

Serotipificación de Cepas de *Serpulina hyodysenteriae* Aisladas de Cerdos con Cuadros de Disentería Porcina en la Provincia de Buenos Aires

F. A. MOREDO,^{1*} G. I. GIACOBONI,² C. J. PERFUMO,³ R. T. MITTAL⁴

Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.¹ Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, FCV, UNLP.² Instituto de Patología, FCV, UNLP.³ Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pathologie et Microbiologie, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

*Corresponding author. Phone: 54-21-83 6880 Int. 65. Fax: 54-21-253276. E-mail: fmoredo@fcv.medvet.unlp.edu.ar

ABSTRACT. Seventeen *Serpulina hyodysenteriae* strains isolated from faeces, rectal swabs and intestinal contents of pigs with Swine Dysentery, from farms located in Buenos Aires province were serotyped. Samples on selective media (trypticase soy agar added by 5% ovine blood, 400 mg/l spectinomycin, 30 mg/l colistin, 30 mg/l vancomycin) were streaked and incubated under anaerobic atmosphere for 72 h at 42°C. Suspected *S. hyodysenteriae* growth were identified by strong β -hemolytic zone, without colonies, and the spirillar morphology, using the Victoria Blue 4-R stain were criteria following by *S. hyodysenteriae* preliminary identification. The following antigens were made by phenolic extraction from a concentrated inocula washed twice in PBS pH 7: whole-cell (WC), boiled cell (BC) and lipopolysaccharide (LPS). Two serological test were: coagglutination and immunodiffusion, using polyclonal rabbit antisera against the 9 serotypes of *S. hyodysenteriae* and *S. innocens*, using WC and BC like antigens for the first test and BC and LPS for the second. The Dot-ELISA Test was performed using BC and LPS antigens and monoclonal antibodies (AbM) against serotypes 1, 2, 3, 8, 9 of *S. hyodysenteriae*, AbM species-specific and AbM against *S. innocens*. All isolated *S. hyodysenteriae* strains belonged to serotype 8. Like in other countries occurred, it would exit a high regional prevalence of *S. hyodysenteriae* serotype, being the serotype 8 in Argentine.

Key words: *Serpulina hyodysenteriae*, Swine dysentery, serology.

RESUMEN. Se aislaron y tipificaron 17 cepas de *Serpulina hyodysenteriae* de materia fecal, hisopados rectales y contenido intestinal, de cerdos con cuadros de Disentería Porcina, de establecimientos localizados en la provincia de Buenos Aires. Las muestras fueron sembradas en medio selectivo agar soya tripticasa adicionado con 5% de sangre ovina, 400 mg/l de espectinomicina, 30 mg/l de colistina y 30 mg/l de vancomicina), e incubadas en atmósfera anaeróbica, durante 72 h a 42°C. La observación de zonas de β -hemólisis fuerte, sin la visualización de colonias y la morfología espirilar, mediante la coloración con Victoria Blue 4R fueron los criterios seguidos para la identificación preliminar de *S. hyodysenteriae*. Se obtuvo la masa antigénica para la preparación de tres tipos de antígenos: células completas (WC), células hervidas (BC) y lipopolisacáridos (LPS) por extracción fenólica. Las pruebas serológicas realizadas fueron: coaglutinación e inmunodifusión, utilizando sueros policlonales obtenidos en conejo contra cada uno de los nueve serotipos existentes de *S. hyodysenteriae* y con el de *S. innocens*, utilizándose como antígeno WC y BC para la primera y BC y LPS para la segunda. Para la prueba Dot-ELISA se utilizó BC y LPS como antígeno y anticuerpos monoclonales (AbM) contra los serotipos 1, 2, 3, 8, 9 de *S. hyodysenteriae*, AbM especie-específicos (GEN) y AbM contra *S. innocens*. Todas las cepas aisladas correspondieron al serotipo 8 para cada una de las pruebas utilizadas. Al igual de lo que ocurre en otros países, existiría una alta prevalencia regional de serotipos de *S. hyodysenteriae* siendo en Argentina el serotipo 8.

Palabras clave: *Serpulina hyodysenteriae*, Disentería porcina, serología.

INTRODUCTION

La Disentería Porcina (DP) es una enfermedad infecciosa producida por *Serpulina hyodysenteriae* que se caracteriza clínicamente por diarrea que varía de mucohemorrá-

gica a fibrinonecrótica.¹⁶ El diagnóstico de la enfermedad se realiza sobre la base de los antecedentes sanitarios del hato, los signos clínicos (edad/etapa de presentación), los hallazgos anatomopatológicos y el aislamiento del agente etiológico.^{7,16} Según la clasificación vigente en EEUU y



Canadá, se reconocen 9 serotipos (1 al 9), siendo los más prevalentes el 1, 2, 8 y 9.^{1,6,11} En Australia se clasificaron en 8 serogrupos (A, B, D, E, F, G, H e I) si bien todos ellos están presentes en dicho país, los prevalentes son el A, B y D.^{6,10} Si bien *S. hyodysenteriae* es el principal agente infeccioso incriminado en la DP,¹⁶ existen otras especies de como *S. innocens* y *S. Pilosicoli*,⁵ que están asociadas a infecciones subclínicas y a diarrea posdestete respectivamente. Las tres especies son indistinguibles morfológicamente y comparten gran parte de componentes proteicos. La inmunidad inducida por la infección es serotipo específica¹⁴ siendo el principal componente antigénico de naturaleza lipopolisacárida (LPS).² La DP está ampliamente difundida en nuestro medio, sin embargo se desconocen los serotipos actuales.^{12,15} El objetivo de este trabajo fue determinar los serotipos de *S. hyodysenteriae* presentes en la provincia de Buenos Aires con el fin de comenzar a estudiar la epizootología de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras. Se procesaron 25 muestras las que consistieron en: 10 materia fecal (almacenada en bolsas de polietileno), 8 hisopados rectales y 7 contenido intestinal de animales con signología clínica o lesiones compatible con DP, provenientes de 3 establecimientos de la provincia de Buenos Aires (Tabla 1). Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4 °C y se procesaron antes de las 48 h de extraídas.

Medios de cultivo. Se utilizó como medio selectivo agar soya tripticasa adicionado con 5% de sangre ovina desfibrinada, 400 mg/l de espectinomicina, 30 mg/l de colistina y 30 mg/l de vancomicina (SVC) y como medio enriquecido agar soya tripticasa adicionado con 5% de sangre ovina (AS).¹²

Procesamiento de las muestras. Los hisopados rectales y el contenido intestinal se sembraron en el medio SVC; la materia fecal se diluyó en una relación 1:10 en agar Tween cisteína (agar 0.1%, Tween 80 0.5 g/l y L-cisteína 0.5 g/l, regulador de fosfato 1 liter). Se tomaron 500 µl de esta dilución y se sembraron en el medio SVC utilizando espátula de Drigalsky. Todas las muestras se incubaron en atmósfera anaeróbica (95% N₂ y 5% CO₂) durante 72 h a 42°C. Se consignó el desarrollo de colonias sospechosas de espiroquetas cuando se observó la presencia de β-hemólisis fuerte, y ausencia de colonias a ojo desnudo. La morfología espirilar se confirmó, en el mismo momento, mediante la coloración con Azul Victoria 4R (solución acuosa al 0.5%), frotando un hisopo embebido con solución fisiológica sobre las zonas hemolíticas y descargándolo posteriormente sobre un portaobjeto.¹³ Las cepas aisladas fueron conservadas a -80°C en caldo cerebro corazón con 30% de glicerol, hasta su posterior procesamiento.¹²

Pruebas de serotipificación. Para la obtención de la

masa antigénica cada cepa se repicó en AS y se incubó bajo las mismas condiciones anteriormente expuestas. Se cosecharon en regulador PBS pH 7 y se lavaron 3 veces con la misma solución. Esta suspensión bacteriana se ajustó a una OD₅₄₀ de 1 y se dividió en 3 partes. La primera se mantuvo a temperatura ambiente (22°C): células completas (WC). La segunda parte se colocó en un baño de agua a 100°C durante 30 min: células hervidas (BC). La tercera se trató con el método "Westphal hot phenol-water" adaptado por Baum y Joens² para la extracción de LPS, los cuales se obtuvieron de la fase acuosa y se dializaron en agua destilada. Los carbohidratos complejos se precipitaron con etanol 90% y acetato de sodio y se incubaron toda la noche a -20°C. El precipitado se sedimentó por centrifugación, se resuspendió en agua destilada y se reprecipitó con acetona. El precipitado final se suspendió en agua destilada.

Coaglutinación. Se siguió el procedimiento descripto por Diarra y col.⁴ Se utilizaron sueros polivalentes de conejo contra cada uno de los 9 serotipos de *S. hyodysenteriae* y *S. innocens*. Como antígeno se utilizaron WC y BC.

Inmunodifusión. Se procedió de acuerdo a Li y col.¹¹ Utilizándose sueros hiperinmunes de conejo contra cada uno de los 9 serotipos existentes de *S. Hyodysenteriae* y con el de *S. innocens*, utilizándose como antígeno BC y LPS.

Dot-ELISA. Se realizó la metodología descripta por Hawkes y col.⁹ Se utilizaron como antígeno BC y LPS y anticuerpos monoclonales (AbM) contra los serotipos 1, 2, 3, 8 y 9 de *S. hyodysenteriae*, AbM especie-específico contra todos los serotipos de *S. hyodysenteriae* (Gen) y AbM contra *S. innocens*.¹

RESULTADOS

De 25 cerdos con cuadros de DP diagnosticados por los signos clínicos y los hallazgos anatomopatológicos, se aislaron 17 cepas de *S. hyodysenteriae*.

Mediante la prueba de coaglutinación, utilizando como antígeno WC y LPS, y mediante la prueba de inmunodifusión, utilizando como antígeno BC y LPS, todas las cepas correspondieron a *S. hyodysenteriae* serotipo 8. No se observaron reacciones cruzadas intraespecie ni extraespecie (*S. innocens*). Mediante la prueba de DOT-ELISA, utilizando como antígeno BC y LPS enfrentados en este caso con AbM, se corroboró el resultado obtenido con las otras pruebas. Los resultados de las diferentes pruebas serológicas se expresan en las tablas 1, 2 y 3.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio preliminar se determinó que el serotipo 8 de *S. hyodysenteriae* es el único identificado en la provincia de Buenos Aires. Se ha considerado que existe una prevalencia regional o nacional de los diferentes serotipos

Tabla 1: Muestras procesadas para aislamiento de *Serpulina hyodysenteriae* de 25 cerdos provenientes de 3 establecimientos porcinos de la Provincia de Buenos Aires.

Muestras	Positivas	Negativas	TOTAL
Materia Fecal	8	2	10
Hisopados Rectales	5	3	8
Contenido Intestinal	4	3	7
TOTAL	17	8	25

Tabla 2: Resultados obtenidos de la serotipificación de las 17 cepas de *S. hyodysenteriae* mediante la prueba de coagulación.

Serotipos de <i>Serpulina hyodysenteriae</i> (sueros policlonales de conejo) (%)										
Ag	Si	1	2	3	4	5	6	7	8	9
WC	0	0	0	0	0	0	0	0	100 (17/17)	0
LPS	0	0	0	0	0	0	0	0	100 (17/17)	0

Ag: antígenos. Si: *S. innocens*. WC: suspensión bacteriana. LPS: lipopolisacárido.

Tabla 3: Resultados obtenidos de la serotipificación de las 17 cepas de *S. hyodysenteriae* mediante la prueba de inmunodi-

Serotipos de <i>Serpulina hyodysenteriae</i> (sueros policlonales de conejo) (%)										
Ag	Si	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BC	0	0	0	0	0	0	0	0	100 (17/17)	0
LPS	0	0	0	0	0	0	0	0	100 (17/17)	0

Ag: antígenos. Si: *S. innocens*. BC: células hervidas. LPS: lipopolisacárido.

Tabla 4: Resultados obtenidos de la serotipificación de las 17 cepas de *S. hyodysenteriae* mediante la prueba de dot-ELISA.

Serotipos de <i>Serpulina hyodysenteriae</i> (AbM) (%)							
Ag	Si	Gen	1	2	3	8	9
BC	0	100	0	0	0	100 (17/17)	0
LPS	0	100	0	0	0	100 (17/17)	0

Ag: antígenos. AbM: anticuerpos monoclonales. Si: *S. innocens*. WC: suspensión bacteriana. LPS: lipopolisacárido. Gen: serotipo especie-específico *S. hyodysenteriae*.



de *S. hyodysenteriae*, siendo los prevalentes en Estados Unidos los serotipos 1 y 2 y en Canadá el 8 y 9.^{1,6,10,11} Hasta el presente no se han observado diferencias en cuanto a la patogenidad de los diferentes serotipos, pero sí en cuanto a la inmunidad ya que es serotipo-específica;¹⁴ lo cuál es fundamental para el diseño de programas de control epidemiológicos.

Por los tres métodos de inmunoserotipificación, no se observaron reacciones cruzadas dentro de la especie ni con *S. innocens*. De las 3 pruebas la más simple en su realización como así también en la elaboración del antígeno fue la de coagulación.

Se concluye la presencia de *S. hyodysenteriae* serotipo 8 en la provincia de Buenos Aires. Dicho resultado fue obtenido mediante 3 pruebas de serotipificación (coagulación, inmunodifusión y Dot-ELISA) y con antígenos obtenidos con diferentes tratamientos (WC, BC, LPS).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración incondicional de la técnica Srta. Suzanne Bourdon del Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Achacha, M. y K. R. Mittal. 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* and *S. innocens* and Their Use in Serotyping. J. Clin. Microbiol. 33:2519-2521.
2. Baum, D. H. y L. A. Joens. 1979. Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. 25:792-796.
3. Diarra, A. T., K. R. Mittal, y M. Achacha. 1994. Microagglutination test for differentiation between *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* and *S. innocens* and serotyping of *S. hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 32:1976-1979.
4. Diarra, A. T., M. Achacha, y K. R. Mittal. 1995. Evaluation of different serological test for detection of antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* in pig sera. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 18:215-221.
5. Fellstron, C., y A. Gunnarson. 1995. Phenotypical characterization of intestinal spirochetes isolated from swine. Res. Vet. Sci. 59:1-4.
6. Hampson, D. J. 1991. Slide agglutination for rapid serological typing of *Treponema hyodysenteriae*. Epidemiol. Infect. 106:541-547.
7. Hampson, D. J., C. D. Maltas, C. P. Stephens, K. Mc Kechnie, N. B., y Buller. 1994. Serogroups of Australian isolates of *Serpulina hyodysenteriae*. Aust. Vet. J. 71:347.
8. Harel, J., M. Bélanger, C. Forget, y M. Jacques. 1994. Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 from Quebec by restriction endonuclease. Can. J. Vet. Res. 58:302-305.
9. Hawkes, R., E. Niday, y J. Gordon. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119:142-147.
10. Lau, T. T., y D. J. Hampson. 1992. The serological grouping system for *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. Epidemiol. Infect. 109:255-263.
11. Li, Z., M. Belanger, y M. Jacques. 1991. Serotyping of Canadian isolates of *Treponema hyodysenteriae* and description of two new serotypes. J. Clin. Microbiol. 29:2794-2797.
12. Moredo, F. A., G. I. Giacoboni, R. Sanguinetti, y T. Yamazaki. 1995. Aislamiento de *Serpulina hyodysenteriae* y *S. innocens* de cerdos con cuadros clínicos de disentería porcina. Analecta Veterinaria. XV(1):23-25.
13. Olson, L. D. 1978. Staining large spirochetes in fecal and colonic scrapings with Victoria Blue 4-R: an aid in the diagnosis of Swine Dysentery. Vet. Med. Small Clin. January 80.
14. Nuessen, M. E., y L. A. Joens. 1982. Serotype-specific opsonization of *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. 38:1029-1032.
15. Sanguinetti, H. R., O. R. Linzitto, N. A. Menéndez, y W. G. Aguirre. 1982. Disentería porcina. Memorias de las Jornadas de Actualización Porcina. Enfermedades Infecciosas. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
16. Taylor, D. J. 1992. Spirochetal diarrhea. p.548-587. En A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'allaire y D. J. Taylor (Ed). Diseases of Swine. 7th ed. Ames, Iowa State University Press.