

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Informe de Trabajo Final presentado para optar al
Grado de Médico Veterinario

Modalidad: Trabajo de investigación

“Detección de *Brachyspira spp.* y sus efectos productivos en
gallinas ponedoras en argentina.”

Basconi, Dario Jesus

37.193.091

Directora: Pelliza, Bibiana.

Río Cuarto, Córdoba.

Septiembre, 2019.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: “Detección de *Brachyspira spp.* y sus efectos productivos en gallinas ponedoras en argentina.”

Autor: Basconi, Dario Jesus.
DNI: 37193091.

Director: Pelliza, Bibiana.

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la
Comisión Evaluadora:

Illanes, Natalia Verónica

Gutierrez Iriart, Valeria Verónica

Fecha:

ÍNDICE

- I. CERTIFICADO DE APROBACION.
- II. ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN	1
EL GÉNERO BRACHYSPIRA.....	2
BRACHYSPIRA SPP. EN MAMÍFEROS.....	3
LA ESPIROQUETOSIS INTESTINAL HUMANA.....	4
BRACHYSPIRA SPP. EN AVES	4
SIGNOS CLINICOS Y LESIONES EN GALLINAS PONEDORAS.....	6
FORMAS DE PRESENTACION Y FACTORES DE RIESGO.....	7
DIAGNOSTICO	10
OBJETIVOS GENERALES.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIÓN.....	21
BIBLIOGRAFIA	22

INTRODUCCIÓN

Con el fin de garantizar una producción de alimentos segura y sostenible, con el correr de los años se ha tendido a la cría de animales controlada. La constante optimización de las técnicas de reproducción y el aumento de la eficiencia de la producción ha llevado a la reducción significativa del precio de la carne y de los productos lácteos a lo largo de los años, proporcionando un acceso más amplio a los productos derivados de animales en países donde no se consumían tradicionalmente (Pretty et al. 2003). Por lo tanto, existe un interés creciente en reducir los costos de producción y garantizar una mayor seguridad y calidad para los consumidores, mejorando el bienestar animal. En este contexto, es particularmente importante reducir las enfermedades en la producción animal, especialmente aquellas que tienen potencial zoonótico. Las enfermedades gastrointestinales son comunes en las aves de producción, y su incidencia ha aumentado en la industria agrícola a gran escala debido a las prácticas intensivas. Este tipo de cría facilita la rápida propagación de las infecciones entre los animales (Hampson et al. 2013). Los trastornos gastrointestinales en los establecimientos avícolas confinados a menudo resultan de la colonización del tracto gastrointestinal por diversos microorganismos patógenos (Ghorbani-Dalini et al. 2011) que produce un impacto negativo en los índices productivos, entre estos, *Brachyspira spp.* es un agente emergente, que induce espiroquetosis intestinal, este patógeno además de ser emergente causa infecciones en varias especies incluidas las aves (Jansson et al. 2011).

EL GÉNERO BRACHYSPIRA

Las espiroquetas intestinales del género *Brachyspira* (etimología Gr. Brachy 'corto' y speira 'bobina') son bacterias anaerobias, tolerantes al oxígeno, Gram-negativas, que tienen forma espiralada, y colonizan el revestimiento de las células epiteliales del tracto intestinal de algunos mamíferos y aves (Jansson, 2009) El género *Brachyspira* actualmente incluye siete especies que se encuentran en la nomenclatura, y seis especies propuestas provisionalmente por Jansson, 2009.

Especies.	Hospedadores.	Referencia.
<i>Brachyspira aalborgi</i>	Humano y primates no humanos.	Hovind-Haugen et al., 1982.
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Cerdo, rata, ratón, ñandú común, pato silvestre, pollo y ganso.	Taylor y Alexander, 1971; Harris et al., 1972.
<i>Brachyspira innocens</i>	Cerdo, perro, caballo y pollo.	Kinyon y Harris, 1979 Stanton et al., 1992.
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	Múltiples especies ^b	Trott et al., 1996b.
<i>Brachyspira intermedia</i>	Cerdo y pollo.	Stanton et al., 1997.
<i>Brachyspira murdochii</i>	Cerdo, pollo y rata.	Stanton et al., 1997.
<i>Brachyspira alvinipulli</i>	Pollo, gallina doméstica, pato serrucho (<i>Mergus serrator</i>) y perro.	Stanton et al., 1998.
' <i>Brachyspira canis</i> '	Perro.	Duhamel et al., 1998.
' <i>Brachyspira pulli</i> '	Pollo y perro.	Stephens and Hampson, 1999.
' <i>Brachyspira ibaraki</i> '	Humano.	Tachibana et al., 2003.
' <i>Brachyspira christiani</i> '	Humano.	Jensen et al., 2001.
' <i>Brachyspira suanatina</i> '	Cerdo y pato silvestre.	Jansson, 2009.
' <i>Brachyspira corvi</i> '	Grajilla, corneja y graja.	Jansson, 2009.

^a Las especies entre comillas no están validadas / reconocidas.; ^b hospedadores: cerdo, perro, caballo, primates no humanos, humano, pollo, faisán, perdiz gris, aves de agua salvaje, ñandú común.

Con los años, ha habido una considerable confusión taxonómica. Originalmente, *Brachyspira hyodysenteriae* se describió como un microorganismo similar al vibrión (*Vibrio coli*) (Lussier, 1962). Una década más tarde, se demostró que cumplía los postulados de Koch, y se identificó como una espiroqueta y se le cambió el nombre a *Treponema hyodysenteriae* (Taylor y Alexander, 1971; Harris et al., 1972). Inicialmente, este nombre se utilizó para todas las espiroquetas intestinales aisladas de cerdos independientemente de las propiedades fenotípicas y la patogenicidad. Más tarde, una especie débilmente hemolítica, aparentemente no patógena presente en las heces de cerdo, se caracterizó y se denominó *Treponema innocens* (Kinyon y Harris 1979). Luego se demostró que estas especies estaban genéticamente relacionadas entre sí, pero distantes al género *Treponema*, y por lo tanto, fueron reclasificadas en un nuevo género *Serpula*

(del Latin 'pequeña serpiente') (Paster et al., 1991, Stanton et al., 1991), que pronto cambió a *Serpulina* (Stanton, 1992).

En 1996, otra espiroqueta, previamente propuesta como *Anguillina coli* (Lee et al., 1993), se agregó al género *Serpulina* como *Serpulina pilosicoli* (Trott et al., 1996c), y pronto fue seguida por descripciones de *Serpulina intermedia* y *Serpulina murdochii* (Stanton et al., 1997). *Serpulina hyodysenteriae*, *Serpulina innocens* y *Serpulina pilosicoli* se unificaron posteriormente con una espiroqueta aislada previamente de un paciente humano, *Brachyspira aalborgi*, en un género común (*Brachyspira*) (Ochiai et al., 1997). El nuevo nombre del género se agregó como nota al pie de la descripción de *Serpulina alvinipulli* (Stanton et al., 1998). En 2006, *Serpulina intermedia* y *Serpulina murdochii* se unificaron oficialmente con el género *Brachyspira* (Hampson y La, 2006).

BRACHYSPIRA SPP. EN MAMÍFEROS

Todas las especies pertenecientes al género *Brachyspira spp.* colonizan el tracto intestinal de mamíferos y/o aves. Además, se han informado varias espiroquetas intestinales no identificadas en mamíferos como cobayos, zarigüeyas norteamericanas, mapaches, ratones caseros, ratones de campo, nutria, conejos, voles, ganado y venado sika (Jansson, 2009).

Brachyspira hyodysenteriae y *Brachyspira pilosicoli* causan enfermedades en cerdos. La disentería porcina, causada por *Brachyspira hyodysenteriae*, es una enfermedad diarreica mucohemorrágica grave que afecta a cerdos (Hampson et al., 2006b). Las bacterias colonizan el ciego, el colon y el recto. Las pérdidas económicas son causadas por el aumento de la mortalidad, la reducción del crecimiento, la mala conversión de alimentos y los gastos en medicación. Los cerdos se infectan por la ingestión de heces de animales enfermos o de un portador clínicamente sano (Jansson, 2009).

Brachyspira pilosicoli es el agente causal de espiroquetosis intestinal porcina, produciendo una tiflocolitis de leve a moderada (Hampson y Duhamel, 2006). A menudo afecta a los cerdos unas semanas después del destete. *Brachyspira innocens* y *Brachyspira murdochii* se consideran no patógenos en cerdos, mientras que el potencial enteropatógeno de *Brachyspira intermedia* es un tema un tanto controvertido (Hampson et al., 2006b).

LA ESPIROQUETOSIS INTESTINAL HUMANA

Brachyspira pilosicoli, *Brachyspira aalborgi* y otras espiroquetas aún no caracterizadas colonizan el intestino grueso humano, lo que se conoce como espiroquetosis intestinal humana. Las espiroquetas intestinales se han implicado como causas de colitis con diarrea crónica, sangrado rectal, dolor abdominal y crecimiento retardado. Se sabe que la espiroquemia por *Brachyspira pilosicoli* ocurre en pacientes debilitados (Trott et al., 1997). *Brachyspira pilosicoli* muestra una alta prevalencia (21-64%) en países en vías de desarrollo, y personas con VIH en las sociedades occidentales, mientras que la incidencia de *Brachyspira aalborgi* es menor (5.6-7.9% en las poblaciones australianas) y parece estar menos afectada por las estructuras sociales y la etnicidad (Mikosza y Hampson, 2001; Brooke et al., 2006).

Los pollos y cerdos han sido colonizados con éxito por cepas de *Brachyspira pilosicoli* originadas en humanos, cerdos y perros (Trott et al., 1996a). Los resultados de la electroforesis de enzimas multilocus (MEE) y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) en aislados de una variedad de especies animales, incluidos los humanos, muestran que *Brachyspira pilosicoli* parece carecer de especificidad de huésped, lo que sugiere la posibilidad de transferencia zoonótica (Trott et al., 1998; Hampson et al., 2006a).

BRACHYSPIRA SPP. EN AVES

El término espiroquetosis intestinal aviar (EIA) se usa a menudo en asociación con la colonización de espiroquetas intestinales en aves (Swayne y McLaren, 1997). Dado que la definición de “espiroquetosis aviar” varía, y como puede confundirse con la espiroquetosis causada por *Borrelia anserina*, no se hará uso de dicho término en este trabajo, por lo que se usará “espiroquetosis intestinal aviar”.

Los primeros relatos de espiroquetas intestinales en aves incluían descripciones morfológicas de urogallo rojo (*Lagopus lagopus scoticus*), pollos (*Gallus gallus*), pavos (*Meleagris gallopavo*) y faisanes (*Phasianus colchicus*) (Fantham, 1910; Harris, 1930; Mathey y Zander, 1955). En 1986, se aislaron espiroquetas intestinales de pollos y se sugirió, por primera vez, una asociación con la enfermedad entérica (Davelaar et al., 1986).

Numerosos informes de casos y estudios de campo sugieren conjuntamente una asociación entre la colonización de *Brachyspira spp.* y enfermedad intestinal, por ende, pérdidas de producción en pollos (Davelaar et al., 1986; Griffiths et al., 1987; Swayne et al., 1992, Trampel et al., 1994; Stephens y Hampson, 1999; Burch et al., 2006; Bano et al., 2008; Feberwee et al., 2008). En la actualidad hay trabajos de investigación en los que se ha encontrado evidencia que demuestra asociación entre la colonización por parte de *Brachyspira alvinipulli*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia* y la aparición de espiroquetosis intestinal aviar. (Swayne et al., 1995; Stephens y Hampson, 2002a; Hampson et al., 2002).

Por otra parte, *Brachyspira hyodysenteriae* infecta naturalmente y causa tiflocolitis en el ñandú (*Rhea americana*) (Jensen et al., 1996). También se aisló *Brachyspira hyodysenteriae* de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) en Suecia (Jansson et al., 2004). Un informe menciona el aislamiento de *Brachyspira hyodysenteriae* en aves de corral en Holanda (Weagenaar et al., 2003). Además, se informaron aislamientos de *Brachyspira hyodysenteriae* de gallinas ponedoras en el Reino Unido (Thomson et al., 2007). Los pocos estudios realizados muestran claramente que *Brachyspira hyodysenteriae* tiene potencial patogénico en gallinas ponedoras, pero faltan más ensayos que demuestren que esta especie pueda producir EIA. Otras especies de *Brachyspiras* se consideran, actualmente, no patógenas en aves de corral. (Feberwee et al., 2007).

La colonización de pollos por *Brachyspira spp.* Se ha informado de muchas partes del mundo, incluyendo Europa (Bélgica, Finlandia, los Países Bajos, Italia, Polonia, Suecia, el Reino Unido, la antigua Yugoslavia), los Estados Unidos, México, Irán y Australia. (Davelaar et al., 1986 Griffiths et al., 1987; Swayne et al., 1992; Trampel et al., 1994; McLaren et al., 1996; Stephens y Hampson, 1999; Jansson et al., 2001; Kizerwetter-Swida et al., 2005; Thomson et al., 2007; Razmyar et al., 2007; Skrzypczak et al., 2007; Corona-Barrera et al., 2007; Bano et al., 2008). Estudios más recientes confirman la presencia de EIA en Latinoamérica, más específicamente en Colombia (Alvarez et al., 2009) y en Brasil (Goulart., 2018). En argentina se ha informado la presencia de *Brachyspira pilosicoli*, mediante pruebas bioquímicas en una granja cercana a la ciudad de rio cuarto, en un estudio realizado por el departamento de patología animal de la UNRC (Illanes et al., 2016).

SIGNOS CLINICOS Y LESIONES EN GALLINAS PONEDORAS

Los signos clínicos incluyen diarrea o excrementos húmedos, zona perianal manchada, cama húmeda, manchas fecales en cáscaras de huevo, aumento del contenido de grasa fecal, reducción de la conversión alimenticia, reducción aproximada del 5-10% de la producción de huevos, retraso en el inicio de la puesta de huevos, retraso del crecimiento, disminución del peso del huevo, mala calidad del cascarón y aumento de la mortalidad. Se informó un crecimiento reducido y una mala digestión de alimento en pollos de engorde negativos en cultivo de *Brachyspira* nacidos de huevos producidos por padres colonizados por *Brachyspira* (Smit et al., 1998). Este cuadro clínico puede variar dependiendo del estado inmunológico de las aves y el estado sanitario del plantel. Las figuras siguientes muestran algunos de los signos clínicos más relevantes en gallinas ponedoras.

Figuras 1 y 2: Coloración fecal de la cáscara de huevo (izquierda). Figuras 3 y 4: Anormalidades en la formación de la cascara: “huevos en fárfara”. (imagen de D. Basconi).



Los hallazgos post mortem no son muy significativos, en algunos casos se puede apreciar contenido cecal normal o amarillento, de aspecto espumoso, puede o no apreciarse la tiflitis. A la histopatología, las alteraciones son leves, y se caracterizan por hiperplasia de las criptas, erosión epitelial, y el aumento del número de células caliciformes. Además, de leve a moderada infiltración de macrófagos y heterófilos en la lámina propia. (Feberwee.,2008).



Figura N°5: Aspecto luminal de un ciego de una gallina ponedora de un lote colonizado por *B. Intermedia* y por *B. Innocens*. (imagen de Jansson, 2009)

Figura N°6: Contenido cecal de una gallina ponedora proveniente de un lote colonizado por *B. Intermedia*, *B. Innocens* y *B. Murdochii*. (imagen de Jansson, 2009)



FORMAS DE PRESENTACION Y FACTORES DE RIESGO

Los estudios de campo indican que la colonización es generalizada entre las gallinas ponedoras y las parvadas reproductoras de pollos de engorde, pero es un evento raro en pollos de engorde. Solo se ha documentado un caso de campo en estos últimos (Dwars et al., 1990). Especulativamente, la edad temprana, la aplicación de rutinas de bioseguridad y el uso de coccidiostáticos ionóforos y alimentos medicados para la promoción del crecimiento pueden explicar los resultados. La prevalencia dentro de la parvada en pollos varía de 10-100% (McLaren et al., 1996; Stephens y Hampson, 1999; Bano et al., 2008).

La fuente de *Brachyspira spp.* en las granjas avícolas no ha sido identificada. La infección cruzada entre bandadas en la misma granja ocurre probablemente por la transmisión indirecta por los cuidadores de animales o el equipo contaminado, y posiblemente por las moscas o los roedores (Joens y Kinyon, 1982; Phillips et al., 2005).



Figura N° 7: Imagen tomada en un aviario cercano a ciudad de Rio Cuarto, en la que se observan cerdos dentro del galpón donde se alojan las aves, propiciando condiciones ideales para la transmisión de *Brachyspira spp.* (imagen de D. Basconi)

Se encontró una asociación significativa entre el tipo de eliminación del guano y la colonización, las gallinas en galpones con fosas profundas tienen mayor riesgo que las de galpones con cintas transportadoras. El tamaño de la bandada no influyó en la colonización (Bano et al., 2008). Se ha reportado una diferencia relacionada con la edad en la colonización de las gallinas ponedoras, a mayor edad mayor es la prevalencia, en general las aves más afectadas son aquellas mayores a 40 semanas. (Stephens y Hampson, 1999; Jansson et al., 2001; Phillips et al., 2005; Bano et al., 2008).

Para el control se debe aplicar limpieza y desinfección entre lotes de aves, rutinas estrictas de bioseguridad y control de roedores para evitar la colonización y para evitar la transmisión entre las bandadas de pollos (Hampson y Swayne, 2008). Se han publicado informes de tratamiento antimicrobiano con dimetridazol, 5-nitroimidazol, lincomicina, lincomicina / espectinomicina, clortetraciclina, oxitetraciclina y tiamulina, pero con resultados variables (Griffiths et al., 1987;

Smit et al., 1998; Stephens y Hampson, 1999; Stephens y Hampson, 2002b; Burch et al., 2006). La falta de productos con licencia apropiados y los largos tiempos de extracción de los huevos para el consumo humano a menudo restringen el uso de antimicrobianos en las aves de corral (Jansson, 2009)

Un creciente número de publicaciones actuales han informado sobre la presencia de especies de *Brachyspira* en granjas de todo el mundo (Hampson et al., 2015). Esta observación podría deberse a varios parámetros, como la prohibición de la Unión Europea de 2006 sobre el uso profiláctico de antibióticos, la modificación de la forma de alojamiento de los animales y, finalmente, el desarrollo de métodos de detección mejorados para este género específico. Por lo tanto, el impacto de esta enfermedad en el bienestar y la producción de los animales es de gran preocupación para la industria avícola, lo que hace necesario plantear nuevas estrategias de intervención para reducir la propagación del EIA (Le Roy et al., 2015)

Sólo unos pocos estudios han investigado el impacto de los probióticos a base de *Lactobacillus* en *Brachyspira pilosicoli*, y la mayoría de ellos se han realizado in vitro. Se ha demostrado que el ácido láctico secretado por lactobacilos tiene efectos similares a otros compuestos ácidos y desinfectantes en *Brachyspira pilosicoli*, por lo que el efecto bactericida está mediado por la desestabilización de la pared celular, lo que reduce la viabilidad bacteriana (Bernardeau et al., 2009). Dos especies prometedoras de *Lactobacillus* para abordar la EIA son *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus reuteri* (EFSA, 2012). Los probióticos también pueden ser útiles para prevenir la recaída de la infección que se observa a menudo con el EIA (Hampson et al., 2015).

La disponibilidad de una vacuna eficaz sería muy beneficiosa, los primeros trabajos experimentales ya se encuentran en desarrollo para obtener las primeras vacunas aviares contra la EIA, principalmente contra *Brachyspira pilosicoli* dada su importancia por su potencial zoonótico. (La, T., Phillips, N. y Hampson. D., 2018).

DIAGNOSTICO

El diagnostico de laboratorio presenta ciertas dificultades. Los datos fenotípicos se han usado durante mucho tiempo para la determinación de especies de aislados de origen porcino (Fellström y Gunnarsson, 1995; Hommez et al., 1998; Fellström et al., 1999). Las pruebas fenotípicas y moleculares usadas en conjunto pueden diferenciar confiablemente la mayoría de los aislados de porcino a nivel de especie. Sin embargo, los ejemplos de aislados porcinos con fenotipos aberrantes / atípicos se están acumulando en la literatura (Hommez et al., 1998, Fellström et al., 1999; Thomson et al., 2001; Fossi et al., 2004).

Comparado con *Brachyspira spp.* en los cerdos, la situación en los pollos es más complicada. Especies patógenas y supuestamente no patógenas de *Brachyspira spp.* Son, con raras excepciones, débilmente β -hemolíticos y no se pueden diferenciar y separar confiablemente en placas de agar, además las aves albergan un mayor número de especies diferentes de *Brachyspiras* que los cerdos (McLaren et al., 1996, 1997; Feberwee et al., 2008). Es evidente que se necesitan más estudios para evaluar el uso de pruebas fenotípicas para *Brachyspira spp.* de aislado de pollos y otras aves. Se sugiere que las pruebas fenotípicas pueden ser útiles como herramientas de screening (Jansson et al., 2008)

La PCR se ha aplicado en estudios previos sobre cultivos primarios y heces para detectar diversas especies de *Brachyspiras* en aves, pero tiene limitaciones importantes porque no se pueden identificar todas las especies presentes en aves, y varios estudios indican falta de sensibilidad y / o especificidad cuando se aplica a cepas aviarias (Atyeo et al., 1999; Suriyaarachchi et al., 2000). La mayoría de los PCR han sido diseñados para identificar cepas de *Brachyspiras* porcinas o humanas (Jansson, 2009).

Las PCR (Polymerase Chain Reaction) pueden usarse en cultivos o en heces. Sin embargo, la sensibilidad cuando se aplica a muestras fecales se ve obstaculizada debido a la presencia de factores inhibidores (Lantz et al., 2000; Phillips et al., 2006). Se ha sugerido que el pH bajo y la presencia de ácido úrico en las heces de pollo son particularmente problemáticos (Phillips et al., 2006).

Además, no hay PCR disponible para *Brachyspira alvinipulli*. Hasta hace muy poco, esta especie solo había sido reportada de una bandada de gallinas ponedoras en los Estados Unidos (Stanton et al., 1998). Resultados recientes de Suecia, los Países Bajos y el Reino Unido (Feberwee et al., 2007; Jansson et al., 2007a; Thomson et al., 2007; Feberwee et al., 2008) indican que la presencia de esta especie ha sido subestimada entre los pollos, y posiblemente también entre otras

especies de aves (Jansson et al., 2007b). En la actualidad, la única forma de detectar *Brachyspira alvinipulli* es mediante el uso de pruebas bioquímicas, y para su identificación se requieren análisis moleculares como MEE (multilocus enzyme electrophoresis) o la secuenciación del gen 16S rRNA o del gen *nox*. Claramente, se necesita invertir más trabajo para diagnósticos de rutina confiables de especies potencialmente patógenas (Jansson, 2009).

Desde que se publicó el primer informe sobre la colonización de espiroquetas intestinales en aves en 1986, las actividades de investigación en Australia, EE. UU. Y Europa nos han aportado una comprensión básica de los aspectos clínicos, epidemiológicos y bacteriológicos. Sin embargo, todavía hay muchas cosas que aprender sobre estas bacterias. Entre las principales causas de la falta de información y el limitado interés entre los profesionales de la avicultura se encuentra la naturaleza no específica de los signos clínicos, y quizás lo más importante, las dificultades de diagnóstico. Es solo durante los últimos 10-15 años que se han realizado intentos para identificar las espiroquetas intestinales a nivel de especie.

Dado que la información a nivel mundial y nacional sobre el impacto de EIA en la producción avícola es escasa; el objetivo del presente estudio es dar inicio a una línea de investigación acerca de esta patología al menos a nivel regional, determinar si el agente afecta a las producciones regionales y que impacto produce sobre las mismas.

OBJETIVOS GENERALES

Detectar la presencia de *Brachyspira spp.* y correlacionarla a los índices productivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1)-Detectar la presencia de *Brachyspira spp.* a partir de muestras de materia fecal.
- 2)- Se determinará por la técnica de PCR la especie de *Brachyspira*.
- 3)-Asociar la presencia de *Brachyspira spp.* en gallinas ponedoras con los índices productivos.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en un establecimiento de gallinas ponedoras ubicado en la ciudad de Rio Cuarto, durante los meses de junio y julio. El mismo cuenta con 5 galpones. Dos de ellos con capacidad de 3000 aves, y el resto con capacidad de 2000 - 2500 gallinas cada uno, distribuidas por edad. Las gallinas, de la línea Hy-Line Brown, se obtienen de un día de vida en la provincia de Buenos Aires. Al llegar a la granja las pollitas son alojadas en galpones con temperatura y humedad adecuadas hasta las 18 semanas de vida. A partir de ese momento se ubican en el galpón donde pasaran su vida productiva (aproximadamente 2 años de vida) y se colocan en jaulas. Las jaulas alojan en promedio 2 aves en cada una.

A criterio del productor en la granja no se observaron síntomas compatibles con EIA.

En primera instancia se registraron las edades y número de gallinas en los distintos galpones, como así también los planes sanitarios que se realizaron o realizaran.

Se escogió para el análisis el galpón que aloja las aves más adultas con una capacidad máxima de 2000 aves, al momento del muestreo contenía unas 1500 aves, de unas 110 semanas de vida. Se recorrió el galpón escogido para el muestreo para seleccionar los animales utilizados en el ensayo. Para esto se seleccionó a simple vista aquellos ejemplares que, o bien tenían signos de diarrea o aquellos en los que la bandeja inferior de la jaula contenía heces diarreicas; de esta manera se seleccionaron 52 ejemplares.

Las aves elegidas fueron apartadas en jaulas individuales dentro del mismo galpón. Tanto las jaulas como los animales se identificaron numéricamente. Las bandejas inclinadas de la parte inferior de las jaulas que alojaron las aves del ensayo, fueron limpiadas y desinfectadas, para evitar que las heces se contaminen.

Se le entrego al propietario del establecimiento las planillas de recolección de datos, como la que se muestra a continuación:

Fecha:					
Jaula N°	N° Huevos	huevo sucio		Huevo anormal	
		materia fecal	sangre	Sin Cascara 	Muy chico 
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

Figura N° 8: planilla de recolección de datos.

Con estas planillas se buscó analizar el porcentaje de postura y la presencia de alteraciones, por un lado, se recolecto información sobre el tipo de manchas que presentaron los huevos colocados por el grupo estudiado; los tipos de manchas a buscar fueron de materia fecal y/o sangre. Y por otro lado se analizaron la presencia de huevos anormales, para esta categoría se buscaron huevos en fáfara y huevos muy chicos (según el criterio del productor).

El propietario, tomo los datos productivos durante 9 días, en este periodo 10 de las 52 aves murieron, por ende, sus datos de postura fueron recolectados de manera incompleta o bien no se obtuvieron datos.

Finalizada la recolección de datos por parte del propietario del establecimiento, se realizó otra visita a la granja para recolectar las planillas completadas por el productor y proceder a la toma de muestras de las heces de las gallinas. Los datos obtenidos por el productor en las planillas fueron cargados a una panilla Microsoft Excel digital. Las pruebas estadísticas se realizaron con la prueba de probabilidad exacta de Fisher online en www.socscistatistics.com.

De cada bandeja, se escogieron aquellas muestras que a simple vista contenían más agua, de este modo se tomaron cuatro muestras de heces de unos 5gr cada una. Estas se combinaron para obtener un pool de 20gr. Cada uno de los pools de materia fecal se enviaron en bolsas de nylon identificadas, refrigeradas a 4° C para su procesamiento en el laboratorio del Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Las 42 aves que sobrevivieron durante todo el periodo del ensayo fueron trasladadas hasta el Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, donde fueron piadosamente sacrificadas, para su correspondiente necropsia, en este procedimiento, se buscaron lesiones compatibles con EIA, en especial tiflitis, y contenido espumoso en ciego.

Para el aislamiento, de las muestras de heces, se utilizaron medios de cultivo selectivos (Agar base sangre -Oxoid®- con 8% (v/v) de sangre equina desfibrinada y el agregado de vancomicina, colistina y espectinomina) y se incubaron en anaerobiosis (AnaeroGen -Oxoid®-) a 37- 42°C durante 6-8 días. De cada placa en las que se observó crecimiento se realizaron extendidos en portaobjetos y se colorearon con Gram® para confirmar la presencia de estructuras compatibles con espiroquetas. De cada cultivo en los que se observaron espiroquetas, se tomaron dos muestras, una de ellas para procesar por la técnica de PCR y la otra para pruebas bioquímicas. Estas últimas fueron nuevamente sembradas en Agar base-sangre sin antibióticos con el fin de purificar las cepas. La identificación de especie de los aislamientos se realizaron en base a las tabletas de identificación bioquímica que incluyen prueba de indol, hidrólisis del hipurato, α y β glucosidasa y α galactosidasa (DIATABS™, Rosco).

Las muestras para PCR se conservaron en medio selectivo a -70°C hasta su procesamiento.

Luego se utilizó una técnica de Duplex PCR para buscar o confirmar la presencia de *Brachyspira pilosicoli* y *Brachyspira hyodysenteriae*. Los pasos que se siguieron para realizar el Duplex PCR fueron:

PASO 1: Extracción de DNA.

La misma se realizó con un kit comercial DNAzol de Invitrogen.

PASO 2: Amplificación.

Los primers utilizados fueron los descriptos por Feberwee et al., 2008 y por Rohde et al., 2008. El ADN extraído será sometido una Duplex PCR específico para las especies *B. pilosicoli* y *B. hyodysenteriae*.

Los primers para *B. pilosicoli* amplifican una región del gen 16S rRNA de 823-bp. Mientras que los primers para *B. hydysenteriae* amplifican el gen nox (NADH oxidasa) una región de 354-bp. Todas las reacciones serán realizadas en un termociclador, con la siguiente configuración de ciclos térmicos: desnaturalización inicial a 95°C durante 5', seguidos por una desnaturalización de 35 ciclos de 94°C durante 30'', un anidamiento a 52°C durante 30'', una extensión a 72°C durante 1', seguidos por 72°C de extensión final durante 7'.

PASO 3: Siembra y lectura

Todos los productos amplificados fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% y corridos en una cuba de electroforesis a 70 volts durante 30 minutos. Posteriormente se observaron en un transiluminador UV.

RESULTADOS

Para el ensayo, se seleccionaron 52 aves en total, de las cuales 10 murieron durante el periodo en que se recolectaron los datos productivos; en las jaulas que contenían a dichos animales, fueron colocados otros ajenos al ensayo, por ende, no se tomaron las muestras de las bandejas de estas jaulas, por lo que se trabajó con los 42 restantes. La mortalidad de animales en el grupo seleccionado fue del 19,2%. No se diagnosticó la causa de muerte. De las 42 muestras, en 28 se aislaron bacterias del genero *Brachyspira*. Las 14 restantes resultaron negativas.

De un total de 28 aislamientos positivos a *Brachyspira spp*, se determinó, mediante pruebas bioquímicas, que 27 correspondían a *Brachyspira innocens* y 1 a *Brachyspira pilosicoli*.

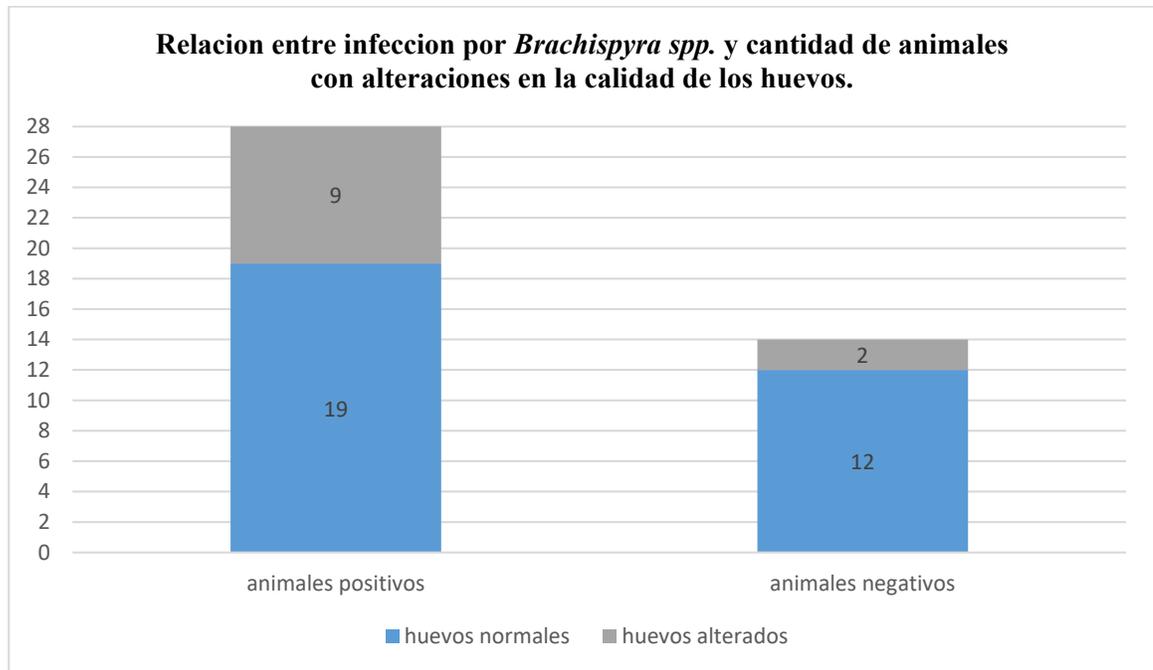
Se procesaron por la técnica de PCR siete muestras; la que resulto compatible con *Brachyspira pilosicoli* mediante las pruebas bioquímicas y seis muestras más.

Mediante la técnica de PCR se confirmó el aislamiento de *Brachyspira pilosicoli* de la prueba bioquímica. Las restantes seis muestras resultaron negativas tanto a *Brachyspira pilosicoli* como a *Brachyspira hyodysenteriae*.

La postura global del grupo estudiado fue del 65% (249 huevos en total), cumpliendo con las expectativas de la línea genética, para las 110 semanas de edad. Incluso al analizar la postura del grupo positivo se encontró una postura del 68%.

Al examinar las alteraciones en los huevos colocados por el grupo estudiado se encontró que las únicas dos alteraciones presentes fueron huevos manchados con materia fecal y huevos en fáfara. No se encontraron huevos manchados con sangre ni huevos muy chicos.

Los animales que presentaron algún tipo de alteración en la postura, predominan en el grupo de los positivos como bien se muestra en el gráfico:



De los 9 animales positivos que presentaron postura con alteraciones, 8 mostraron postura con huevos en fáfara y 1 con huevos manchados con materia fecal. De los 2 animales negativos que presentaron postura con alteraciones en la calidad ambos mostraron huevos manchados con materia fecal.

Mediante una prueba exacta de Fisher se demostró que existe asociación significativa entre la colonización con *Brachyspira spp.* y la postura de huevos en fáfara ($P= 0,036$). Pero no se encontró asociación entre la colonización con *Brachyspira spp.* y la postura de huevos manchados con materia fecal ($P= 0.2537$).

DISCUSIÓN

Se analizaron 42 muestras, de las cuales 28 fueron positivas en el aislamiento para *Brachyspira sp.*, totalizando el 66,6 % de muestras positivas, un valor superior al 44% encontrado por Illanes et al. (2016) en Argentina en gallinas ponedoras, y al 43,6% del trabajo de Goulart et al. (2018) en Brasil, pero algo inferior al 68% encontrado en Australia por Stephens y Hampson (2002) o el 72,4% en Italia por Bano et al. (2008). La diferencia hallada entre los trabajos latinoamericanos y el presente estudio probablemente se deba al tipo de muestreo, siendo al azar en aquellos primeros y dirigido a animales con diarrea en este último.

En este estudio, como en anteriores (Stephens y Hampson, 1999; Stephens et al., 2005; Feberwee et al., 2008; Bano et al., 2008) la colonización de un mismo galpón por varias especies de *Brachyspira* fue algo común.

La especie predominante fue *Brachyspira innocens* con 27 de 28 (96,4%) muestras positivas a dicha especie. Y un aislamiento (3,6%) de *Brachyspira pilosicoli*. Estos valores difieren de los encontrados por Bano et al. (2008) en Italia, donde el 13,8 % de los aislamientos fueron de *Brachyspira pilosicoli* y 49,7 de *Brachyspira innocens*, aunque en ambos casos *Brachyspira innocens* fue aislada en mayor proporción que *Brachyspira pilosicoli*. En el estudio de Illanes et al. (2016) en Argentina, se realizaron pruebas bioquímicas a 3 muestras, todas fueron identificadas como *Brachyspira pilosicoli*. Goulart et al. (2018) reporta en Brasil aislamientos de *Brachyspira intermedia* (4,5%), y de *Brachyspira hyodysenteriae* (11,8%).

Otra observación importante fue el porcentaje de postura normal, incluso al analizar solo el grupo positivo. Estos resultados concuerdan con el estudio de Amin et al. 2014. en donde tampoco se encontró asociación significativa entre la colonización y la disminución de postura. Esta falta de asociación se contrapone a la significativa asociación hallada en otros estudios (Davelaar et al., 1986; Griffiths et al., 1987; Swayne et al., 1992, Trampel et al., 1994; Stephens and Hampson, 1999; Burch et al. 2006; Bano et al., 2008; Feberwee et al., 2008)., esta discrepancia puede deberse a una serie de factores como ser el grado de colonización de los individuos, factor que no se determinó en el presente trabajo. Medir esto requeriría el uso de técnicas de diagnóstico como la PCR cuantitativa. Otro factor puede ser la especie implicada, como bien se determina en el estudio de Bano et al., 2008 la asociación entre la reducción en la producción de huevos y la infección por *Brachyspiras* es significativa solo cuando se analizan las especies consideradas patógenas.

En el presente estudio se encontró una asociación significativa entre la colonización y la postura de huevos con cascara ultra delgadas o en fáfara. Se ha informado que varias enfermedades afectan la calidad del huevo y la cáscara del mismo; cualquier enfermedad que comprometa la salud del ave puede producir huevos defectuosos y cáscaras de huevo por medios indirectos (Roberts et al., 2004). No se ha podido demostrar fehacientemente las causas de la relación entre la colonización por *Brachyspira spp.* y la colocación de huevos en fáfara. Dwars, R.M., Davelaar, F.G. & Smit, H.F. (1993) proponen que, si bien la colonización y lesiones son a nivel del ciego, esto puede mejorar la penetración de sustancias tóxicas presentes en la luz cecal. Las sustancias tóxicas absorbidas a través de la mucosa cecal podrían influir en la absorción intestinal, lo que daría lugar a deficiencias en la calidad tanto interna como externa del huevo.

CONCLUSIÓN

Dado que la mayoría de los animales de este estudio estaban colonizados por *Brachyspira innocens* podemos asociar el signo de postura de huevos en fáfara a esta especie. La mayor parte de la bibliografía consultada concuerda que por sí sola esta especie no produce signos clínicos. Consideramos necesario realizar ensayos con esta especie en particular para replantear su falta de patogenicidad. Como bien mencionan Stephens y Hampson (1999) en los cerdos, las especies *Brachyspira innocens* y *Brachyspira murdochii* se consideran apatógenas, pero la situación en las aves de corral no es del todo clara.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez Mira D. (2009). Valoración de la presencia de *Brachyspira intermedia* y *Brachyspira pilosicoli* en ponedoras comerciales de granjas avícolas colombianas. Tesis de Magister en Ciencias y Salud Animal. Facultad de medicina veterinaria y de zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia.
- Amin, M.M., Phillips, N.D., La, T., Robertson, I.D., Hampson, D.J. (2014). Intestinal spirochaetes (*Brachyspira spp.*) colonizing flocks of layer and breeder chickens in Malaysia. *Avian Pathol.* 43, 501–505.
- Atyeo, R. F., Stanton, T. B., Jensen, N. S., Suriyaarachichi, D. S., Hampson, D. J. (1999). Differentiation of Serpulina species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. *Vet Microbiol.* 67, 47-60.
- Bano, L., Meriardi, G., Bonilauri, P., Dall’Anese, G., Capello, K., Comin, D., Cattoli, G., Sanguinetti, V., Hampson, D. J., Agnoletti, F. (2008). Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira spp.*) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathol.* 37, 281-286.
- Bernardeau, M., Gueguen, M., Smith D.G.E., Corona-Barrera, E., Vernoux, J.P. (2009). In vitro antagonistic activities of *Lactobacillus spp.* against *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *Vet Microbiol.* 138 (1-2), 184-190.
- Brooke, C. J., Riley, T. V., Hampson, D. J. (2006). Comparison of prevalence and risk factors for faecal carriage of the intestinal spirochaetes *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in four Australian populations. *Epidemiol Infect.* 134, 627-634.
- Burch, D. G. S., Harding, C., Alvarez, R., Valks, M. (2006). Treatment of a field case of intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* with tiamulin. *Avian Pathol.* 35, 211- 216.
- Corona-Barrera, E., Munguia, J., Rivera, K., Juménez, F., Fajardo, R., Pradal-Roa, P., Thomson, J. (2007). Isolation of intestinal spirochaetes from pig, avian and dog in México. Abstract 38. In Proceedings of the Fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, May 20-22, Prague, Czech Republic.
- Davelaar, F. G., Smit, H. F., Hovind-Hougen, K., Dwars, R. M., Van der Valak, C. (1986). Infectious typhlitis in chickens caused by spirochaetes. *Avian Pathol.* 15, 247-258.

- Duhamel, G. E., Trott, D. J., Muniappa, N., Mathiesen, M. R., Tarasiuk, K., Lee, J. I., Hampson, D. J. (1998). Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a newly identified group provisionally designated “*Serpulina canis*” sp. nov. *J Clin Microbiol* 36, 2264-2270.
- Dwars, R. M., Smit, H. F., Davelaar, F. G. (1990). Observations on avian intestinal spirochaetosis. *Vet Q.* 12, 51-55.
- Dwars, R. M., Davelaar, F. G., Smit, H. F. (1993). Infection of broiler parent hens (*Gallus domesticus*) with avian intestinal spirochaetes; effects on egg production and chick quality. *Avian Pathol.* 22, 693-701.
- EFSA. (2012). Scientific opinion on the safety and efficacy of *Lactobacillus salivarius* (CNCM I-3238) and *Lactobacillus casei* (ATTC PTA-6135) as silage additives for all species. European Food Safety Authority. Vol. 10: 9.
- Fantham, H. B. (1910). Observations on the parasitic protozoa of the red grouse (*Lagopus scoticus*), with a note on the grouse fly. *Proc Zool Soc Lond*, 692-708.
- Feberwee, A., Hampson, D. J., Phillips, N. D., La, T., van der Heijden, H. M. J. F., Wellenberg, G. J., Landman, W. J. M. (2007). Survey of *Brachyspira* spp. in Dutch poultry and the isolation of a *Brachyspira hyodysenteriae*-like spirochaete. Abstract #36. In Proceedings of the Fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, May 20-22, Prague, Czech Republic.
- Feberwee, A., Hampson, D. J., Phillips, N. D., La, T., Van der Heijden, H. M. J. F., Wellenberg, G. J., Dwars, R. M., Landman, W. J. (2008). Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced egg production or both. *J Clin Microbiol.* 46, 593-600.
- Fellström, C. y Gunnarsson, A. (1995). Phenotypical characterization of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res Vet Sci.* 59, 1-4.
- Fellström, C., Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., Aspan, A. (1999). Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Vet Microbiol.* 70, 225-238.
- Fossi, M., Pohjanvirta, T., Sukura, A., Heinikainen, S., Lindecrona, R., Pelkonen, S. (2004). Molecular and ultrastructural characterization of porcine hippurate-negative *Brachyspira pilosicoli*. *J Clin Microbiol.* 42, 3153-3158.

- Ghorbani-Dalini, S., Kargar, M., Doosti, A., Sarshar, M., Souod, N., Golshan, M. (2011). Quantitation of bacteria in gastric biopsy specimen from patients with gastrointestinal disorders: relationship between counts and clinical features. *Int J Infect Dis.* Vol.15, 68.
- Goulart, T. (2018). Primeiro relato da frequência de *brachyspira pilosicoli*, *brachyspira hyodysenteriae* e *brachyspira intermedia* em aves de postura e matrizes de corte na região oeste do paraná atraves do isolamento bacteriano e tipifica o na qpcr. Disserta o apresentada como requisito parcial   obten o do grau de Mestre em Ciência Animal. Universidade federal do Paraná, Palotina, Paraná, Brasil.
- Griffiths, I. B., Hunt, B. W., Lister, S. A., Lamont, M. H. (1987). Retarded growth rate and delayed onset of egg production associated with spirochaete infection in pullets. *Vet Rec.* 121, 35-37.
- Hampson, D. J., Phillips, N. D., Pluske, J. R. (2002). Dietary enzyme and zinc bacitracin reduce colonization of layer hens by the intestinal spirochaete *Brachyspira intermedia*. *Vet Microbiol.* 86, 351-360.
- Hampson, D. J., Oxberry, S. L., La, T. (2006a). Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. *Emerg Infect Dis.* 12, 869-870.
- Hampson, D. J., Fellström, C., Thomson, J. R. (2006b). Swine dysentery. In *Diseases of swine 9th edn*, Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S y Taylor, D. Blackwell Publishing Ames, Iowa, USA. pp. 785-805.
- Hampson, D. J. y Duhamel, G. E. (2006). Porcine colonic spirochaetosis/Intestinal spirochaetosis. In *Diseases of swine 9th edn*. Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S., Taylor, D. Blackwell Publishing Ames, Iowa, USA. pp. 755-767.
- Hampson, D. J. y La, T. (2006). Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia* comb. nov. and *Brachyspira murdochii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56, 1009-1012.
- Hampson, D. J. y Swayne, D. E. (2008). Avian intestinal spirochetosis. In *Diseases of poultry 12th edn*. Saif, Y. M., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K. & Swayne, D. E. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. pp. 922-940.
- Hampson, D.J. (2013). Avian intestinal spirochetosis. In *Diseases of Poultry 13th edn*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. Ames: Wiley-Blackwell. (pp. 995–1007)

Hampson, D.J., La, T., Phillips, N.D. (2015). Emergence of *Brachyspira* species and strains: reinforcing the need for surveillance. *Porc. Heal. Manag.* 1: 8.

Harris, D. L., Glock, R. D., Christensen, C. R., Kinyon, J. M. (1972). Swine dysentery. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Vet Med Small Anim Clin.* 67, 61-64.

Harris, M. B. K. (1930). A study of spirochetes in chickens with special reference to those of the intestinal tract. *Am J Hyg.* 12, 537-568.

Hommeze, J., Castryck, F., Haesebrouck, F., Devriese, L. A. (1998). Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Vet Microbiol.* 62, 163-169.

Hovind-Hougen, K., Birch-Andersen, A., Henrik-Nielsen, R., Orholm, M., Pedersen, J. O., Teglbjaerg, P. S., Thaysen, E. H. (1982). Intestinal spirochaetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochaete *Brachyspira aalborgi* gen. nov. sp. nov. *J Clin Microbiol.* 16, 1127-1136.

Illanes, N., Tamiozzo, P., Cabral, A., Bertone, J., Romanini, S., Yaciuk, R., Vazquez, M., Pelliza, B. (2016). Detección de *Brachyspira pilosicoli* y otras especies de *Brachyspira* en granjas avícolas argentinas. *Rev Argent Microbiol.* Vol. 48 (1), 67-70

Jansson, D. S., Fossum, O., Satora, K., Gunnarsson, A., Fellström, C. (2001b). Intestinala spiroketala infektioner, del 4. Spiroketala infektioner (*Brachyspira spp.*) hos tamhöns i Sverige. *Svensk Vet Tidn.* 53, 69-74

Jansson, D. S., Johansson, K.E., Olofsson, T., Råsbäck, T., Vågsholm, I., Pettersson, B., Gunnarsson, A., & Fellström, C. (2004). *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly β -haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Med Microbiol.* 53, 293-300.

Jansson, D. S., Fellström, C., Råsbäck, T., Gunnarsson, A., Johansson, K.E. (2007a). Characterization of *Brachyspira spp.* from Swedish laying hens. Abstract #37. In Proceedings of the fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, May 20-22, Prague, Czech Republic.

Jansson, D. S., Ingermaa, F., Fellström, C., Johansson, K-E. (2007b). Isolation of the chicken enteropathogen *Brachyspira alvinipulli* from laying hens and wild ducks. In Proceedings of the

15th Congress of the World Veterinary Poultry Association (WVPA), September 10-15, Beijing, China. p. 552.

Jansson, D. S., Fellström, C., Råsbäck, T., Vågsholm, I., Gunnarsson, A., Ingermaa, F., Johansson, K.E. (2008). Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens in different housing systems. *Vet Mic.* 130, 348-362.

Jansson, D. (2009). Genus *Brachyspira* in Birds: Phenotypes, Phylogeny and Pathogenicity. Doctoral Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Department of Clinical Sciences. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Sweden.

Jansson, D.S., Persson, M., Zimmerman, U., Johansson, K.E. (2011). Phenotypic and genetic diversity among intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) in free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*) sampled in southern Sweden. *Syst Appl Microbiol.* Vol. 34 (8), 566-575.

Jensen, N. S., Stanton, T. B., Swayne, D. E. (1996). Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea americana*). *Vet Microbiol.* 52, 259-269.

Jensen, T. K., Boye, M., Ahrens, P., Korsager, B., Teglbjaerg, P. S., Lindboe, C. F., Møller, K. (2001). Diagnostic examination of human intestinal spirochetosis by fluorescent in situ hybridization for *Brachyspira aalborgi*, *Brachyspira pilosicoli*, and other species of the genus *Brachyspira* (*Serpulina*). *J Clin Microbiol.* 39, 4111-4118.

Joens, L. A. y Kinyon, J. M. (1982). Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J Clin Microbiol.* 15, 994-997.

Kinyon, J. M. y Harris, D. L. (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.

Kizerwetter-Swida, M., Rzewuska, M., Binek, M. (2005). Characterization of *Brachyspira* spp. strains isolated from flock of hens with diarrhoea. *Bull Vet Inst. Pulawy* 49, 169-173.

La, T., Phillips, N., Hampson, D. (2018). Vaccination of chickens with the 34 kDa carboxy-terminus of Bpmp72 reduces colonization with *Brachyspira pilosicoli* following experimental infection. *Avian Pathol.* 48(1), 80-85.

Lantz, P. G., Abu Al-Soud, W., Knutsson, R., Hahn-Hägerdal, B. & Rådström, P. (2000). Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol Annu Rev.* 5, 87-130.

- Le Roy, C., Mappley, L., La Ragione, R., Woodward, M., Claus, S. (2015). *Brachyspira pilosicoli*-induced avian intestinal spirochaetosis. *Microb Ecol Health Dis.* 26, 1-9.
- Lee, J. I., Hampson, D. J., Lymbery, A. J., Harders, S. J. (1993). The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. *Vet Microbiol.* 34, 273-285.
- Lussier, G. (1962). Vibronic dysentery of swine in Ontario. Part. 2. Morphological, biochemical, and serological characteristics of *Vibrio coli*. *Can Vet J.* 3, 267-278.
- Mathey, W. J. y Zander, D. V. (1955). Spirochetes and cecal nodules in poultry. *J Am Vet Med Assoc.* 126, 475-477.
- McLaren, A. J., Hampson, D. J., Wylie, S. L. (1996). The prevalence of intestinal spirochaetes in poultry flocks in Western Australia. *Aust Vet J.* 74, 319-321.
- McLaren, A. J., Trott, D. J., Swayne, D. E., Oxberry, S. L., Hampson, D. J. (1997). Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens, and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J Clin Microbiol.* 35, 412-417.
- Mikosza, A. S., y Hampson, D. S. (2001). Human intestinal spirochetosis: *Brachyspira aalborgi* and/or *Brachyspira pilosicoli*?. *Anim Health Res Rev.* 2, 101-110.
- Ochiai, S., Adachi, Y., Mori, K. (1997). Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachyspira innocens* Comb. Nov. and *Brachyspira pilosicoli* Comb. Nov. *Microbiol Immunol.* 41, 445-452.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Weisburg, W. G., Tordoff, L. A., Fraser, G. J., Hespell, R. B., Stanton, T. B., Zablén, L., Mandelco, L., Woese, C. R. (1991). Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol.* 173, 6101-6109.
- Phillips, N. D., La, T., Hampson, D. J. (2005). A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira spp.*) in three flocks of chickens. *Vet Microbiol.* 105, 189-198.
- Phillips, N. D., La, T. y Hampson, D. J. (2006). Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. *Vet Microbiol.* 116, 239-245.
- Pretty, J., Morison, J.I., Hine, R. (2003). Reducing food poverty by increasing agricultural sustainability in developing countries. *Agric Ecosyst Environ.* 95(1), 217-234.

Razmyar, J., Johansson, K-E., Jansson, D. S., Råsbäck, T., Peighambari, M., Barin, A., Ahmadian, S., Fellström, C. (2007). Isolation and characterization of *Brachyspira species* in Iran. Abstract #41. In Proceedings of the Fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, May 20-22, Prague, Czech Republic.

Roberts, J.R. (2004). Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. J. Poul. Sci. 41(3), 161-177.

Rohde, J., Rothkamp, A., Gerlach, G. (2002). Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 40, 2598-2600

Skrzypczak, T., Fossi, M., Ahola, H., Vuorela, J., Prusti, M. (2007). Occurrence of *Brachyspira spp.* in farmed birds and dogs in Finland – a preliminary study. Abstract #40. In Proceedings of the Fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, May 20-22, Prague, Czech Republic.

Smit, H. F., Dwars, R. M., Davelaar, F. G., Wijtten, G. A. W. (1998). Observations on the influence of intestinal spirochaetosis in broiler breeders on the performance of their progeny and on egg production. Avian Pathol. 27, 133-141.

Stanton, T. B., Jensen, N. S., Casey, T. A., Tordoff, L. A., Dewhirst, F. E., Paster, B. J. (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, 189-192.

Stanton, T. B., Jensen, N. S., Bosworth, B. T., Kunkle, R. A. (1997). Evaluation of the virulence of rhea *S. hyodysenteriae* strains for swine. First International Virtual Conference on Infectious Diseases of Animals. National Animal Disease Center. Ames, Iowa, IA, US. [online]. Disponible en: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/50302000/VirtualConference/Posters/I00006.pdf> [03/07/2019]

Stanton, T. B., Postic, D., Jensen, N. S. (1998). *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species enteropathogenic for chickens. Int J Syst Bacteriol. 48, 669-676.

Stephens, C. P. y Hampson, D. J. (1999). Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. Avian Pathol. 28, 447-454.

Stephens, C. P. y Hampson, D. J. (2002a). Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* causes reduced egg production. Avian Pathol 31, 169-175.

Stephens, C. P. y Hampson, D. J. (2002b). Evaluation of tiamulin and lincomycin for the treatment of broiler breeders experimentally infected with the intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli*. Avian Pathol. 31, 299-304.

Stephens, C. P., Oxberry, S. L., Phillips, N. D., La, T., Hampson, D. J. (2005). The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochates (*Brachyspira spp.*) colonising hens in commercial flocks. Vet Microbiol. 107, 149-157.

Suriyaarachchi, D. S., Mikosza, A. S. J., Atyeo, R. F., Hampson, D. J. (2000). Evaluation of a 23S rDNA polymerase chain reaction assay for identification of *Serpulina intermedia*, and strain typing using pulsed-field gel electrophoresis. Vet Microbiol. 71, 139-148.

Swayne, D. E., Bermudez, A. J., Sagartz, J. E., Eaton, K. A., Monfort, J. D., Stoutenburg, J. W., Hayes, J. R. (1992). Association of cecal spirochetes with pasty vents and dirty eggshells in layers. Avian Dis. 36, 776-781.

Swayne, D. E., Eaton, K. A., Stoutenburg, J., Trott, D. J., Hampson, D. J., Jensen, N. S. (1995). Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity for chickens. Infect Immun. 63, 430-436.

Swayne, D. E. y McLaren, A. J. (1997). Cap. 10. Avian intestinal spirochaetes and avian intestinal spirochaetosis. De: Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans. Hampson, D. J. y Stanton, T.B. eds. CAB International Wallingford, USA. pp 267-300.

Tachibana, H., Nakamura, S., Adachi, Y. (2003). Proposal of *Brachyspira ibaraki* sp. nov. for Japanese human intestinal spirochetes closely related to *Brachyspira aalborgi*. Abstract #3. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, April 2-4, Eddleston, UK.

Taylor, D. J. y Alexander, T. J. L. (1971). The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J.* 127, 58-61.

Thomson, J. R., Smith, W. J., Murray, B. P., Murray, D., Dick, J. E. y Sumption, K. J. (2001). Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. *Anim Health Res Rev.* 2, 31-36.

Thomson, J. R., Murray, B. P., Henderson, L. E., Thacker, J., Burch, D. G. S. (2007). *Brachyspira* species isolated from UK poultry samples. Abstract #39. In Proceeding of the fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, 20-22 May, Prague, Czech Republic.

Trampel, D. W., Jensen, N. S., Hoffman, L. J. (1994). Cecal spirochetosis in comercial laying hens. *Avian Dis.* 38, 895-898.

Trott, D. J., Huxtable, C. R., Hampson, D. J. (1996a). Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infect Immun.* 64, 4648- 4654.

Trott, D. J., Stanton, T. B., Jensen, N. S., Duhamel, G. E., Johnson, J. L., Hampson, D. J. (1996b). *Serpulina pilosicoli* sp. nov.: the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Bacteriol.* 46, 206-215.

Trott, D. J., Jensen, N. S., Saintgirons, I., Oxberry, S. L., Stanton, T. B., Lindquist, D., Hampson, D. J. (1997). Identification of and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients. *J Clin Microbiol.* 35, 482-285.

Trott, D. J., Mikosza, A. S. J., Combs, B.G., Oxberry, S. L. & Hampson, D. J. (1998). Population genetic analysis of *Serpulina pilosicoli* and its molecular epidemiology in villages in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Int J Syst Bacteriol.* 48, 659-668.

Wagenaar, J., van Bergen, M., van der Graaf, L. and Landman, W. (2003). Free-range chickens show a higher incidence of *Brachyspira* infections in the Netherlands. Abstract #16. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. April 2-4, Eddleston, Scotland, UK