

NOTA TÉCNICA

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* FRENTE A CINCO ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *SERPULINA HYODYSENTERIAE* AISLADAS EN ARGENTINA

Fabiana Moredo, M.V.¹, Gabriela Giacoboni, M.V., Bact.², Florencia Pantozzi, M.V. Bact.²
Carlos Perfumo, D.V.M.³

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF ARGENTINE FIELD ISOLATED STRAINS OF *SERPULINA HYODYSENTERIAE* TO FIVE CHEMOTHERAPEUTICS

The aim of this work was to evaluate In Vitro susceptibility of twenty strains of Serpulina hyodysenteriae to five antimicrobial agents, two of them widely used in field outbreaks of Swine Dysentery in Argentina. Field strains of Serpulina hyodysenteriae were obtained from Swine Dysentery cases. Five drugs were used: Carbadox, Tiamulin, Lincomycin, Tylosin, Sedecamycin. Minimal Inhibitory Concentration Test was determined by the agar block dilution test. The results obtained indicated that Carbadox was the most effective antimicrobial agent In Vitro against Serpulina hyodysenteriae, followed by Tiamulin. Tylosin, Lincomycin and Sedecamycin had poor efficacy In vitro against Serpulina hyodysenteriae isolates.

Palabras claves: Serpulina hyodysenteriae.

Key words: Serpulina hyodysenteriae.

INTRODUCCIÓN

La Disentería Porcina (DP) es una de las enfermedades entéricas de importancia económica en la mayoría de los países en los cuales la producción porcina es intensiva (Messier y col., 1990). Esta enfermedad puede presentar una forma aguda, caracterizada por una diarrea hemorrágica severa, ocasionalmente muerte; o crónica, caracterizada por heces diarreicas amarillo-grisáceas con presencia de fibrina y mucus (Harris y Lysons, 1992). Esta última forma es la más frecuentemente encontrada. Las categorías de animales susceptibles son destete, engorde y terminación. El agente etiológico que produce la enfermedad es una espiroqueta, *Serpulina hyodysenteriae*. Dentro del género *Serpulina* existen otras especies, *S. intermedius*, con patogenicidad intermedia; *S. innocens*, no patógena y frecuentemente encontrada en el intestino de los cerdos y *S. pylosicoli* agente etiológico de la espiroquetosis porcina (Fellstrom, 1996).

Para el tratamiento o prevención de la DP, existen varias drogas a las cuales se les ha estimado la Con-

centración Mínima Inhibitoria (CM) contra cepas aisladas en campo de *S. hyodysenteriae*, en diversos países (Kinyon y Harris, 1980; Jacks y col., 1986; Kinyon y Walter, 1989; Messier y col., 1990; Gunnarsson y Franklin, 1992).

Este trabajo evaluó la susceptibilidad *in vitro* de veinte cepas de *S. hyodysenteriae* aisladas de granjas con signología clínica de DP, ubicadas en diferentes regiones de la provincia de Buenos Aires, frente a cinco agentes antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Las 20 muestras se obtuvieron del recto con lisopos, material fecal o contenido intestinal, de cerdos con signología clínica de DP, provenientes de seis establecimientos con sistemas de cría intensiva en confinamiento y con tratamientos previos contra DP.

Medios de cultivo: Para el aislamiento primario de la *S. hyodysenteriae* se utilizó Agar Tripticosa Soya (Oxoid) con 400 µg/l espectinomina (Sigma), 25 mg/l colistina (Sigma), 30 mg/l vancomicina (Sigma) y 30 mg/l rifampicina (Sigma), suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada (SVCR). Los subcultivos se realizaron sobre Blood Agar Base Nº 2 (Oxoid) suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada (AS). Para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana también se utilizó AS.

¹Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, FCV, UNLP.

³Instituto de Patología "Dr. B. Epstein", FCV, UNLP. CC 296 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Aislamiento de los microorganismos: Las muestras recibidas fueron sembradas en placas de SVCR e incubadas a 42 °C durante 72 h en atmósfera anaeróbica (95% H y 5% CO₂). El primer subcultivo se realizó en placas de SVCR y el segundo en AS. La identificación de *S. hyodysenteriae* se realizó en base a la morfología, utilizando la coloración de Azul Victoria 4R (Olson, 1978) y a la presencia de zonas de beta-hemólisis fuerte. Una vez obtenidos los cultivos puros, se cortaron bloques de agar, de las zonas periféricas de hemólisis, de 0,8 por 2 cm y se guardaron a -70 °C en tubos estériles con tapa rosca.

Agentes antimicrobianos (AA): Se probaron 5 drogas, Carbadox (CDX) (Mecadox, Pfizer, USA), Tiamulina (TML) (Tiamulin, Sandoz), Lincomicina (LCM) (Upjohn Co, Mi. USA), Tilosina (TLS) (Romage, Argentina), Sedecamicina (SDC) (Takeda Chemical Industries, Ltd., Japón). A cada AA se le realizaron diluciones seriadas en base 2, siendo el rango para el CDX: 125 a 0,0018 µg/ml; TML: 125 a 0,25 µg/ml; LCM: 500 a 0,5 µg/ml; TLS: 32 a 0,5 µg/ml y SDC: 500 a 3,9 µg/ml. La selección de las concentraciones de AA utilizadas se basó en estudios previos publicados (Kinyon y Harris, 1980; Jacks y col., 1986; Hayashi y col., 1988; Kinyon y Walter, 1989; Messier y col., 1990; Gunnarson y Franklin, 1992).

Preparación del Inóculo: Se descongelaron las cepas de *S. hyodysenteriae* (bloques de agar) en 2 ml de buffer fosfato-salino (PBS, pH 7). De esta suspensión, se sembraron 500 µl en AS y se incubaron durante 72 h a 37 °C en atmósfera anaeróbica. Posteriormente se cortaron dos bloques de 0,8 por 2 cm, de las zonas periféricas de hemólisis, y se colocaron en 2 ml de PBS, y se agitaron para lograr una buena suspensión bacteriana. A partir de aquí, se realizaron diluciones seriadas en base 10 (seis), y se llevaron a cabo el conteo viable y la determinación de la CM.

Conteo Viable: Se sembraron 50 µl de cada dilución bacteriana en AS y se incubaron durante 48 h a 42 °C en atmósfera anaeróbica. La finalidad de este paso fue determinar en cuál de las diluciones bacterianas había una concentración de 10⁷ UFC/ml.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Las placas se prepararon el mismo día de su uso, con 9 ml de AS y 1 ml de cada una de las diluciones de antimicrobiano a probar. De las seis diluciones bacterianas realizadas, se le determinó la CMI a las tres 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 AA. La CMI fue definida como la mínima concentración de antimicrobiano que inhibió la presencia de zonas visibles de beta-hemólisis, luego de 48 h de incubación a 37 °C en atmósfera anaeróbica.

RESULTADOS

- Conteo viable: Se observó que en la dilución 10⁻², la concentración bacteriana era de 10⁷ UFC/ml, por lo cual se leyeron los resultados correspondientes a esta dilución, de cada cepa de *S. hyodysenteriae* sembrada.
- Valores de CMI: En la Tabla 1 se expresan los rangos de la CMI y la CMI₉₀ de los AA estudiados.

TABLA 1
SUSCEPTIBILIDAD DE 20 CEPAS DE *S. HYODYSENTERIAE*
FRENTE A CARBADOX (CDX), TIAMULINA (TML),
TILOSINA (TLS), LINCOMICINA (LCD) Y
SEDECAMICINA (SDC)

| Antimicrobianos | CMI (µg/ml) | |
|-----------------|-------------|-------------------|
| | rango | CMI ₉₀ |
| CDX | 0,0018 | < 0,0018 |
| TML | 3,9 | 1,98 |
| TLS | 1-16 | > 16 |
| LCD | 7,8-125 | 31,3 |
| SDC | 31,3-125 | 125 |

Carbadox fue el antimicrobiano *in vitro*, más efectivo contra *S. hyodysenteriae*, siendo el 100% de los aislamientos inhibidos a ≤ 0,0018 µg/ml. Tiamulina tuvo una eficacia intermedia. Tilosina demostró una eficacia pobre, el 90% de las cepas fueron inhibidas a 16 µg/ml. Lincomicina fue inefectiva al igual que Sedecamicina, siendo el 90% de los aislamientos inhibidos por 62,5 µg/ml para la primera y 125 µg/ml para la segunda.

DISCUSIÓN

La CMI₉₀ de TML, LCM, TLS y SDC, para las cepas de *S. hyodysenteriae* probadas en este estudio, fue más alta que la obtenida por otros autores. En contraposición, CDX mostró mayor efectividad que la encontrada en los trabajos de referencia, en los cuales los valores de CMI₉₀ fueron más altos: > 6 µg/ml (Messier y col., 1990), 2 µg/ml (Jacks y col., 1986), 0,015 µg/ml (Kinyon y Harris, 1988), 0,62 µg/ml (Kinyon y Walter, 1989) y 0,006 µg/ml (Hayashi y col., 1988), siendo nuestro valor ≤ 0,0018 µg/ml. La CMI₉₀ de Tiamulina para *S. hyodysenteriae* fue de 1,98 µg/ml, valor superior a los encontrados por Messier y col. (1990) de 1 µg/ml, al encontrado por Hayashi y col. (1988) de 0,2 µg/ml y por Gunnarson y Franklin (1992) de 0,12 µg/ml. Tilosina, Lincomicina y Sedecamicina, no fueron efectivos, *in vitro*, contra *S. hyodysenteriae*. Los valores de CMI₉₀ de las

dos primeras son comparables con los encontrados en los trabajos de referencia, especialmente Tilosina con la cual se obtuvieron los mismos resultados que Gunnarson y Franklin (1992). La gran diferencia se observó con la Sedecamicina, donde encontramos valores de CMI₉₀ de 125 µg/ml; mientras que Hayashi y col. (1988) la citaron como droga de elección para el tratamiento y prevención de la DP, ya que sus valores de CMI₉₀ fueron de 3,13 µg/ml. La mayoría de los estudios publicados sobre pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *S. hyodysenteriae*, determinan los valores de CMI pero no los correlacionan con resistencia y/o sensibilidad. Esta falta de correlación es consecuencia de que no hay suficiente información publicada.

Se concluye, de este estudio *in vitro*, que Carbadox y Tiamulina son los agentes antimicrobianos más efectivos para el tratamiento de la Disentería Porcina.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de veinte cepas de *S. hyodysenteriae* aisladas de cerdos con Disentería Porcina, frente a cinco antimicrobianos, dos de ellos utilizados masivamente en el tratamiento de esta entidad en Argentina. La técnica utilizada fue la Concentración Mínima Inhibitoria, según el método de dilución de bloques de agar. Las drogas probadas fueron Carbadox, Tiamulina, Tilosina, Lincomicina y Sedecamicina. Los resultados obtenidos demostraron

que Carbadox fue la droga más efectiva seguida por Tiamulina, siendo Tilosina, Lincomicina y Sedecamicina drogas poco efectivas *in vitro*, contra *S. hyodysenteriae*.

REFERENCIAS

- C. FELLSTROM, 1996. Proc. Satellite Symposium. Swine Dysentery 75 years of the disease and 25 years of *S. hyodysenteriae*. 14th Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Bologna, Italia.
- A. GUNNARSON y A. FRANKLIN, 1992. Proc. 12th Int. Pig. Vet. Soc. Cong., pp. 269.
- D.L. HARRIS y R.J. LYSONS, 1992. Diseases of swine. Ed. 7th. Iowa State Uni. Press. Editor D.J. Taylor.
- T. HAYASHI, I. SUENAGA, N. NARUKAWA y T. YAMAZAKI, 1988. Antimicrob. Agents Chemother 32: 458-461.
- T.M. JACKS, F.R. JUDITH, S.D. FEIGHNER y R.O. LIKOFF, 1986. 3-acetyl-4"-isovaleryl tylosin for prevention of swine dysentery. Am. J. Vet. Res. 47: 2325-2328.
- J.M. KINYON y D.L. HARRIS, 1980. Susceptibility of *Treponema hyodysenteriae* and *T. innocens* by the agar dilution method. Proc. Int. Symp. Vet. Lab. Diagn. 2: 125-128.
- J.M. KINYON y D.H. WALTER, 1989. MIC susceptibility testing of recent field isolates of *Treponema hyodysenteriae* from swine in the midwestern United States. Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Swine Pract., pp. 317-322.
- S. MESSIER, R. HIGGINS y C. MOORE, 1990. Minimal Inhibitory Concentration of five antimicrobials against *Treponema hyodysenteriae* and *T. innocens*. J. Vet. Diagn. Invest. 2: 330-333.
- L.D. OLSON, 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 An. Clin. January, pp. 80.

Recibido el 30 de enero de 1997
Aceptado el 30 de mayo de 1997