

# EFFECTO DE DOS DOSIS DE FLORFENICOL ADMINISTRADO EN EL ALIMENTO A LECHONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON *ACTINO~ACILLUS PL~UKOPNEUMONIAE* SEROTIPO 1.



Palacios A.J.\* Gutierrez P.J. Hernandez C.R.\*\*

## INTRODUCCION

La pleuroneumonía infecciosa porcina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) se caracteriza por afectar cerdos de todas las edades, sin embargo se presenta con mayor frecuencia entre las 12 y 16 semanas de edad, con morbilidad del 100% y mortalidad que fluctúa de acuerdo a la inmunidad de hato que exista en la Granja y la presencia de factores desencadenantes. Los cerdos de 4 a 12 semanas de edad pueden ser afectados, sin embargo la mortalidad en estos casos no es alta, debido principalmente al nivel de inmunidad pasiva.

El uso de diversos antibióticos en el alimento como preventivos de la infección y signos es común, sin embargo éstos son dosificados a niveles que permiten que el microorganismo se mantenga controlado sin provocar signos clínicos y estimulando inmunidad. El uso de los mismos en presencia de brote y signos agudos queda condicionado a tratamientos parenterales debido a la anorexia que provoca el estado patológico.

El objetivo de este trabajo es demostrar la eficacia del florfenicol como un nuevo antibiótico de amplio espectro, baja toxicidad y amplio grado de absorción en lechones sometidos a una infección de tipo experimental después del destete y sin inmunidad pasiva.

## MATERIAL Y METODO

**ANIMALES Y DISEÑO.** Para este estudio se utilizaron 25 lechones de 6 semanas de edad con un peso promedio de 10.5Kg provenientes de cerdas serológicamente positivas a APP. Antes del inicio de la prueba se verificó en cada lechón su nivel de anticuerpos contra toxinas de APP el peso, estado general de salud y temperatura. Los animales fueron alojados en una Granja Experimental en tres corrales colocando el grupo control en la parte media. La temperatura promedio registrada durante la prueba fue de 22-25°C.

Se hicieron tres grupos de animales, dos para ser tratados con 10 animales cada uno y un control con cinco. A todos los lechones se les dió el mismo alimento excepto por la presencia de florfenicol en cada grupo tratado a concentraciones diferentes, 20 ppm y 40 ppm.

En todos los grupos se registró el consumo diario de alimento y peso corporal cada tercer día.

Los lechones fueron alimentados durante doce días consecutivos con las diferentes dosis de florfenicol y al quinto día se efectuó el desafío experimental.

A partir del desafío se registró el estado clínico de todos los animales y la temperatura corporal cada 4 horas durante 48 horas.

\* Schering-Plough S.A. de C.V. \*\* Departamento de Microbiología FMVZ-UNAM

**ALIMENTO.** El alimento utilizado en esta prueba contenía por cada tonelada: 674.0 Kg. de Maiz, 272.0 Kg. de Soya, 10.0Kg de grasa, 1.32 Kg. de Lisina, 0.5Kg. de Sulfato de Cobre, 1.0 Kg de Fungicida, 2.0 Kg. de Oxido de Zinc, 4.0 Kg. de Caolin, 1.0 Kg. de Edulcorante, 3.0Kg. de Premezcla vitaminica, 3.2 Kg. de Sal, 2.5 Kg. de Acidificante, 1.18 Kg. de Treonina, 18.0 Kg. de Ortofosfato, y 4.0Kg. de Carbonato de Calcio. El alimento fue administrado en polvo ad libitum.

**FLORFENICOL.** Para esta prueba se utilizó el Lote de Florfenicol # 24559, al 2.0% en una base de cáscara de Arroz. Mezclándolo en el alimento a razón de 1.0 Kg. y 2.0 Kg. por tonelada durante 15 minutos, para obtener una proporción final de Florfenicol de 20 y 40 ppm. respectivamente.

Cada lote medicado fue identificado individualmente y ensacado.

**SEROLOGIA.** Todos los animales fueron sangrados para realizar la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación para detectar anticuerpos contra las toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, de acuerdo a la técnica descrita por Fenwick (4). La hemolisina fue obtenida por el crecimiento de APP en medio RPMI durante 8 horas (O.D. 0.18-0.2). Posteriormente fue filtrada a 0.2 um y mantenida en congelación a -70°C. Todos los sueros fueron inactivados durante una hora a 57°C y diluidos de acuerdo al siguiente esquema:

Hemolisina	0	50	75	100	ul
RPMI	100	50	25	0	
Suero	5	5	5	5	

La mezcla anterior fue incubada durante una hora a 37°C. En cada pozo se agregó una suspensión de eritrocitos de borrego al 1.0% y se incubó 2 horas a 37°C.

Las placas fueron centrifugadas a 800 rpm durante 6 minutos y leídas en un Espectrofotómetro a una Absorbancia de 410 nm.

**BACTERIOLOGIA.** Todos los pulmones fueron tomados aseptícamente después de la necropsia y sembrados en Agar Sangre por la Técnica de Aislamiento en Cultivo puro con una Estria Nodriz de *Staphylococcus aureus* como fuente de NAD. Las colonias con satelitismo característico fueron identificadas como APP mediante su morfología y Reacción al Gram, Prueba de Satelitismo, Reacción de CAMP, Urea, y Oxidasa.

**HISTOPATOLOGIA.** Se tomó una muestra de cada pulmón en una Solución de Formalina al 10% para posteriormente efectuar

cortes Histopatológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina .

**INOCULO DE DESAFIO.** Para el desafío se utilizó una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotipo 1 aislada de un caso clínico. La bacteria fue desarrollada en un caldo Infusión Cerebro Corazon durante 8 horas a 37~ hasta alcanzar una concentración leida contra un McFarland de  $1.0 \times 10(8)$  bacterias por ml.

Este cultivo se coloco en una bomba casera de aspersión calculando inocular a cada cerdo por aerosol con 2 ml.a las 0 horas y posteriormente con 3.0 ml a las 4 horas.

**EXAMEN CLINICO POST-DESAFIO.** Se evaluarón individualmente mediante una hoja clinica los siguientes parámetros: Tos, Disnea, Anorexia y Depresión en una escala de 1 al 3 como: 1-ausente, 2-moderado y 3-severo. La temperatura se tomo por vía rectal cada 4 horas después del desafío.

**NECROPSIAS.** A los 12 días de medicación total que corresponden a 7 días después del desafío se sacrificaron 5 animales de cada grupo y todo el control. En cada caso se evaluaron las lesiones macroscópicas en pulmón, pleura, tráquea y pericardio. Al finalizar este periodo se suspendió la medicación y se dejaron los 5 animales restantes de cada grupo con el alimento sin florfenicol durante 7 días. Al finalizar el periodo todos los animales fueron sacrificados de forma semejante a los anteriores.

**RESULTADOS.** En el grupo control se detectaron signos severos de infección con anorexia, disnea, tos y estornudos, sin embargo en ningún caso hubo mortalidad. En los animales tratados se observó un buen estado de salud excepto por tres animales en el grupo tratado con 20 ppm los cuales mostraron diversos grados de tos y depresión 24-36 hs. después del desafío.

En el caso del grupo medicado con 40 ppm dos animales mostraron signos de tos y estornudos y otro se mantuvo levemente deprimido, aunque en ningún caso se registro algún grado de anorexia.

**TEMPERATURA.** El indicador del grado de infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue la temperatura de los animales en las siguientes horas post-desafío(PD).

En todos los grupos se registraron tres alzas de temperatura con diferentes grados cada una. La primera fue a las 24 hs, la segunda a las 72 horas y la tercera a las 168 hs. todas con un decremento paulatino conforme avanzó el tiempo.

El grupo control registró incremento de la temperatura promedio por arriba de los 40°C hasta los 41.5 °C desde las 12 hasta las 36 horas PD y posteriormente aunque en menor intensidad desde las 44 hasta las 96 horas.

En el grupo de animales medicados con 20 ppm se alcanzó una temperatura promedio mayor a los 40°C durante un lapso muy corto de tiempo entre las 27 y 29 hs. PD con temperaturas individuales que alcanzaron 40.8 °C.

En el tercer grupo de animales medicados con 40 ppm no se alcanzó una temperatura promedio mayor a los 40°C con temperaturas individuales que alcanzaron los 40.3°C.

Aunque el microorganismo mantuvo en los tres casos una reproducción muy semejante con incremento de la temperatura, se observó una clara diferencia entre el grupo Control y los medicados.

Este incremento en la temperatura más los signos observados provocaron un estado de anorexia en los animales controles, obteniendo al final de la prueba una conversión alimenticia de 3.59 para el grupo control, 2.29 para el grupo medicado con 20 ppm y 2.01 para el grupo de 40 ppm.

**LESIONES MACROSCOPICAS EN PULMON.** En cada caso se registró en un plano el grado de lesiones macroscópicas encontradas , bajo el siguiente esquema: Congestión, necrosis, Pleuritis, Hemorragias, Abscesos y Consolidación, encontrando un promedio de lesiones de > 90~ en los animales controles, 10~ en los medicados con 20 ppm y < 2.0~ en el grupo de 40 ppm.

**AISLAMIENTO BACTERIOLOGICO.** Este fué positivo en todos los animales controles y en un animal de cada grupo medicado con 20 y 40 ppm.

**LESIONES HISTOPATOLOGICAS.** Las lesiones histopatológicas de los animales desafiados y 5 pertenecientes al grupo de 20 PPM consistieron en general de congestión, hemorragias,e Infiltración linfocitaria peribronquial.

En todos los animales desafiados se encontraron granulomas caseosos con acúmulos de neutrófilos y diversos grados de proliferación de macrófagos.

**DISCUSION** De acuerdo a la literatura las dosis infectantes por nebulización para lograr la reproducción experimental de la enfermedad varían de  $2.0 \times 10(4)$  hasta  $2.0 \times 10(8)$ . En nuestro caso decidimos utilizar 5.0 ml de un cultivo con  $10(8)$  en lugar de los 2.0 ml. reportados, debido principalmente a la edad de los animales, sin embargo aunque no hubo mortalidad se demostró la presencia de la infección por signos clínicos , lesiones en pulmón y aislamiento bacteriológico en todos los controles.

De acuerdo a la temperatura registrada el microorganismo mostró tres fases de reproducción con bacteremia,misma que fue disminuyendo desde las 24 horas hasta las 120 horas post-desafío, volviéndose a incrementar a las 168 horas.

Los signos de la infección en los animales controles se presentaron con mayor severidad entre las 20 y las 72 horas, mientras que en el grupo medicado con 20 ppm estos signos tendieron a presentarse después de las 72 hasta las 168 horas lo cual indica la presencia de un elemento de bloqueo.Aunque el grupo medicado con 40 ppm mostró signos moderados , estos se presentaron de las 32 a las 44 horas en dos animales disminuyendo paulatinamente hacia el final del periodo de observación.

Las lesiones macroscópicas encontradas son clásicas de una infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y demuestran la patogenicidad de la cepa utilizada.Las lesiones involucraron más del 90~ del pulmón en el caso de los animales controles excepto en el animal # 15 con menos del 30~ de area afectada. 4 animales medicados con 20 ppm mostraron lesiones localizadas en la parte anterior de los lóbulos diafragmáticos y no se detectaron lesiones de tipo granulomatoso excepto en uno.

La ganancia de peso de cada grupo también muestra una diferencia significativa, sobre todo si consideramos que los animales

Cuadro 1. Determinación de concordancia entre Dot-ELISA y Seroneutralización en Cultivo de Tejidos para la Enfermedad de Aujeszky mediante cálculo de KAPPA<sup>a</sup>.

		SERONEUTRALIZACION		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTALES
DOT ELISA	POSITIVO	A=66	B=2	A+B=68
	NEGATIVO	C=8	D=24	C+D =32
		A+C =74	B+D =26	N=100

Proporción observada de concordancia = 0.90.  
 Proporción esperada de concordancia = 0.59.  
 Proporción observada menos el azar = 0.31.  
 Concordancia máxima posible más allá del azar = 0.41  
 Valor de KAPPA = 0.76.

Cuadro 2. Comparación de los parámetros expresados en porcentajes entre Dot-Auj y Seroneutralización en Cultivo de Tejidos (SN) para diagnóstico serológico de la Enfermedad de Aujeszky<sup>a</sup>.

	Dot-Auj			SN		
	valor	lim inf	lin sup	valor	lim inf	lin sup
Sensibilidad	98.65	96.02	101.28	89.19	82.11	96.26
Especificidad	92.31	82.06	102.55	100.00	100.00	100.00
<b>Valores predictivos<sup>b</sup>:</b>						
Positivo	97.33	93.69	100.98	100.00	100.00	100.00
Negativo	96.00	88.32	103.68	76.47	62.21	90.73
<b>Prevalencias:</b>						
Aparente	75.00	66.51	83.49	66.00	56.72	75.28
Real	74.00	65.40	82.60	74.00	65.40	82.60
<b>Probabilidad de<sup>c</sup>:</b>						
Resultado falso positivo		2.67			0.0	
Resultado falso negativo		4.00			23.53	
<b>Probabilidad de<sup>d</sup>:</b>						
Resultado falso positivo		7.69			0.0	
Resultado falso negativo		1.35			10.81	

Tiempo de diagnóstico (horas) 3

48-72