

ARTÍCULOS ORIGINALES

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

G. Giacoboni, M.V., Bact.¹; M.A. Risso, M.V., Dr. med. vet.²; A.R. Massone, M.V.²; C.J. Perfumo, M.V. Dr. med. vet.²

¹Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). 60 y 118 C.C 296, La Plata, Argentina.

² Instituto de Patología Dr. "B. Epstein", Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

SUMMARY

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

In order to determine susceptibility to *Serpulina hyodysenteriae* infection four inbred strains of SPF mice (Balb/cAnN, Balb/J, C57BL/6J and C57BL/6N) were inoculated with a single intragastric dose of 10⁷ to 10⁸ colony forming units (CFU) *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 post-inoculation (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. Globlet cell hyperplasia, mononuclear cell infiltration of lamina propria and inflammatory oedema of submucosa membrane were the most remarkable changes. No correlation between the lesions and the degree of macroscopic findings was observed. Histopathological changes found in mice were correlated with those reported previously in this species, but they differed from those found in pigs. However, progressive bacteriological counts and gross changes of cecum appeared to be a good indicators of **S.h** infection in C57BL/6J mice and this strain may be a useful animal model in order to study the "in vivo" sensibility of *S.h* to different antibiotics and chemotherapeutic.

Palabras claves: *Serpulina hyodysenteriae*, inoculación experimental, cepas de ratones SPF. Bacteriología-Patología.

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

INTRODUCCION

La disentería porcina (DP) es una enfermedad que afecta a los cerdos en las etapas de crecimiento y engorde y que se caracteriza por la presentación de una tiflitis y colitis que varía de mucohemorrágica a fibrinonecrótica ([Harris y Lysons, 1992](#)). El agente etiológico primario es una espiroqueta anaerobia reclasificada como *Serpulina hyodysenteriae* (*S.h*) ([Stanton y col., 1991](#); [Stanton, 1992](#)). Más recientemente se han caracterizado 2 nuevas especies dentro del género: *Serpulina innocens* (*S.i*) ([Kinyon y Harris, 1979](#)) y *Serpulina pilosicoli* ([Trott y col. 1996](#)).

Se han utilizado diferentes modelos experimentales en animales de laboratorio ([Joens y col., 1978](#); [Sueyoshi y col., 1987](#)) para el estudio de la patogenicidad de las cepas de *S.h* aisladas ([Kinyon y col., 1977](#)) así como para el estudio de la patogenia de la infección. De ellos el más extensamente probado es el ratón; sin embargo la evaluación de los resultados en esta especie es difícil debido a que en los mismos influyen la

cepa de ratón utilizada, su origen genético así como el laboratorio de origen ([Nibbelink y Wannemuehler, 1991](#); [Suenaga y Yamazaki, 1984](#)).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la susceptibilidad de diferentes cepas de ratones libres de patógenos específicos (SPF) a la inoculación experimental de *S.h* mediante el estudio bacteriológico y anatomopatológico secuencial. El comportamiento de esta bacteria en el modelo murino aportará información para la comprensión de la patogénesis de la infección por *S.h* en el cerdo y su aplicación para estudios *in vivo* de antibióticos y quimioterápicos.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación. Se utilizaron las siguientes cepas de ratones SPF Balb /cJ, Balb/cAnN, C57BL/6J y C57BL/6N, del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

Los animales de 4 a 6 semanas de edad y de ambos sexos se alojaron en miniaisladores (cajas de policarbonato de 20 cm x 30 cm, con cama, agua y cobertor estéril y alimento irradiado).

Diseño experimental. Se utilizó un modelo de diseño de bloques aleatorizados, en total 3 ([Lison, 1976](#)). Cada bloque estuvo compuesto por 20 animales, 5 de cada cepa de ratón. De ellos, se inocularon 3 animales con la cepa DJ70 de *S.h* y dos testigos alojados en cajas separadas.

Cepa de Serpulina hyodysenteriae (S.h) y medios de cultivo. Se utilizó la cepa DJ70 de *S.h* (National Health Institute, Japón) cuya patogenicidad fue demostrada en cerdos SPF ([Suenaga y Yamazaki, 1983](#)).

Para el cultivo y determinación del conteo total de viables de la cepa DJ70 se utilizó agar tripticasa soya (ATS) suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada. El aislamiento de *S.h* de materia fecal y de ciego se realizó en ATS adicionado de espectinomina 400 mg/l, colistina 25 mg/l y vancomicina 25 mg/l. ([Jenkinson y Wingar, 1981](#)). La incubación fue en atmósfera anaeróbica (N₂ 85%, CO₂ 15%) durante 72 horas (Anaeroincubator Hirayama).

Inoculación de los ratones. Los ratones se inocularon previo ayuno de 48 horas, con sonda rígida intragástricamente. El inóculo consistió en 1 ml de una suspensión al 50% (vol/vol) de la cepa bacteriana cultivada en ATS y caldo tripticasa soya (TS). El inóculo final se estandarizó en 10⁷-10⁸ UFC por ml determinado por siembras en placas de ATS en diluciones seriadas de base 10. Los animales testigos se inocularon con caldo TS sin sembrar. A las 3 horas post-inoculación se les ofreció alimento y agua a voluntad hasta la finalización de la experiencia.

Estudios bacteriológicos. Para el aislamiento de *S.h* se extrajo materia fecal de todos los ratones a los 3, 5 y 7 días postinoculación (d.p.i). Las muestras se pesaron y diluyeron al 10% (p/v) con diluyente estéril (4.5 g KH₂PO₄; 6.0 g Na₂HPO₄; 0.5 g L-cisteína HCl.H₂O; 0.5 g Tween 80, 1.0 g agar y 1000 ml de agua destilada, pH 7.0). Este homogeneizado se sembró en placas de ATS y se incubó en anaerobiosis durante 72 horas y a 42°C. Para confirmar el aislamiento de las espiroquetas las colonias que presentaron marcada hemólisis b se tiñeron con Victoria Blue 4-R ([Olson, 1978](#)).

Las observaciones realizadas se expresaron como porcentaje de recuperación de *S.h* en materia fecal (n=360).

El aislamiento de *S.h* del ciego se realizó el día 14 p.i. Los ciegos se extrajeron en forma aséptica, se pesaron en morteros estériles y se homogeneizaron con el mismo diluyente utilizado para la materia fecal. Estas suspensiones se diluyeron con solución fisiológica en forma seriada de base 10 y se sembró 0.1 ml de cada una de ellas en placas de ATS. Se contaron las zonas de hemólisis b fuerte y se calculó el número de *S.h* por g de ciego luego de la incubación a 42 °C en atmósfera anaeróbica durante 72 horas.

El análisis de los datos se basó en las observaciones de los conteos de *S.h* en contenido cecal y de su pared a los 14 d.p.i (n=120).

Estudios anatomopatológicos. Los animales se sacrificaron el día 14 p.i. En la observación macroscópica de los ciegos se consideró: grado de distensión del órgano, características del contenido cecal (gas, mucus), adelgazamiento de la pared y visualización o no de los vasos sanguíneos a través de la serosa.

En base a los cambios mencionados y su comparación entre ratones inoculados y testigos no inoculados con *S.h*, los hallazgos macroscópicos del ciego se clasificaron en: 0 = sin lesiones aparentes; 1 = con lesiones leves; 2 = con lesiones moderadas y 3 = con lesiones severas. Las observaciones macroscópicas fueron expresadas en porcentaje (n=120).

Los ápices de los ciegos se fijaron en formol neutro al 10%, se incluyeron en parafina y los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) y Warthin Starry (W.S).

Análisis estadístico. Se utilizó el análisis de varianza, prueba de Fisher, para contrastar el conteo total de *S.h* con los hallazgos macroscópicos en las cuatro cepas de ratones estudiadas. El nivel de significación elegido fue del 5% ([Lizasoain y Joaristi, 1995](#)).

RESULTADOS

En la [tabla 1](#) se consignan los resultados correspondientes a la sumatoria de la excreción de *S.h* en materia fecal por los animales a los 3, 5 y 7 d.p.i. El porcentaje de recuperación de *S.h* 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 2](#) expresa las medias de las UFC de *S.h* por g de ciego 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).

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 3](#). 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 ([foto 1](#)) 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 1

Análisis de la excreción de *S.h* en MF, en los días 3, 5 y 7 postinoculación

Analysis of excretion of *S.h* in the feces at 3, 5 and 7 days postinoculation

| 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 | 360 | 142 | | 218 | |

Referencias: cr: cepa de ratón, n: número de observaciones, s: excreción de *S.h* correspondiente a cada cepa de ratón consignado con diferente letra fue significativamente diferente (p<0.05). A: aislamientos positivos; N: aislamientos negativos.

References: cr: strain of mice, n: number of observations, s: excretion of *S.h* by different strains of mice indicated with different letters was statistically significant (p<0.05). A: positive isolation; N: negative isolation.

Tabla 2

Análisis de la cantidad de *S.h* por gramo de ciego, expresada en media y desvío estándar.

Analysis of concentration of *S.h* per gram of cecum.

Values are expressed in mean and standard deviation

| 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 |

Referencias: cr: cepa de ratón, n: número de observaciones (120), m: media, ds: desvío estándar, s: concentración de *S.h* por gramo de ciego correspondiente a cada cepa de ratón consignado con diferente letra fue significativamente diferente ($p < 0.05$).

References: cr: strain of mice, n: number of observations (120), m: mean, ds: standard deviation, s: concentration of *S.h* per gram of cecum in different strains of mice indicated with different letters was statistically significant ($p < 0.05$).

Tabla 3

Análisis de lesiones macroscópicas del ciego en el día 14 postinoculación

Analysis of macroscopic cecal lesions at 14 days postinoculation

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

Referencias: cr: cepa de ratón, n: número de observaciones (120), s: porcentaje de lesiones macroscópicas dentro de la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes, ($p < 0.05$).

References: cr: strain of mice, n: number of observations (120), s: percentage of macroscopic lesions with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

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 a nivel de las criptas, dilatación de los vasos linfáticos y edema en la submucosa. Cuando la dilatación macroscópica fue muy marcada, las criptas se observaron más cortas y planas ([foto 2](#)). En las cepas Balb/cAnN 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 ([foto 3](#)) y en donde persistieron, en el borde de las mismas, se observó la presencia de focos de bacterias W.S positivas adheridas a las mismas ([foto 4](#)), 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.

DISCUSION

Sobre la base de los resultados de los estudios bacteriológicos, excreción de *S.h* 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 *S.h.*, exhibiendo las cepas C57BL/6N, Balb/cJ y Balb/cAnN menor susceptibilidad. Dentro de los parámetros establecidos para definirlo, los resultados de la colonización del ciego por *S.h* y los hallazgos macroscópicos en este estudio fueron equiparables a los

obtenidos por Nibbelink y Wannemuehler (1991), en 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 ([Joens y Glock, 1979](#); [Suenaga y Yamazaki, 1984](#)), y la cepa ICR ([Adachi y col., 1992](#)).

En el presente estudio, realizado con las 4 cepas de ratones, no se consignaron signos clínicos compatibles con los de la *D.P* y/o con un cuadro entérico, a diferencia de lo observado por [Joens y Glock \(1979\)](#), con la cepa CF#1, quienes consignaron heces mucoides en el 68% de los animales inoculados con 2 dosis consecutivas. Ello se debería al hecho de que en el ratón, a diferencia de lo que ocurre en el cerdo, las lesiones están localizadas sólo 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 ([Mysore y Duhamel 1994](#)). Sin embargo, en nuestro trabajo y en concordancia con otros autores ([Adachi y col., 1992](#), [Nibbelink y Wannemuehler, 1991](#), [Mysore y Duhamel, 1994](#) y [Suenaga y Yamazaki, 1984](#)) una sola dosis de 107 UFC/ml de *S.h* 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; sin embargo, otros autores describieron inflamación catarral y hemorragias del ciego ([Joens y Glock, 1979](#), [Joens y col., 1981](#)), no observadas en este estudio.

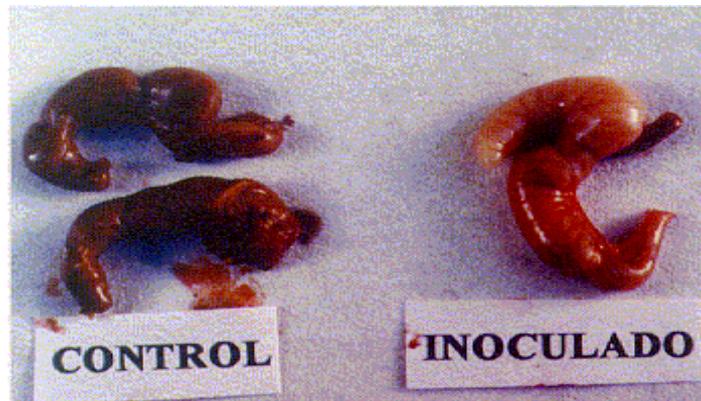


Foto 1. Aspecto macroscópico de los ciegos del grupo control vs. grupo inoculado. Se observa distensión, cambio de color del contenido cecal y remarcación de los vasos sanguíneos de la serosa

Gross changes seen on cecum from control group vs. inoculated group. The affected cecum was distended with colour changes in the lumen contents and with congestive serosal blood vessels.

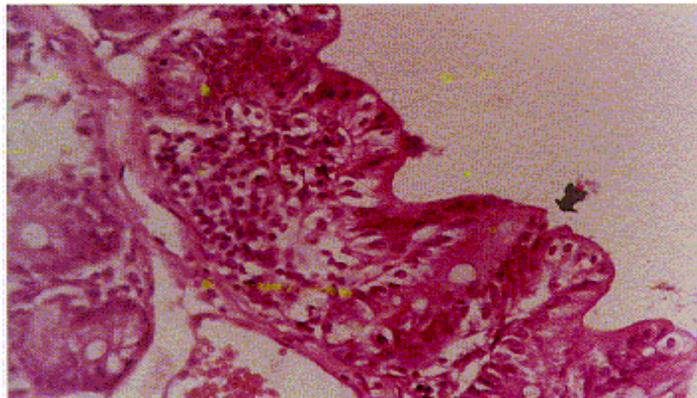


Foto 2. Ratón cepa C57BL/6N. Se observa aplanamiento de las criptas epiteliales del ciego (flecha) H&E 100x

Flattening of cecum cryptal epithelia is observed. (arrow) H&E 100 x.

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 adheridas al glicocalix de los enterocitos. Los resultados de los estudios histopatológicos obtenidos en otros trabajos, describen edema, hiperemia con dilatación de las criptas en donde se observan *S.h* así como cierto grado de erosión, necrosis y descamación epitelial ([Joens y Glock, 1979](#), [Suenaga y Yamazaki, 1984](#)). En la cepa de ratón ICR, [Adachi y col. \(1992\)](#) 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. Estudios morfométricos utilizando como parámetros longitud y diámetro de las criptas, número de células epiteliales y relación enterocitos/células caliciformes por cripta, hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los diversos tratamientos sólo en el ciego a los 7 y 14 d.p.i. ([Mysore y Duhamel, 1994](#)).

A diferencia de lo que ocurre en la D.P, no se consignó en el trabajo realizado necrosis coagulativa superficial de la mucosa ni exudado fibrinonecrótico ([Harris y Lysons, 1992](#)). 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 podría deberse a un recambio acelerado de las células epiteliales como resultante de la degeneración y necrosis celular ([Mysore y Duhamel, 1994](#)).

Las diferencias en la susceptibilidad a la infección por *S.h* entre las distintas cepas de ratones estarían ligadas a factores genéticos ([Nibbelink y Wannemuehler, 1991](#)), al laboratorio de origen de las colonias utilizadas e íntimamente relacionadas con la flora bacteriana normal del intestino ([Itoh y col., 1983](#)).

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

Se concluye que de los parámetros utilizados, la excreción de *S.h* a los 3, 5, y 7 d.p.i., las UFC por g de ciego y los hallazgos macroscópicos en ciego, hacen de la cepa de ratón C57BL/6J un modelo de laboratorio válido para el estudio de la infección de *S.h* y de su posible aplicación para estudios *in vivo* de antibióticos y quimioterápicos.

RESUMEN

Se inocularon 4 cepas de ratones SPF (Balb/cAnN, Balb/cJ, C57BL/6J y C57BL/6N) con una sola dosis intragástrica de *Serpulina hyodysenteriae* (*S.h*). DJ70 (10^7 a 10^8 UFC/ml) para determinar la cepa de ratón más susceptible a la infección experimental. El criterio utilizado para evaluar la infección comprendió los siguientes parámetros: bacteriológicos, descarga de *S.h* en materia fecal a los 3, 5 y 7 d.p.i, conteo de UFC por g de ciego, cambios anatomopatológicos macroscópicos y lesiones histopatológicas a los 14 d.p.i. En base a los resultados de los conteos bacteriológicos y el grado de los cambios macroscópicos, la cepa de ratón C57BL/6J demostró ser la más susceptible a la infección experimental. 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. Sin embargo, fueron equiparables a los descritos en el ratón por otros autores.

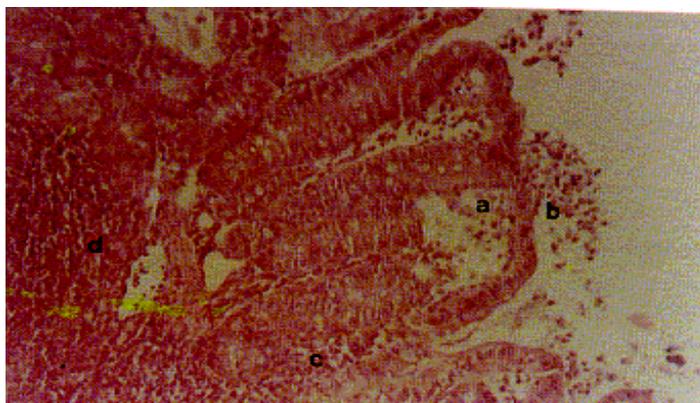


Foto 3. Ratón cepa Balb/cJ. Ciego.

a) dilatación del quilífero central. b) descamación del epitelio y detritus celulares en la luz. c) infiltración mononuclear. d) agregado linfocitario. H&E 100x.

Strain of mice Balb/cJ. Cecum.

a) distended central lymph-vessels. b) sloughing of epithelial cells with cellular debris. c) mononuclear cell infiltration. d) lymphoid cells aggregate.

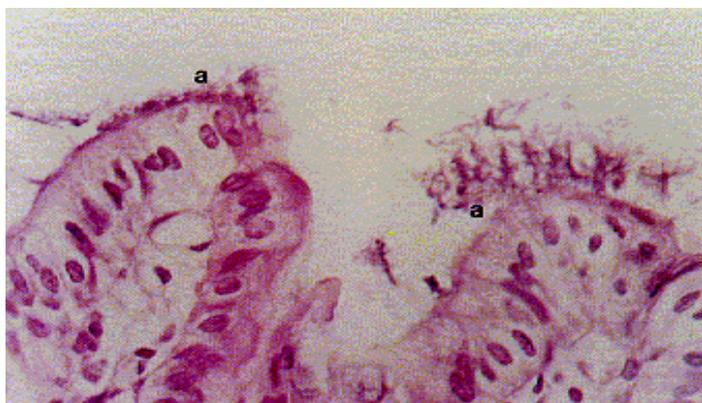


Foto 4. Ratón cepa Balb/cAnN.

a) se observan bacterias adheridas a los enterocitos de las criptas. H&E 400x.
Strain of mice Balb/cAnN.

a) Foci of adherent bacterial to cryptal epithelium are observed. H&E 400x.

Se concluye que los conteos bacteriológicos progresivos y los cambios macroscópicos registrados en el ciego de la cepa de ratones C57BL/6J a los 14 d.p.i constituyen un buen indicador de infección de *S.h* y por lo tanto un modelo útil para futuros estudios de sensibilidad *in vivo* de diferentes antibióticos y quimioterápicos.

Aceptado: 14.04.98.

* Este trabajo forma parte del plan de tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

BIBLIOGRAFIA

ADACHI, Y.; T. ANJIKI; K. KADOTA; K. HIRANO. 1992. Experimental infection of spectomicin-treated ICR- mice with *Serpulina hyodysenteriae*. Proceedings 12th IPVS Congress. Netherlands, pp. 279.

HARRIS, D.L.; R.J. LYSONS. 1992. Swine dysentery. En Diseases of Swine. 7th ed.

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.

JENKINSON, S. R.; C. R. WINGAR .1981. Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* 109: 384-385.

JOENS, L.A.; J. GLENN SONGER; D.L. HARRIS; R. D. GLOCK. 1978. Experimental infection with *Treponema hyodysenteriae* in guinea pigs. *Infect. Immun.* 22: 132-135.

JOENS, L. A.; R. D. GLOCK. 1979. Experimental infection in mice with *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 25 : 757-760.

JOENS, L. A.; I. M. ROBINSON; R. D. GLOCK; P. J. MATTHEWS. 1981. Production of lesions in gnotobiotic mice by inoculation with *Treponema hyodysenteriae*. *Infec. Immun.* 31: 504-506.

KINYON, J.M.; D. L. HARRIS; R. D. GLOCK. 1977. Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 15: 638-646.

KINYON, J.M.; D. L. HARRIS. 1979. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae* . *Int. J. Syst. Bacteriol*, 29: 102-109.

LEMAN, A.D.; B.E. STRAW; W.L. MENGELING; S. D'ALLAIRE; D.J. TAYLOR. The Iowa State University Press, Ames Iowa USA, p. 599-626, 1992.

LIZASOAIN, L.; L. JOARISTI. 1995. SPSS para Windows, versión 6.0. 1ra Edición. Editorial Paraninfo S.A. Madrid, España, p. 480.

LISON, L. 1976. Estadística aplicada a la biología experimental. 1ra. Edición Editorial EUDEBA . Buenos Aires, p. 357.

- 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.
- NIBBELINK, S.K.; WANNEMUEHLER. 1991. Susceptibility of inbred mouse strains to infection with *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Infect. Immun.*, 59: 3111-3118.
- OLSON, L.D. 1978. Staining large spirochetes in fecal and colonic scraping with Victoria blue 4-R: an aid in diagnosis of Swine Dysentery. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 59: 80.
- STANTON, T. B.; N. S. JENSEN; T. A. CASEY; L.A. TORDOFF; F.E. DEWHIRST; B. J. PASTER. 1991. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. Nov. As *Serpula hyodysenteriae* comb. Nov. And *Serpula innocens* comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:50-58.
- STANTON, T. B. 1992. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. Containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 189.
- SUENAGA, Y.; T. YAMAZAKI. 1983. Experimental infection with *Treponema hyodysenteriae* in nude mice. *Zbl. Bakt. Hyg., A* 254: 528-533.
- SUENAGA, I.; T. YAMAZAKI. 1984. Experimental *Treponema hyodysenteriae* infection of mice. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 257: 348-356.
- SUEYOSHI, M.; Y. ADACHI; S.SHOYA. 1987. Enteropathogenicity of *Treponema hyodysenteriae* in young chicks. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 266: 469-477.
- TROTT, D.J.; T.B. STANTON; N.S. JENSEN; G.E. DUHAMEL; J.L. JOHNSON; D.J. HAMPSON. 1996. *Serpulina pilosicoli* spp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int. J. Syst. Bact.* 46: 206-215.