

Aislamiento de *Serpulina hyodysenteriae* e *innocens* de Cerdos con Cuadros de Disentería Porcina.*

MOREDO, F.A.¹; GIACOBONI, G.I.²; SANGUINETTI, R.³; YAMASAKI, T.⁴

¹ Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P..

² Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P.

³ Instituto de Patología "Dr. B. Epstein", Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P. CC 296 (1900) La Plata.

⁴ Experto Japonés del Convenio Internacional.

RESUMEN

A partir de muestras de materia fecal recolectada en bolsas de polietileno o hisopados rectales de cerdos con cuadro clínico-patológico de Disentería Porcina se aisló *Serpulina hyodysenteriae* y *Serpulina innocens*, esta última apatógena. De los tres medios de cultivos sólidos selectivos utilizados, el medio de Jenkinson et al. fue el que permitió el mayor número de aislamientos e inhibió la flora fecal normal.

La identificación del género y especie se realizó sobre la base de las características morfológicas y culturales (producción de beta-hemólisis franca). El crecimiento en los medios de cultivo fue escaso. Se concluye que el aislamiento de *Serpulina spp.* es sencillo con la metodología indicada y útil para ulteriores estudios de sensibilidad a antimicrobianos.

Palabras claves: Disentería Porcina, *Serpulina hyodysenteriae* y *Serpulina innocens*, Aislamiento.

SUMMARY

Isolation of *Serpulina hyodysenteriae* and *S. innocens* from Pigs with Swine Dysentery Signs.

From faecal samples taken in polyethylene bags or rectal swabs of pigs with clinical signs of swine dysentery, *Serpulina hyodysenteriae* and *Serpulina innocens* were isolated. The latter apathogenic of the three selective solid culture medium in use methods being used, Jenkinson's proved to be most effective to isolate the organisms and to inhibit the growth of normal faecal bacteria. The identification by genera and species were made on the basis of cultural and morphological differences (product of a clear beta-hemolysis). The growth in liquid culture medium was unsatisfactory. In conclusion, *Serpulina spp.* isolated by means of the described methodology is simple and useful for further sensitivity research for in vitro testing.

Key Words: Swine Dysentery, *Serpulina hyodysenteriae* and *Serpulina innocens*, Isolation.

INTRODUCCION

La Disentería Porcina (DP) es una enfermedad infecciosa de curso hiperagudo, agudo o crónico, caracterizada por la presencia de diarrea mucohemorrágica, que afecta a los cerdos desde el destete hasta la etapa de terminación (Achacha y Messier 1992). La entidad tiene distribución mundial y está descrita en la Argentina (Sanguinetti et. al. 1982).

Se considera a la *Serpulina hyodysenteriae* (S.h.) como el agente etiológico primario de la DP, sin embargo la interacción sinérgica con otras bacterias, factores de manejo y nutricionales pueden acentuar el cuadro clínico. El género *Serpulina* comprende dos especies: *Serpulina innocens* (S.i) no patógena y S.h. (Stanton et. al. 1991). La diferenciación entre ambas, además de su patogenicidad, se basa en la capacidad de producir hemólisis (Mapother y Joens 1985).

En nuestro país el diagnóstico de DP se realiza en base a la diarrea mucohemorrágica, a la cecitis fibrinocrótica superficial y a la baciloscopía a partir de frotis de mucus en materia fecal o improntas de mucosa cecal.

Los objetivos del presente trabajo fueron demostrar la presencia de *Serpulina spp.* a partir de material sospechoso de DP así como también establecer los medios de cultivo apropiados para su aislamiento y caracterización debido a la escasa información referente a estas bacterias en nuestro país.

* Trabajo realizado en el marco del convenio de cooperación en Investigación en el área de Ciencias Veterinarias, U.N.L.P. y J.I.C.A. (Japan International Cooperation Agency).

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 38 muestras provenientes de 2 establecimientos de ciclo completo, de manejo intensivo en confinamiento. Las muestras remitidas consistieron en 18 hisopados rectales (CULTURETTE Collection and Transport System, Beckton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, Md.) y 20 muestras de materia fecal, conservadas a 4°C las que se procesaron dentro de las 48 hs. de haber sido recolectadas. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo sólido: agar tripticasa soya adicionado de sangre ovina al 5% más espectomicina 200 mg/l, vancomicina 6.25 mg/l, rifampicina 12.5 mg/l, (SRV); agar tripticasa soya, mas sangre ovina al 5%, espectinomicina 400 mg/l, (ATS-400) (Achacha y Messier 1992); agar tripticasa soya más sangre ovina al 5%, espectomicina 400 mg/l, colistina 25 mg/l, vancomicina 25 mg/l, Medio de Jenkinson (Jenkinson y Wingar 1981); agar tripticasa soya más sangre ovina al 5% (AS). Como medios líquidos se utilizaron: caldo tripticasa soya como medio base, 1: adicionado de suero fetal bovino 10% (SFB); 2: 0.5% de glucosa, 0,2% de bicarbonato de sodio, 0.05% de mono hidrato de cisteína hidrociorada, 1.0% de extracto de levadura fresco, SFB al 10 % (Kunkle et.al. 1986) y 3: espectomicina 400 mg/l, colistina 25 mg/l, vancomicina 25 mg/l y SFB al 10%. Los caldos se fraccionaron en alícuotas de 2 ml en tubos con tapa a rosca. Se empleó la siguiente metodología: los hisopos se sembraron directamente en los diferentes medios sólidos. La materia fecal se diluyó en agar Tween cisteína: agar 1%, Tween 80 0.5g/l y L-cisteína 0.5g/l en buffer de fosfato en una relación 1:10. Se tomaron 0.5ml de esta dilución y se sembraron en diferentes medios sólidos mediante espátula de Drigalsky. Las placas fueron incubadas a 42°C (Songer et. al. 1976) durante 72 hs. en una atmósfera anaeróbica de H₂ y CO₂, provista por un generador de gas con alumias de paladio como catalizador en jarras de anaerobiosis (GasPak System). La identificación de género se realizó en base a las características culturales (desarrollo en anaerobiosis) y morfológicas (observación microscópica en fresco de la forma espiralada a 40X de aumento).

La diferenciación de especie se realizó en base a la presencia o no de hemólisis franca. De las placas positivas se procedió a su clonación a través de sucesivos pasajes en medios líquidos y medios sólidos mediante la transferencia de un trozo de agar del cultivo primario de 0.5 cm de ancho por 1 cm. de largo.

De igual forma se procedió a guardar las cepas en trozos colocados en tubos estériles almacenados a -80°C.

RESULTADOS

De los 18 hisopados sembrados directamente en placas, se observó la presencia de beta-hemólisis débil con forma de cola de cometa en dos. Microscópicamente se corroboró la presencia de espiroquetas de aproximadamente 0.3µ de ancho por 6.9µ de largo y 2 a 4 vueltas de espiral, con activa movilidad. Por las características de la hemólisis se las clasificó como *S.i.* De las 20 muestras de materia fecal procesadas con diluyente, 2 presentaron beta-hemólisis fuerte, circular, de bordes netos y diferentes diámetros, los cuales representan una unidad formadora de colonia y morfología espirilar, semejante a la anteriormente descrita, clasificándoselas como *S.h.*

DISCUSION

La diferenciación de las 2 especies de *Serpulina* es de difícil interpretación, ya que al evaluar la actividad hemolítica de la bacteria, el método se torna subjetivo y cuestionado, pero aún hoy es el de elección cuando se realiza el aislamiento de las bacterias (Kinyon 1974). El uso de técnicas de inmunofluorescencia, si bien es más práctico, reconoce falsos resultados positivos debido a las reacciones cruzadas entre las especies patógenas y no patógenas (Lysons et al. 1983; Stanton et al. 1991). De los medios de cultivo utilizados, el que brindó mejores resultados fue el de Jenkinson (Jenkinson y Wingar 1981) ya que permitió el desarrollo de las 2 cepas de *Serpulina* e inhibió el crecimiento de contaminantes. Con relación a los medios líquidos utilizados no se obtuvieron los resultados esperados, siendo necesario estudios ulteriores para precisar la causa del escaso desarrollo de las cepas de *Serpulina* en los mismos.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se describe la presencia de *Serpulina hyodysenteriae* y *Serpulina innocens* a partir de muestras fecales de cerdos con cuadros de DP.

BIBLIOGRAFIA

- 1-ACHACHA, M.; MESSIER, S. 1992. Comparison of six Different Culture Media for Isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *J.Clin.Microbiol.* 30:249-251.
- 2-JENKINSON, S.R.; WINGAR, C.R. 1981. Selective Medium for the Isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet.Rec.* 109:384-385.
- 3-KINYON, J.M. 1974. Characterization of *Treponema hyodysenteriae* isolated from outbreaks of swine dysentery. M.S. thesis, Iowa State Univ.
- 4-KUNKLE, R.A.; HARRIS, D.L.; KINYON, J.M. 1986. Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *J.Clin.Microbiol.* 24:669-671.
- 5-LYSONS, R.J.; LEMCKE, R.M. 1983. Swine dysentery: To isolate or to fluoresce?. *Vet.Rec.* 112:203.
- 6-MAPOTHER, M.E.; JOENS, L.A. 1985. New serotypes of *Treponema hyodysenteriae*. *J.Clin.Microbiol.* 22:161-164.
- 7-SANGUINETTI, H.R.; LINZITTO, O.R.; MENENDEZ, N.A.; AGUIRRE, W.G. 1982. Disentería porcina. Memorias de las jornadas de actualización porcina. Enfermedades infecciosas. Univ. de Rio Cuarto.
- 8-SONGER, J.G.; KINYON, J.M.; HARRIS, D.L. 1976. Selective medium for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *J.Clin.Microbiol.* 4:57-60.
- 9-STANTON, T.B.; JENSEN, N.S.; CASEY, T.A.; DEWHIRST, F.E. ; PASTER, B.J. 1991. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula*, gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb.nov. and *Serpula innocens* comb.nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 41 (1): 50-58.