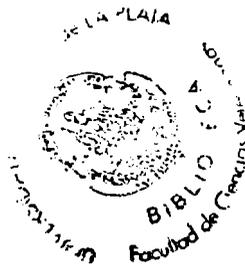


Pag. 98
n° - 2519



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

"SUSCEPTIBILIDAD DE DIFERENTES CEPAS DE RATONES LIBRE DE
PATÓGENOS ESPECÍFICOS A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Serpulina*
***hyodysenteriae* AGENTE PRODUCTOR DE LA DISENTERÍA PORCINA"**

Doctorando: GIACOBONI, Gabriela Isabel

Director: PERFUMO, Carlos Juan

Lugar de trabajo: Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas.

Instituto de Patología " Dr. B. Epstein". Microscopio Electrónico

Miembros del jurado:

Dra. CARBONE, Cecilia

Dr. SANGUINETTI, Ramón

Dr. BUSSO, Juan

1998

A MI ESPOSO E HIJOS

Agradecimientos:

A la Dra. María Elisa Echeverrigaray, consejera permanente desde mis inicios en la Facultad.

Al Dr. Itoh, quien me enseñó los primeros pasos en la Microbiología e Investigación.

Al Dr. T. Yamazaki, por la experiencia y la enseñanza brindadas en el tema de esta tesis.

A mis colegas del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas.

A los técnicos del Laboratorio: Walter y Fabio Nievas, por su colaboración incondicional para preparar el material.

A los docentes y técnicos de la Cátedra de Virología, quienes siempre tienen voluntad y tiempo para quienes necesitamos de sus conocimientos y uso de su equipamiento.

Al personal docente y no docente de la Cátedra de animales de Laboratorio y Bioterio

Al Dr. Miguel Angel Petrucelli

Al Dr. Julio Idiart

Al Dr. Miguel Risso

A la Dra. Fabiana Landon

A la Dra. María Gabriela Echeverría

Al Dr. Edgardo Nosetto, por su confianza en mi persona.

Y al Dr. Carlos Perfumo, por su dedicación a los que recién nos iniciamos.

Publicaciones parciales:

Diferente susceptibilidad de ratones endocriados libre de patógenos específicos a la inoculación experimental de *Serpulina hyodysenteriae*

Giacoboni, G., Rizzo, M., Massone, A., Perfumo, C.J.

Archivos de medicina Veterinaria. Vol 30 N°2

Índice de contenidos:

Título	1
Palabras clave	1
Resumen	2
Title	4
Key Words	4
Summary	5
INTRODUCCION	6
Parte 1: Disentería Porcina	7
1.a. Agente etiológico: estructura, taxonomía, identificación	8
1.b. Aspectos clínicos	12
1.c. Manejo farmacológico	15
Parte 2: Modelos experimentales	19
2.a. Importancia del animal de laboratorio como modelo experimental	20
2.b. Modelos experimentales en la disentería porcina	21
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS	24
1.1. Breve reseña epidemiológica de los cuadros de DP, origen de las cepas de Sh aisladas y utilizadas en este estudio.	25
1.2. Obtención, transporte y procesamiento de las muestras	26

1.3. Medios de cultivo y de mantenimiento	26
1.4 Aislamiento e identificación del género Serpulina	27
1.5 Clasificación serológica de las cepas de Sh aisladas	28
2.1. Animales de experimentación	29
2.2. Evaluación del modelo experimental	30
2.3. Diseño experimental	34
2.4 Análisis estadístico	34
3.1 Drogas utilizadas	35
3.2. Diseño experimental:	36
3.3 Desarrollo de la experiencia:	37
RESULTADOS	38
Objetivo 1	39
Objetivo 2	42
a. Estudios con la cepa de Sh DJ70	43
Estudios clínicos	43
Estudios anatómopatológicos	43
Estudios bacteriológicos	55
b. Estudio con las cepas de Sh aisladas de casos de campo de DP	57
Estudios clínicos	57
Estudios anatomopatológicos	58
Estudios bacteriológicos	59

Objetivo3	62
Estudios "in vitro"	62
Estudios "in vivo"	62
DISCUSION	69
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFIA	79

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:**Anticuerpo (Ac)****Anticuerpos monoclonales (AcMo)****Antígeno (Ag)****Agar Tripticasa Soya (ATS)****Caldo tripticas soya (TS)****Carbadox (CDX)****Células hervidas (BC)****Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)****Días postinoculación (d.p.i)****Disentería Porcina (DP)****gramo (g)****Kilodalton (Kda)****Hematoxilina y eosina (H&E)****Horas (hs)****Libre de patógenos específicos (SPF)****Lipopoliacárido (LPS)****Post-inoculación (p.i)****Serpulina hyodysenteriae (Sh)****Serpulina innocens (S.i)****Pared celular (PC)****Tilosina (TLS)****Unidades Formadoras de Colonias (UFC)**

TÍTULO

Susceptibilidad de Diferentes Cepas de Ratones Libre de Patógenos Específicos a la Infección Experimental por *Serpulina hyodysenteriae*, Agente Productor de la Disentería Porcina

Palabras clave: -*Serpulina hyodysenteriae*, inoculación experimental, cepas de ratones SPF, bacteriología, patología, tratamientos, carbadox, tilosina.

RESUMEN

Se inocularon 4 cepas de ratones libre de patógenos específicos (**SPF**) (Balb/cAnN, Balb/cJ, C57BL/6J y C57BL/6N) con una dosis intragástrica de *Serpulina hyodysenteriae* (**Sh**) DJ70 (10^7 a 10^8 Unidades Formadoras de Colonias por ml (**UFC/ml**)) para determinar la cepa de ratón más susceptible a la infección experimental. Los criterios utilizados para evaluar la infección fueron los siguientes: bacteriológicos, descarga de **Sh** en materia fecal a los 3, 5 y 7 días post-inoculación (**d.p.i**), conteo de **UFC** por gramo (**g**) de ciego, y anatomopatológicos, hallazgos macroscópicos y lesiones histopatológicas a los 14 **d.p.i**. Similares criterios fueron utilizados para estudiar la patogenicidad de las cepas de **Sh** aisladas de campo y la respuesta a la administración de tilosina (**TLS**) y carbadox (**CDX**).

Sobre la base de los resultados de los estudios bacteriológicos y los resultantes de la categorización en grados de los cambios macroscópicos, la cepa de ratón C57BL/6J demostró ser la más susceptible a la infección experimental por **Sh**. Las observaciones histopatológicas más remarcables fueron hiperplasia de células caliciformes, infiltración mononuclear de la lámina propia y edema de la membrana submucosa. La severidad de las lesiones mencionadas no se correlacionaron con los hallazgos macroscópicos y difirieron de aquellos encontrados en los cerdos con cuadros de Disentería Porcina. (**DP**). Sin embargo, fueron equiparables a los descritos en el ratón por otros autores. El estudio comparativo de las cepas de **Sh** aisladas de los casos de campo con la cepa de referencia **Sh** DJ70 en ratones

C57BL/6J permitió comprobar que la cepa de referencia fue la que expresó mayor poder patógeno. Estudios realizados "in vitro" por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) e "in vivo" en el modelo ratón cepa C57BL/6J para evaluar la sensibilidad de **Sh** a la **TLS** y **CDX**, 2 de las drogas usadas en la Argentina para el control de la **DP**, permitieron comprobar la mayor eficacia del **CDX**.

Different susceptibility of inbred specific pathogen free strains of mice to experimental inoculation with *Serpulina hyodysenteriae*

Key words: *Serpulina hyodysenteriae*, experimental inoculation, SPF mice strains. bacteriology, pathology.

SUMMARY

In order to demonstrate the susceptibility of different mice strains, four inbred strains of SPF mice (Balb/cAnN, Balb/J, C57BL/6J and C57BL/6N) were inoculated with a single intragastric dose of 10^7 to 10^8 Colony Forming Units (CFU) of *Serpulina hyodysenteriae* DJ 70 strain (S.h). The criteria used to evaluate the infection were shedding of bacteria in faeces at 3, 5, and 7 days postinoculation (d.p.i), CFU per gram of cecum, cecal macroscopic changes and histopathological lesions at 14 d.p.i. According to the bacteriological counts and the degree of macroscopic changes the C57BL/6J mice strain seemed to be the most susceptible. Goblet cell hyperplasia, mononuclear cell infiltration of lamina propria and inflammatory oedema of the submucosal layer were the most remarkable changes. No correlations between the degree of gross cecal lesions and the histopathological findings was observed. Histopathological changes found in mice were correlated with those previously reported on this species, but they were different from those found in pigs. However, the results from comparative studies between strains of Sh isolated from field cases of swine dysentery and the reference Sh strain DJ70 demonstrated that the last one expressed more pathogenicity. The in vitro antimicrobial activity of TLS and CDX and their efficacy in the experimental infection with Sh in C57BL/6J mice were evaluated according to progressive bacteriological counts and gross changes of cecum. The results showed that CDX was more effective than TLS.

INTRODUCCION

Parte 1:**DISENTERÍA PORCINA*****1.a- Agente etiológico: estructura, taxonomía, identificación.******1.b- Aspectos clínicos******1.c- Manejo farmacológico***

DISENTERIA PORCINA

1.a- *Agente etiológico*

La DP es una enfermedad contagiosa de los cerdos caracterizada clínicamente por una colitis mucohemorrágica. Fue descrita hace 76 años (72) y a pesar de los avances realizados en el conocimiento de su etiopatogenia, epizootiología, diagnóstico y control, es una enfermedad aún hoy prevalente en los países con alto desarrollo de la producción porcina.

A principios de 1970, se atribuyó a una espiroqueta fuertemente hemolítica ser la causa de la DP (3), la que más tarde se llamó *Treponema hyodysenteriae* (26).

La taxonomía actual de esta bacteria se terminó de dilucidar con estudios de reasociación de DNA-DNA, perfiles proteicos de células enteras en geles de poliacrilamida (SDS-page) y secuencias de 16S RNA (55), los que revelaron que el *Treponema hyodysenteriae* estaba muy distante de *Treponema pallidum*, la especie tipo del género *Treponema* (48). Stanton propuso un nuevo género "*Serpula*" (61) renombrado *Serpulina* (62), dentro del orden *Spirochaetales*, donde están incluidas ésta y otras espiroquetas. **Sh**, es una espiroqueta anaerobia, móvil, oxígeno tolerante y Gram negativa. Mide 6-25 μm de longitud y 0,27-0,37 μm de diámetro, tiene forma de hélice con una o más vueltas y posee 8-14 endoflagelos (70). Produce una toxina hemolítica, que fue purificada y caracterizada como un péptido pequeño de 19 Kilodalton (kDa) de peso molecular similar a la estreptolisina S en estructura y propiedades (47). La misma es codificada por un gen *tlyA* (32), que le confiere su

actividad β hemolítica fuerte que se pone de manifiesto en placas de agar sangre, factor esencial para su identificación. La ultraestructura de **Sh** muestra un cilindro protoplasmático espiralado, con una vaina que envuelve todo el microorganismo y los filamentos axiales o endoflagelos que se insertan en los extremos finales de la célula, que yacen entre la túnica o vaina y la membrana citoplásmica (70).

Otras espiroquetas no productoras de **DP** han sido aisladas del intestino del cerdo, como *Serpulina innocens* (**S.i**), apatógena y un grupo de espiroquetas asociadas con colitis espiroquetal llamadas *WBHIS* (*weakly beta-hemolytic intestinal spirochetes*) que hacen confusa la identificación y diferenciación de **Sh** (42).

Durante los últimos años se realizaron diferentes esquemas de clasificación para establecer la taxonomía de estas bacterias. Hunter y Wood, en 1979, distinguieron 7 modelos enzimáticos con el sistema API ZIM (33). Beckman y Amtberg identificaron 5 grupos diferentes de espiroquetas mediante la aglutinación de lectinas (5). Fellstrom (17) separó a las espiroquetas en cuatro grupos fenotípicos diferentes, I al IV, con 3 subgrupos en el grupo III (tabla 1) sobre la base de las propiedades bioquímicas las que reflejan también, el origen filogenético de las espiroquetas intestinales de los cerdos (18).

Tabla N°1 Diferenciación de las especies de *Serpulina* por reacciones bioquímicas.

Grupo	Hemólisis	indol	hipurato	α -gal	α -glu	β -glu
I	Fuerte	+	-	-	+/-	+
II	Débil	+	-	-	+	+
IIIa	Débil	-	-	-	-	+
IIIb	Débil	-	-	+	-	+
IIIc	Débil	-	-	+	+	+
IV	Débil	-	+	+/-	-	-

Lee y col. , (42) las clasificaron en tres grupos genéticos, A, B., y C a partir de multilocus de enzimas electroforéticas.

Las especies actualmente clasificadas y de patogenicidad definida se indican en la tabla 2, sobre la base de la clasificación bioquímica:

Tabla N°2: Nombres de las especies, patogenicidad y clasificación por reacciones bioquímicas de las cepas de *Serpulina* del cerdo.

Grupo	Hemólisis	indol	hipurato	patogenicidad	Especie
I	Fuerte	+	-	Sí	<i>S.hyodisenteriae</i>
II	Débil	+	-	presumible	<i>Serpulina sp.</i>
III	Débil	-	-	no	<i>Serpulina sp.</i>
IV	Débil	-	+	Sí	<i>S.pilosicoli</i>

Por la composición de los lipopolisacáridos de membrana, se crearon 9 serotipos (1 al 9) (4) y serogrupos (A-I) (24). Sin embargo, al poseer más de un antígeno **Ag** y compartir determinantes antigénicos con otras espiroquetas hace que la detección antigénica con sueros policlonales se torne dificultosa.

Como una alternativa se produjo anticuerpos monoclonales (**AcMo**) para identificar, aislar y purificar a los antígenos y definir los roles específicos de éstos en la infección e inmunidad (68). Las dificultades que surgieron con los mismos, fueron que los **AcMo** producidos contra el **Ag** de membrana externa de 16 kDa no estaban presentes en todas las cepas de **Sh**. Lee y Hampson (43) produjeron **AcMo** contra una proteína de la membrana externa de 30 kDa de peso molecular, teniendo éxito con diferentes serotipos de **Sh** con los que pudieron hacer pruebas de aglutinación e inmunofluorescencia.

1.b Aspectos clínicos de la DP y patogenia de la infección

La DP afecta a los cerdos, principalmente entre las 5 y 16 semanas de vida. Los animales infectados sufren deshidratación, emaciación y en casos severos la muerte. La enfermedad se introduce en la piara por cerdos portadores y se mantiene por cerdos que se recuperaron de la infección, los cuales pueden seguir eliminando microorganismos con la materia fecal durante meses sin manifestar signos clínicos de la enfermedad (25). La tabla 3 muestra los signos clínicos principales y las lesiones de la DP.

Tabla N° 3: Principales signos clínicos y lesiones de la disentería porcina

SIGNOS CLINICOS	
INCUBACIÓN	2 días a 3 meses, usualmente 10-14 días
DISEMINACIÓN EN LA PÍARA	usualmente lenta
ANIMALES AFECTADOS	cerdos a partir de la recria hasta la terminación
COMIENZO	Gradual
SIGNOS INICIALES	materia fecal blanda, amarilla grisácea, con mucus, con manchas de sangre, anorexia parcial, temperatura rectal 40°C
PROGRESION DE LOS SIGNOS	heces más líquidas, incremento de sangre, pérdida del estado
MORBILIDAD	incrementada- alta
APETITO	sin modificar
LESIONES	
LESIONES PARCIALES	solo mucosa del intestino grueso
	Hiperemia
	Edema
	contenido blando, amarillo grisáceo, con mucus, con manchas de sangre. Agrandamiento de los nódulos linfáticos mesentéricos.
PROGRESIÓN DE LAS LESIONES	mucosa del intestino grueso: necrosis superficial pseudomembrana mucofibrinosa.
	Contenido: líquido, sangre oscura fundus del estómago congestivo.
	Carcasa: emaciada, deshidratada

Los cerdos adquieren la enfermedad por ingestión de alimentos contaminados con las heces de animales enfermos o portadores sanos que diseminan **Sh**. Las bacterias sobreviven al pH ácido del estómago al estar cubiertas por el mucus de la materia fecal diarreica y posteriormente invaden las criptas de la mucosa del intestino grueso. En el proceso de colonización estarían involucrados los flagelos y la movilidad a alta velocidad, por un proceso de quimiotaxis ejercido por materiales viscosos como la mucina (7). También como factores de virulencia se incluyen la hemolisina y una toxina de naturaleza lipopolisacárida con actividad endotóxica (47).

El daño final de la mucosa y submucosa se caracteriza por una necrosis superficial, erosión del epitelio, edema e infiltración linfocitaria (25, 67).

Si bien los cultivos puros de **Sh** inoculados a ratones y cerdos reproducen la enfermedad, otros autores demostraron el sinergismo que otras bacterias anaerobias como *Bacteroides vulgatus* (27), *Fusobacterium necrophorum* o *Listeria denitrificans* tienen con **Sh**, para que ésta exprese su patogenicidad. Estas bacterias facilitarían la colonización y la producción de lesiones.

Los factores nutricionales, tales como la alimentación basada en silo de maíz que baja los valores de pH en el intestino, pueden modular la expresión de la enfermedad (56). Recientemente, se demostró que los cerdos alimentados con dietas altamente digestibles como arroz cocido y proteína de origen animal, están protegidos contra la infección de **Sh**, debido a que estos compuestos se absorben casi en su totalidad en el intestino delgado, con escasa fermentación en el intestino grueso (58).

Otros aspectos relacionados con la dieta, como el efecto profiláctico de dietas con zinc, fueron probados en modelos de ratones C3H/HeN (54).

Diagnóstico clínico

El diagnóstico presuntivo de la DP se realiza en función a los signos clínicos, el cuadro epizootológico, los hallazgos de necropsia y la observación de microorganismos de forma espirilar en improntas de ciego o colon. La confirmación se realiza por aislamiento e identificación de **Sh**.

El aislamiento del microorganismo es difícil, y más lo es la identificación de la especie. En los laboratorios de diagnóstico convencionales, su identificación se realiza aislándola de materia fecal y contenido cecal de los animales clínicamente afectados mediante cultivos "in vitro". Los medios de cultivo que responden a las necesidades de estas bacterias tienen como base, la sangre, donde se revela la β hemólisis fuerte (36). Las bacterias pueden observarse con microscopio con contraste de fase o campo oscuro, con microscopio óptico en exámenes en fresco (apreciándose su movimiento y forma características) o colorearse con Azul Victoria 4R (53). La realización de las pruebas bioquímicas que permiten clasificarlas en grupos (17), ofrece dificultades para llevarlos a cabo en laboratorios no especializados.

Se lograron avances en el diagnóstico de **Sh** utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Con ella se pudieron identificar animales portadores por detección de DNA en materia fecal (20).

La identificación de **Ag** y **Ac** no es de utilización frecuente por las dificultades que presenta, pero existen diferentes pruebas como coagulación, inmunodifusión y dot ELISA (9, 21). Estas técnicas están limitadas por las similitudes entre **Sh** y otras espiroquetas por lo que se necesitan **Ag** y/o anticuerpos (**Ac**) específicos.

1.c Manejo farmacológico de la disentería porcina

Para el control de la **DP**, se ha utilizado una amplia gama de agentes antimicrobianos, pero pocos han sido capaces de eliminar por completo a **Sh** del animal.

Los antimicrobianos que se utilizan corrientemente en el tratamiento de la **DP** se indican en la tabla N° 4:

Tabla N° 4: Quimioterápicos y antibióticos utilizados para el control de la disentería porcina

Compuesto	Ruta y dosis	Tiempo de administración
Macrólidos: tilosina, kitasamisina, eritomicina	Parenteral 10mg/Kg Agua: 0,25 g/Tn Alimento: 100g ton	1-3 días 5 días 21 días
Nitroimidazoles: dimetridazole, ronidazole, ipronidazole	Agua: 0,25 g/l Alimento: 500 g/Tn Parenteral: 10mg/Kg	3-7 días 7-14 días 1-2 días
Lincomicina : lincomicina	Agua: 33mg/Kg Alimento: 110 g Tn	10 días 21 días
Substitutos de las quinolonas: carbadox, olaquinox	Alimento; 55mg/Tn	4-35 días

Macrólidos: (tilosina) Desde el año 1965 (11), se lo utiliza para el control de la DP, habiéndose descrito en el año 1972 resistencia a Sh (66). Se la utiliza parenteralmente y con el alimento. Tiene escaso efecto contra las enterobacterias y no se lo puede usar en infecciones mixtas donde estas bacterias están presentes.

Nitroimidazoles: Son muy efectivos contra la enfermedad. Eliminan Sh, otros anaerobios y protozoos. Los que se utilizan para el tratamiento de la DP son el dimetridazole y ronidazole. El uso prolongado puede conducir a la reducción de su eficacia, pero ese efecto no tiene larga duración. Su administración con el agua de bebida y en el alimento y en afecciones complicadas con otras bacterias, puede administrarse con otras drogas por vía oral.

Lincomicina: Se la puede utilizar parenteralmente, en agua y en el alimento. Hay variaciones en cuanto a su sensibilidad. Es una de las drogas de elección utilizadas como primer tratamiento. En general se administra asociada a la espectinomicina.

Carbadox: este compuesto es utilizado en muchos lugares del mundo y en nuestro país como agente promotor del crecimiento y preventivo de la **DP** a dosis de 55 ppm y en dosis mas elevadas como curativo (25). La administración en dosis altas y continuadas puede causar intoxicación y modificaciones en los índices reproductivos (60). Tiene el inconveniente que hay que retirar la droga 10 semanas previas al sacrificio (15).

Actualmente, existen otros grupos de drogas que están siendo efectivas como la sedecamicina, antibiótico del grupo de la sedecamicina A, con efecto protector y terapéutico similar al **CDX**, tiamulina y lincomicina en infecciones experimentales (29). La tiamulina es una de los antibióticos de mayor aplicación de las drogas recomendadas en el momento, se lo utiliza en agua y en el alimento, y se han citado muy pocos casos de resistencia (6).

Modo de acción

Las espiroquetas son resistentes a los antibióticos beta lactámicos como por ej. penicilinas, cefalosporinas y vancomicina. Asimismo los antibióticos que se limitan a la distribución en sitios extracelulares son inefectivos. (59)

De los antimicrobianos citados en la tabla N°4, la mayoría tiene actividad sobre la síntesis proteica y son bacteriostáticos (macrólidos, lincomicina, carbadox), (59)

De las drogas que actúan dentro de la célula bacteriana, está el grupo de los nitroimidazoles. El grupo nitro de éstas se reduce por una enzima y esto produce

componentes intermedios citotóxicos o radicales libres que actúan sobre el DNA bacteriano (12).

El rango u orden de la eficacia de todas las drogas mencionadas es discutido y la elección del antibacteriano que se utiliza para el tratamiento de la DP, depende del país y de la disponibilidad, como así también del costo y vía de administración.

Parte 2:**MODELOS EXPERIMENTALES**

2.a- Importancia del animal de laboratorio como modelo experimental

2. b - Modelos experimentales en la disentería porcina

2.a- Importancia del animal de laboratorio como modelo experimental

Los modelos animales, son modelos "in vivo" capaces de proporcionar datos de gran valor en la investigación de los mecanismos patogénicos de las enfermedades infectocontagiosas. Hay 2 grandes categorías de reproducción de cuadros en modelos animales: a.- no infectados y b.- los que reproducen los procesos infecciosos de una manera similar al de la especie en estudio llamados modelos *discriminativos*. Estos últimos pueden ser de utilidad para la comprensión de la patogenia de la enfermedad y la administración de dosis óptimas de drogas para un mejor enfoque terapéutico (8).

Sea cuales fueren, los animales que se utilizan como reactivos biológicos, deben estar definidos en su estado de salud y condición genética para obtener resultados confiables, reproducibles y comparables. (10, 16)

La uniformidad genética se logra utilizando cepas de ratones endocriadas que son el producto de 20 cruzamientos hermano por hermana durante 20 generaciones (13).

De acuerdo con las normas internacionales establecidas por el ICLAS (Comité Internacional para la Ciencia de los Animales de Laboratorio) (16) los animales de laboratorio se han clasificado de acuerdo a su carga microbiológica y su modo de obtención en: **convencionales**: son aquellos animales que se crían y mantienen en sistemas abiertos y se encuentran libres de zoonosis, **libre de patógenos específicos (SPF)** son animales que están libres de los microorganismos y parásitos

específicos, pero no necesariamente de otros no especificados. Los mismos se mantienen en instalaciones bajo barreras sanitarias y se controlan de manera de poder acreditar tal condición. **Libres de gérmenes (GFA)** son animales en los que no se puede detectar ningún microorganismo por los métodos hasta ahora conocidos, se obtienen por histerectomía y se mantienen en regímenes cerrados bajo un sistema de barreras absolutas, y por último, **gnotobiotas**: son aquellos animales GFA que se han puesto en contacto con uno o más cultivos puros de microorganismos específicos.

2. b. - Modelos experimentales en la disentería porcina

Los animales de experimentación jugaron un rol importante para esclarecer su etiología así como algunos aspectos de su patogenia. Los cerdos **SPF** fueron los primeros en utilizarse para cumplir los postulados de Koch y atribuir el rol etiológico a la espiroqueta aislada llamada *Treponema hyodysenteriae* (3, 26, 31). La inoculación por vía oral reprodujo la enfermedad. También se comprobó la existencia de otra espiroqueta morfológicamente parecida pero sin la capacidad de producir **DP**, la que habitaba el colon de cerdos normales, a la que llamaron *Treponema innocens* (41, 42). Posteriormente, se utilizaron diferentes animales de laboratorio a los efectos de comprobar la susceptibilidad de especie y reproducir la enfermedad (37). Se inocularon pollos de un día de vida tanto para caracterizar las espiroquetas patógenas de los mismos, como para demostrar la patogenia de **Sh** (22, 64, 65), así como de espiroquetas con actividad hemolítica débil aisladas de cerdos y humanos (68).

Una de las especies más utilizadas con este propósito fue el ratón, cuyas ventajas frente al cerdo, única especie donde se desarrolla naturalmente la **DP**, son numerosas y de las cuales se destacan su pequeño tamaño para el alojamiento, el fácil manejo y el menor costo.

Joens y Glock (38), fueron quienes consiguieron reproducir la enfermedad , en ratones de la cepa CF1, seguidos por otros investigadores, quienes experimentaron con la misma cepa (38) y otras como C3H/HeJ, C3H/HeN, C3Heb/FeJ (51), animales atímicos congénitos (Balb/c nude)(63) etc.

Los diferentes resultados obtenidos en el modelo ratón, permitieron inferir que si bien el mismo puede ser utilizado para el estudio de la **DP** existe una gran variabilidad en su respuesta. La misma estaría estrechamente relacionada a la cepa de ratón, cepa de **Sh** y otros factores aún hoy no muy bien precisados.

Los objetivos del presente trabajo de tesis, tratan de dar una respuesta a los mismos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un modelo experimental en ratones **SPF** de infección por **Sh** y evaluar en el mismo la eficacia o no de un tratamiento “in vivo”

OBJETIVOS PARCIALES

1. Aislar las bacterias del género *Serpulina* a partir de cuadros de campo de **DP**.
Identificación de **Sh** por el tipo de hemólisis y pruebas serológicas.
2. Determinar la susceptibilidad de diferentes cepas de ratones **SPF** a la inoculación experimental con la cepa bacteriana **Sh** de referencia y con las cepas de **Sh** aisladas de casos de campo de **DP** utilizando estudios clínicos, anatomopatológicos y bacteriológicos.
3. Determinar la eficacia de 2 de los antibacterianos utilizados en nuestro país, **CDX**, **TLS**, frente a diferentes cepas de **Sh** mediante pruebas “in vitro” e “in vivo”

MATERIALES Y METODOS

Objetivo 1.

Aislar las bacterias del género *Serpulina* a partir de cuadros de campo de **DP**.
Identificación de **Sh** por el tipo de β hemólisis y pruebas serológicas.

1.1. Breve reseña epidemiológica de los cuadros de DP, origen de las cepas de Sh aisladas y utilizadas en este estudio.

Cepa DJ70: De reconocido poder patógeno experimental para el cerdo, se utilizó como cepa testigo. La misma fue cedida por el Dr. T. Yamazaki del National Health Institute, Japón.

Cepa Bolivar: Se aisló de un cuadro de **DP** detectado en una granja de cría y engorde de cerdos semintensiva. El cuadro se presentó en las pistas de engorde con una población de 1200 animales. La mortandad osciló entre el 1,6 al 2 % mensual. La población susceptible, animales de 30 a 60 kg de peso, manifestaron diarrea mucohemorrágica. El tratamiento combinado de dimetridazole 0,25 g/l y CDX 50-100 ppm controló el cuadro. Sin embargo, cuando se suspendió el mismo hubo recrudescimiento de la enfermedad. Se aisló **Sh** de materia fecal y contenido cecal.

Cepa Chascomús: Se aisló de un cuadro de **DP** ocurrido en un establecimiento dedicado al engorde de cerdos con lactosuero. En un lote de 120 cerdos se detectó una morbilidad del 25%. Las cepas fueron aisladas de materia fecal y de contenido cecal de cerdos con lesiones de tiflitis fibrinonecrótica, provenientes de 3 corrales, sobre un total de 24.

Cepa Roque Pérez: Establecimiento de cría y engorde de cerdos en forma intensiva en confinamiento compuesto de 1000 hembras. A los cerdos de las categorías recría, desarrollo y terminación se les suministraba CDX 50 ppm en forma continuada en el alimento, presentándose el cuadro diarreico luego de la supresión de la droga. Se procesaron muestras de contenido cecal de animales necropsiados y muestras de materia fecal.

1.2. Obtención, transporte y procesamiento de las muestras

Se procesaron en total 30 muestras entre materia fecal y contenido cecal de animales con signos clínicos compatibles con DP. Las mismas fueron remitidas en bolsas de polietileno o hisopos comerciales con medio de transporte, a 4°C y procesadas con no más de 24 horas de extraída.

Los hisopos fueron directamente sembrados en medio selectivo sólido y la materia fecal y contenido cecal fueron diluidos en una proporción 1/10 en solución de agar tween cisteína (ver 1.3). Se tomó 0,5 ml de esta suspensión y se sembró en medio de cultivo selectivo de Jenkinson (36) con espátula de Drigalski. Las placas fueron incubadas a 42 °C durante 72 horas, en una atmósfera anaeróbica de N₂, H₂ y CO₂ (Anaeroincubator, Hirayama Japón).

1.3. Medios de cultivo y de mantenimiento

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo, cuyas fórmulas se detallan a continuación:

Agar tween cisteína: KH_2PO_4 4,5g

(diluyente)	L-cisteína HCl.H ₂ O	0,5g
	Tween 80	0,5g
	Agar	1g
	agua destilada csp.	1000 ml

Medio de Jenkinson: Agar tripticasa soya

(selectivo)	sangre ovina 5%	
	espectinomicina	400 mg/l
	colistina	25 mg/l
	vancomicina	25mg/l
	agua destilada csp.	1000 ml

1.4 Aislamiento e identificación del género *Serpulina*

La identificación de género se realizó basándose en las características culturales (crecimiento en medio selectivo de Jenkinson y atmósfera anaeróbica) y morfológicas (observación microscópica en fresco con aumento 40x y tinción positiva con Azul Victoria 4-R 100x en aceite de inmersión) (53).

La diferenciación de especie se realizó por la presencia o no de β hemólisis franca en placas de agar sangre, las que se repicaron sobre nuevas placas de agar sangre agar tripticasa soya (ATS) adicionada con 5% de sangre ovina.

El desarrollo bacteriano de *Sh* de 48 horas de incubación a 42°C en agar sangre fue cortado en bloques de 2 cm², colocados en tubos con tapón a rosca y conservados a -80°C hasta su utilización.

1.5 Clasificación serológica de las cepas de Sh aisladas

Las cepas aisladas fueron serotipificadas en el Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada.

Se utilizaron 3 tipos de antígenos: 1. Pared celular (**PC**) (suspensión bacteriana), 2. Células hervidas (**BC**), y 3. lipopolisacáridos (**LPS**) éste último mediante extracción fenólica. Las pruebas de serotipificación realizadas fueron coagulación según el procedimiento de Diarra y col. (9) e inmunodifusión según el procedimiento de Li y col. (44). Para ambas pruebas se utilizaron sueros polivalentes de conejo contra los 9 serotipos de **Sh** y **S.i.** Como antígenos se utilizaron **PC** y **BC** en la primera y **BC** y **LPS** en la segunda.

La tercera prueba para serotipificar desarrollada fue el Dot-ELISA por la metodología de Hawkes y col. (28). Los antígenos utilizados fueron **BC** y **LPS** y **AcMo** especie-específico contra todos los serotipos de **Sh** y **S.i.**

Objetivo 2.

Deteminar de la susceptibilidad de diferentes cepas de ratones **SPF** a la inoculación experimental con la cepa de referencia y con las cepas de **Sh** aisladas de casos de campo de **DP** utilizando estudios clínicos, anatomopatológicos y bacteriológicos.

2.1. Animales de experimentación

2.1.1. Denominación y origen de las cepas utilizadas

Se utilizaron las siguientes cepas de ratones endocriados **SPF** de ambos sexos y de 4 a 6 semanas de vida.

C57BL/6J, Balb/cJ (Jackson Laboratory, USA)

C57BL/6N, Balb/cAnN (National Institute of Health, Maryland, USA)

(Bioterio-Cátedra de Animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP)

Las colonias de las cepas de ratones fueron sometidas a controles periódicos microbiológicos, parasitológicos e inmunoserológicos indicados en la tabla 5.

Tabla N°5: Controles microbiológicos, parasitológicos y serológicos de los ratones utilizados en la experiencia.

Bacterias	Parásitos	Serología
<i>Salmonella spp</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>E. coli 0-115 a, c; K (B)</i> <i>Pasteurella pneumotrópica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Corynebacterium kutscheri</i>	<i>Eimeria spp.</i> <i>Spiroucleus muri</i> <i>Hexamita muris</i> <i>Syphacia muris</i> <i>Cysticercus fasciolaris</i> <i>Myobia musculus</i>	virus Sendai virus de la hepatitis murina <i>Clostridium piliformis</i> <i>Corynebacterium kutscheri</i> virus de la Ectromegalia adenovirus del ratón virus de la neumonía

2.1.2 Alojamiento y manejo

Los animales se alojaron en miniaisladores (cajas de policarbonato de 20 cm x 30 cm) con cama de viruta, agua y cobertor estéril y alimento balanceado comercial irradiado).

Los mismos se colocaron en una habitación con luz artificial y ventilación natural.

El manipuleo de los animales se realizó bajo flujo laminar.

2.1.3 Inoculación de los ratones

Los ratones se inocularon previo ayuno de 48 hs, con sonda rígida por vía intragástrica. El inóculo consistió en una suspensión 50% vol/vol de la cepa **Sh DJ70** cultivada en **ATS** y caldo tripticasa soya (**TS**). El inóculo final se estandarizó en 10^7 - 10^8 UFC/ ml determinado por siembra en placas de **ATS** en diluciones seriadas en base 10.

Los animales testigos se inocularon con caldo **TS** estéril. A las 3 hs post-inoculación se les ofreció alimento y agua "ad-libitum" hasta finalizar la experiencia.

2.2 Evaluación del modelo experimental

2.2.1 Estudios clínicos

a. Consumo de alimento y agua: Se observó y midió la cantidad de alimento ingerido y agua consumida por los animales luego de la inoculación, en comparación con el lote testigo.

b. Peso de los animales: se pesaron los animales de cada lote antes de comenzar la experiencia y a su finalización, a los 14 d.p.i.

c. Evaluación clínica de la presencia de diarrea: Se observaron diariamente la región perianal de los animales y el aspecto y consistencia de la materia fecal.

2.2.2 Estudios anatomopatológicos

a. Macroscópicos

Los ratones fueron sacrificados por decapitación el 14 d.p.i. El órgano blanco para la observación de las lesiones fue el ciego. Las lesiones macroscópicas se clasificaron arbitrariamente sobre la base de: grado de distensión de la pared, contenido cecal: mucoso o gas, adelgazamiento de la pared y visualización de los vasos sanguíneos de la serosa en 4 grados. Grado 0: sin lesiones aparentes; 1:leve; 2: moderada y 3:severa.

El ciego fue extraído cortándose el ápice para microscopía óptica y el resto del órgano para estudios bacteriológicos.

b. Microscópicos

Muestras de ciego fueron fijadas en formol neutro al 10%, incluidas en parafina y coloreadas con hematoxilina y eosina (H&E). De casos seleccionados se realizó la coloración de Warthin Starry (WS) para la visualización de las bacterias del género *Serpulina spp.*

c. Ultraestructurales

Se seleccionaron algunas muestras para estudios ultraestructurales. Las muestras fueron fijadas con solución Karnovsky modificada, lavadas en solución de sucrosa al 5%, posfijadas en solución de tetróxido de osmio, deshidratada en alcoholes crecientes y óxido de propileno y embebidas en resinas epoxi (Quetol 182).

Los bloques cortados por ultramicrotomo (Super Nova), se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los preparados así obtenidos se observaron con microscopio electrónico JEM-1200 EX II.

d. Inmunohistoquímicos

Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizó la técnica **ABC** (Avidina-Biotina-Complex). Se utilizaron sueros policlonales primarios anti **Sh** serotipo 8, en diluciones 1:50; 1:100 y 1:500. Para precisar la especificidad del método se utilizó suero anti **S.i** cepa B276 en iguales diluciones. Ambos sueros fueron provistos gentilmente por el Dr.Mittal (Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montreal, Quebec,Canada).

Las muestras de ciego fijadas en formol neutro 10 % e incluidas en parafina fueron procesadas según técnicas histológicas de rutina. Los cortes de 3 μm de espesor adheridos a portaobjetos con adhesivo, se desparafinaron en xilol e hidrataron mediante pasajes en etanol en concentraciones decrecientes. La peroxidasa endógena fue bloqueada por tratamiento con agua oxigenada en metanol. La tinción inespecífica de fondo se redujo cubriendo las muestras con solución de albúmina bovina al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron con el suero primario en cámara húmeda a 4°C durante 24 horas. A continuación se incubaron los cortes con suero secundario marcado con biotina y se adicionó una solución de complejo avidina-biotina-peroxidasa preparada según las indicaciones de su fabricante (ABC Vector Laboratories USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se reveló con

diamenobenzidina. Se consignó reactividad positiva a la observación de formas bacilares, alargadas de color amarillo dorado. Como control negativo, las muestras se procesaron de igual manera omitiéndose el suero primario.

2.2.3 Estudios bacteriológicos

a. Aislamiento de Sh de materia fecal:

A las 72 horas p.i se comenzó la extracción de materia fecal a cada uno de los ratones. Se utilizaron para tal propósito tubos con tapa a rosca de 4 cm x 1,2 cm, estériles los que se colocaron directamente alrededor del orificio anal. Este estímulo fue suficiente para provocar la deyección de los animales. Así colectadas las muestras fueron pesadas y diluidas al 10% (p/v) con el diluyente agar tween cisteína (**ver 1.3**) De este homogeneizado se sembró una alícuota en placas de **ATS** con el agregado de con 5% de sangre ovina y se incubaron en anaerobiosis a 42°C durante 72 hs. Este proceso se repitió 3 veces consecutivas con intervalos de 48 horas.

b. Aislamiento y cuantificación de Sh de ciego:

El estudio bacteriológico posmortem del ciego, se realizó el 14 d.p.i. Dicho órgano se pesó en morteros estériles y se homogeneizó con el mismo diluyente usado en el procesamiento de la materia fecal y en las mismas proporciones (**ver 1.2**). Este homogeneizado se diluyó en forma seriada de base 10 con solución fisiológica estéril y se sembró 0,1 ml de cada una de las diluciones en placas de **ATS** más 5% de sangre ovina por duplicado. El número de **Sh** por gramo de ciego fue calculado mediante la determinación de la media del número de colonias (entre 30 y 300) que mostraron β

hemólisis franca en placas de **ATS** mas 5% de sangre ovina luego de la incubación a 42°C durante 72 horas en atmósfera anaeróbica.

2.3. Diseño experimental

a. Determinación de la cepa de ratón más susceptible

Se utilizó un modelo de diseño en bloques aleatorizados (45). El bloque se compuso de 20 animales, 5 de cada una de las cepas de ratones. Cada una de ellas se alojó en una caja y se inocularon 3 ratones con la cepa de **S.h DJ70** de reconocido poder patógeno en dosis 10^7 - 10^8 UFC/ml, dejándose 2 ratones como testigos.

b. Determinación del poder patógeno experimental para el ratón de las cepas de S.h aisladas de casos de campo de DP

Se utilizaron en total 60 ratones, 20 por cada cepa de **Sh** aislada, procediéndose como en a.

2.4 Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza, prueba de Fisher (46). Para el análisis de la patogenicidad de las cepas de campo de **Sh** se utilizaron iguales parámetros que los utilizados con la cepa patrón (conteo total de **Sh** viables y hallazgos macroscópicos). El nivel de significación elegido fue del 5%.

Objetivo 3.

Determinar la eficacia de 2 de los antibacterianos utilizados en nuestro país **CDX** y **TLS** frente a diferentes cepas de **Sh** mediante las pruebas a.- "in vitro" y b.- "in vivo"

3.1 Drogas utilizadas

Tartrato de tilosina, (C₄₆ H₇₇N O₁₇·C₄ H₆ O₆) Tylan, Elanco.

Carbadox, (metil-2-3 (quinoxalinilmetilene) carbazate-N1, N4dioxido) Mecadox de Pfizer.

3.1.1 Estudios "in vitro"

a. Muestras: Se utilizaron los aislamientos de las cepas a campo y la cepa de referencia **Sh DJ70**.

b. Preparación de los inóculos: Se descongelaron las cepas de **Sh** en 2ml de solución fisiológica buferada (PBS, pH 7). De esta suspensión, se sembraron 500µl en **ATS** más 5% de sangre ovina y se incubaron durante 72hs a 37°C en atmósfera anaeróbica. Posteriormente se cortaron bloques de 0,8 por 2cm, de las zonas periféricas de hemólisis, y se colocaron en 2ml de PBS, agitándose para lograr una buena suspensión bacteriana. A partir de aquí, se realizaron diluciones seriadas en base 10 (seis) y se llevó a cabo el conteo total de viables y determinación de la **CIM**.

c. Conteo total de viables: Se sembraron 50 µl de cada dilución bacteriana en **ATS** y se incubaron durante 48hs a 42°C. Con este paso se determinó en cuales de las diluciones bacterianas había una concentración de 10⁷ **UFC/ml**.

d. Determinación de la CIM: Las placas se prepararon el mismo día de su uso, con 9 ml de ATS y 1ml de cada una de las diluciones de la TLS y CDX. De las seis diluciones bacterianas realizadas, se le determinó la CIM a las 3 primeras (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}). Se transfirieron a un multiinoculador tipo Steer y posteriormente, se inocularon sobre las placas con las respectivas diluciones de los antibacterianos. La CIM fue definida como la mínima concentración de antibiótico que inhibió la presencia de zonas visibles de β hemólisis, luego de 48 hs de incubación a 37 °C en atmósfera anaeróbica.

3.1.2 Estudios “in vivo” con la cepa ShDJ70

a. Elección de la dosis terapéutica de CDX y TLS para Sh en el ratón.

Para hallar la dosis adecuada de CDX se probaron concentraciones de 1mg/kg, 2 mg/kg, 4mg/kg y 8 mg/kg. El CDX se disolvió en agua destilada y dimetilsulfóxido (relación 1/10). El volúmen máximo administrado a cada animal fue de 1ml.

Para hallar la dosis adecuada de la TLX, se utilizaron concentraciones de 1mg/kg, 2 mg/kg, 3mg/kg y 4mg/kg. La TLX se disolvió en agua destilada. El volúmen máximo administrado a cada animal fue de 1ml.

3.2.Diseño experimental:

Se utilizó el método de bloques aleatorizados. El bloque se compuso de 25 ratones susceptibles a Sh, (cepa C57BL/6J), de 4 a 6 semanas de edad y ambos sexos distribuidos en 4 grupos de 5 animales (uno para cada dosis de droga seleccionada) y

un grupo testigo. El alojamiento y manejo de los animales fueron los utilizados en el punto **2.1.2**.

3.3 Desarrollo de la experiencia: Los animales se inocularon con la cepa de **Sh DJ70** como lo indica el punto **2.1.3**.

Se realizaron 2 muestreos de materia fecal en los días 3 y 5 **p.i**. Se administró el **CDX** en las dosis indicadas en **3.1.2.a**. a partir del día 7 **p.i** y durante 4 días consecutivos mediante sonda rígida. Se volvió a extraer materia fecal los días 10 y 12 **p.i**. La necropsia de los animales se realizó el 14 **d.p.i**. De ellos se extrajeron muestras para estudios anatomopatológicos macroscópicos, microscópicos y bacteriológicos indicados en **2.2.2**, **2.2.2.a**; **2.2.2.b**. **2.2.3**.

RESULTADOS

Objetivo 1

Aislamiento de bacterias del género *Serpulina* a partir de cuadros de campo de DP.

Identificación de **Sh** por el tipo de β hemólisis y pruebas serológicas.

De las 30 muestras procesadas de los 3 establecimientos con brotes clínicos sospechosos de DP, 22 fueron positivas al aislamiento de bacterias del género *Serpulina*. Los movimientos en tirabuzón se observaron en los análisis con microscopía óptica (40X) y la morfología con la tinción Azul Victoria 4-R (figuras 1 y 2).

La clasificación como **Sh** se basó en la β hemólisis fuerte observada en las placas de **ATS** con el agregado de sangre ovina al 5% (figura3).

La serología mediante la prueba de coagulación utilizando como antígeno **PC** y **LPS** y por la prueba de inmunodifusión, utilizando como antígeno **BC** y **PLS**, reveló que todas las cepas correspondían al serotipo 8. No se observaron reacciones cruzadas intraespecie ni extraespecie **S.i.** Mediante la prueba de Dot-ELISA utilizando como antígeno **BC** y **LPS** enfrentados a **AcMo**, se corroboró el mismo resultado obtenido con las otras pruebas (28)

Figura 1: *Serpulina hyodysenteriae* (flecha). Examen directo en fresco (400 X)
Figura 2: *Serpulina hyodysenteriae*. Tinción con Azul Victoria 4-R. (1000 X)
Figura 3: *Serpulina hyodysenteriae*. β hemólisis fuerte en placas de agar sangre. Cultivo de 48 horas a 42°C.

Figura 1

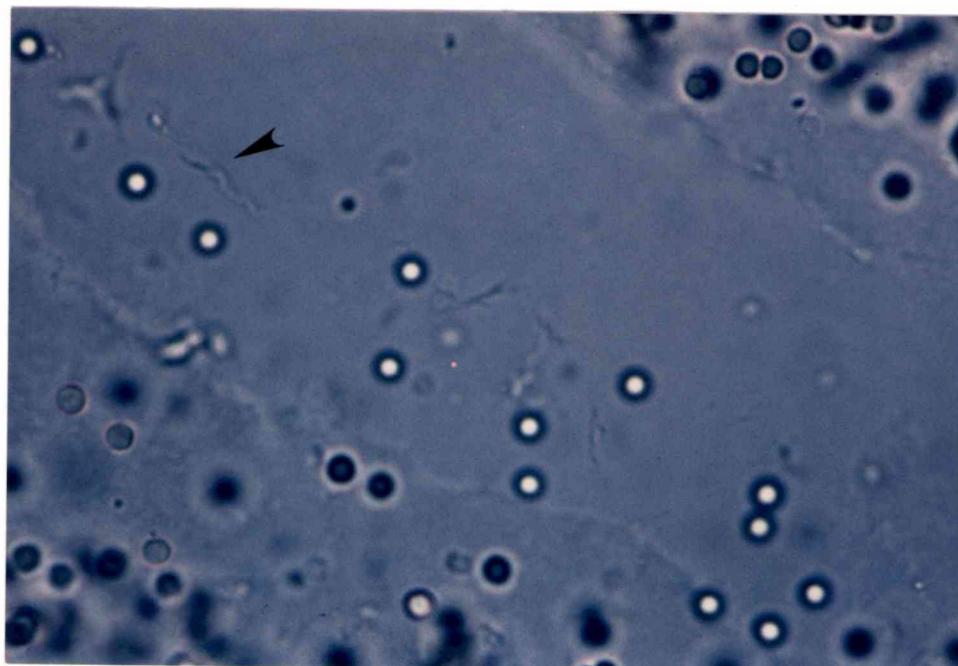


Figura 2



Figura 3:



Objetivo 2

Deteminar la susceptibilidad de diferentes cepas de ratones **SPF** a la inoculación experimental con la cepa bacteriana **Sh** de referencia y con las cepas de **Sh** aisladas de casos de campo de **DP** utilizando estudios clínicos, anatomopatológicos y bacteriológicos.

a. Estudios con la cepa de Sh DJ70

Estudios clínicos: No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de alimento y agua entre los animales inoculados y los testigos. El control de los pesos de los animales testigos y los inoculados no ofreció diferencias siendo el promedio de aumento de peso de 17 g en el transcurso de toda la experiencia (14 días). No se observaron cambios en la consistencia de la materia fecal, excepto en un animal donde se pudo observar materia fecal de aspecto mucoso.

Estudios anatomopatológicos

El análisis de los resultados de los hallazgos macroscópicos clasificados en un rango creciente de severidad de 0 a 3 se expresan en la tabla N° 6. En función de los mismos, su distribución comprendió 2 grupos. El primero con un porcentaje de las lesiones macroscópicas significativamente mayor ($p < 0,05$) estuvo conformado por las cepas C57BL/6J y C57BL/6N (figuras 4 y 5) y el segundo grupo, con lesiones leves, conformado por las cepas Balb/cAnN y Balb/cJ. La mayor significación estadística resultó de la comparación entre las cepas de ratones Balb/cJ vs C57BL/6J.

Tabla N°6 Análisis de las lesiones macroscópicas del ciego en el día 14 post-inoculación

cr	Balb/cAnN	%	Balb/cJ	%	C57BL/6J	%	C57BL/6N	%	Total n
lesión									
0	24	25%	28	29%	20	21%	24	25%	96
1	2	20%	0	0%	6	60%	2	20%	10
2	4	50%	2	25%	2	25%	0	0%	8
3	0	0%	0	0%	2	33%	4	67%	6
	30		30		30		30		120
s	a		a		b		b		

cr: cepa de ratón, n: número de observaciones (120), %: porcentaje de lesiones anatomopatológicas macroscópicas del ciego, dentro de la misma fila con diferente letra, es significativamente diferente ($P < 0,05$).

Figura 4: Cepa de ratón C57BL/6J inoculado con caldo tripticasa soya sacrificado 14 días post-inoculación. Aspecto del ciego de animales controles.

Figura 5: Cepa de ratón C57BL/6J inoculado con *Serpulina hyodysenteriae* sacrificado 14 días post-inoculación. Marcada distensión del ciego. Lesión categorizada como grado 3.

Figura 4:

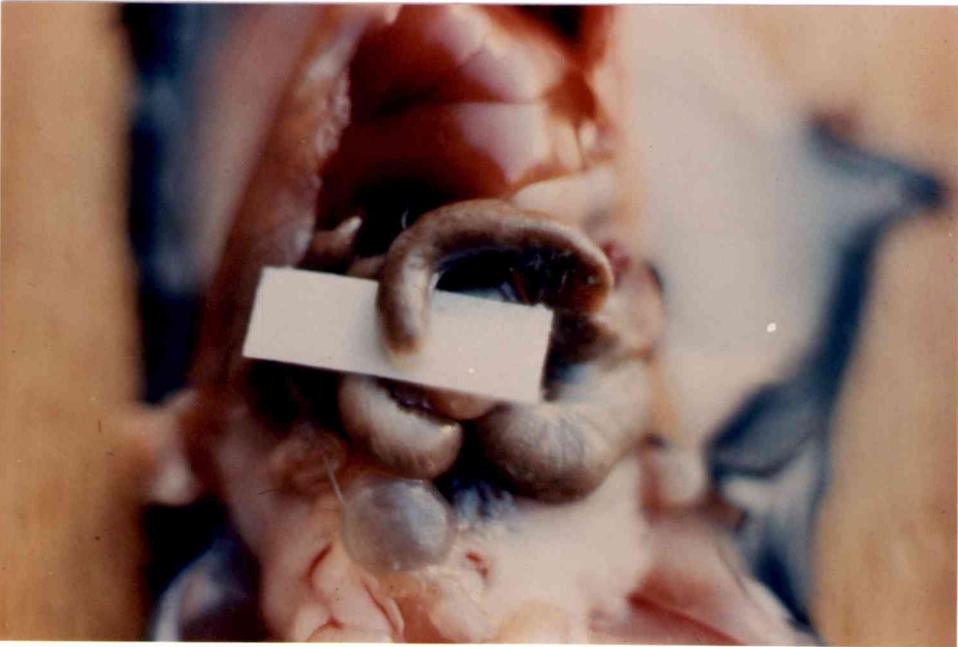


Figura 5:



Los hallazgos microscópicos más importantes se observaron en las cepas C57BL/6J y C57BL/6N y consistieron en infiltración de células inflamatorias mononucleares en la lámina propia, hiperplasia de las células caliciformes de las criptas (figura 6), dilatación de los vasos linfáticos y edema en la submucosa. Cuando la dilatación macroscópica fue muy marcada, las criptas se observaron más cortas, planas y fusionadas (figura 7). En las cepas Balb/c AnN y Balb/c J se consignó: edema e infiltración celular mononuclear en la lámina propia con dilatación del quilífero central. Las células epiteliales se observaron en algunos cortes descamadas hacia la luz (figura 8). En donde persistieron, en el borde de las mismas, se observó la presencia de focos de bacterias en parte adheridas a las mismas y libres (figura 9) hallazgo que no fue observado en los intestinos controles. Desde el punto de vista microscópico, no hubo diferencias significativas en las lesiones observadas, como para cuantificarlas y compararlas por grado de severidad.

Figura 6: Ciego de la cepa de ratón C57BL/6J inoculado con *Serpulina hyodysenteriae*. Cortes transversales de criptas. Se observa aumento de células caliciformes (H&E, 400 X).

Figura 7: Ciego de la cepa de ratón C57BL/6J inoculado con *Serpulina hyodysenteriae*. a) Se observan criptas aplanadas y fusionadas b. Infiltrado celular (H&E, 100 X).

Figura 8: Ciego de la cepa de ratón Balb c/ J inoculado con *Serpulina hyodysenteriae*. a. Dilatación del quilífero central. b. descamación y detritus celulares en la luz. c. infiltración mononuclear. d. agregado linfocitario. (H&E, 100 X)

Figura 9: Ciego de la cepa de ratón Balb c/ AnN inoculado con *Serpulina hyodysenteriae*.

a) Se observan bacterias adheridas al glucocalix de los enterocitos (H&E, 400 X).

Figura 6:

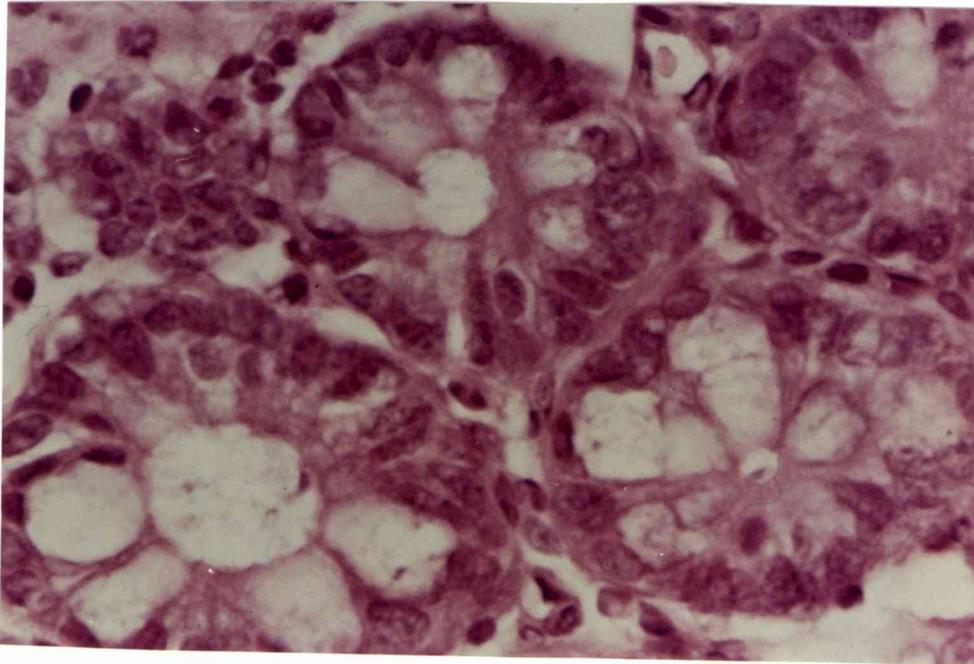


Figura 7:

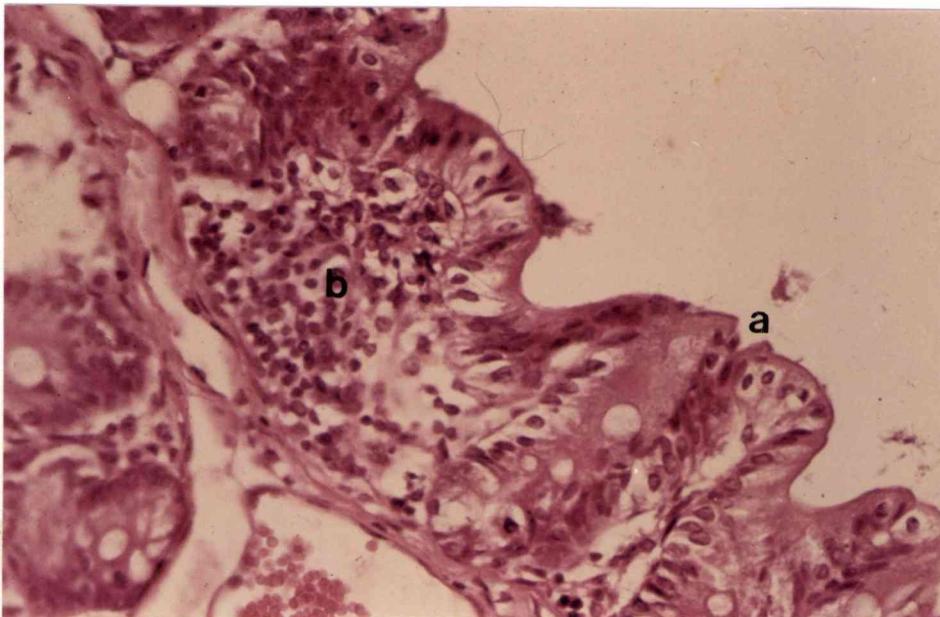


Figura 8:

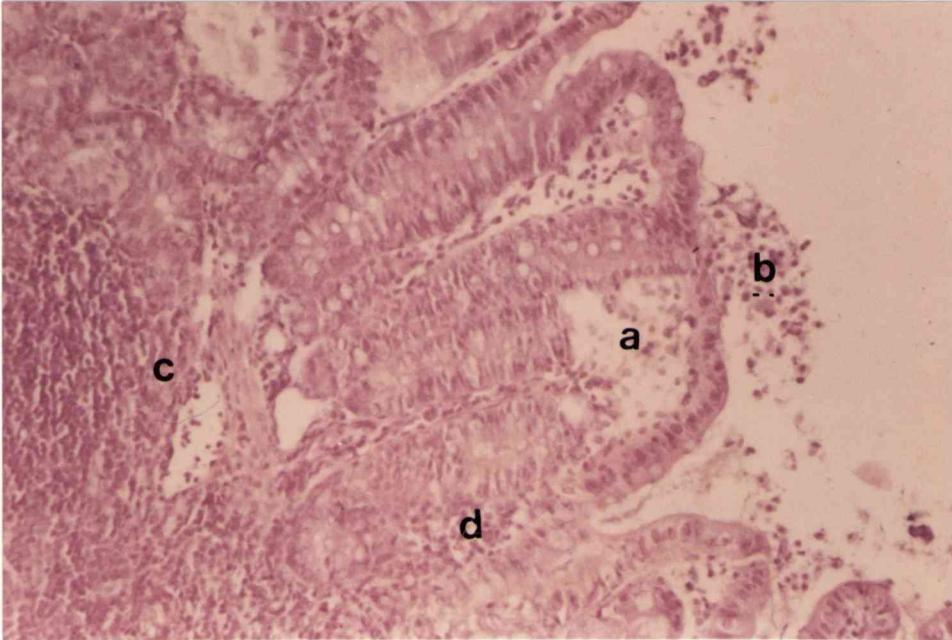
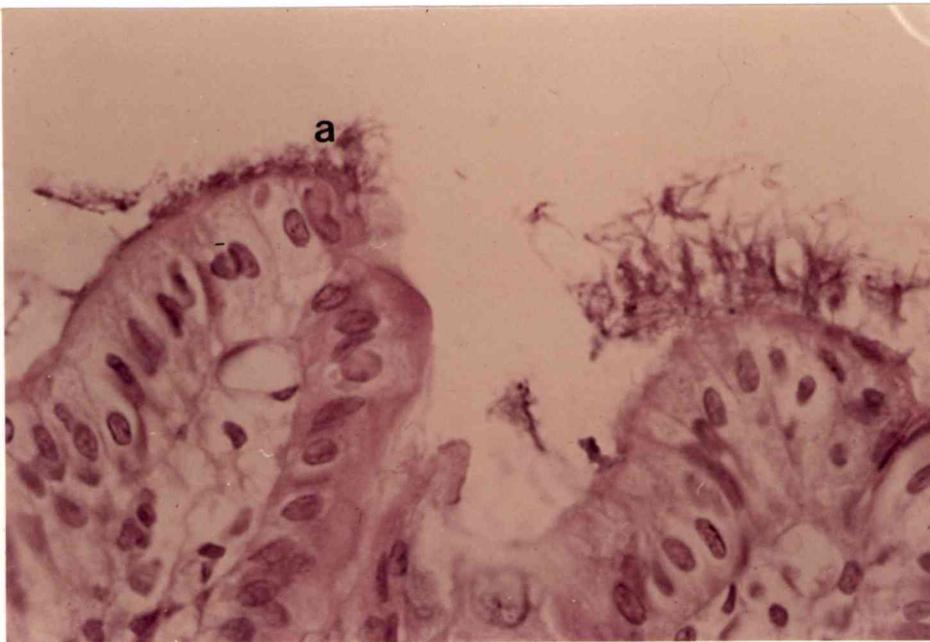


Figura 9:

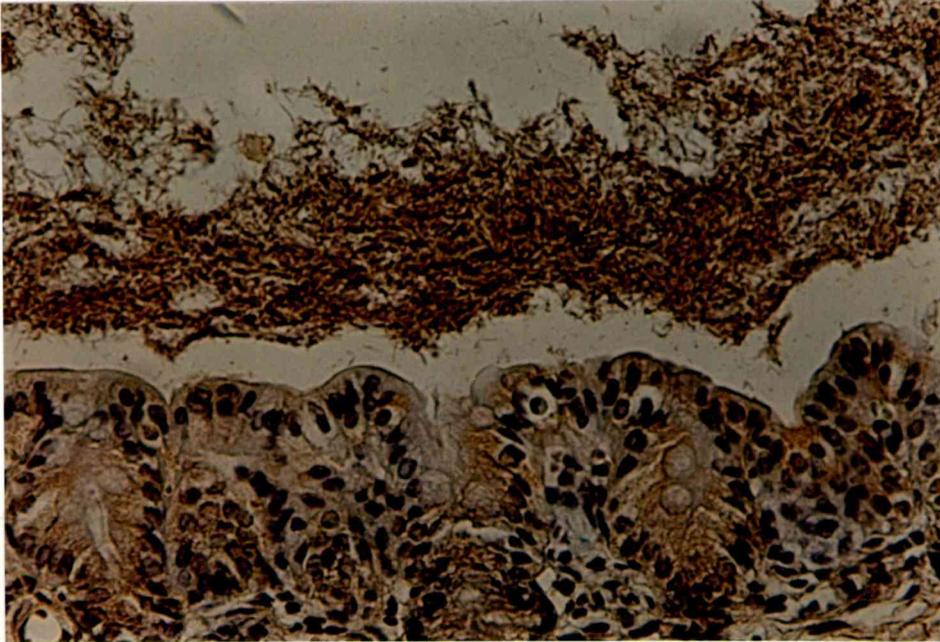


Estudios Inmunohistoquímicos:

La dilución de trabajo óptima del suero primario fue de 1:500. Con el suero anti **S.i.** en dilución 1:100 se observó inmunomarcación inespecífica y con dilución 1:500, el 50 % de las muestras experimentales fueron también positivas. Se consignó reactividad positiva cuando se observaron formas bacilares, alargadas de color amarillo dorado. En los ratones inoculados experimentalmente con **Sh** las bacterias se observaron en la luz del ciego, entre los repliegues de la mucosa o en la luz de las criptas superficiales, en su mayor parte no adheridas o solo parcialmente a los enterocitos (figura 10).

Figura 10: Corte de ciego de ratón, cepa C57BL/6J, con reactividad positiva a *Serpulina hyodysenteriae*. (Técnica de inmunohistoquímica ABC 400 X).

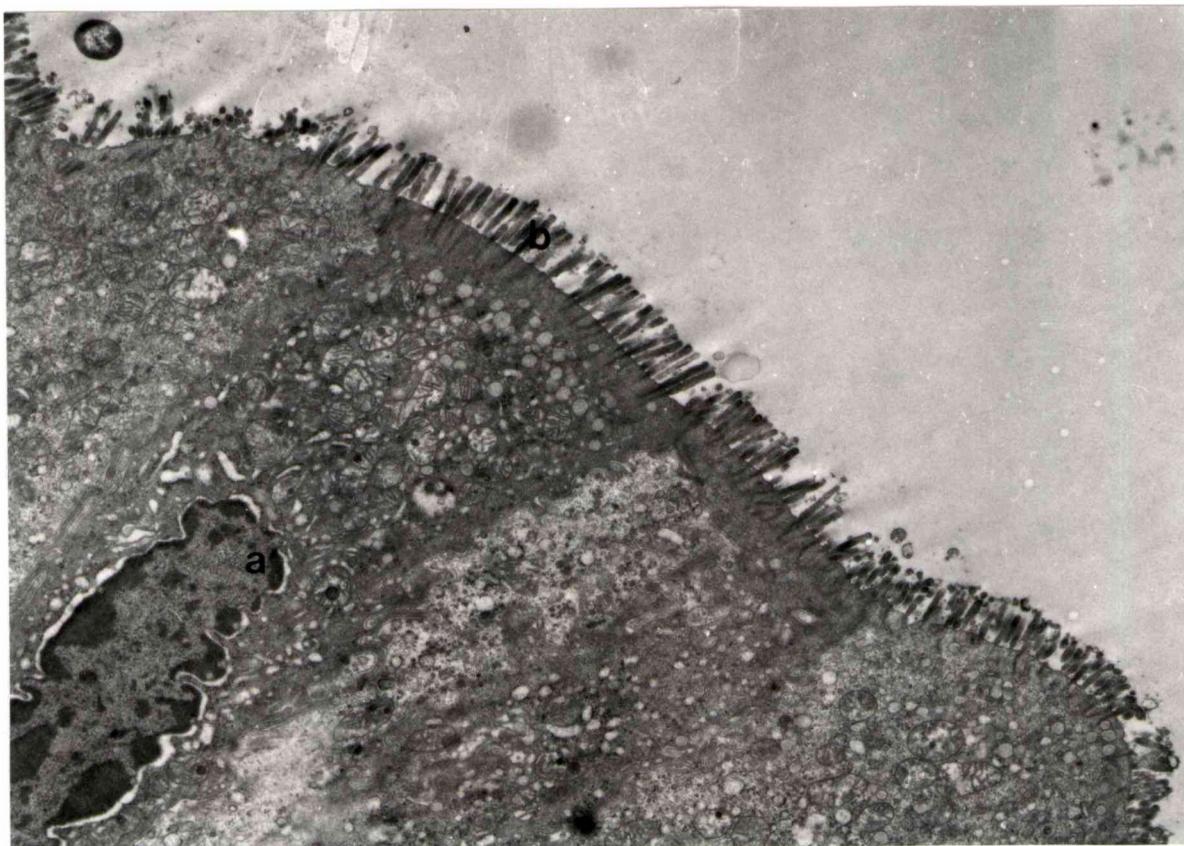
Figura 10:



Estudios Ultramicroscópicos:

En el ciego del ratón control inoculado con caldo **TS**, se observaron enterocitos maduros y escasas células caliciformes. Los primeros se diferenciaron por la presencia de microvellocidades. Tanto en el citoplasma como en el glucocálix no se observaron formas equiparables a bacterias. Así mismo en la luz del intestino tampoco se apreciaron formas bacterianas (figura 11). En las muestras de ciego de ratones C57BL/6J inoculados con la cepa de **Sh DJ70**, se observaron bacterias equiparables morfológicamente a **Sh** cortadas en forma transversa y sagital en vecindad del glucocálix pero no adheridas al microvilli (figuras 12, 13). En el citoplasma de algunos enterocitos se observaron cambios degenerativos y estructuras bacterianas compatibles con el género *Serpulina* (figura 14).

Figura 11:



Micrografía electrónica (X 9200)

Ciego de la cepa de ratón C57BL/6J inoculado con caldo tripticasa soya.

a.- núcleos y citoplasma de enterocitos maduros

b.- microvilli sin cambios y ausencia de bacterias en la luz.

Figura 12:



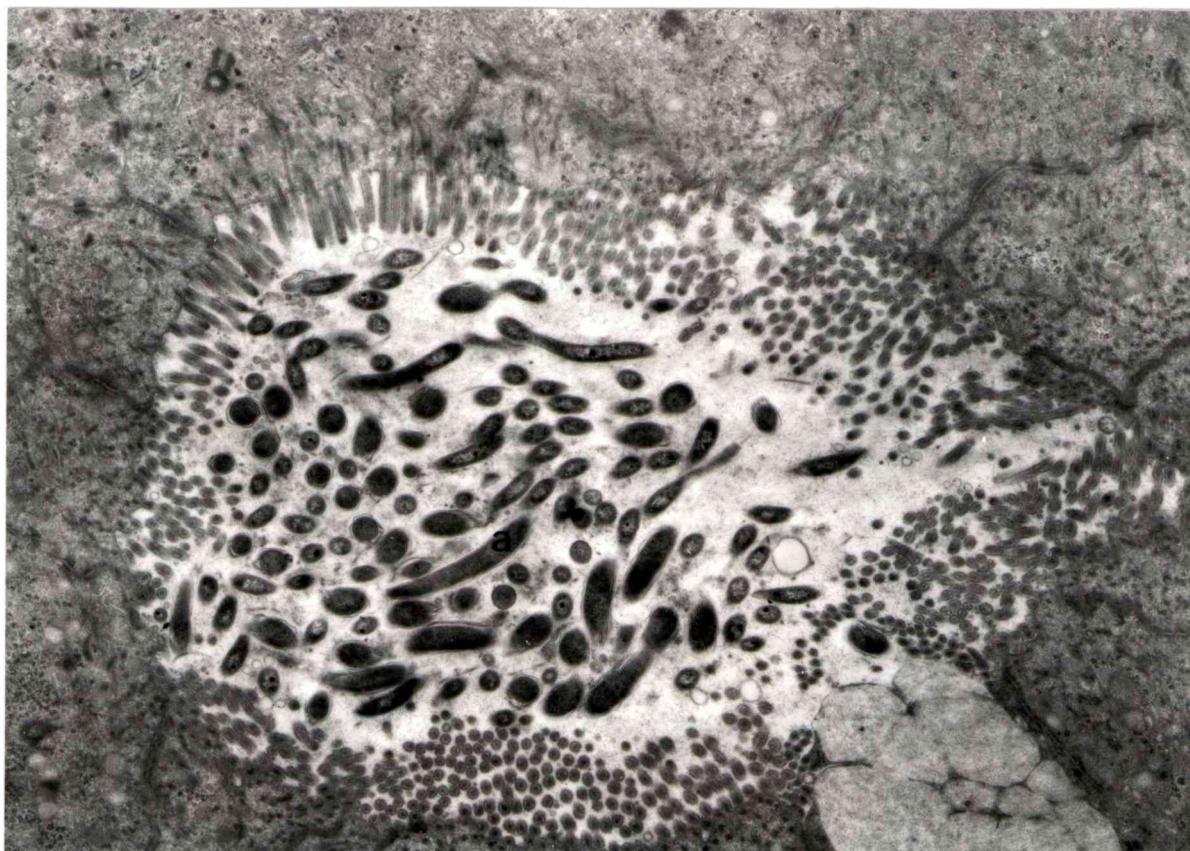
Micrografía electrónica (X 7800).

Ciego de la cepa de ratón C57BL/6J inoculado con *Serpulina hyodysenteriae* cepa DJ70. Animal lesión grado 1.

a) cortes de bacterias morfológicamente equiparables al género *Serpulina* sin contacto directo con el glucocálix.

b) Microvilli de aspecto normal.

Figura 13:

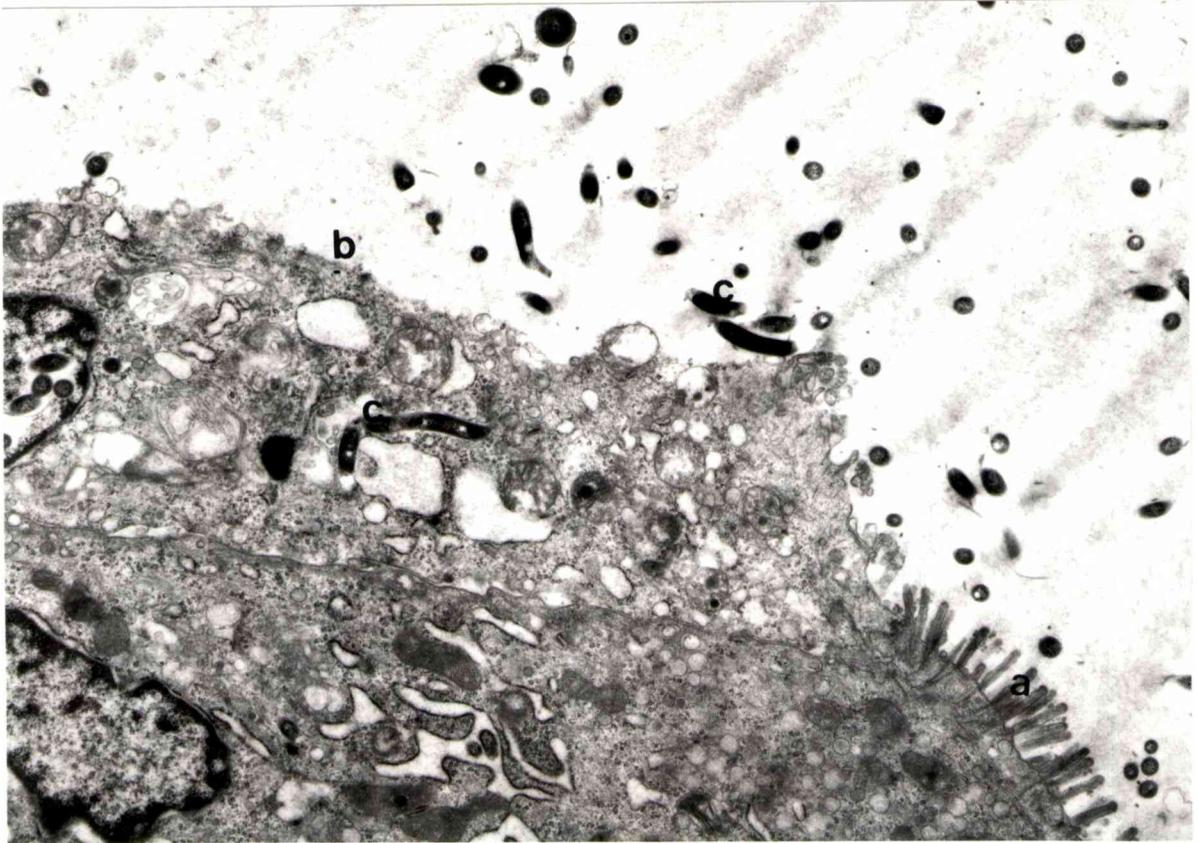


Micrografía electrónica (X 11500)

Ciego de la cepa de ratón C57BL/6J inoculado con *Serpulina hyodysenteriae* cepa DJ70. Animal lesión grado 2.

a.- en la luz y en la vecindad del glucocálix de enterocitos se observan cortes de bacterias morfológicamente equiparables al género *Serpulina*.

Figura 14:



Micrografía electrónica (X 11700)

Ciego de la cepa de ratón C57BL/6J inoculado con *Serpulina hyodysenteriae* cepa DJ70. Animal lesión grado 2.

a) enterocitos con microvilli de aspecto normal

b) enterocitos con pérdida del microvilli.

c) bacterias equiparables a *Serpulina hyodysenteriae* en la luz del intestino y en el interior del citoplasma.

Estudios bacteriológicos

En la tabla N° 7 se consignan los resultados correspondientes a la sumatoria de la excreción de **Sh** en materia fecal por los animales a los 3, 5 y 7 d. p. i. El porcentaje de recuperación de **Sh** aisladas en las heces de los ratones de la cepa C57BL/6J fue significativamente mayor, 46,7 % ($p < 0,05$), que en las otras 3 cepas de ratones endocriados (Balb/cJ 40,0 %; C57BL/6N 36,4% y Balb/cAnN 33,3%).

La tabla N° 8 expresa las medias de las unidades formadoras de colonias (**UFC**) de **Sh** por g de ciego (pared y contenido) a los 14 d.p.i. Las cepas de ratones C57BL/6J y C57BL/6N contenían **S.h** en un número significativamente mayor que la cepa de ratón Balb/cAnN ($p < 0,05$). A su vez, la cepa Balb/cJ excretó **S.h** en un número significativamente menor que las otras 3 cepas de ratones estudiadas ($p < 0,05$).

Tabla N° 7: Análisis de la excreción de Sh en materia fecal, a los 3, 5 y 7 días post inoculación según cepa de ratón utilizada.

Cr	n	A	%	N	s
Balb/cAnN	90	30	33.3%	60	a
Balb/cJ	90	36	40.0%	54	b
C57BL/6J	90	42	46.7%	48	c
C57BL/6N	90	34	37.8%	56	b
Total		142		218	

cr: cepa de ratón, n: número de observaciones (360), s: la excreción de Sh correspondiente a cada cepa de ratón consignado con diferente letra fue significativamente diferente ($P < 0,05$). A: aislamientos positivos, N: aislamientos negativos.

Tabla N° 8 Análisis del conteo de Sh por gramo de ciego*, expresada en media y desvío estándar según la cepa de ratón utilizada

Cr	n	m	ds	s
Balb/cAnN	30	3.09E+08	2.08E+08	a
Balb/cJ	30	2.54E+08	1.76E+08	b
C57BL/6J	30	4.67E+08	2.36E+08	c
C57BL/6N	30	3.91E+08	1.42E+08	C

cr: cepa de ratón, n: número de observaciones (120), m: media: expresada en UFC de Sh por gr de ciego * (contenido y pared) con notación científica. ds: desvío estándar, s: concentración por gramo de ciego de Sh correspondiente a cada ratón consignado. Columna con diferentes letras expresa valores estadísticamente significativos($P < 0,05$).

b.- Estudio con las cepas de Sh aisladas de casos de campo de DP

Estudios clínicos: No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de alimento y agua entre los animales inoculados y los testigos. El control de los pesos de los animales testigos y los inoculados no ofreció diferencias siendo en promedio de aumento de peso de 16 g en el transcurso de toda la experiencia (14 días).

Estudios anatomopatológicos:

Macroscópicos: Las lesiones macroscópicas del ciego se expresan en la tabla N° 9. En el contraste final de cepas de **Sh** la población difirió significativamente entre sí ($p < 0,001$), con un comportamiento especial de la cepa Roque Pérez que no difirió significativamente de la cepa Chascomús. La cepa **S.h DJ70** presentó el mayor porcentaje de lesiones (38,7%)

Las lesiones microscópicas fueron equiparables a aquellas descriptas para la cepa **Sh DJ70**. No hubo diferencias marcadas entre las distintas cepas de campo.

Tabla N°9 Lesiones macroscópicas del ciego de ratones C57BL/6J inoculados con cepas de Sh aisladas de casos de campo de DP y Sh DJ70

Cepas de Sh	media	%	n	S
	0,00	0,00	16*	A
Bolívar	0,50	6,45	8	B
Chascamos	1,12	30,65	17	C
Roque Pérez	1,15	24,19	13	C
DJ70	2,00	38,71	12	D
total	0,94	100,00	66	

media: lesiones anatomopatológicas macroscópicas del ciego

s: medias dentro de la misma columna con diferentes letras difieren significativamente

n: número de animales. * testigos inoculados con caldo TS estéril.

Estudios bacteriológicos:

La tabla N° 10 expresa la descarga en materia fecal de las diferentes cepas de Sh Bolívar, Chascomús Roque Pérez y DJ70 inoculadas en la cepa de ratón susceptible C57BL/6. Las mismas se expresaron como media y porcentaje total (ausencia/presencia de las espiroquetas en las heces) y correspondieron a la sumatoria de los días 3, 5 y 7 p.i. La excreción de las mismas difirió entre sí ($p < 0,001$) con la sola excepción de la cepa Roque Pérez que se colocó entre las cepas Chascomús y DJ70, no presentando diferencias significativas con estas dos

últimas. La mayor y significativa descarga correspondió a la cepa de **S.h DJ70** (32,2%).

Tabla N°10: Descarga en materia fecal de las diferentes cepas de Sh aisladas de casos de campo de DP y ShDJ70 inoculadas en ratones C57BL/6J

cepas de Sh	media	%	n	s
	0,00	0,00	16*	a
Bolivar	2,00	10,74	8	b
Chascomus	2,71	30,87	17	c
Roque Perez	3,00	26,17	13	cd
DJ70	4,00	32,21	12	d
total	2,26	100,00	66	

media: expresado como presencia (1) o ausencia (0) de **Sh** en materia fecal

n: número de animales. . * testigos inoculados con caldo **TS** estéril

s: medias dentro de la misma columna con diferentes letras difieren significativamente

La cantidad de **Sh** por g de ciego (contenido y pared) la expresa la tabla N°11 en media y porcentaje de la población. El comportamiento de las diferentes cepas de **Sh** ante esta variable fue similar a lo expuesto en la tabla anterior. La cepa **Sh DJ70** presentó la mayor concentración de bacterias en el ciego (67,9%)

Tabla N°11: Unidades formadoras de colonias por gramo ciego* expresadas en media y porcentaje, de diferentes cepas de Sh aisladas de casos de campo de DP y Sh DJ70 inoculadas en ratones C57BL/6J.

Cepas de Sh	media	%	n	s
	9,90E+01	0,00	16*	a
Bolívar	2,25E+ 09	7,62	8	b
Chascomús	9,47+08	6,81	17	c
Roque Perez	3,29+09	17,63	13	cd
DJ70	1,3 4+10	67,94	12	d
Total	3,58E+09	100,00	66	

media: expresada en UFC de Sh por gr de ciego * (contenido y pared) con notación científica.

n: número de animales* testigos inoculados con caldo TS estéril

s: medias dentro de la misma columna con diferentes letras difieren significativamente

Objetivo 3: Determinación de la eficacia del **CDX** y de la **TLX** frente a diferentes cepas de **Sh** mediante la prueba "in vitro" de **CIM**

El antimicrobiano "in vitro", más efectivo contra **Sh** fue el **CDX**, siendo el 100% de los aislamientos inhibido a $\leq 0,0018 \mu\text{g/ml}$. La **TLS** mostró una eficacia pobre el 90% de las cepas fueron inhibidas a $16 \mu\text{g/ml}$.

Los resultados de la **CIM** de las muestras procesadas se expresan en la tabla N°12

Tabla N° 12: Susceptibilidad de distintas cepas de Sh frente a carbadox y tilosina. Valores de CIM expresados en $\mu\text{g/ml}$

Antimicrobianos	Rango	CMI
CDX	0,0018	< 0,0018
TLS	1-16	> 16

Determinación "In vivo" de la sensibilidad de la cepa Sh DJ70 frente al CDX y la TLS mediante el modelo experimental murino

Los resultados de los estudios bacteriológicos observados en los ratones de la cepa **C57BL/6J** infectados con **Sh DJ70** y tratados con **CDX** y **TLS** se expresan en la tabla N°13. La misma muestra la excreción de **Sh** en materia fecal después de la administración de ambas drogas. Antes de la administración de las diferentes dosis

no hubo diferencias significativas en la descarga de **Sh** en las heces. Después de la administración de las drogas el comportamiento fue el siguiente:

CDX: En el contraste de dosis se formaron 3 grupos significativamente diferentes. Un primer grupo (**a**) que comprendió los ratones inoculados con la dosis 4mg/kg y 8mg/kg, cuyo promedio de excreción fue 0. Le siguió el grupo **b** correspondiente a la dosis 2 mg/kg con promedio 1 de excreción y por último en tercer grupo (**c**) formado por las dosis 0 y 1 mg/kg con un intervalo de medias de 1,33 a 1,40 ($p < 0,001$).

TLX: Para este macrólido, el agrupamiento de medias arrojó 2 grupos significativamente diferentes, el (**a**) correspondiente a 0 dosis y el grupo (**b**) donde las diferentes dosis desde 1mg/k hasta 4mg/kg no difirieron entre sí con respecto a la descarga de **Sh** en materia fecal ($p < 0,001$).

Tabla N° 13: Descarga de Sh DJ70 en materia fecal en ratones de la cepa C57BL/6J después del tratamiento con diferentes dosis de carbadox y tilosina

Tratamiento	datos	Dosis					
		0	1	2	3	4	8
Carbadox	media	1,33	1,40	1,00		0,00	0,00
	n	3	5	4		3	3
Tilosina	s	c	c	b		a	a
	media	1,50	0,00	0,00	0,00	0,17	
	n	8	4	4	4	12	
	s	A	b	b	b	b	

tratamiento: diferentes dosis administradas expresadas en mg/kg de peso

dosis: expresadas en mg/kg de peso.

media: expresado como presencia (1) o ausencia (0) de Sh en materia fecal

n: número de animales

s: medias dentro de la misma fila con diferente letra difieren significativamente (0,05)

En la misma experiencia, cuando se realizó el conteo de UFC de Sh por g de ciego al 14 d.p.I, el análisis de agrupamiento de las medias para el CDX reveló 5 grupos que difirieron significativamente entre sí. Los resultados se expresan en la tabla N° 14. El grupo *a* y el grupo *e* correspondieron a la dosis 0 y 8 mg/kg con la mayor y menor cantidad de UFC de Sh por g de ciego respectivamente. Los grupos *b*, *c* y *d* constituyeron rangos intermedios con diferente distribución.

En el estudio cuando se administró TLX surgió un grupo **a** correspondiente a la dosis 0 y significativamente mayor que el grupo **b** que correspondió a las dosis 1mg/kg, 2mg/kg, 3mg/kg y 4 mg/kg, no existiendo diferencias dentro del grupo de tratados con respecto al control (0)

Tabla N° 14: UFC de Sh DJ 70 por gramo de ciego * de ratones C57BL/6J tratados con diferentes dosis de carbadox y tilosina en el día 14 post-inoculación

Tratamiento	Dosis	Media	n	s
Carbadox	0	2,49E+ 09	3	a
	1	3,23E+08	5	b
	2	7,63E+06	4	c
	4	5,13E+04	3	d
	8	1,90E+00	3	e
Tilosina	0	3,00E+04	8	a
	1	5,01E+02	4	b
	2	5,00E+03	4	b
	3	6,40E+03	5	b
	4	8,33E+03	12	b

* contenido y pared

tratamiento: drogas administradas por vía oral a los animales

dosis: expresadas en mg/kg de peso

media: expresada en UFC de Sh por gr de ciego con notación científica. n: número de animales. s: medias dentro de la misma columna con diferentes letras difieren significativamente

Los resultados de las lesiones anatomopatológicas macroscópicas del ciego clasificadas en cuatro grados (0 sin lesiones aparentes, 1 leve, 2 moderada y 3 severa) luego del tratamiento con **CDX** y **TLS** en el día 7 p.i de **Sh** se expresan en la tabla N° 15. Para el **CDX**, los grupos difirieron significativamente entre sí, excepto los correspondientes al grupo de dosis 2mg/kg y 4mg/kg que no lo hicieron entre sí. La mayor media registrada de las lesiones anatomopatológicas macroscópicas se observó con dosis 0 mg/kg y la menor con la dosis 8mg/kg ($p \leq 0,01$).

Para la **TLS** se formaron 3 grupos significativamente diferentes: el grupo **a** correspondiente a las dosis 3 y 4 mg/kg con medias de lesiones anatomopatológicas menores, el grupo **b** correspondiente a las dosis 1y 2 mg/kg de lesiones intermedias y el grupo **c** (testigo), con mayores lesiones, con una media de 1,88 ($p < 0,001$)

Tabla 15: Lesiones macroscópicas del ciego al 14 d.p.i después del tratamiento con carbadox y tilosina.

Tratamiento	Dosis	Media	n	s
Carbadox	0	2,00	3	d
	1	1,00	5	c
	2	0,75	4	b
	4	0,67	3	b
	8	0,00	3	a
Tratamiento	Dosis	Media	n	s
Tilosina	0	1,88	8	c
	1	1,25	4	b
	2	1,00	4	b
	3	0,20	5	a
	4	0,17	12	a

tratamiento: drogas administradas por vía oral a los animales

dosis: expresadas en mg/kg de peso

media: lesiones anatomopatológicas macroscópicas del ciego

n: número de animales

s: medias dentro de la misma columna con diferentes letras difieren significativamente

DISCUSSION

Sobre la base de los resultados de los estudios bacteriológicos, excreción de **Sh** en materia fecal y **UFC** por **g** de ciego, y por los hallazgos anatomopatológicos macroscópicos, la cepa de ratón C57BL/6J demostró ser la más susceptible a la inoculación experimental de **Sh**, exhibiendo las cepas C57BL/6N, Balb/cJ y Balb/c AnN menor susceptibilidad. Dentro de los parámetros establecidos para definirlo, los resultados de la colonización del ciego por **Sh** y los hallazgos macroscópicos, en este estudio fueron equiparables a los obtenidos por Nibbelink y Wannemuehler (52), con la cepa de ratón C3H/HeN, en su ensayo, la más susceptible. Otras cepas de ratones que han demostrado ser susceptibles son la CF#1 (38) y la cepa ICR (1).

En el estudio realizado con las 4 cepas de ratones, no se consignaron signos clínicos compatibles con los de la **DP** y/o con un cuadro entérico, a diferencia de lo observado por Joens y Gloock (38), con la cepa CF#1 quienes consignaron heces mucoides en el 68 % de los animales inoculados con 2 dosis consecutivas. Ello se debería en parte, al hecho de que en el ratón a diferencia de lo que ocurre en el cerdo, las lesiones están localizadas solo a nivel del ciego, por lo que los trastornos fisiopatológicos que allí se producen como por ejemplo, falla en la reabsorción de agua, podrían compensarse a nivel del colon distal en el cual no se observan cambios (51). Sin embargo, en concordancia con otros autores (1, 51, 52, 63), una sola dosis de 10^7 UFC/ml de **Sh** fue suficiente para observar cambios macroscópicos y lesiones microscópicas en el ciego. Los primeros se caracterizaron por distensión por mucus y/o gas del órgano, adelgazamiento de sus paredes y remarcación de los vasos

sanguíneos. Otros autores describieron tifitis catarral y hemorragias del ciego (38, 39) no observadas en este estudio.

Las lesiones microscópicas se caracterizaron por hiperplasia de las células caliciformes, edema e infiltración de células mononucleares en la lámina propia con dilatación del quilífero central. En la luz del ciego, se observaron masas compactas de bacterias en parte libres y en parte adheridas a las células epiteliales de las criptas. Con la coloración de **W. S**, se observaron bacterias en el glucocálix de los enterocitos. Los resultados de los estudios histopatológicos obtenidos por otros autores, describen edema, hiperemia con dilatación de las criptas en donde se observaron **Sh** así como cierto grado de erosión, necrosis y descamación epitelial (38, 63). En la cepa de ratón ICR, Adachi y col. (1) constataron erosión, necrosis y descamación epitelial, hiperplasia de las células caliciformes con numerosas figuras mitóticas e infiltración de la lámina propia por células plasmáticas y células acidófilas y en la cepa C3H/HeN neutrófilos (52).

A diferencia de lo que ocurre en la **DP**, no se consignó en el trabajo realizado necrosis coagulativa superficial de la mucosa ni exudado fibrinonecrótico (38, 26). Sin embargo, se ha sugerido que el aumento de la media porcentual del índice mitótico sin una correlación significativa en la relación enterocitos/células caliciformes observado a los 14 **d.p.i** en ratones podría deberse a un recambio acelerado de las células epiteliales como resultante de la degeneración y necrosis celular (51).

Las lesiones ultraestructurales observadas a nivel de las células epiteliales fueron mínimas y guardaron relación con los hallazgos microscópicos. En el cerdo se ha

consignado, separación entre las células localizadas a nivel de las criptas, necrosis y descamación hacia la luz. Las espiroquetas en gran número se observaron libres en la luz, en vecindad de las células necróticas así como también en su interior. No se observaron cambios a nivel del microvilli aún en células con bacterias en su interior.

(2). Estos hallazgos, concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, ausencia de signos clínicos de diarrea, asociado con lesiones mínimas en los enterocitos y la presencia de bacterias tanto en el interior como en la luz del intestino.

Las diferencias en la susceptibilidad a la infección por **Sh** entre las distintas cepas de ratones observadas por otros autores y confirmadas en este estudio, estarían ligadas a factores intrínsecos y extrínsecos. Dentro de los primeros, se debería de considerar al origen genético de las cepas (52), laboratorio de origen de las colonias utilizadas y flora bacteriana normal del intestino (34). Los factores extrínsecos estarían relacionados al diseño experimental como por ej. número de inoculaciones, serotipos de **Sh** utilizadas así como a la duración de la experiencia.

En el estudio realizado, los hallazgos histopatológicos no guardaron relación con la categorización utilizada macroscópicamente, así como no se apreciaron en forma constante, diferencias histopatológicas marcadas entre las distintas cepas de ratones utilizadas. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores y con otras cepas de ratones. Solo Adachi y col. , 1992, Joens y Glock, 1979 y Suenaga y Yamazaki, 1984 (1, 38, 63) constataron necrosis, descamación y denudación del epitelio del ciego equiparables a las observadas en el intestino del cerdo.

La información referente a la patogénesis de la infección por **Sh** en el ratón resulta en parte de la extrapolación de aquella estudiada en el cerdo. La infección por **Sh** en el cerdo es una infección de superficie. La bacteria por medio de sus flagelos y la presencia de factores quimiotácticos en el mucus, es muy eficiente en su movilidad a través del mismo, permitiéndole invadir rápidamente las criptas, favoreciendo su penetración en los enterocitos y células caliciformes (49). No se requirió daño previo para la colonización y está en discusión la acción concomitante de otras bacterias para iniciar la infección, en particular anaerobios (23, 30). La administración de estreptomina 7 días previos a la inoculación de **Sh** para reducir la flora anaeróbica no afectó la colonización, distribución y severidad de las lesiones observadas en ratones C3H/HeN (52). Como ocurre con otras infecciones de superficie, la presencia de radicales de hidratos de carbono, en particular ácido siálico, tanto en las mucinas de secreción como en las mucinas membrano-asocidas favorecería su adherencia al mucus y la persistencia de la **Sh** en vecindad de la célula epitelial (7). Mediante experiencias con cepas mutantes de **Sh** privadas de hemolisina así como con cepas de ratones cuya susceptibilidad fue independiente del gen que controla la sensibilidad del huésped hacia el lípido A, principal componente tóxico de los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas, se comprobó que la lesión en las células epiteliales como en aquellas situadas en la lámina propia se debería a la acción combinada de la hemolisina y de sustancias con actividad endotóxica (antígeno 14-19 kDa) (73). Sin embargo en el cerdo, el mecanismo patogénico de la diarrea inducida por **Sh** diferiría del producido por bacterias Gram negativas enteropatógenas ya que en éstas últimas

hay un aumento del AMP cíclico en la mucosa colónica o cecal no observada en la DP. En las infecciones por enterobacterias, particularmente *Escherichia coli*, los hallazgos microscópicos más significativos son la adherencia a las células epiteliales y la dilatación del quilífero central (14). En el estudio realizado, la adherencia de **Sh** fue inconstante, no así la dilatación de los vasos linfáticos, sin aumento de la fluidez de las heces.

Las cepas de **Sh** aisladas de muestras de campo, no mostraron mayor poder patógeno que la cepa de referencia **Sh DJ70** a pesar de pertenecer al mismo grupo cuando se las clasificó serológicamente. Las referencias bibliográficas, citan diferencias en la patogenicidad entre especies dentro del género *Serpulina*. Kynyon (40) correlacionó la enteropatogenicidad de 25 aislamientos de **Sh** β hemolíticas fuertes aislados a campo y 13 β hemolíticas débiles en cerdos, comprobando que las primeras eran patógenas. Mas recientemente Trott y col. (69) evaluaron un modelo experimental en pollos **SPF** de un día de vida para discriminar entre las especies de *Serpulinas* patógenas y no patógenas aisladas de diferentes especies animales. Este trabajo constituye una de las primeras experiencias de evaluación de la patogenicidad de diferentes cepas de la misma especie de **Sh** utilizando como modelo experimental el ratón.

Aunque las propiedades farmacocinéticas del carbadox hacen de ésta, una droga inapropiada para el tratamiento de la DP (19), en nuestro país es una de las más utilizadas como promotora de crecimiento y para el tratamiento de la DP.

La utilización del **CDX** está cuestionada por sus efectos tóxicos y sus propiedades carcinogénicas. La toxicidad del **CDX**, fue reproducida experimentalmente usando dosis de 159 mg/kg, observándose con ella como principal efecto tóxico hiperaldosteronismo asociado a la destrucción de la zona glomerular (57). El efecto de altos niveles de **CDX** en la performance reproductiva fue estudiado por Shultz y col. (58) quienes no hallaron diferencias entre los grupos tratados y controles.

En algunos países de la Comunidad Europea se lo sigue utilizando, si bien el Registro Federal de Estados Unidos de Norteamérica (FDA, USA 1972) (15) recomienda su retiro a las 10 semanas previas a la faena y las autoridades de la entidad de regulación de alimentos de Alemania (Dutch Feed Regulations, 1986) (71) a las 4 semanas así como su prohibición de suministro en cerdos de más de 4 meses de edad.

En los estudios realizados "in vivo", el **CDX** en dosis de 8mg/kg en la cepa de ratón C57BL/6J, fue capaz de inhibir la excreción de **Sh** por materia fecal así como detener la multiplicación bacteriana en el ciego, órgano éste, donde los animales utilizados no mostraron lesiones anatomopatológicas macroscópicas ni microscópicas.

El 100% de los aislamientos de cepas de campo así como la cepa de referencia **Sh DJ70** fueron sensibles al **CDX** con valores in vitro de **CIM** de $\leq 0,0018$ ug/ml.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por Molnár en Hungría (50) quien en un estudio de 332 cepas de **Sh** todas fueron sensibles al carbadox con **CIM** de $0,005\mu\text{g/ml}$. La actividad in vivo fue similar a la obtenida por Hayashi quien obtuvo un efecto terapéutico del **CDX** en dosis de 5mg/kg con límites de 2,4mg/kg y 8,7 mg/kg.

La **TLX**, se usa en el tratamiento de la **DP** desde 1969. En la década del 70 fue uno de los antibióticos más efectivos. Su uso continuo a dosis inadecuadas originó la resistencia a este macrólido. (6, 66). Los estudios "in vivo", lo citan como preventivo de la **DP** en dosis de 55 a 100 mg/kg en el alimento asociado a un valor de **CIM** de 0,25-16ug/ml (**CIM90** de 12,5 ug/ml) (35).

Cuando los ratones fueron tratados con **TLX**, no pudieron eliminar por completo las bacterias en el ciego (contenido y pared) y se registraron lesiones anatomopatológicas macroscópicas en el mismo (media 0,17). Su actividad "in vitro" mostró una eficacia pobre (el 90% de las cepas fueron inhibidas a altas concentraciones, 16 µg/ml.)

Los resultados de los estudios "in vitro" como "in vivo" demostraron que el **CDX** fue la droga más efectiva para la inhibición del crecimiento, la excreción y el control de la colonización de **Sh** en el ciego siendo los valores estadísticamente significativos cuando se los contrapuso con la **TLX**. El modelo murino de infección por **Sh**, desarrollado para la evaluación "in vivo" de quimioterapéuticos resultó ser sensible, práctico y adecuado a los objetivos propuestos.

CONCLUSIONES

Se concluye que:

a.- Las 22 cepas de **Sh** aisladas de casos de campo de **DP** fueron β hemolíticas fuertes y correspondieron al serotipo 8.

b.- De los parámetros utilizados, la excreción de **Sh** a los 3, 5, y 7 d.p.i., las **UFC** por g de ciego y los hallazgos macroscópicos en ciego fueron los más adecuados para precisar la cepa de ratón más susceptible a ésta bacteria.

c. La cepa de ratón C57BL/6J, fue la más susceptible de las 4 utilizadas si bien no reprodujo los signos clínicos de la enfermedad como así tampoco las lesiones anatomopatológicas microscópicas de la **DP**.

d. Las cepas de **Sh** aisladas de casos de campo de **DP** y con poder patógeno en la especie naturalmente susceptible, expresaron pobremente su patogenicidad en el modelo murino C57BL/6J, obteniéndose los mejores resultados con la cepa de referencia **DJ 70** de **Sh**

e.- El **CDX** fue la droga más efectiva para la inhibición del crecimiento, la excreción y el control de la colonización de **Sh** en el ciego de ratón, siendo los valores estadísticamente significativos cuando se los contrapuso con los de la **TLX**.

*f.- La cepa de ratón C57BL/6J fué un modelo de laboratorio válido para el estudio de la infección de **Sh** y para su aplicación en estudios "in vivo" de antibióticos y quimioterápicos.*

BIBLIOGRAFIA

1. ADACHI, Y.; T. ANJIKI; K. KADOTA; K. HIRANO. (1992) Experimental infection of spectomycin-treated ICR-mice with *Serpulina hyodysenteriae*. Proceedings 12th. IPVS. Congress. Netherlands, pp.279.
2. ALBASSAM, M.A.; OLANDER, H.J.; THACKER, H. L. TUREK, J.J. (1985) Ultrastructural Characterization of Colonic Lesions in Pigs Inoculated with *Treponema hyodysenteriae*. Can. J. Comp. Med. 49: 384-389.
3. ALEXANDER, T. J. L; TAYLOR, D. J. (1969) The clinical signs, diagnosis and control of swine dysentery. Vet. Rec. 85: 59-63
4. BAUM, D.H.; JOENS, L. A. (1979) Serotypes of beta- hemolytic *Treponema hyodysenteriae*. Immfect. Immun. 25: 792-796.
5. BECKMAN,G.; AMTSBERG, G. (1990) Lektinaagglutinationen zur charakterisierung von intestinalen Treponemenisolaten verschiedener Tierspezies. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 103: 266-273.
6. BINEK, M.; WOJCIK, U.; SZYNKIEWICZZ, JAKUBOWSKI T. (1994) Dynamics of susceptibility of *Serpulina hyodysenteriae* to different chemotherapeuticcs in-vitro. Procceding 13th. IPVS. Congress. Bangkok, pp.203.
- 7 BOWDEN, C. A.; JOENS, L. A.; KELLEY, L. M. (1989) Characterization of the attachment of *Treponema hyodysenteriae* to henle intestinal cells in vitro. Am. J. Vet. Res. 50: 1481-1485.
8. CARBON, C.; J. (1991) Animal Models and clinical use of antibiotics. Newsletter of the Infectious Disease Council. 1: 4-7.

9. DIARRA, A. T.; MITTAL, K. R.; ACHACHA, M. (1995) Evaluation of different serological test for detection of antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* in pig sera. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 18:215-221
10. DONNELLY, H. (1995) Quality in laboratory animals. En: Tuffery, A, A.(ed): *Laboratory Animals. An introduction for experimenters. Second Edition.* JohnWiley & Sons. New York, Toronto. P.181.
11. DOORNENBAL, H. (1965) Tylosin as a treatment of vibronic dysentery in swine. *Comparative Medicine and Veterinary Science.* 29: 179-182.
12. EDWARDS, D.L. (1993) Nitroimidazole drugs action and resistance mechanism. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 9-20.
13. FALCONER, D. S. (1976). Genetic aspects of breeding methods. En: Hume, C. W. (ed): *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals.* 5th UFAW, Churchill Livingstone. Edinburgh, London and New York. P. 7-26
14. FAIRBROTHER, J. M. (1992) Enteric colibacillosis. In *Disease of swine.* 7th Edition. Edited by Leman A. D; Straw, B. E.; Mengeling W. L.; D'Alleire, S.; Taylor, D. J. Iowa State University Press. Ames Iowa USA.
15. FDA, 1972, *Federal Register*, 37 (192) 20683-20685 (Oct.3).
16. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, and rabbit experimental units. (1996) Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Association. Working Group on Animal Health accepted by the FELASA board of management. *Laboratory Animals* 30: 193-208

17. FELLSTROM, C. (1995) Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Research in Veterinary Science*. 59:1-4.
18. FELLSTROM, C. (1995) Phylogeny of *Serpulina* based on sequence analyses of the 16S rRNA gene and comparison with a scheme involving biochemical classification. *Research of veterinary Science* 59:5-9.
19. FELLSTROM, C.; GUNNARSON, G.; HOLMSTROM, A.; FRANKLIN. (1996). In vitro activity of 7 antibacterials against 4 phenotypical variants of *Serpulina* species. *Proceedings of the 14th IPVS Congress Bologna, Italy 7-10 de julio*. P-292.
20. FELLSTROM, C.; PETERSON, B.; THOMSON, J.; GUNNARSSON, A.; PERSSON, M.; JOHANSSON, K. E. (1997) Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35: 462-467.
21. HAMSON, D. J. (1991) Slide agglutination for rapid serological typing of *Treponema hyodysenteriae*. *Epidemiol. Infect.* 106: 541-547
22. HAMSON, D.J. (1998) Evaluation of day-old specific pathogen-free chicks as an experimental animal model for pathogenicity testing of intestinal spirochete species. *J. Comp. Pathol.* 118: 365-381.
23. HAMSON, D. J.; GLOCK, R.D.; CHISTENSEN, C. R.; KINYON, J.M. (1972) Swine dysentery. I. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 67:61-64

24. HAMPSON, D.H.; MALTAS, C. D.; STEPHES, C.P.; MC KECHNIE, K.; BULLER, N. B. (1994) Serogroups of Australian isolates of *Serpulina hyodysenteriae*. Australian Veterinary Journal. 71: 347.
25. HARRIS, D. L.; R. J. LYSONS (1992) Swine dysentery. En: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; Dáltaire, S.; S.; Taylor, D.J. (eds): Disease of Swine 7th ed. The Iowa State University Press, Ames Iowa USA, pp. 599-626.
26. HARRIS, D. L.; KINYON J.M.; MULLIN M.T; GLOCK, R.D. (1972) Isolation and propagation of spirochetes from the colon of swine dysentery affected pigs. Can. J. Comp. Med. 36: 74-76.
27. HARRIS, D. L.; ALEXANDER, J. L.; WHIPPS, S. C.; ROBINSON, I. M.; GLOCK, R. D.; MATHEWS, P.J. (1978) Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus* and *Fusobacterium necrophorum*. J. Am.Vet. Assoc. 172: 468-471
28. HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. (1982) A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Analytical Biochemistry. 119:142-147.
29. HAYASHI, T.; SUENAGA, I.; NARUKAWA, N.; YAMAZAKI, T. (1988) In vitro activities of sedecamicyn against *Treponema hyodysenteriae*. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 32: 458-461.
30. HAYASHI, T.; SUENAGA, I. KOMEDA T.; YAMAZAKI, T. (1990) Role of *Bacteroides uniformis* in susceptibility of Ta: CF#1 mice to infection by *Treponema hyodysenteriae*. Zbl.Bakt. 274: 118-125.

31. HUGUES, R.; OLANDER, H.; J and WILLIAMS, C.; B. (1978). Swine Dysentery: pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. Am.J.Vet.Res. 36:971-978.
32. HUMME, A.; HYATT, D. R.; JOENS, L.; DE REA, J. M. (1994) Development of a swine dysentery vaccine based on a *Serpulina hyodysenteriae* tlyA-deletion mutant. Proc. IPVS 13th, 150.
33. HUNTER, D.; WOOD, T. (1979) An evaluation of the API-ZIM system as a means of classifying spirochaetes associated with swine dysentery. Vet. Rec. 104: 383-384
34. ITOH, K.; T. MITSUOKA; K. SUDO; K. SUZUKI (1983) Comparison of fecal flora of mice based upon different strains and different housing conditions. Z. Versuchstierk. 25: 135-146.
35. JACKS, T. M.; JUDITH, F. R., FEIGHNER, S. D.; LIKOFF, R. O. (1986) 3-acetyl-4"isovaleryl tylosin for prevention of swine dysentery. Am. J. Res. 47: 2325-2328.
36. JENKINSON, S. R.; C. R. WINGAR (1981) Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. Vet. Resc. 109: 384-385
37. JOENS, L.; A. GLENN SONGER J.; HARRIS, D.L.; GLOCK, R.D. (1978) Experimental infection with *Treponema hyodysenteriae* in guinea pigs. Infection and Immunity. 22: 132-135.
38. JOENS, L.A.; GLOCK R.D. (1979). Experimental Infection in mice with *Treponema hyodysenteriae*. Infection and Immunity. 25: 757-760.
39. JOENS, L. A.; I. M. ROBINSON; R.D.GLOCK; P.J. MATTHEWS. (1981) Production of lesions in gnotobiotic mice by inoculation with *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. 31: 504-506.

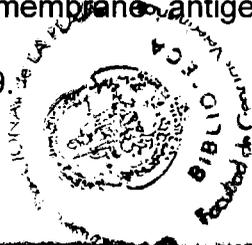
40. KINYON, J.M.; HARRIS D.L.; GLOCK, R.D. (1977) Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. Infection and Immunity. 15: 638-646.
41. KINYON, J.M.; HARRIS D.L. (1979) *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae* Harris et al. International Journal of Systematic Bacteriology. 29: 102-109.
42. LEE, J. E.; HAMPSON, D. J. (1994). Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. J.Med.Microbiol.40: 365-371
43. LEE, B. J.; HAMPSON, D. J. (1996) Production and characterisation of a monoclonal Antibody to *Serpulina hyodysenteriae*. FEMS Microbiology Letters. 139: 193-197
44. LI, Z.; BELANGER, M.; JACQUES, M. (1991) Serotyping of Canadian isolates of *Treponema hyodysenteriae* and description of two new serotype. J.Clin.Microbiol.29: 2794-2797.
45. LISON, L.. (1976) Estadística aplicada a la biología experimental. 1ra. Edición. Editorial EUDEBA. Buenos Aires. P.357.
46. LIZASOAIN, L.; JOARITI, L. (1995) SPSS para Windows, versión 6.0 1ra Edición Editorial Parainfo S. A. Madrid, España. P.480.
47. LYSONS, F.J.; KENT, M.A.; BLAND, A.; SELLWOOD, R.; ROBINSON, W.F.; FIRT, A. (1991) A cytolytic haemolysin from *Treponema hyodysenteriae*: a probable virulence determinant in swine dysentery. J.Med. Microbiol. 34:97-102.
48. MIAO, R.M.; FIELDSTEEL, A.H.; HARRIS, D. L. (1978) Genetics of *Treponema*: characterization of *Treponema hyodysenteriae* and its relationship to *Treponema pallidum*. Infect. Immun. 22: 736-739.

49. MILNER, J. A.; SELLWOOD, R. (1994) Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: a potential role in intestinal colonization. *Infect. Immun.* 62: 4095-4099.
50. MOLNAR, L. (1996) Sensitivity of strains of *Serpulina hyodysenteriae* isolated in Hungary to chemotherapeutic drugs. *Vet. Rec* 138: 158-160.
51. MYSORE, J.V.; G. E. DUHAMEL (1994) Morphometric analysis of enteric lesions in C3H/HeN mice inoculated with *Serpulina hyodysenteriae* serotypes 2 and 4 with or without oral streptomycin pretreatment. *Can. J. Vet. Res.* 58: 281-286
52. NIBBELINK, S. K.; WANNEMUEHLER (1991). Susceptibility of inbred mouse strains to infection with *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 59: 3111-3118.
53. OLSON, L. D.; (1978) Staining large spirochetes in fecal and colonic scrapings with Victoria blue 4-R: and aid in the diagnosis of Swine Dysentery. *Vet. Med. Small and Clin.* January, pp.80.
54. PENG ZHANG, P.; GERALD, E.; DUHAMEL, JAGANNATHA, V.; MYSORE, MICHAEL, P.; CARLSON, M.; SCHNEIDER, N.R. Prophylactic effect of dietary zinc in a laboratory mouse model of swine dysentery. *Am.J.Vet.Res.* 56: 334-339

55. PETERSSON, B.; FELLSTROM, C.; ANDERSSON, A.; UHLÉN, M.; GUNNARSSON, A.; JOHANSSON, K. (1996) The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of bacteriology*.
56. PLUSKE, J. R.; SIBA, P.M.; PETHICK, D. W.; DURMIC, Z.; MULLAN, B.P.; HAMPSON, D. HAMPSON, D. J. (1996) The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *American Institute of Nutrition*. 2920-2933.
57. POWER, S. B.; DONNELLY, W. J. C.; MCLAUGHLIN, J. G.; WALSH, M. C.; DROMEY, M. F. (1989). Accidental carbadox overdosage in pigs in an Irish weaner-producing herd. *Vet. Rec.* 124: 367-370.
58. PROHASZAKA, L.; LUKACS, K (1984) Influence of the diet on the antibacterial effect of volatile fatty acids and on the development of swine dysentery. *Zentr. fur Veteriner. B.* 31: 779-785.
59. SCOTT A BROWN. (1997) Respiratory and enteric pharmacology. *American Association of Swine Practitioners. 28th Annual Meeting. Quebec City, Quebec. Proceedings.* P323-328.
60. SCHULTZ, R. A.; SCHULTZ, G. L.; HOFFMANN, J.; HOFFMAN, M. (1988). The effect of high-level carbadox on reproductive performance in limit-fed gilts. *Proceeding 10 th IPVS. August. 14-17 Río de Janeiro, Brasil.*

61. STANTON, T.; JENSEN, N. S.; CASEY T.A.; TORDOFF, L. A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B. J. (1991) Reclassification of *Treponema innocens* in a New Genus, *Serpula* gen.nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. Nov. And *Serpula innocens* comb.nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 41 :50-58.22
62. STANTON, T. (1992) Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen.nov. Containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. Nov. And *Serpulina innocens* comb. nov. 178: 4189-4199.
63. SUENAGA, Y.; YAMAZAKI, T. (1984) Experimental *Treponema hyodysenteriae* of mice. Zbl.Bakt. Hyg. A 257: 348-356.
64. SUEYOSHI, M.; ADACHI, Y. (1990). Diarrhea induced by *Treponema hyodysenteriae*: a young chick model for swine dysentery. Infect. Immun. 58: 3348-3362.
65. SWAYNE, D. E.; EATON, K.A.; STOUTENBURG, D. J.; TROTT, D. J.; HAMPSON, D. J.; JENSEN, N. S. (1995) Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity for chickens. Infect. Immun. 63: 430-436.
66. TAYLOR, D. J.(1972) PhD Thesis, University of Cambridge. Studies of bacteria associated with swine dysentery.
- 67 TAYLOR, D. J.; ALEXANDER, T. J. L. (1971) The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochete. Br. Vet. J. 127: 58-61
68. THOMAS, W.; SELLWOOD, R. (1992) Monoclonal antibodies to a 16-kDa antigens of *Serpulina hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 37: 214-220.

- 69. TROTT D. J.; MCLAREN, A. J.; HAMPSON, D. J. (1995) Pathogenicity of human and porcine intestinal spirochetes in one-day-old specific-pathogen-free chicks: an animal model of intestinal spirochetosis. *Infect. Imm.* 63: 3705-3710.
- 70. TURNER, L. H. (1976) The biology of parasitic spirochetes. Academic press, Inc, New York, San Francisco, London. In Johnson (ed). pp 95.
- 71. VOOR VEEVOEDER PRODUKTSCHAP (1986) Duch Feed Regulations.
- 72. WHITHING, R. A. (1921) Swine dysentery. *Purdue Univ. Agric. Exp. Stn. Bull.* 257: 3
- 73. WANNEMUEHLER, M.J.; HUBBARD, R.D.; GREER, J. M. (1988) Characterization of the major outer membrane antigens of *Treponema hyodysenteriae* *Infect. Immun.* 56: 3032-3039



29023

Biblioteca Facultad de	de Veterinaria U.F.C.
País	Donación
Procedencia	
Folio	Fecha
	Marzo 2003