



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PESQUISA DE *Streptobacillus moniliformis* EN RATAS DE
BIOTERIO CONVENCIONAL**

DANIELLA PIETRANTONI FIGALLO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: DR. SERGIO ROMERO MEDEL

**PROFESORES COLABORADORES: DRA. M^a ANGÉLICA MARTÍNEZ TAGLE, Ph. D
BQ ABEL VASQUEZ VELOSO, Ph. D (c)**

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PESQUISA DE *Streptobacillus moniliformis* EN RATAS DE
BIOTERIO CONVENCIONAL**

DANIELLA PIETRANTONI FIGALLO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: SERGIO ROMERO MEDEL
PROFESOR CONSEJERO	: MARÍA LUISA SANCHEZ CHONG
PROFESOR CONSEJERO	: MARÍA ANTONIETA JARA OSORIO

SANTIAGO, CHILE
2008

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. SUMMARY.....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	5
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
VII. RESULTADOS.....	23
VIII. DISCUSIÓN.....	25
IX. CONCLUSIONES.....	29
X. ANEXOS.....	30
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	32

Dedicado a mi Padre, por enseñarme a vivir la vida
con pasión y a disfrutar cada momento.
Siempre estarás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres por darme la oportunidad de estudiar lo que realmente quería, por confiar en mí y por darme su inmenso apoyo durante este largo camino. A mi Mamá por el cariño, a mi Papá por la confianza, a mis hermanos por la alegría y a mi Yayita por la dedicación, muchas gracias.

Quiero agradecer también a Gonzalo, por todo el amor y el apoyo que siempre me brindó y principalmente por estar ahí cada vez que lo necesité.

De manera especial quiero agradecer a mi profesor guía, el Dr. Sergio Romero, por darme la posibilidad de trabajar en este proyecto, por depositar toda su confianza en mí y por darme ánimo en todas las situaciones difíciles que se presentaron. De verdad muchas gracias.

No puedo dejar de agradecer a todos quienes hicieron posible que este trabajo se realizara, especialmente a la Dra. M^a Angélica Martínez, por su paciencia y dedicación para enseñarme todo lo que era necesario y por estar ahí cada vez que tuve dudas. A Abel Vásquez, por socorrerme cuando las cosas no iban bien y por haberme aceptado como una más en su laboratorio, y a todos quienes trabajan con él, gracias por enseñarme, por dedicarme tiempo y por convertirse en amigos, nunca los olvidaré. Al Dr. Luis Rodríguez, gracias por su paciencia. A la Sra. M^a Eugenia Valenzuela, gracias por su ayuda y cooperación. Al Dr. César Romero y a todo el personal del Bioterio que colaboró con mi trabajo, muchas gracias por su tiempo.

Quiero aprovechar de dar las gracias también a todos mis amigos y compañeros, que me acompañaron en esta travesía, que me enseñaron tanto y me dieron su apoyo en todo momento, transformando esta etapa de mi vida en algo maravilloso, siempre estarán en mi corazón.

Gracias a todos por hacer de mí una mejor persona y por ayudarme a cumplir mi sueño, ser Médico Veterinario.

RESUMEN

Entre los numerosos agentes causantes de enfermedad que los animales pueden transmitir al ser humano, está el *Streptobacillus moniliformis*, patógeno poco común que parece estar emergiendo en el último tiempo. Esta bacteria, que habita naturalmente en el tracto respiratorio anterior de las ratas, produce en el ser humano dos cuadros de signos y síntomas muy similares, conocidos como fiebre por mordedura de rata y fiebre de Haverhill según el modo de contagio. Además, este microorganismo puede infectar también a otros animales que viven o tienen contacto con ratas.

El objetivo de este estudio es determinar la presencia o ausencia de *Streptobacillus moniliformis* en el tracto nasofaríngeo de ratas provenientes de un bioterio convencional. Para esto se seleccionaron 20 ejemplares adultos de la cepa Sprague- Dawley, sin distinción de sexo y clínicamente sanos. Para la extracción de la muestra clínica los animales fueron previamente sedados y se obtuvo secreción nasofaríngea con una tórula fina de pequeño tamaño (torulín). Las muestras fueron sembradas en agar sangre anaerobio durante 72 hrs e incubadas a 36°C con 3% de CO₂. Posterior a la siembra el contenido de la tórula se suspendió en tampón sacarosa fosfato que se almacenó a -20°C para utilizarse en el diagnóstico molecular mediante PCR. Para éste último se amplificaron 296 pb del gen 16S rRNA, empleando los partidores descritos por Boot *et al.*, 2002.

De las 20 muestras estudiadas, se detectaron 8 muestras positivas a la técnica de PCR y ninguna muestra fue positiva al cultivo microbiológico.

Por análisis estadístico se obtuvo que la prevalencia de *S. moniliformis* en las ratas en estudio se encuentra entre 21.9% a 61.4%.

Los resultados de este estudio, permiten concluir que las ratas utilizadas son portadoras de este microorganismo en porcentajes similares a los que se describen en la literatura. La técnica de PCR resultó ser más sensible en el hallazgo del patógeno en comparación con la baja sensibilidad que posee el aislamiento en cultivo para el diagnóstico de *S. moniliformis* a partir de muestras nasofaríngeas.

Se discute la importancia de este primer diagnóstico positivo nacional de *S. moniliformis* en ratas de bioterio convencional y su relación con la salud humana.

SUMMARY

Streptobacillus moniliformis is one of the many causative agents of disease that animals can transmit to humans. Traditionally considered as an uncommon pathogen, the incidence of *S. moniliformis*, in human as well as in animals infections, has shown to increase in recent times. This bacterium habits naturally in the upper respiratory tract of rats, being considered as part of their comensal microbiota, and thus, behaves as an opportunist pathogen. *S. moniliformis* produces two syndromes in man, which are characterized by their signs and symptoms similarity. The syndromes are known as “rat-bite fever” and “Haverhill fever” depending on the mode of transmission. On the other hand, this micro-organism can also infect other animals, who live or have contact with rats.

The objective of this study is to determine the presence or absence of *S. moniliformis* in the nasopharyngeal tract of conventional laboratory rats. For this, we selected 20 adult individuals of the Sprague-Dawley strain, regardless of sex and clinically healthy. For the clinic sample extraction, the animals were sedated and specimens were obtained by using a thinner swab. All specimens were cultured in anaerobic blood agar plates during 72 hrs and incubated at 36 ° C with 3% CO₂. In parallel to culture, swabs were agitated in sucrose phosphate buffer and stored at -20 ° C until use in molecular diagnostics by PCR. For this last, 296 bp DNA fragment of the 16S rRNA gene was amplified, using a set of primers described by Boot *et al.*, 2002.

Of the 20 studied specimens, 8 were positive by the PCR technique. No positive specimens were obtained by the culture technique.

For the statistical analysis, it was found that the prevalence of *S. moniliformis* in the rats in study is between 21.9% to 61.4%.

The results of this study allow us to suggest that rats are carriers of *S. moniliformis* in percentages similar to those described in the literature. The PCR was more sensitive than the traditional culture procedure for their detection from nasopharyngeal samples, and may possibly be used as election technique for the diagnosis of this micro-organism.

There is discussed the importance of this first positive national diagnosis of *S. moniliformis* in conventional laboratory rats and its relation with the human health.

INTRODUCCIÓN

Las zoonosis son enfermedades infecciosas que se transmiten desde los animales al ser humano bajo condiciones naturales. Los agentes infecciosos involucrados son muy numerosos e incluyen bacterias, virus, parásitos y hongos, entre otros.

En los últimos años se ha observado la emergencia de algunas zoonosis, fenómeno estrechamente relacionado a cambios ecológicos, climáticos y socioculturales que han determinado que la población animal comparta su hábitat con el hombre cada vez con mayor frecuencia.

Un patógeno zoonótico poco común, que se ha vuelto emergente en el último tiempo, es el *Streptobacillus moniliformis*, bacteria Gram negativa que habita naturalmente en el tracto respiratorio anterior de ratas silvestres y de laboratorio.

En el ser humano se describen dos síndromes asociados a esta bacteria según el modo de contagio: la fiebre por mordedura de rata, por contacto directo y la fiebre de Haverhill, por contacto indirecto, ambas con signos y síntomas muy similares.

Las personas que se encuentran en mayor riesgo son aquellas que interactúan diariamente con roedores, como el personal de bioterios, de laboratorios en donde se hace experimentación animal, trabajadores de tiendas de mascotas y especialmente niños, debido al gran aumento de la popularidad de roedores como animales de compañía.

La fiebre por mordedura de rata es una enfermedad de distribución mundial, pero debido a que no es de denuncia obligatoria es muy difícil estimar su prevalencia. En Chile no existen registros de estudios detallados sobre la presencia de esta bacteria en las ratas y menos de su aislamiento.

De acuerdo a lo anterior, se estudiaron muestras de la nasofaringe de ratas convencionales del Bioterio Central de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, para corroborar la presencia o ausencia del *Streptobacillus moniliformis* a través del diagnóstico por cultivo microbiológico y la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las ratas y ratones transmiten varios agentes infecciosos que tienen un enorme impacto en salud pública. Hace más de 2000 años que se conoce el hecho que las mordidas de ratas producen enfermedades en el hombre, pero recientemente esto ha sido descrito alrededor del mundo como fiebre por mordedura de rata. Este término se refiere a la enfermedad causada por dos microorganismos similares pero muy distintos a la vez, *Spirillum minus* y *Streptobacillus moniliformis*, siendo este último el objetivo del presente trabajo.

El *Streptobacillus moniliformis* es una bacteria anaeróbica facultativa, inmóvil y altamente pleomórfica. Respecto a su taxonomía, está relacionada a los miembros del orden *Mycoplasmatales*; sin embargo, su origen filogenético exacto aun no ha sido determinado (Forbes *et al.*, 1998).

A pesar de tratarse de una bacteria de distribución mundial, la mayoría de los informes provienen de Estados Unidos, aunque otros del hemisferio occidental se originan en Brasil, Canadá, México y Paraguay. En Europa gran parte de la información viene de Reino Unido y Francia, pero también se ha reportado esporádicamente en Noruega, Finlandia, Alemania, España, Italia, Grecia, Polonia, Dinamarca y Holanda. En África existen muy pocos informes (Elliott, 2007).

El hábitat natural del *S. moniliformis* es el tracto respiratorio anterior, nasofaringe, laringe, tráquea superior y oído medio, de ratas silvestres y de laboratorio. Su portación nasofaríngea se calcula en 10 a 100% en ratas sanas de laboratorio y en 50 a 100% en ratas silvestres.

El riesgo de infección humana después de una mordida de rata se estima en un 10% (Elliott, 2007); sin embargo, su prevalencia exacta aun no ha sido determinada con claridad (Chen *et al.*, 2007).

El *S. moniliformis* es una bacteria zoonótica, por lo tanto, resulta patógena para el ser humano, al que se transmite por dos vías:

- por contacto directo con las ratas, ya sea por medio de una mordida, contacto con su flora oral, como besarlas o compartir alimentos con ellas (Albedwawi *et al.*, 2006), o por un rasguño (Dendle *et al.*, 2006).
- por la ingestión de alimentos contaminados con materia fecal o con secreciones orales de ratas, como leche o productos lácteos no pasteurizados y, con menos frecuencia, agua (Forbes *et al.*, 1998). En este caso, el cuadro se conoce como fiebre de Haverhill y generalmente se manifiesta como brotes epidémicos.

Los pacientes con fiebre de Haverhill desarrollan signos y síntomas muy similares a aquellos con fiebre por mordedura de rata (Elliott, 2007).

Debido a que la enfermedad se asocia a la mordida de ratas silvestres o de laboratorio, la fiebre por mordedura de rata ha afectado históricamente al personal de laboratorio y a la población de estrato socioeconómico bajo. Pese a esto, el hecho que hoy en día las ratas se hayan vuelto populares como mascotas ha traído cambios, tanto así que en Estados Unidos el 50% de los casos corresponde a niños, seguido por personal de laboratorio y empleados de tiendas de mascotas (Elliott, 2007).

Mientras que la mayoría de los casos resultan de la mordedura de ratas y otros roedores, se han informado casos que ocurrieron en ausencia de mordedura en personas que tienen contacto cercano con perros, gatos y cerdos (Bottone *et al.*, 1996). En un estudio se demostró la presencia de DNA de *S. moniliformis* en la cavidad oral de perros que tenían contacto con ratas. Por causa de este hallazgo, es necesario considerar que el ser humano puede infectarse también a través de la mordida de un perro. Sin embargo, en la literatura existen pocos informes de estreptobacilosis posterior a la mordedura de un perro, una de las razones de esto puede ser que en el caso de mordidas de perros a menudo se realiza una profilaxis con antibióticos, no así cuando ocurre una mordida de rata (Wouters *et al.*, 2007).

Debido a la baja incidencia de la enfermedad y a su baja tasa de mortalidad cuando es oportunamente tratada, aun no existe información suficiente que describa la patogénesis del *S. moniliformis*. No obstante, este microorganismo parece ser capaz de producir hallazgos morfológicos que habitualmente no se asocian a infecciones bacterianas (Elliott, 2007). La probabilidad de una sepsis fulminante en una infección por *S. moniliformis* puede estar relacionada al reconocimiento diferencial que hacen los receptores Toll-like (Irvine y Wills, 2006), involucrados en la respuesta inmune innata de los seres humanos.

Otro aspecto que todavía se desconoce es la dosis infectante de este microorganismo, que puede ser diferente para distintos individuos. En la literatura se describe un caso en que dos personas fueron mordidas por una misma rata y sólo una de ellas adquirió la patología (Wouters *et al.*, 2007).

El período de incubación varía de 3 días a 3 semanas posterior a la exposición, aunque generalmente es menor a 7 días. Muchos pacientes presentan síntomas de una infección respiratoria alta durante este tiempo. Si hubo mordida, ésta usualmente sana con rapidez sin presentar inflamación severa ni linfadenopatía regional significativa (Elliot, 2007).

Como muchas otras patologías, la fiebre por mordedura de rata tiende a mostrar manifestaciones inespecíficas en un principio, caracterizándose por fiebre de aparición brusca que puede ir de 38 a 41°C (Elliot, 2007), dolor de cabeza, mialgias y erupciones cutáneas. Diarrea y pérdida de peso a menudo se observan en lactantes y niños pequeños (Murray *et al.*, 2003). Es importante enfatizar que más del 50% de los pacientes infectados desarrollan una poliartritis migratoria asimétrica, que afecta rodillas, hombros, codos, muñecas y manos (Stehle *et al.*, 2003). Esta artritis puede ser supurativa o no, y raramente ocurre en ausencia de otras manifestaciones cutáneas o sistémicas (Clarke *et al.*, 2005).

Entre las complicaciones producto de la fiebre por mordedura de rata se describen endocarditis, miocarditis, pericarditis, vasculitis sistémica, periarteritis nodosa, meningitis, hepatitis, nefritis, amnionitis, neumonía y abscesos focales. De estas complicaciones la endocarditis es rara, pero es la forma más letal, ocurre más a menudo en personas con una enfermedad valvular subyacente (Chen *et al.*, 2007), la mortalidad puede llegar hasta un 53% y la muerte por esta causa puede ocurrir desde 2 semanas hasta 3 años después de iniciados los síntomas (Elliott, 2007).

Dependiendo de la presencia o no de eritema cutáneo y poliartritis acompañando los episodios febriles, los diagnósticos diferenciales pueden incluir brucelosis, leptospirosis, fiebre de las montañas Rocallosas, enfermedad de Lyme, exantema viral, enfermedades de transmisión sexual y una variedad de otros procesos vasculares e infecciosos (Graves y Janda, 2001). Vale aclarar que la mayoría de las enfermedades citadas en este párrafo son muy poco frecuentes en el medio nacional.

La enfermedad puede imitar una artritis reumatoide (Cunningham *et al.*, 1998) y por ende ser confundida con ella, lo cual es de gran riesgo para un paciente que está cursando una artritis séptica, debido a que si se prescriben erróneamente corticoides locales y sistémicos se podría conducir a un sepsis fatal (Wang y Wong, 2007).

La infección causada por *Spirillum minus*, microorganismo asociado también a la fiebre por mordedura de rata, a pesar de ser de distribución mundial resulta mucho más común en Asia, en donde se conoce como Sodoku (so= rata y doku= veneno). Este cuadro es de ocurrencia ocasional, la saliva y dientes de ratas y otros roedores son la fuente de infección. El cuadro clínico causado se diferencia del que produce *S. moniliformis* en que el período de incubación es más largo, la herida tarda en sanar, comienza a indurarse y puede haber ulceración con linfadenopatía regional asociada. Los episodios febriles recurren en varias ocasiones durante 1 a 3 meses. Las manifestaciones articulares no son frecuentes (Elliott, 2007). En este caso el diagnóstico se realiza por medio de un examen microscópico en campo oscuro del infiltrado de la herida, debido a que la bacteria no crece en medios de cultivo sintéticos (Acha y Szyfres, 1986).

Se ha visto que el *S. moniliformis* no afecta solamente al ser humano. El ratón, cobayo y pavo pueden contraer la infección desde las ratas, especialmente por mordeduras (Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats, 1991) y aunque la mayoría de las ratas son colonizadas de manera asintomática en ocasiones pueden mostrar signos y síntomas de enfermedad, ya que la bacteria puede actuar como un patógeno oportunista (Elliott, 2007) produciendo otitis media crónica o poliartritis en ratas jóvenes (Wilson *et al.*, 1996). En una epizootia en ratones de laboratorio, se registró alta morbilidad y mortalidad, con síntomas tales como poliartritis, gangrena y amputación espontánea de los miembros. Se sospecha que la infección de ratones de laboratorio puede producirse por vía aerógena cuando se les aloja en un mismo ambiente con ratas (Acha y Szyfres, 1986).

Manifestaciones de la infección por *S. moniliformis* en otros animales son abscedaciones cervicales y neumonía granulomatosa en cobayos, pleuritis en koalas y tendovaginitis, bursitis y poli artritis en pavos (Wilson *et al.*, 1996). Existe el caso de un perro infectado con *S. moniliformis* descrito en la literatura, el animal presentó diarrea, vómitos, anorexia y artritis de los miembros posteriores (Wouters *et al.*, 2007). También existen informes de la infección en primates no humanos como macacos rhesus y monos tití (Elliot, 2007).

Desafortunadamente, el diagnóstico de la fiebre por mordedura de rata es a menudo tardío debido a la ausencia de una historia de exposición a las ratas, a su presentación clínica inespecífica y a las características microbiológicas inusuales del organismo (Forbes *et al.*, 1998).

El *S. moniliformis* es el único integrante del género *Streptobacillus*. Este Gram negativo es altamente pleomórfico y en ocasiones forma filamentos que pueden mostrar abultamientos laterales, lo que le da apariencia de collar de perlas, de aquí el nombre moniliformis que quiere decir, en latín, en forma de collar (Wouters *et al.*, 2007). Su morfología varía con la edad y las condiciones del cultivo, pero usualmente mide de 1 a 5 μm de largo por 0.3 a 0.7 μm de ancho (Bottone *et al.*, 1996).



Figura n° 1: Tinción Gram de *S. moniliformis* que demuestra su apariencia típica, pleomórfica y en forma de collar, responsable de su nombre (Sthele *et al.*, 2003).

Este bacilo es extremadamente fastidioso y necesita una concentración de O₂ estrictamente baja (microaerofilia) para crecer, lo que hace más difícil el diagnóstico microbiológico. Su crecimiento óptimo requiere de agar o caldo soya trypticase enriquecido con 20% de sangre, suero sanguíneo o líquido ascítico. La bacteria crece lentamente (2 a 3 días) y puede tardar hasta una semana. El desarrollo típico tiene forma de motas de algodón en el caldo, mientras que las colonias en el agar aparecen circulares, convexas, grisáceas, suaves y brillantes (Elliott, 2007). El microorganismo debe ser subcultivado tan pronto como sea detectado, debido a que una marcada disminución en el pH del medio de cultivo puede ser letal (Murray *et al.*, 2003). Una vez que la bacteria ha crecido, su confirmación se realiza por medio de pruebas bioquímicas convencionales y análisis de fermentación de carbohidratos (Elliott, 2007).



Figura n° 2: Aspecto de motas de algodón característico de *Streptobacillus moniliformis* en caldo de cultivo (Albedwawi *et al.*, 2006).

Existen dos variantes del *S. moniliformis*, la forma bacilar común y la forma L, que es deficiente en pared y que generalmente ocurre frente a desafíos con penicilina. Las formas L crecen en el cultivo con forma de huevo frito, con centro oscuro y borde plano, similar a la apariencia de micoplasmas (Irvine y Wills, 2006). Se describe que se desarrollan con mayor frecuencia en cultivos envejecidos y es más fácil observarlas si son subcultivadas a un medio transparente (Wang y Wong, 2007). La forma L es considerada como apatógena, pero se le atribuye cierta responsabilidad en recaídas clínicas y en la resistencia a la terapia (Elliott, 2007).

La falta de familiaridad con la bacteria, el hecho que no existan test serológicos confiables disponibles y que el diagnóstico definitivo requiere del aislamiento del *S. moniliformis* desde la herida, sangre o líquido articular (Stehle *et al.*, 2003), hacen del diagnóstico de este microorganismo algo aun más complejo.

Para realizar el diagnóstico de *S. moniliformis*, éste puede ser aislado desde sangre o líquido articular de individuos sintomáticos (Bottone *et al.*, 1996) y también desde material pustular (Albedwawi *et al.*, 2006). Sin embargo, el aislamiento desde líquido sinovial es muy poco común (Dendle *et al.*, 2006).

Por todo lo anterior, una historia certera de exposición a las ratas es crucial. Alertar al laboratorio de bacteriología de la posibilidad de este diagnóstico antes de hacer el cultivo, será de gran ayuda en la recuperación del microorganismo (Cunningham *et al.*, 1998). Esto resulta primordial a la hora de escoger el medio de cultivo para sembrar la muestra, ya que éste no debe contener polianetol sulfonato de sodio (SPS), anticoagulante que es usado con frecuencia y que aun en cantidades muy pequeñas (0,0125%) inhibe el crecimiento de esta bacteria (Elliott, 2007).

Debido a la dificultad que presenta en este caso el diagnóstico microbiológico, nuevos métodos han sido desarrollados para ayudar a identificar al *S. moniliformis*. Estos métodos incluyen la cromatografía gas-líquido que analiza el perfil de ácidos grasos celulares del aislado y métodos moleculares como la secuenciación del gen 16S rRNA y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos moleculares pueden también utilizarse en la tipificación de aislados de *S. moniliformis* de humanos y roedores, y de este modo identificar la fuente de infección, incluso sin saber de la existencia de una mordida de rata (Wang y Wong, 2007).

La técnica de PCR ofrece una novedosa herramienta alternativa para el diagnóstico, la que adquiere especial importancia en pacientes en estado crítico y en aquellos en que la terapia antimicrobiana ya ha sido iniciada. Las herramientas de diagnóstico molecular pueden mejorar el diagnóstico de esta enfermedad y ayudar a disminuir su relevante mortalidad y morbilidad (Chen *et al.*, 2007).

Una vez realizado el diagnóstico es necesario instaurar una terapia con el antimicrobiano más adecuado. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos realizadas a distintas cepas de *S. moniliformis* utilizando el método de difusión de disco usualmente muestran sensibilidad a penicilina, cefalosporina, carbapenem, clindamicina, eritromicina, nitrofurantoina, bacitracina, tetraciclina y vancomicina. Por otra parte, este microorganismo resulta resistente a la acción de trimetoprim-sulfametoxazol, polimixina B y ácido nalidixico (Elliott, 2007).

Algunos autores proponen realizar una profilaxis posterior a la exposición con penicilina oral en dosis de 2 g diarios durante 3 días, a pesar que su eficacia clínica es desconocida (Chen *et al.*, 2007).

El tratamiento de elección para la fiebre por mordedura de rata es la penicilina, debido a que es el antibiótico *in vitro* más activo contra este microorganismo (Murray *et al.*, 2003), y además porque no se han reportado casos de cepas de *S. moniliformis* resistentes a ella; ampicilina, tetraciclina y cefalosporinas de segunda y tercera generación son también otras alternativas (Cunningham *et al.*, 1998).

Sin embargo, en caso de pacientes con artritis séptica la elección del antibiótico estará basada en la habilidad de éste para penetrar la membrana sinovial inflamada y alcanzar una concentración mínima inhibitoria deseable en el líquido sinovial. Estos pacientes responden a la flucloxacilina, vancomicina, clindamicina y rifampicina con buenos resultados, pese a esto, hacen falta estudios para determinar el mejor tratamiento para la artritis séptica asociada a *S. moniliformis*. Otras modalidades de tratamiento como artroscopia, artrotomía y lavados articulares son importantes para controlar localmente la enfermedad al interior de la articulación y están recomendados para todos los pacientes con artritis séptica de grandes articulaciones (Wang y Wong, 2007).

Los adultos con fiebre por mordedura de rata deben recibir 400.000 a 600.000 UI/día de penicilina G endovenosa por al menos 7 días, pero esto puede incrementarse hasta 1.200.000 UI/día al no obtener respuesta después de 2 días de tratamiento. Los niños deben recibir 20.000 a 50.000 UI/kg/día de penicilina G endovenosa durante 5 a 7 días, seguido de 7 días de penicilina V oral, en dosis de 25 a 50 mg/kg/día distribuido 4 veces al día. Para aquellos pacientes que son alérgicos a la penicilina, la estreptomocina y tetraciclina son bastante efectivas. Pacientes con endocarditis debido a la infección por *S. moniliformis* requieren una terapia dual con altas dosis de penicilina G en combinación con estreptomocina o gentamicina (Elliott, 2007).

Los casos de fiebre por mordedura de rata que no son tratados presentan una tasa de mortalidad de aproximadamente un 10% (Elliott, 2007). Esta mortalidad generalmente se asocia a los casos ocurridos en lactantes y a los pacientes que desarrollan endocarditis (Graves y Janda, 2001).

Debido a que no existen vacunas disponibles para prevenir la fiebre por mordedura de rata, la mejor manera de prevenir esta enfermedad es evitando el contacto con aquellos animales en que es sabido que son portadores del organismo causal. En las personas que no pueden evitar el contacto, debido a que es parte de su trabajo, se recomienda trabajar responsablemente siguiendo las medidas de bioseguridad pertinentes, como el uso de guantes y mascarilla, lo que puede prevenir el contagio.

Otras medidas importantes de protección son la pasteurización de la leche y la protección de alimentos contra los roedores (Acha y Szyfres, 1986).

En los bioterios el control se basa en la detección y eliminación de animales portadores, y en evitar el acceso de roedores peridomésticos a las instalaciones (Fernández *et al.*, 2001). También se realiza derivación por cesárea, procedimiento que consiste en la extracción de las crías por cesárea y que luego serán criadas por madres nodrizas SPF (libres de patógenos específicos), con este método las crías se mantienen libres del microorganismo. Otras medidas de control son la mantención de barreras sanitarias y el monitoreo regular de los animales. Lo principal es evitar mantener albergados ratas y ratones en una misma sala (Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats, 1991).

HIPÓTESIS

- *Streptobacillus moniliformis* es un microorganismo comensal de las ratas convencionales en estudio.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia o ausencia de *Streptobacillus moniliformis* en el tracto nasofaríngeo de ratas provenientes de un bioterio convencional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar búsqueda activa de *Streptobacillus moniliformis* en el grupo de ratas en estudio.
- Comparar la sensibilidad entre cultivo microbiológico y la técnica de amplificación del DNA mediante PCR, en la detección de *Streptobacillus moniliformis* desde la cavidad nasofaríngea de las ratas en estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experiencia piloto:

Como introducción al estudio de *S. moniliformis* se realizó previamente una experiencia de aproximación con el fin de obtener información beneficiosa para realizar el estudio propiamente tal de la mejor manera posible. Para esto se utilizaron 14 ratas convencionales pertenecientes al Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de cada una de ellas se obtuvo una muestra de secreción nasofaríngea con tómulas estériles tamaño estándar (DOC[®]), siendo introducidas por un costado de la cavidad oral del animal hasta lo más profundo y finalmente rotada hacia ambos lados. Todas las muestras fueron sometidas a diagnóstico microbiológico y molecular obteniéndose un 100% de negatividad. Este resultado se asoció principalmente al método de obtención de la muestra, el cual fue modificado en busca de mejores resultados.

Diseño experimental:

Estudio descriptivo y prospectivo.

Ética:

La presente investigación se realizó bajo las normas internacionales para la investigación biomédica con animales, señaladas en los códigos internacionales de ética por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas en el Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana de 1990 (Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas, 1990).

Animales:

Se utilizaron 20 ratas (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley convencionales, adultas, con un peso que varió entre 216 y 298 g, sin distinción de sexo y clínicamente sanas. Todas las ratas pertenecían al Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En este bioterio, por ser convencional, los animales poseen una carga microbiana desconocida, son mantenidos en una sala exclusiva en un ambiente sin barreras sanitarias, en jaulas de policarbonato con viruta autoclavada y alimentadas con un extruído formulado especialmente para ratas de laboratorio (Champion[®]) y agua *ad libitum*.

Obtención de muestras clínicas:

Se obtuvieron muestras de secreción nasofaríngea de cada una de las 20 ratas seleccionadas, las cuales fueron previamente sedadas para tomar la muestra, con el fin de alcanzar de manera más fácil la mucosa nasofaríngea del animal. Para la sedación se utilizó ketamina en dosis de 100 mg/kg (Ketamil 10%, Troy Laboratorios) y xilacina en dosis de 10 mg/kg (Xylavet 2%, Alfasan Internacional B.V), ambas por vía intraperitoneal. Una vez sedada la rata y dispuesta en decúbito dorsal, se le extrajo cuidadosamente la lengua con una pinza para introducir un torulín estéril (Linsan[®]) hasta la nasofaringe.



Figura n° 3: Tórula y torulín, se aprecia la gran diferencia de volumen.

La toma de muestras se realizó en la sala de procedimientos del bioterio, bajo condiciones de bioseguridad adecuadas y con el apoyo y supervisión del personal, el cual se encuentra calificado para esta función. Las muestras clínicas obtenidas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio.

Siembra y cultivo de las muestras:

Las técnicas microbiológicas clásicas fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.

Las muestras fueron sembradas en placas de agar sangre anaerobio (ANEXO 1). Una vez realizada la siembra el contenido de cada torulín fue inmediatamente suspendido en 100 µl de tampón sacarosa fosfato (ANEXO 2) y se almacenó a -20°C para su posterior utilización en el diagnóstico molecular.

Las siembras fueron incubadas a 36°C en un ambiente con 3% de CO₂ (jarra con vela). Los cultivos fueron examinados a las 72 hrs. de incubación mediante análisis con lupa estereoscópica en busca de colonias sospechosas (circulares, convexas, grisáceas, suaves y brillantes). Se efectuó tinción de Gram (ANEXO 3) de todas las colonias que cumplieron con las características descritas; circulares, de superficie lisa y brillante y de un tamaño de 1-3 mm. Toda colonia sospechosa fue procesada para su posterior identificación y confirmación por medio de pruebas bioquímicas en el Laboratorio de Anaerobios y Fastidiosos del Instituto de Salud Pública de Chile.

Caracterización bioquímica esperada:

- Reducción de Nitrato (-)
- Hidrólisis de Esculina (-)
- Citrato de Simmons (-)
- Arginina (+)
- Urea (-)
- Manitol (-)
- Lactosa (-)
- Sacarosa (-)
- Xilosa (-)
- Maltosa (-)
- Oxidasa (-)
- Catalasa (-)
- Indol (-)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

El protocolo de amplificación de *S. moniliformis* mediante PCR fue implementado en el Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, utilizando como control positivo una cepa chilena de *S. moniliformis*. Se estandarizó la concentración óptima de MgCl₂ y la temperatura de hibridación, ya que ellas inciden directamente en la sensibilidad y especificidad del procedimiento, mientras que las concentraciones de los otros reactivos de la PCR; partidores, dNTP, buffer de reacción y enzima *Taq*, como asimismo el número de ciclos fue similar a la empleada de rutina para las reacciones de amplificación en el laboratorio de Microbiología. Para la determinación de la concentración óptima de MgCl₂, se amplificó el DNA de *S. moniliformis* en presencia de concentraciones crecientes de MgCl₂: 1.5, 2, 2.5 y 3 mM. La concentración óptima correspondió a aquella que permitió observar una banda intensa y precisa de DNA. La temperatura óptima de hibridación correspondió a 2 grados bajo la T_m (temperatura de melting) de los partidores, para lo cual se utilizó la fórmula proporcionada en: http://www.promega.com/biomath/calc11.htm#melt_results. Esta temperatura fue confirmada efectuando las reacciones de amplificación a 54°C, 55°C y 56°C, para elegir la temperatura en la que la banda de amplificación fue de mejor calidad.

Una vez implementada la PCR, el diagnóstico molecular de las muestras clínicas fue efectuado en la Unidad de Biotecnología e Inmunobiológicos del Instituto de Salud Pública de Chile.

Para llevar a cabo la prueba de PCR, se utilizó un termociclador Parkin Elmer modelo Thermal Cycler 480[®], 48 pocillos, 0.5 ml. Los partidores utilizados en la prueba fueron seleccionados de la literatura por su alta especificidad para detectar *S. moniliformis*, que detectan una secuencia específica del gen 16S rRNA y fragmentos de DNA de alrededor de 296 pares de bases (Boot *et al.*, 2002). Éstos fueron elaborados por la empresa Cesat[®].

Partidor sentido: 5' GCT TAA CAC ATG CAA ATC TAT 3';

Partidor anti sentido: 5' AGT AAG GGC CGT ATC TCA 3'.

La reconstitución de los partidores se hizo considerando la concentración informada por el fabricante (Cesat[®]).

La mezcla de reacción fue preparada bajo una cámara de flujo laminar (Esco[®] Smart Control). Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 100 µl conteniendo 2.5 mM MgCl₂, ThermoPol Buffer 1X (New England Bio Labs[®]), 200 µM de cada nucleótido trifosfato (Invitrogen[®]), 1 µM de cada partidor, 5 U de *Taq* DNA Polimerasa (New England Bio Labs[®]) y 7 µl de templado.

El protocolo de amplificación incluyó una denaturación inicial de 94°C por 4 minutos, seguida por 40 ciclos con denaturación de 94°C por 1 minuto, hibridación o “annealing” de 55°C por 1 minuto y, extensión a 72°C por un minuto. Finalmente, se hizo un período de extensión adicional de 72°C por 7 minutos. El producto del PCR fue sometido a electroforesis para su visualización en forma inmediata o bien se almacenó a 4°C por no más de 24 hrs.

La visualización del producto amplificado por el PCR, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (US Biological[®]) al 2% en buffer Tris acetato EDTA (TAE). Se tomaron 12 µl del producto de PCR, y se mezclaron con 3 µl de un producto comercial de carga (6X Loading Dye Solution (Fermentas[®])) que posee glicerol para proporcionar densidad a la muestra y dos tintes: azul de bromofenol y xileno cianol FF, para chequear el progreso de la migración de las bandas de DNA en la electroforesis, que se llevó a cabo a 120V por 45 minutos. Se utilizó un marcador de tamaño molecular (100 bp DNA Ladder (Novagen[®])), el cual contiene fragmentos de DNA entre 100 y 1000 pares de bases. Como control positivo del proceso de amplificación se incluyó una cepa de referencia, la cual fue suministrada gentilmente por T.M. María Eugenia Valenzuela M. (ISP, Chile). Como control negativo se incluyó un tubo conteniendo todos los reactivos de la PCR excepto DNA, cada 8 muestras amplificadas. Al finalizar la electroforesis, el gel se sumergió en bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) (Sigma[®]), durante 10-15 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat[®]), y posteriormente se fotografiaron.

Bioseguridad:

En el bioterio se siguieron las medidas de bioseguridad internas, se utilizó bata, gorro y cubrecalzado para ingresar a la sala de animales y su posterior manipulación.

En el ISP los geles de electroforesis contaminados con bromuro de etidio fueron depositados en una bolsa especial para desechos biológicos, la que posteriormente es derivada a la Central de Energía y Fluidos donde una empresa externa se encarga de su incineración.

Análisis de Datos:

Los resultados del presente estudio fueron expresados como una proporción de prevalencia con un intervalo de confianza de 95%, utilizando una fórmula descrita por Agresti & Coull, 1998.

$$p' = \frac{n^\circ \text{éxitos} + 2}{n^\circ \text{experimentos} + 4} = \frac{S + 2}{N + 4}$$

$$p' = \frac{8 + 2}{20 + 4} = \frac{10}{24} = 0.4167$$

$$IC = \left[p' - \left(1.96 \sqrt{\frac{p' \cdot (1 - p')}{N + 4}} \right) \right] \text{ hasta } \left[p' + \left(1.96 \sqrt{\frac{p' \cdot (1 - p')}{N + 4}} \right) \right]$$

$$IC = \left[0.4167 - \left(1.96 \sqrt{\frac{0.243}{24}} \right) \right] \text{ hasta } \left[0.4167 + \left(1.96 \sqrt{\frac{0.243}{24}} \right) \right]$$

$$IC = [0.219 \text{ hasta } 0.614]$$

RESULTADOS

Aislamiento en cultivo:

En las 20 muestras nasofaríngeas obtenidas de ratas no se detectó ninguna muestra positiva. Un solo cultivo que resultó sospechoso y que fue procesado en el ISP para su confirmación, fue descartado, debido a que la caracterización bioquímica resultó negativa.

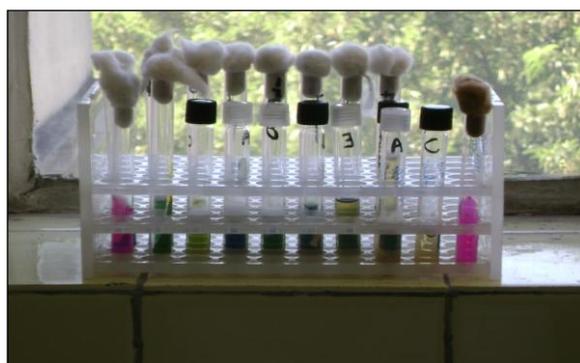


Figura n° 4: Batería de pruebas bioquímicas realizada para la identificación del cultivo sospechoso.

Reacción en cadena de la polimerasa:

Al realizar la PCR de acuerdo al protocolo implementado, con 40 ciclos, en muestras nasofaríngeas de ratas convencionales, se logró amplificar la secuencia blanco buscada: el gen 16S rRNA. De las 20 muestras analizadas se detectaron 8 (40%) muestras positivas al PCR, las bandas obtenidas poseían un peso molecular de alrededor de 296 pares de bases, y se observaron nítidas y gruesas. Se obtuvo una sola banda por carril, sin que se produjeran amplificaciones inespecíficas. El control positivo también mostró una banda de amplificación de 296 pares de bases aproximadamente, mientras que el control negativo no presentó amplificación alguna.

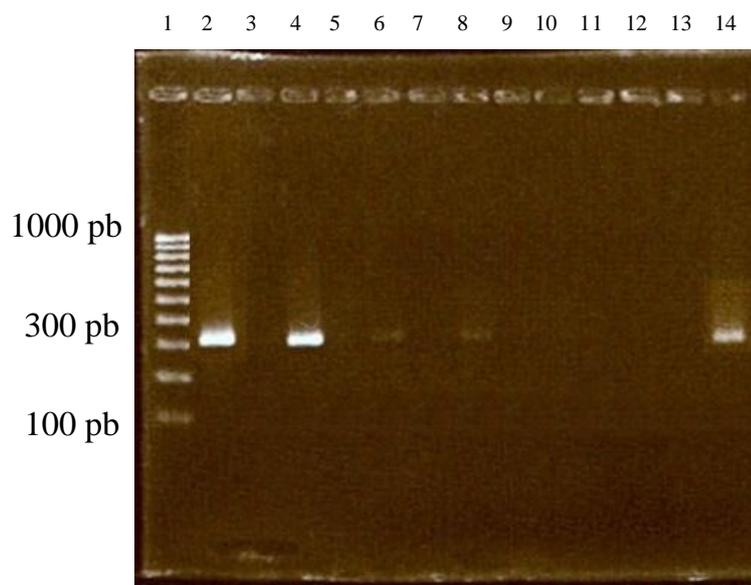


Figura n° 5: Gel de electroforesis de los productos de amplificación mediante PCR del gen 16S rRNA de *Streptobacillus moniliformis*. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: control positivo; Carril 3: control negativo; Carriles 4 y 14: muestras positivas; Carriles 5-13: muestras negativas.

Prevalencia:

Utilizando la fórmula de Agresti & Coull, 1998 se obtuvo que:

$$p' = 41,6\%$$

Luego al reemplazar este valor en la fórmula de los intervalos de confianza (IC), obtenemos que la prevalencia de *S. moniliformis* en las ratas convencionales en estudio se encuentra entre 21.9% y 61.4%.

Un valor $p' = 0,4167$ es un estimador del verdadero p de la población (universo). El intervalo de confianza tiene un 95% de confianza por haber trabajado con el factor 1.96 de la curva normal. Por lo tanto, el 95% de las veces se obtendrán intervalos de confianza que contienen el mismo parámetro al repetir el experimento bajo las mismas condiciones.

DISCUSIÓN

Streptobacillus moniliformis es una bacteria zoonótica que merece una mayor atención que la que posee actualmente debido a las consecuencias que tienen las infecciones que produce en el hombre y en los animales. En el hombre como agente causal tanto de la fiebre por mordedura de rata como de la fiebre de Haverhill, enfermedades que si bien no se conocen sus prevalencias ni incidencias con exactitud debido a que no son de denuncia obligatoria, constituyen un riesgo ya que si no son diagnosticadas ni tratadas adecuadamente, pueden llevar a graves complicaciones con una letalidad de hasta 13% (Elliott, 2007).

Por otra parte, este microorganismo que se creía erradicado con el uso de modernos sistemas de mantenimiento de animales de laboratorio (Boot *et al.*, 2002), necesita de más alerta, debido a que recientemente ha sido aislado desde roedores de laboratorio. Esto representa un grave riesgo para los animales, ya que a pesar que en las ratas es parte de su microbiota, puede comportarse como un patógeno oportunista y dar origen a infecciones y también puede producir graves epizootias en ratones con consecuencias desastrosas en bioterios. Debido a que el ratón es el modelo animal preferido por los investigadores, se han hecho grandes esfuerzos en identificar el riesgo de colonización y enfermedad por *S. moniliformis* y de esta forma evadir las pérdidas producidas por la alta morbilidad y mortalidad que caracteriza a la infección en estos animales.

El diagnóstico de *S. moniliformis* mediante aislamiento en cultivo ha demostrado tener bajo rendimiento, incluso a partir de sangre y líquido sinovial de individuos infectados, por lo que ha sido reemplazado por las técnicas de biología molecular como PCR (Stehle *et al.*, 2003). La morfología de las colonias varía ampliamente dependiendo del medio de cultivo y su tiempo de incubación (Wullenweber, 1995). En agar, da origen a colonias diminutas y de lento crecimiento, siendo rápidamente inhibidas por la microbiota acompañante. A partir de los 5 días de incubación *S. moniliformis* origina colonias en forma de “huevo frito” (Elliott, 2007) más fáciles de observar, pese a esto, no es posible técnicamente cultivar muestras polimicrobianas por un período de tiempo tan prolongado, ya que la mayoría de los microorganismos crecen rápidamente a partir de las 24 hrs de incubación, impidiendo la visualización de las

colonias. Sería necesario efectuar diluciones seriadas de las muestras clínicas con el objeto de obtener colonias aisladas. Es importante mencionar que la capacidad de seleccionar colonias puras es un requisito indispensable para la identificación y caracterización bacteriana.

Por otra parte, en medios de cultivo líquido enriquecidos con suero sanguíneo o líquido ascítico, *S. moniliformis* presenta un desarrollo característico como motas de algodón, entre 2 y 7 días de incubación (Elliot, 2007). Sin embargo, los caldos de enriquecimiento resultan una herramienta especialmente útil para el aislamiento microbiano a partir de tejidos habitualmente estériles como sangre y líquido sinovial, mientras que la cavidad oral de las ratas se caracteriza por poseer una abundante microbiota comensal que impide la visualización del crecimiento de este microorganismo, lo que dificulta su diagnóstico por medio de esta técnica. Por lo demás, una vez que el caldo resulta positivo, lo que está dado por su turbidez, igual debe subcultivarse en agar para obtener colonias aisladas y poder realizar su identificación, lo que resulta igualmente engorroso.

Lamentablemente, aun no se han desarrollado medios selectivos para el aislamiento de este microorganismo, lo que ha dificultado el conocimiento de su verdadera prevalencia en la microbiota de las ratas y su frecuencia en infecciones humanas.

A pesar de que *S. moniliformis* es un microorganismo bastante inerte bioquímicamente, la prueba de hidrólisis de la arginina constituye una prueba diagnóstica de certeza ya que el 100% de las cepas muestran un resultado positivo (Bottone *et al.*, 1996). En el caso de la única colonia obtenida como sospechosa, esta resultó negativa a la hidrólisis de la arginina; para confirmar se realizó una repetición de la prueba y se obtuvo el mismo resultado.

Las técnicas de PCR como las de ELISA resultan igualmente exitosas en detectar la infección en ratas cuando *S. moniliformis* no logró ser detectado utilizando aislamiento en cultivos (Boot *et al.*, 2002). Para este estudio, se utilizó la técnica de PCR con los partidores descritos por Boot *et al.*, 2002. El partidor sentido es 100% específico para *S. moniliformis*, sin embargo, con el tiempo se ha demostrado que el partidor anti sentido muestra complementariedad con otras bacterias, entre las cuales para este caso resulta más significativa *Leptotrichia sp.* (Boot *et al.*, 2007), bacteria que habita en la saliva de mamíferos. Al no haberse realizado secuenciación del DNA de las muestras positivas, debido a que ocurrió degradación del material genético, se podría suponer que se trataría de falsos positivos, sin embargo, el hecho de no haber encontrado ningún resultado positivo en la experiencia piloto, donde la muestra correspondía mayoritariamente a saliva del animal, y por el contrario haber encontrado un alto número de muestras positivas en el estudio, donde la muestra correspondía a secreción nasofaríngea, hábitat del *S. moniliformis*, nos sugiere especificidad de la prueba. Además, las reacciones de PCR fueron efectuadas en condiciones de estrictez, como temperatura y concentración de magnesio, lo que le otorga especificidad a las reacciones.

La PCR se utiliza como herramienta indispensable para el diagnóstico de bacterias no cultivables, bacterias de lento crecimiento o para aquellas en las que la técnica de cultivo tiene escasa sensibilidad, como es el caso de *S. moniliformis*. Debido a que la técnica es de alto costo, en la actualidad sólo algunos laboratorios y centros de referencia cuentan con esta tecnología. Por ello, resulta fundamental que estas entidades implementen las condiciones necesarias para la realización de futuros diagnósticos de *S. moniliformis*. Por otro lado, es necesario que los centros de salud estén en pleno conocimiento de dónde se realizan estas técnicas moleculares, para que en caso de presentarse una sospecha de fiebre por mordedura de rata, se realicen los estudios pertinentes, y no sólo las técnicas microbiológicas tradicionales.

Idealmente, después de efectuar la PCR, se debiese secuenciar el DNA, para así tener plena certeza del diagnóstico y descartar posibles falsos positivos, en el caso de *S. moniliformis* se recomienda hacer la secuenciación lo más pronto posible, y de esta forma evitar una potencial degradación del material genético, que fue lo que aconteció en este estudio.

El alto número de muestras positivas obtenidas en el estudio, a diferencia de lo observado en la experiencia piloto, se explica porque al anestésiar a las ratas y utilizar un torulín muy delgado, resulta mucho más accesible la nasofaringe del animal, que constituye el hábitat del *S. moniliformis*.

Por lo descrito anteriormente el diagnóstico de este microorganismo resulta muy dificultoso.

Debido a que *S. moniliformis* representa un riesgo para la salud humana por corresponder a un microorganismo zoonótico, sería necesario que la población sea educada al respecto, especialmente las personas que tienen mayores posibilidades de infectarse, ya sea:

- porque viven en condiciones de pobreza o ruralidad, en donde el contacto con ratas silvestres es más factible.
- porque poseen roedores como mascotas, lo que significa un gran riesgo principalmente para los niños.
- porque trabajan en un bioterio o en tiendas de mascotas.

Además, todo el personal que trabaja con animales de laboratorio debe saber como manejar las especies involucradas, tanto para su salud y seguridad propia, como para la de los animales. En consecuencia, las instituciones tienen el deber de proveerles la capacitación adecuada.

Por otra parte, resulta imperioso que el personal de la salud esté en conocimiento de la posible reemergencia de este microorganismo, y así reconocer oportunamente las infecciones causadas por este agente ya que el diagnóstico y tratamiento inadecuados ponen en riesgo la vida del paciente.

CONCLUSIONES

- 1.- Por primera vez en el país se detectó *Streptobacillus moniliformis* en ratas de bioterio convencional mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 2.- *S. moniliformis* se aisló en el 40% de muestras nasofaríngeas de ratas de un bioterio convencional, parámetro incluido dentro de la información bibliográfica internacional.
- 3.- El cultivo microbiológico no detectó la presencia de *S. moniliformis*.
- 4.- La técnica de PCR permitió detectar la presencia de *S. moniliformis*, demostrando ser una técnica altamente sensible para el diagnóstico de este microorganismo.
- 5.- Se demuestra la presencia de *S. moniliformis* en animales provenientes de un bioterio convencional, lo que alerta la posibilidad de riesgo para profesionales y trabajadores que se desempeñan en esta área.

ANEXO 1

Soluciones y medios de cultivo:

Agar Sangre Anaerobio (100 ml)

Tripticase Soy Agar (Difco®)	4 g
Extracto de levadura (BD®)	0.5 g
L-cisteína* (Merck®)	0.04 g
Agua destilada	100 ml

Esterilizar a 121°C por 15 min. Cuando esté a 48-50°C, colocar sangre desfibrinada de cordero 5 ml y 1 ml de solución vitamina K1/hemina.

* Disolver la L-cisteína en 0.5 ml de NaOH 1N.

Distribuir en placas (20 ml).

Solución de vitamina K/hemina

Hemina	50 mg
NaOH 1N	10 ml
Agua destilada	100 ml

Esterilizar a 121°C por 15 min.

Solución stock 0.5 mg/ml.

Usar en concentración final de 5 µg/ml.

Vitamina K

Agregar una ampolla de vitamina K1 (Fitoquinona) de 10 mg (LCh®) a los 100 ml de hemina (en forma estéril).

Solución stock 0.1 mg/ml.

Usar en concentración final de 10 µg/ml.

Repartir en forma estéril en tubos de tapa rosca protegidos de la luz.

Agregar 1 ml por cada 100 ml de medio.

ANEXO 2

Buffer Sacarosa Fosfato (2SP) (200 ml)

Composición:

- Sacarosa	9.7 g
- K ₂ HPO ₄	0.4 g
- KH ₂ PO ₄	0.2 g
- Agua destilada	180 ml

Preparación:

Se suspenden los ingredientes en 85 ml de agua destilada.

Se esteriliza a 121°C por 15 min.

Se enfría por media hora en el baño termorregulado ajustado a 55°C.

Se le agrega en forma estéril: - suero de caballo 20 ml
- cefotaxima 32 µg/ml

Se distribuye 3 ml aproximadamente en tubos tapa rosca.

Los tubos se etiquetan y se congelan.

ANEXO 3

Tinción de Gram

Técnica:

- preparar los frotis bacterianos
- teñir con cristal violeta 1 min.
- lavar con abundante agua el exceso de colorante
- cubrir con lugol 1 min.
- lavar con agua el exceso de lugol
- descolorar con alcohol-acetona hasta que la preparación deje de perder color (30 seg.)
- lavar con abundante agua para eliminar el resto de disolvente
- teñir con safranina 1 min.
- lavar con agua para eliminar el colorante de contraste
- secar la preparación
- observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X)

BIBLIOGRAFÍA

- **ACHA, P.; SZYFRES, B.** 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª ed. Publicación Científica N° 503 OPS/OMS. v. 1.
- **AGRESTI, A.; COULL, B.A.** 1998. Approximate is better than "exact" for interval estimation of binomial proportion. *TAS*. 52(2): 119-126.
- **ALBEDWAWI, S.; LEBLANC, C.; SHOW, A.; SLINGER, R.W.** 2006. A teenager with fever, rash and arthritis. *CMAJ*. 175(4): 354.
- **BOOT, R.; OOSTERTHUIS, A.; THUIS, H.** 2002. PCR for detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab. Anim.* 36: 200-208.
- **BOOT, R.; VAN DE BERG, L.; REUBSAET, F.; VLEMMINX, M.J.** 2007. Positive *Streptobacillus moniliformis* PCR in guinea pigs likely due to *Leptotrichia* spp. [en línea] *Vet. Microbiol.* 128 (3-4): 395-399.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD6-4PX7B46-2&_user=6440747&_coverDate=04%2F30%2F2008&_alid=751993800&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5190&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_ct=3&_acct=C000053978&_version=1&_urlVersion=0&_userid=6440747&_md5=a759257df1513ad48b0e93c2ef79d627 [consulta:15-11-2007]
- **BOTTONE, E.; HANNA, B.; HONG, T.; INZANA, T.; NAMDARI, H.; QURESHI, N.; WEYANT, R.** 1996. Laboratory diagnosis of zoonotic infections: bacterial infections obtained from companion and laboratory animals. *ASM news CUMITECH* 27: 1-24.
- **CHEN, P.; LEE, N.; YAN, J.; YANG, Y.; CHEN, H.; CHANG, C.; LEE, H.; KO, N.; LAI, C.; KO, W.** 2007. Prosthetic valve endocarditis caused by *Streptobacillus moniliformis*: a case of rat bite fever. *J. Clin. Microbiol.* 45(9): 3125-3126.

- **CLARKE, A.M; VIRGINCAR, N.; LANKESTER, B.; RAZA, M.; ROBERTSON, L.; GARGAN, M.F.** 2005. Rat bite fever – a rare cause of septic arthritis. [en línea] Injury Extra. 36: 99-100. <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B7CRN-4FN4VV9-1-3&_cdi=17999&_user=10&_orig=search&_coverDate=05%2F31%2F2005&_sk=999639994&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkWW&md5=f6fcb2fa4547bcbfff71885bd56e0404&ie=/sdarticle.pdf> [consulta: 15-11-2007]
- **COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES OF MICE AND RATS, INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES, COMMISSION ON LIFE SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL.** 1991. Infectious Diseases of Mice and Rats. National Academy Press. Washington DC, USA. 415 p.
- **CONSEJO DE ORGANIZACIONES INTERNACIONALES DE CIENCIAS MÉDICAS.** 1990. Normas Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 108 (5-6): 637-641.
- **CUNNINGHAM, B.B; PALLER, A.S; KATZ, B.Z.** 1998. Rat bite fever in a pet lover. J. Am. Acad. Dermatol. 38: 330-332.
- **DENDLE, C.; WOOLLEY, I.J.; KORMAN, T.M.** 2006. Rat-bite fever septic arthritis: illustrative case and literature review. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25: 791-797.
- **ELLIOTT, S.P.** 2007. Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. Clin. Microbiol. Rev. 20(1): 13-22.

- **FERNÁNDEZ, M.; TARRADAS, C.; ASTORGA, R.; LUQUE, I.; SERRANO, J.** 2001. Zoonosis y alergia. **In:** Zúñiga, J.; Tur Marí J.; Milocco, S.; Piñeiro, R. Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 267-289.

- **FORBES, B.; SAHM, D.; WEISSFELD, A.** 1998. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed. Mosby, Inc. USA. 1074 p.

- **GRAVES, M.H; JANDA, J.M.** 2001. Rat-bite fever (*Streptobacillus moniliformis*): a potencial emerging disease. Int. J. Infect. Dis. 5: 151-154.

- **IRVINE, L.E.; WILLS, T.S.** 2006. *Streptobacillus moniliformis*: a mouse trying to become a rat. Clin. Microbiol. Newsl. 28: 118-120.

- **MURRAY, P.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J.; PFALLER, M.; YOLKEN, R.** 2003. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM PRESS. Washington DC, USA. v.2.

- **PROMEGA CORPORATION.** 2007. Tools, BioMath Calculators. [en línea] <http://www.promega.com/biomath/calc11.htm#melt_results> [consulta: 02-07-2007]

- **STEHLE, P.; DUBUIS, O.; SO, A.; DUDLER, J.** 2003. Rat bite fever without fever. Ann. Rheum. Dis. 62: 894-897.

- **WANG, T.; WONG, S.** 2007. *Streptobacillus moniliformis* septic arthritis: a clinical entity distinct from rat-bite fever? BMC Infect. Dis. 7: 56.

- **WILSON, J.R; MORTON, J.G; MATTHEWS, L.M.** 1996. *Streptobacillus moniliformis* infection in Swiss white mice. J. Vet. Diagn. Invest. 8: 202-209.

- **WOUTERS, E.; HO, H.; LIPMAN, L.; GAASTRA, W.** 2007. Dogs as vectors of *Streptobacillus moniliformis* infection? [en línea] Vet. Microbiol. 128 (3-4): 419-422.
 <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD6-4R063XP-2&_user=6440747&_coverDate=04%2F30%2F2008&_alid=703605943&_rdoc=2&_fmt=full&_orig=search&_cdi=5190&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_ct=26&_acct=C000053978&_version=1&_urlVersion=0&_userid=6440747&md5=833c47037e7d52d015b0b670df40b5a6> [consulta: 15-11-2007]

- **WULLENBERG, M.** 1995. *Streptobacillus moniliformis* – a zoonotic pathogen. Taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. Lab. Anim. 29:1-15.