *B. Violaceus* Isolated from Human Beings. *Am. J. Path.*, 15, (1939): 592-595.