



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN
AGROPECUARIA
ARGENTINA-BRASIL**

**Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencia, Tecnología e Innovación
Agropecuaria**

**DETECCIÓN Y EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE
BRACHYSPIRA SPP EN CERDOS**

MV Mag. Alicia Isabel Carranza

DIRECTOR: Dr. Gustavo Zielinski
CODIRECTOR: Mag. Arnaldo Ambrogi

Río Cuarto, diciembre 2018

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

DEFENSA ORAL y PÚBLICA

Lugar y fecha.....

Calificación.....

*Dedicado a mis cuatro hombres:
Leonardo, Ezequiel, Lisandro e Ignacio*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi país ARGENTINA y en él a la UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO, que me dieron la oportunidad de formarme en estudios de grado y posgrado, me ofrecieron una educación de calidad y gratuita.

Al Dr. Gustavo Zielinski por su acompañamiento y apoyo, junto a Julián Parada, Pablo Tamiozzo y Abel Estnnguet, con ellos logré la culminación de esta tesis.

A Naly Ambrogi por inculcarme a emprender nuevos desafíos.

A mis compañeros Analía Chanique, Gabriel Di Cola, Juan José Busso, Roberto Ambrogi, Pablo Camacho, Natalia Illanes; cada uno de ellos aportó con su trabajo durante los años de realización de la tesis.

A los alumnos y becarios de investigación que con su trabajo y dedicación colaboraron durante las actividades en el laboratorio: Malena Flores León, Sabrina Dávila, Gisela Rocco, Juan Pablo Grosso. Al Dr Fernando Ibáñez por su aporte desinteresado en los resultados de tipificación.

A los integrantes del Departamento de Patología Animal por permitirme tomar momentos para concluir este trabajo final.

A mi familia, por comprender la ocupación de tantas horas de trabajo en casa, quitando momentos para compartir.

A mi mamá por enseñarme a concluir lo emprendido, a mi hermana por su ejemplo en su permanente accionar de comenzar cosas nuevas.

A CADA UNO, MUCHAS GRACIAS!!!!

RESUMEN

El género *Brachyspira* se encuentra reportado en distintos países afectando a cerdos y otros hospederos. En Argentina, había pocos datos sobre la presencia de las especies de este género en cerdos. Para conocer acerca de la prevalencia en granjas porcinas confinadas, se realizó un relevamiento en la zona central de Argentina, abarcando siete provincias en donde están contenidas aquellas de mayor producción de cerdos. Sobre un total de 53 granjas se tomaron 30 muestras de materia fecal de animales, con y sin diarrea, en edad de faena. Se procesaron 1556 muestras por bacterioscopía, bacteriología y técnicas moleculares (PCR). En el 75,5% (39/53) de las granjas y en cada una de las provincias, se encontró alguna especie de *Brachyspira*. Tras el cultivo primario de la materia fecal se obtuvieron 290 aislamientos y mediante la realización de pruebas bioquímicas, Dúplex PCR, PCR-RFLP y la secuenciación del gen *nox*, se identificaron las especies *B. hyodysenteriae* (4%), *B. pilosicoli* (6%), *B. murdochii* (52%) y *B. innocens* (38%). Se pudieron identificar el 44% (127/290) de los aislados, el resto se consideró como *Brachyspira* spp. La prevalencia de granjas con *B. hyodysenteriae* fue 1,9% (1/53) y 7,5% (4/53) para *B. pilosicoli*, mientras que para *B. murdochii* y *B. innocens* fue 39,6 (21/53) y 34% (18/53), respectivamente. La caracterización de más de una especie de *Brachyspira* en la misma granja se encontró en el 22,5% de los establecimientos positivos. También, se identificaron los genes que codifican para factores de virulencia en diez cepas de *B. hyodysenteriae*, provenientes del estudio anterior y de cepas obtenidas de casos clínicos de disentería porcina. Todas las cepas presentaron los genes que codifican para las hemolisinas *tlyA*, y *hlyA*, y para el gen *nox_{hyo}*, mientras que ninguna tuvo los genes de proteína de membrana externa *bhlp 29,7* y *bhmp 39f*. En tanto que el gen ACP estuvo presente en el 70% (7/10) de las cepas. Las mismas cepas fueron analizadas por MLST sobre siete *loci* y estaban filogenéticamente emparentadas, aunque las secuencias tipo obtenidas no se correspondieron con ninguna de las previamente publicadas en el PubMLST. Estos resultados revelan que distintas especies de *Brachyspira* están presentes en la zona de mayor producción porcina de Argentina y que hay una limitada diversidad genética entre las cepas de *B. hyodysenteriae*.

SUMMARY

The genus *Brachyspira* has been reported as a cause of disease in pigs and other hosts in different countries. In Argentina, little is known about the presence of the species of this genus in pigs. A study was conducted in the central region of Argentina as to determine the prevalence of *Brachyspiraspp.*, in confined porcine farms, the study covered seven provinces of importance of pig production. A total of 53 pig farms were sampled from which 30 fecal samples were taken from fattening pigs with or without diarrhea. A total of 1556 samples were processed for bacterioscopy, bacteriological isolation and molecular techniques (PCR), *Brachyspira spp.*, was found in 75.5% (39/53) of the farms. After primary fecal cultures, 290 isolates in pure culture were obtained, and by biochemical testing and the molecular approaches such as Duplex PCR, PCR-RFLP and sequencing of the *nox* gene, the *Brachyspira* species were identified as *B. hyodysenteriae* (4%), *B. pilosicoli* (6 %), *B. murdochii* (52%) and *B. innocens* (38%). Out of the total isolates a figure of 44% (127/290) were properly identified, the other isolates were considered as *Brachyspira spp.* The prevalence found for the different species was, *B. hyodysenteriae* 1.9% (1/53), *B. pilosicoli* 7.5% (4/53), and for *B. murdochii* and *B. innocens* 39.6% (21/53) and 34% (18/53), respectively. The isolation of more than one *Brachyspira* species in a farm was found in 22.5% (9/40) of the positive ones. The genes coding for virulence factors in ten strains of *B. hyodysenteriae* isolated in a previous study and in strains isolated in the present study from pigs with clinical signs of swine dysentery were also recognised. We found the genes for the hemolysins *tlyA*, *hlyA*, and the *nox_{hyo}* gene in all the strains, while none had the outer membrane protein genes *bhlp 29.7* and *bhmp 39f*. Regarding the ACP gene, it was present in 70% (7/10) of the strains. All the isolates were analyzed by MLST on seven *loci* and were phylogenetically related, however the sequences obtained did not match any of those previously published in PubMLST. These results reveal a collection of different species of *Brachyspira spp.*, that are present in the main region of swine production in Argentina, also limited genetic diversity among strains of *B. hyodysenteriae* was found in this study.

INDICE

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
Hipótesis.....	5
Objetivos generales.....	5
1.2. LAS ESPIROQUETAS.....	7
1.2.1. Descripción estructural.....	7
1.2.2. Taxonomía.....	8
1.2.3. Las espiroquetas intestinales.....	10
1.3. GÉNERO <i>BRACHYSPIRA</i>.....	10
1.3.1. Morfología.....	10
1.3.2. <i>B. hyodysenteriae</i>	11
1.3.3. <i>B. pilosicoli</i>	13
1.3.4. <i>B. innocens</i>	13
1.3.5. <i>B. murdochii</i>	14
1.3.6. <i>B. intermedia</i>	14
1.3.7. <i>B. aalborgi</i>	15
1.3.8. <i>B. alvinipulli</i>	15
1.3.9. Otras <i>Brachyspiras</i>	16
1.3.9.1. “ <i>B. pulli</i> ”.....	16
1.3.9.2. “ <i>B. suanatina</i> ”.....	16
1.3.9.3. “ <i>B. hampsonii</i> ”.....	17
1.3.10. Factores de virulencia.....	17
1.4. DETECCIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>BRACHYSPIRA</i>...	20
1.4.1. Bacterioscopía.....	21
1.4.2. Cultivo y aislamiento.....	21
1.4.2.1. Características de los antibióticos utilizados en los medios de cultivo.....	22
1.4.2.2. Cultivo en medios líquidos.....	23
1.4.2.3. Cultivo en medios sólidos.....	24
1.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>BRACHYSPIRA</i>.....	25
1.5.1. Identificación fenotípica.....	25
1.5.1.1. Hemólisis.....	25
1.5.1.2. Pruebas bioquímicas.....	25
1.5.2. Identificación por pruebas moleculares.....	27
1.5.3. Serología.....	29
1.6. TIPIFICACIÓN DE CEPAS DE <i>BRACHYSPIRA</i> SPP.....	30
1.7. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR <i>BRACHYSPIRA</i> SPP.....	32
1.7.1. Disentería porcina.....	32
1.7.1.1. Control de la disentería porcina.....	35
1.7.2. Espiroquetosis intestinal porcina.....	36
1.7.2.1. Control de la espiroquetosis intestinal porcina.....	39
1.7.3. Otras colitis producidas por <i>Brachyspira</i> spp.....	39
CAPÍTULO II: PREVALENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE <i>BRACHYSPIRA</i> EN GRANJAS DE LA REGIÓN CENTRAL DE ARGENTINA.....	41
2.1. INTRODUCCIÓN.....	43

2.1.1. Primeros aislados de espiroquetas intestinales en Argentina.....	44
2.1.2. Presencia de espiroquetas intestinales en países de América.....	45
2.2. OBJETIVOS.....	47
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
2.3.1. Población de estudio.....	49
2.3.2. Muestreo en granjas.....	52
2.3.3. Procesamiento de la materia fecal.....	52
2.3.3.1. Registro de la consistencia de la materia fecal.....	52
2.3.3.2. Visualización de espiroquetas en frotis.....	52
2.3.3.2.1 Impregnación de <i>Fontana-Tribondeau</i>	53
2.3.3.2.2 Tinción de Carbol-Fucsina.....	54
2.3.3.3. Aislamiento bacteriológico.....	54
2.3.3.3.1 Medios de cultivo.....	55
2.3.3.3.1a Agar selectivo <i>Brachyspira</i> (ASB).....	55
2.3.3.3.1b Agar sangre-TSA.....	56
2.3.4. Preservación de aislados.....	56
2.3.4.1 Infusión Cerebro-Corazón.....	57
2.3.4.2 Caldo de triptona y soja.....	57
2.3.4.3 Medio para preservar cepas de <i>Brachyspira</i>	57
2.3.5. Identificación de especie por pruebas bioquímicas.....	58
2.3.6. Identificación de especie por PCR.....	58
2.3.6.1. Extracción de ADN a partir de papel de filtro con espiroquetas utilizando DNAzol.....	58
2.3.6.2. Extracción de ADN a partir de placas de cultivo con espiroquetas	59
2.3.7. Identificación y confirmación de aislados por Dúplex PCR.....	59
2.3.8. Identificación de aislados por PCR -RFLP.....	59
2.3.9. Identificación por secuenciación.....	62
2.3.9.1. Purificación de ADN a partir de productos de PCR en solución (Puriprep S).....	63
2.3.10. Análisis estadístico.....	63
2.4. RESULTADOS.....	65
2.4.1. Procesamiento de la materia fecal.....	65
2.4.1.1. Visualización de espiroquetas en frotis.....	65
2.4.1.2. Relación consistencia fecal con el aislamiento de <i>Brachyspira</i> spp	66
2.4.2. Aislamiento bacteriológico e identificación de especies.....	67
2.4.2.1. Identificación por pruebas bioquímicas.....	68
2.4.2.2. Identificación por PCR-RFLP.....	69
2.4.2.3. Identificación por secuenciación.....	69
2.4.3. Prevalencia de <i>Brachyspira</i> spp en granjas porcinas.....	70
2.4.4. Preservación de los aislados.....	75
2.5. DISCUSIÓN.....	76
2.5.1. Prevalencia de granjas infectadas por distintas especies del género <i>Brachyspira</i> y su comparación con datos mundiales.....	76
2.5.2. Caracterización de las granjas infectadas con distintas especies del género <i>Brachyspira</i>	78
2.5.3. Asociación entre visualización de espiroquetas en frotis, consistencia fecal y detección de <i>Brachyspira</i> spp.....	79
2.5.4. Descripción de las especies de <i>Brachyspira</i> encontradas.....	80
2.5.5. Descripción de cultivos mixtos.....	83
2.5.6. Importancia de la presencia de cepas débilmente β hemolíticas.....	83

2.5.7. Dificultades para la identificación de especies.....	84
2.5.8. Banco de cepas.....	86
CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>BRACHYSPIRA</i>	
<i>HYODYSENTERIAE</i> RECUPERADAS DE GRANJAS DE ARGENTINA...	87
3.1. INTRODUCCIÓN.....	89
3.2. OBJETIVOS	93
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
3.3.1. Cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> para estudios moleculares.....	95
3.3.1.1. Extracción del ADN cromosómico.....	96
3.3.1.2. PCR para detectar factores de virulencia.....	97
3.3.1.3. Análisis genotípico de <i>B. hyodysenteriae</i>	99
3.3.1.3.1. Análisis de secuenciación multilocus (MLST).....	99
3.3.1.3.1.a Cebadores utilizados para MLST de <i>Brachyspira</i> spp	99
3.3.1.3.1.b Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	100
3.3.1.3.1.c Secuenciación.....	101
3.3.1.3.1.d Análisis de las secuencias.....	101
3.3.1.3.1.e Árboles filogenéticos.....	102
3.4. RESULTADOS.....	103
3.4.1. Detección de factores de virulencia en cepas de <i>Brachyspira</i>	
<i>hyodysenteriae</i> recuperadas de granjas porcinas argentinas.....	103
3.4.2. Análisis de secuenciación multilocus en cepas de <i>Brachyspira</i>	
<i>hyodysenteriae</i> recuperadas de granjas porcinas argentinas	104
3.5. DISCUSIÓN.....	115
CAPÍTULO IV: ENSAYOS PARA EL CRECIMIENTO RÁPIDO DE	
<i>BRACHYSPIRA</i> SPP EN MEDIOS LÍQUIDOS.....	119
4.1. INTRODUCCIÓN.....	121
4.2. OBJETIVOS	123
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	125
4.3.1. Cepas utilizadas de <i>Brachyspira</i> spp.....	125
4.3.2. Medios líquidos.....	125
4.3.2.1. Medio Kunkle.....	125
4.3.2.1.1. Preparación del extracto de heces porcinas.....	126
4.3.2.1.2. Caldo suplementado.....	126
4.3.2.1.3. Caldo modificado.....	127
4.3.3. Ensayos para el cultivo de <i>Brachyspira</i> en medios líquidos.....	127
4.3.3.1. Protocolo 1: cultivo de materia fecal inoculada con espiroquetas	
en tubos de vidrio con caldo suplementado y diferentes periodos de incubación...	128
4.3.3.2. Protocolo 2: cultivo de espiroquetas y de materia fecal inoculada	
con espiroquetas en flask con caldo suplementado.....	129
4.3.3.3. Protocolo 3: cultivo de espiroquetas en flask con medio liquido	
modificado.....	130
4.4. RESULTADOS.....	131
4.4.1. Ensayos para el cultivo de <i>Brachyspira</i> en medios líquidos.....	131
4.4.1.1 Protocolo 1: cultivo de materia fecal inoculada con espiroquetas	
en tubos de vidrio con caldo suplementado y diferentes periodos de incubación...	131

4.4.1.2. Protocolo 2: cultivo de espiroquetas y de materia fecal inoculada con espiroquetas en flask con caldo suplementado.....	133
4.4.1.3. Protocolo 3: cultivo de espiroquetas en <i>flask</i> con medio liquido modificado	133
4.5. DISCUSIÓN.....	135
CAPÍTULO V: CONSIDERACIONES FINALES.....	139
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Diferenciación de cepas de <i>Brachyspira</i> spp y grupos según la especie	26
1.2	Tamaño de los fragmentos predichos después de la digestión del producto de PCR <i>nox</i> específico con <i>DpnII</i> y <i>BfmI</i> para las cinco <i>Brachyspira</i> spp porcinas, tomado de Rohde <i>et al.</i> , 2002.	28
2.1	Identificación y ubicación de la granja, número de madres y año del muestreo	50
2.2	Mezcla de reacción para Dúplex-PCR	60
2.3	Condiciones de Ciclado	60
2.4	Mezcla de reacción para PCR (gen <i>nox</i>) <i>Brachyspiras spp</i> (Rohde <i>et al.</i> , 2002)	61
2.5:	Condiciones de Ciclado	61
2.6	Mezcla de reacción para PCR-RFLP (Rohde <i>et al.</i> , 2002)	62
2.7	Condiciones de incubación	62
2.8	Resultado de cultivo y visualización de espiroquetas con tinción de Gram en 1391 muestras de materia fecal de 53 granjas de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Juan, San Luis y La Pampa entre los años 2010 y 2013	65
2.9	Relación entre la consistencia fecal y la presencia de espiroquetas en frotis en muestras de materia fecal procedentes de 20 granjas procedentes de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, San Juan y San Luis durante el período 2011-2013	66
2.10	Prevalencia provincial e intrapredial de <i>Brachyspira</i> spp en granjas de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Juan, San Luis y La Pampa durante el período 2010-2013	71
2.11	Prevalencia predial e intra-predial de <i>Brachyspira</i> spp según el tamaño de la granja de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Juan, San Luis y La Pampa durante el período 2010-2013	72
2.12	Distribución de especies de <i>Brachyspira</i> como única o combinada con otras especies por granja y por provincia durante el período 2010-2013	74
2.13	Número de <i>Brachyspira</i> spp guardadas a -70°C y en papel de filtro refrigeradas	75
3.1	Identificación, origen y provincia de la que provienen las cepas de <i>B. hyodysenteriae</i>	95
3.2	Mezcla de reacción para PCR	97

3.3	Cebadores utilizados para cada gen y sus condiciones particulares de ciclado	98
3.4	Condiciones de Ciclado	98
3.5	Cebadores utilizados para la amplificación de los genes utilizados en el análisis MLST	99
3.6	Mezcla de reacción para PCR	100
3.7	Condiciones de ciclado	100
3.8	Número de alelos publicados sobre <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> en el PubMLST y tamaño del fragmento analizado para cada gen	101
3.9	Factores de virulencia identificados en cepas de <i>B. hyodysenteriae</i>	103
3.10	Identificación alélica de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en relación con las publicadas en el PubMLST	113
3.11	Patrones de genes de virulencia de diez cepas argentinas de <i>B. hyodysenteriae</i> aisladas entre 2008 y 2013	114
4.1	Medios líquidos y procedimientos para el cultivo de <i>Brachyspira</i> spp	132

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Diagrama esquemático de espiroqueta que muestra la vaina de la membrana externa, cilindros de células protoplasmáticos y flagelos periplásmicos (tomado de Charon y Goldstein, 2002)	8
1.2	Géneros del phylum “ <i>Spirochaetes</i> ” (tomado de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Vol 4, 2010)	9
2.1	Distintas tinciones aplicadas a frotis de <i>Brachyspira</i> spp. A: <i>Fontana-Tribondeau</i> , B: Gram, C: Carbol-Fucsina.	66
2.2	Placas de agar sangre TSA comparando tipos de hemólisis. A: zonas con fuerte β hemólisis, B: zonas con débil β hemólisis	67
2.3	Morfología externa de las distintas especies de <i>Brachyspira</i> observadas por microscopía electrónica de transmisión, técnica tinción negativa. A: <i>B. hyodysenteriae</i> (granja H11) 20.000x, B: <i>B. pilosicoli</i> (granja endémica) 12.000x, C: <i>B. innocens</i> (granja 22) 12.000x, D: <i>B. murdochii</i> (granja 20) 12.000x. Se puede observar en A, C y D que los extremos de la espiroqueta son romos, mientras que en B son puntiagudos	68
2.4	Dúplex PCR especie específico. B. hyo: <i>B. hyodysenteriae</i> . B. pilo: <i>B. pilosicoli</i> . M: marcador de peso molecular. 100-1000 pb	69
2.5	Secuencia del gen <i>nox</i> de un aislado de <i>B. murdochii</i> en formato FASTA	70
2.6	Especies de <i>Brachyspira</i> identificadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, San Juan, San Luis y La Pampa durante el período 2010-2013.	73
2.7	Número de especies aisladas de <i>Brachyspira</i> y distribución por provincia	75
3.1	Fragmento de las secuencias alineadas del gen <i>adh</i> de las 10 cepas argentinas, dos de EE. UU y el resto pertenecen a los alelos publicados en el PubMLST	102
3.2	Resultados de PCR para la amplificación de los genes <i>adh</i> , <i>glp</i> , <i>gdh</i> , <i>alp</i> , <i>thi</i> y <i>pgm</i> de las cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> H11 y H28 (Muestra: H11; Muestra: H28). M: marcador de peso molecular	104
3.3	Resultados de PCR para la amplificación de los genes <i>adh</i> , <i>alp</i> , <i>glp</i> y <i>gdh</i> de todas las cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio. M: marcador de peso molecular	105
3.4	Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 345 pb del gen <i>adh</i> de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio (señaladas en negrita), de los 19 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de <i>B. intermedia</i> (subrayada). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio	106

3.5	Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento 647 pb del gen <i>alp</i> de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio (señaladas en negrita), de los 35 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de <i>B. intermedia</i> y uno de <i>B. pilosicoli</i> (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio	107
3.6	Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 503 pb del gen <i>est</i> de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio (señaladas en negrita), de los 30 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de <i>B. intermedia</i> y de <i>B. hampsonii</i> (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio	108
3.7	Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 415 pb del gen <i>gdh</i> de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio (señaladas en negrita), de los 32 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de <i>B. intermedia</i> , <i>B. pilosicoli</i> y <i>B. hampsonii</i> (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio	109
3.8	Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 687 pb del gen <i>glpK</i> de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio (señaladas en negrita), de los 42 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de <i>B. intermedia</i> , <i>B. hampsonii</i> y <i>B. pilosicoli</i> (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio	110
3.9	Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 744 pb del gen <i>pgm</i> de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio (señaladas en negrita), de los 25 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de <i>B. intermedia</i> , <i>B. pilosicoli</i> y <i>B. hampsonii</i> (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio	111
3.10	Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 745 pb del gen <i>thi</i> de las 12 cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> en estudio (señaladas en negrita), de los 39 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de <i>B. intermedia</i> y <i>B. hampsonii</i> (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio	112
4.1	Controles positivos de la materia fecal inoculada (1) y del inóculo CC 1/10 (2)	133
4.2	Controles positivos de <i>B. hyodysenteriae</i> con dilución puro, 1/10 y 1/100. A la derecha de cada placa está sembrada la materia fecal inoculada, a la izquierda solo el inóculo con la misma dilución	134

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µl	Microlitro
α	Letra alfa griega
β	Letra beta griega
Ac	Anticuerpo
adh	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
alp	Fosfatasa alcalina
ASB	Agar sangre <i>Brachyspira</i>
BAM-SR	Medio modificado de agar sangre con rifampicina y espectinomicina
BHIS	Caldo de cerebro y corazón con suero fetal bovino
bmpB	Proteína de membrana externa de <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> de 29,7 kDa
CC	Cerebro-corazón
Cl	Cloro
cm	Centímetro
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₂	Dióxido de Carbono
DP	Disentería porcina
D-PCR	Dúplex-reacción en cadena de la polimerasa
Ed.	Edición
EE. UU	Estados Unidos
EIH	Espiroquetosis intestinal humana
EIP	Espiroquetosis intestinal porcina
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas
est	Esterasa
etc.	Etcétera
Fig.	Figura
g	Gramo
G+C	Contenido de guanina y cito
gdh	Glutamato deshidrogenasa

glpK	Glucosa quinasa
h	Hora
H ₂	Hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
IC	Intervalo de confianza
IgG	Inmunoglobulina
kbp	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	kilogramo
L	Litro
log	Logaritmo
LOS	Lipooligosacáridos
LPS	Lipopolisacárido
min.	Minuto
MAT	Test de microaglutinación
MEE	Ánálisis electroforético de enzimas multilocus
ml	mililitro
MLEE	Electroforesis de isoenzimas multilocus
MLST	Tipado de secuencias multilocus
mm	milímetro
mM	Concentración milimolar
N°	Número
Na	Sodio
nm	Nanómetro
NN	Nuevo perfil alélico
nox	Oxidasa
pb	Pares de bases
O ₂	Oxígeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
pgm	fosfoglucomutasa
RAPD	Amplificación polimórfica al azar del ADN
REA	Análisis del ADN con enzimas de restricción

RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
s	Segundo
S/D	Sin dato
SFB	Suero fetal bovino
SmpA	Lipoproteína de membrana externa de <i>B. hyodysenteriae</i> de 16 kDa
SPF	Libre de patógenos específicos
sp. nov.	Nueva especie (<i>species novum</i>)
ST	Secuencia tipo
Taq	ADN polimerasa 1 termoresistente de <i>Thermus aquaticus</i>
thi	Acetil-CoA acetiltransferasa
TSA	Agar de triptona y soja
TSB	Caldo de triptona y soja
Vol.	Volumen
UFC	Unidad formadora de colonia

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los sistemas productivos para la crianza de cerdos han tenido grandes cambios en los últimos 20 años en nuestro país. En 1995 había alrededor de 150.000 madres con una producción de 16 capones/cerda/año y un consumo per cápita de 6,48 kg/año en su mayoría con sistemas de producción al aire libre. Actualmente esos valores subieron a 380.000 madres, 25 capones/cerda/año de las cuales alrededor de 250.000 tienen una eficiencia de producción entre baja y mediana con 10 a 18 capones/cerda/año y unas 130.000 madres con una eficiencia alta llegando a producir 27 capones/madre/año. En cuanto al consumo, viene subiendo sostenidamente en los últimos 10 años y se encuentra alrededor de 16 kg/año per cápita.

El crecimiento productivo ha sido acompañado de mejoras a nivel de genética, alimentación, instalaciones, manejo y sanidad. Una correcta sistematización y ejecución de programas sanitarios permite optimizar el resto de las variables, siendo indispensable para ello un acabado conocimiento de la situación de partida cuando se emprende la empresa de administrar sanitariamente una granja tecnificada.

El conocimiento del estado de salud de una granja porcina implica conocer los agentes presentes y su dinámica en la producción a través de distintos tipos de monitoreos, como los clínicos, etiológicos, parasitológicos, y *post mortem* en frigorífico.

Los trastornos digestivos se presentan como uno de los más importantes, ya que pueden producir pérdidas económicas por aumento de la mortalidad, disminución de la ganancia diaria de peso, aumento en la conversión alimenticia, gastos en medicación, etc. El principal signo clínico es la diarrea y se puede presentar en cualquiera de las etapas productivas, aunque también algunos agentes producen cuadros subclínicos de difícil observación y las pérdidas son menos perceptibles.

Los agentes infecciosos que producen trastornos digestivos que pueden afectar a los cerdos en la etapa de maternidad son *E. coli*, *Isospora suis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* y Rotavirus. Mientras que a partir del destete se destacan *E. coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* y *Brachyspira spp.*

En el género *Brachyspira* figuran especies patógenas y cuestionadas especies apatógenas que afectan a los cerdos, otros mamíferos, aves e incluso el hombre.

Este trabajo profundizará estudios sobre este último género bacteriano cuantificando su difusión y estudiando la expresión de patogenicidad de sus especies.

HIPÓTESIS

Las bacterias del género *Brachyspira* que se encuentran colonizando a los cerdos en granjas porcinas de la región con mayor producción de Argentina, representan distintas especies y codifican distintos factores de virulencia.

OBJETIVOS GENERALES

- a- Identificar a las distintas especies de los aislados de espiroquetas intestinales del género *Brachyspira* spp. en granjas de cerdos de distintas provincias del país.
- b- Identificar factores de virulencia y la relación genotípica en cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* presentes en granjas de cerdos de distintas provincias del país.
- c- Desarrollar un protocolo bacteriológico que favorezca el crecimiento rápido de *Brachyspira* spp.

1.2. LAS ESPIROQUETAS

1.2.1. Descripción estructural

Las espiroquetas (**speira**, espiral; **chaete**, pelo) abarcan un grupo de organismos de forma helicoidal, Gram negativas, delgadas, flexuosas, quimioheterótrofas, que difieren morfológicamente de otros procariontes por la presencia de una fibrilla axial, conocida también como un endoflagelo o filamento axial. Los miembros del grupo poseen una cubierta exterior, que rodea la célula, un cilindro protoplásmico, que consta de pared celular, membrana celular y citoplasma cerrado, y la fibrilla axial (Holt, 1978).

Las distintas especies de espiroquetas varían con respecto a tamaño, número de flagelos periplásmicos y si éstos se superponen en el centro de la célula (Charon y Goldstein, 2002).

La cubierta o vaina externa puede variar entre géneros. Pueden ser desde finas capas lisas no texturadas a estar formada por subunidades poligonales (que pueden estar plegadas), pudiendo en otras bacterias tener estriaciones finas y transversales (Holt, 1978). También se encontraría una capa de lipopolisacáridos (LPS).

El cilindro protoplásmico se encuentra por debajo de la vaina externa (Fig. 1.1), consta de pared celular, membrana celular y citoplasma (Holt, 1978). La membrana citoplásmica es morfológicamente similar a la encontrada en bacterias Gram positivas como negativas. En el cilindro protoplásmico se encuentra el núcleo y elementos citoplásmicos (Sellwood y Bland, 1997).

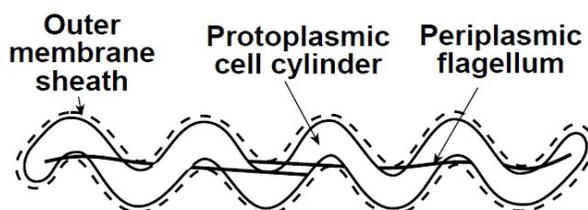
El espacio entre el cilindro protoplásmico y la vaina externa se conoce como periplasma. Las espiroquetas son únicas, ya que su periplasma contiene los flagelos periplásmicos que son similares en muchos aspectos a los flagelos externos de bacterias con forma de bacilos. Estos orgánulos no son fácilmente accesibles al entorno ambiental, por lo tanto, no interactúan con anticuerpos flagelares específicos y así evitan la inmovilización del organismo intacto (Charon y Goldstein, 2002).

La fibrilla axial o flagelo periplásmico consiste en dos componentes básicos: un eje y su cubierta de la vaina, y un aparato de inserción que es diferenciado en una perilla terminal compuesta de un gancho proximal y discos de inserción o protuberantes "hinchazones anulares". El eje puede ser filamentosos o globular en subestructura y, por lo tanto, muy similar a la subestructura del eje de un flagelo bacteriano. Sin embargo, a diferencia del flagelo bacteriano, el eje o filamento de la fibrilla axial es una estructura totalmente "interna" que se encuentra entre la capa interior de la cubierta exterior y la capa más externa del

cilindro protoplásmico. La fibrilla axial se enrolla alrededor del cilindro protoplásmico y, en la mayoría de las espiroquetas, se superpone cerca del centro de la célula (Holt, 1978). Dependiendo de la especie de espiroqueta el número de flagelos periplásmicos puede ir de 2 a cientos (Paster y Dewhirst, 1997). Estos organismos pueden nadar en medios altamente viscosos y gelatinosos (Charon y Goldstein, 2002).

La división celular se realiza por fisión binaria transversal, por un proceso de constricción luego de la formación de las nuevas fibrillas axiales (Holt, 1978).

Fig. 1.1: Diagrama esquemático de espiroqueta que muestra la vaina de la membrana externa, cilindros de células protoplasmáticas y flagelos periplásmicos (tomado de Charon y Goldstein, 2002)



1.2.2. Taxonomía

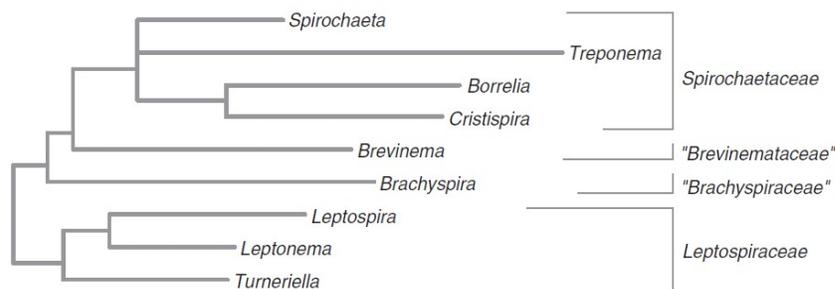
Los miembros del Orden *Spirochaetales* anteriormente fueron agrupados en cinco géneros, *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, *Borrelia*, y *Leptospira*, y separados uno de otro en base a la morfología y rasgos fisiológicos. Entre ellas, la longitud de la ondulación, la presencia o ausencia de terminales ganchos (polares), la forma de los polos de la célula, y el número de fibrillas axiales. En general, las dimensiones varían de 0,1 a 3 μm de diámetro y 3 a 500 μm de longitud (Holt, 1978).

El estudio de la secuencia de los genes 16S rRNA de los miembros de los géneros nombrados permitió definir que las espiroquetas representan un Phylum bacterial monofilético (Paster *et al.*, 1991). Algunas especies de *Treponema* (*T.*) como *T. hyodysenteriae* y *T. innocens* tenían relación lejana con otros miembros del género y con otras espiroquetas, cuando se compararon mediante distintos análisis genéticos; por ello se propuso transferirlos a un nuevo género, “*Serpula*” (Stanton *et al.*, 1991).

Como resultado del análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, las espiroquetas se clasifican actualmente en la Clase *Spirochaetes* en el Orden *Spirochaetales* y se dividen en tres grandes grupos filogenéticos o familias. La primera, familia *Spirochaetaceae* contiene

especies de los géneros *Borrelia*, *Brevinema*, *Cristispira*, *Spirochaeta*, *Spironema* y *Treponema*. La segunda, familia *Brachyspiraceae* contiene el género *Brachyspira* (inicialmente *Serpula* y después *Serpulina*). La tercera, familia *Leptospiraceae* contiene especies de los géneros *Leptonema* y *Leptospira* (Paster y Dewhirst, 2000). Los miembros del Orden *Spirochaetales*, se caracterizan por una ultraestructura celular única de bacterias con orgánulos internos de la motilidad, que son los ya nombrados flagelos periplásmicos.

Fig. 1.2: Géneros del phylum “*Spirochaetes*” (tomado de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Vol 4, 2010)



Actualmente la Clase *Spirochaetes*, comprende a cuatro familias: *Spirochaetaceae*, *Leptospiraceae*, *Brachyspiraceae* y *Brevinemateceae* (Fig. 1.2). La familia *Brachyspiraceae* tiene un único género, *Brachyspira*, que contiene distintas especies estrechamente relacionadas. Se reconocían siete (7) especies: *B. aalborgi*, *B. alvinipulli*, *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *B. intermedia* y *B. murdochii*. Estas especies tienen una alta similitud en la secuencia del 16S rADN, por lo que conforman un mismo grupo, que incluye a las siete especies. Por análisis electroforético de enzimas multilocus (MEE) se han asignado ocho grupos electroforéticos. Los grupos MEE corresponden a las siete especies, según se define a partir de estudios de homología de ADN, y una especie provisional no caracterizada actualmente, llamada "*B. canis*" (Stanton, 2006). En los últimos años también se habían propuesto 2 especies llamadas provisionalmente "*B. suanatina*" y "*B. hamptonii*", que producirían una enfermedad indistinguible a la disentería porcina producida por *B. hyodysenteriae* (Hampson *et al.*, 2015), al poco tiempo se reconocieron como nuevas especies (Mushtaq *et al.*, 2015; Miratkjar *et al.*, 2016). Existen otras espiroquetas no caracterizadas que han sido reportadas por afectar a los pollos, provisionalmente llamada "*B. pulli*", o a los humanos que recomiendan llamarla "*B. christiani*" (Stephens y Hampson, 2001, Stanton, 2006). En forma general, la estrecha similitud entre la secuencia de los genes

16S rRNA entre las distintas especies de *Brachyspira* implica que la especiación en el género es algo reciente (Hampson, 2012). Luego de estudios genómicos y fenotípicos se ha propuesto el nombre de *B. suanatina* a la llamada provisionalmente con el mismo nombre anteriormente, y que fue aislada de cerdos y patos salvajes (Mushtaq *et al.*, 2015).

1.2.3. Las espiroquetas intestinales

En el tracto digestivo de los cerdos pueden estar presentes distintas familias de la Clase *Spirochaetes*, como *Spirochaetaceae* y *Brachyspiraceae*, con sus géneros *Treponema* y *Brachyspira* (Soler *et al.*, 2018).

1.3. GÉNERO BRACHYSPIRA

Las bacterias de este género comparten las características de otras espiroquetas, tienen forma de hélice y una ultraestructura celular con flagelos periplásmicos internos (antes llamado fibrilla axial), secuencias del gen16S rDNA con bases de nucleótido de espiroqueta y una resistencia natural al antibiótico rifampicina (Paster y Dewhirst, 1997; Paster y Dewhirst, 2000). Son anaerobias pero capaces de consumir O₂ a través de la enzima NADH oxidasa (Stanton *et al.*, 1999). Algunas especies son patógenas, aunque todas se localizan en el ciego y colon de animales y de humanos (Stanton, 2006). Todas las especies crecen lentamente, y pueden ser cubiertas por la microbiota anaeróbica intestinal a menos que para el aislamiento se utilicen medios selectivos con antimicrobianos (Hampson, 2012).

1.3.1. Morfología

Las *Brachyspiras* son espiroquetas de estructura única, forma helicoidal, con terminaciones romas o puntiagudas y poseen flagelos periplásmicos que se insertan subterminalmente en dos líneas o en forma de V. Estos flagelos les confieren una motilidad diferente a otras bacterias, permitiéndole moverse en medios altamente viscosos, como el moco producido por las células caliciformes en el intestino grueso (Sellwood y Bland, 1997). Se caracterizan por ser Gram negativas y anaeróbicas, aunque son aerotolerantes, debido, al menos en parte, a la alta actividad NADH oxidasa. Las diferentes especies producen débil o fuerte β hemólisis, lo que permite una diferenciación fenotípica entre especies. Utilizan azúcares solubles como fuentes de carbono y energía. El crecimiento de *Brachyspira* spp. consume bajas concentraciones de oxígeno y producen acetato, butirato, H₂ y CO₂ a partir

de glucosa. Algunas especies también producen etanol. El ADN de *Brachyspira* spp. tiene un bajo contenido de G+C (24,5 a 26,7% en moles).

Las *Brachyspiras* presentan una membrana lipídica bicapa, externa e interna, suelta, rodeando a un cilindro protoplasmático. En cada extremo subterminal del cilindro protoplasmático se unen los flagelos periplásmicos que residen en el espacio periplásmico. La forma final de la célula, dependiendo de la especie, es como una onda plana. El tamaño de la espiroqueta, el número de flagelos periplásmicos unidos en cada extremo, y si los flagelos periplásmicos se superponen en el centro de la célula, es particular de cada especie. Las especies de *Brachyspira* se pueden dividir en dos grupos según el número de flagelos y del tamaño. Las especies de mayor tamaño, como *B. hyodysenteriae*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii* y *B. alvinipulli*, tienen 20-30 flagelos por célula. Mientras que *B. pilosicoli* y *B. aalborgi* son más cortas en longitud y tienen de 8-12 flagelos. Al igual que otras espiroquetas, tienen un número de flagelos aproximadamente iguales en cada extremo (Stanton, 2006).

Seis especies de *Brachyspira* colonizan el intestino grueso de los cerdos: las dos principales patógenas son *B. hyodysenteriae*, el agente de la disentería porcina (DP) y *B. pilosicoli*, la causa de la espiroquetosis intestinal porcina. Las especies propuestas "*Brachyspira suanatina*" y "*B. hampsonii*" y algunas cepas de *B. murdochii* y *B. intermedia* también, de vez en cuando, pueden causar colitis en los cerdos, mientras que *B. innocens* suele considerarse como un comensal no patógeno (Hampson, 2012).

Se han encontrado especies idénticas de *Brachyspira* en cerdos y roedores de una misma granja (Backhans *et al.*, 2011).

1.3.2. *Brachyspira hyodysenteriae*

Brachyspira hyodysenteriae es el agente etiológico de la DP, por lo tanto, la especie más estudiada. Mide de 7-9 μm de longitud por 0.3-0.4 μm de ancho y puede presentar de 7 a 14 flagelos periplásmicos insertados en cada extremo de la espiroqueta y se superponen en el centro (Hampson, 2012). Son muy móviles, con movimiento serpenteante en medios sólidos y semisólidos y de traslación o rotación en medios líquidos. Cuando los cultivos tienen varios días suelen tomar una forma esférica (Hampson *et al.*, 1997). Se caracteriza por producir una fuerte β hemólisis en cultivos de agar sangre, aunque existen reportes de cepas débilmente β hemolíticas (Mahu *et al.*, 2016).

Brachyspira hyodysenteriae infecta naturalmente a los cerdos domésticos y salvajes y a veces algunas especies de aves (ñandúes, pollos, patos y gansos). En granjas infectados

ha sido aislada de ratones, ratas, perros y aves silvestres, incluidas las gaviotas (Hampson, 2012).

Recientemente se secuenció y analizó la cepa WA1 de *B. hyodysenteriae* que consta de un cromosoma circular (~3.0 Mbp) y un plásmido circular (~36 kbp), que no había sido reportado. El tamaño del cromosoma, superior a otras espiroquetas como *Borrelia* spp y *Treponema* spp., podría reflejar la versatilidad para poder sobrevivir en el complejo y variable ambiente del intestino grueso. Además, permitió conocer que muchas proteínas de este patógeno, principalmente asociadas con el transporte y el metabolismo, son más similares con proteínas presentes en otras bacterias, como *Escherichia coli* y *Clostridium* spp, que con las de otras espiroquetas. Esto es importante para la supervivencia en el denso, complejo y cambiante ambiente nutricional y polimicrobiano del intestino grueso porcino, sugiriendo que los genes que las codifican se han adquirido poco a poco de otras especies entéricas por transferencia horizontal (Bellgard *et al.*, 2009).

Numerosas proteínas de membrana externa y lipoproteínas se han descrito y nombrado en *B. hyodysenteriae*; sin embargo, recientemente se prefiere describirlas según su tamaño molecular. Por ejemplo, una lipoproteína de 29,7 KDa anteriormente llamada BmpB o BLPA, se identifica como Bhlp29.7. La membrana externa de *B. hyodysenteriae* contiene además lipooligosacáridos (LOS), una forma semirrugosa de LPS, que parecen tener algunas de las propiedades biológicas presentes en LOS de otras bacterias Gram negativas, con efectos tóxicos que pueden actuar localmente para alterar la barrera epitelial colónica. Los genes *rfbBADC* que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de ramnosa, y que parece estar asociado con la asimilación del O-antígeno en los LOS, se encuentran en el plásmido de la cepa WA1 de *B. hyodysenteriae* (Bellgard *et al.*, 2009).

A través de RAPD, PFGE y MLST se demostró la diversidad genotípica en los aislamientos de campo de *B. hyodysenteriae* y permitió la investigación de las relaciones epidemiológicas entre estos aislamientos (Hidalgo *et al.*, 2010; Råsbäk *et al.*, 2007). En un trabajo reciente, se compararon 20 cepas de *B. hyodysenteriae* que mostraron un alto porcentaje de homología en el genoma a pesar de originarse en lugares geográficos muy diferentes. Esto es consistente con que *B. hyodysenteriae* es una especie clonal relativamente conservada, y está en contraste con *B. pilosicoli* que es altamente recombinante (Black *et al.*, 2015).

1.3.3. *Brachyspira pilosicoli*

Brachyspira pilosicoli mide de 6-10 μm de largo, 0,25-0,30 μm de ancho, presenta de 4 hasta 7 flagelos periplásmicos unidos en cada extremo de las células. Éstas terminan en forma puntiaguda y se ha observado una subestructura como un enrejillado que cubre los extremos (Sellwood y Bland, 1997). *Brachyspira pilosicoli* se caracteriza por su unión por un extremo al epitelio colónico y forma una densa a moderada franja de espiroquetas (Jensen *et al.*, 2004).

Numerosas especies pueden ser infectadas naturalmente con *B. pilosicoli*, con signos clínicos y lesiones típicas. Los aislamientos de cerdos, perros, aves y humanos pueden estar estrechamente relacionados genéticamente (Hampson, 2012). *Brachyspira pilosicoli* coloniza al hombre, generalmente inmunocomprometidos o que viven en países en desarrollo, en comunidades donde hay poca higiene y los suministros de agua están contaminados con materia fecal (Margawani *et al.*, 2004).

Una de las cepas más estudiadas de *B. pilosicoli*, identificada como 95/1000, tiene un cromosoma circular de alrededor de 2.59 Mbp, genes de un GTA, y un sistema integrado profago, pero no posee plásmidos. La envoltura exterior de este patógeno contiene LOS, que son serológicamente heterogéneos entre las diferentes cepas, aunque carece de la agrupación de genes rfbBADC encontrado en el plásmido de *B. hyodysenteriae*, y, por lo tanto, se estima que tiene una estructura de LOS diferente (Hampson, 2012).

Diversos trabajos sobre la epidemiología de *B. pilosicoli* permiten demostrar la diversidad genética entre sus cepas, mediante análisis de MLEE y PFGE sobre aislados obtenidos de una misma granja y de distintas fuentes (cerdos, patos, pollos, agua de estanque, efluentes) (Oxberry y Hampson, 2003).

1.3.4. *Brachyspira innocens*

Se ha mencionado que en la década de los 80, la presencia de *B. hyodysenteriae* y *B. innocens*, entonces pertenecientes al género *Treponema*, eran morfológicamente indistinguibles en cuanto a la longitud y diámetro de la célula (Sellwood y Bland, 1997). Cuatro características permitieron diferenciarlas, la enteropatogenicidad, el patrón de hemólisis, la fermentación de la fructosa y la producción de indol, de la identificada como *T. hyodysenteriae* no patógena. Llamada ahora *T. innocens* sp. nov., cuyas características principales fueron gram negativa, forma de serpentina con dos o tres curvas por célula y 8-9 flagelos axiales. Las células midieron aproximadamente 326 nm de ancho y 8,8 μm en longitud, crecieron en bilis y iodoacetato, 42 y 37°C, débilmente hemolíticas y no patógenas

para el cerdo, también se encuentra en perros (Kinyon y Harris, 1979). En 1991, luego de evidenciar a través de distintos análisis de ADN, que *T. hyodysenteriae* y *T. innocens* eran diferenciables de otras especies de *Treponema*, se propone que formen parte de un nuevo género *Serpula*. El estudio evidenció que ambas especies están relacionadas estrechamente por su alta similitud en la secuenciación del 16S rRNA, mientras que su homología de ADN es baja (Stanton *et al.*, 1991).

A pesar de ser considerada como no patógena, cepas de *B. innocens* inoculadas a cerdos gnotobióticos resultaron ser patógenas, pero sin signos clínicos evidentes (Neef *et al.*, 1994), se identificaron solas o junto a otros patógenos (Komarek *et al.*, 2009; Jensen y Boye, 2005).

1.3.5. *Brachyspira murdochii*

Brachyspira murdochii mide de 5 a 8 por 0,35 a 0,4 μm , cada célula presenta entre 22 a 26 flagelos (11 a 13 insertados en cada extremo) y es débilmente β hemolítica.

En 1997, Stanton *et al.*, a través del análisis de DNA validaron dos nuevas especies de *Serpulina*, proponiendo los nombres de *S. intermedia* (anteriormente "*S. intermedius*") y *S. murdochii* (anteriormente llamadas espiroquetas del grupo B). Su nombre se debe al reconocimiento al trabajo de la Universidad de Murdoch, donde se realizó la identificación. Es considerada como no patógena, pero varios trabajos la identificaron de casos clínicos leves de colitis como también en inoculaciones experimentales, pudiéndosela encontrar sola o asociada a otros patógenos (Jensen y Boye, 2005; Weissenböck *et al.*, 2005; Wendt *et al.*, 2008; Komarek *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010).

1.3.6. *Brachyspira intermedia*

Brachyspira intermedia tiene forma helicoidal, mide de 0,35 a 0,45 por 7,5 a 10 μm , tienen de 24 a 28 flagelos periplásmicos por célula (12 a 14 inserciones en cada extremo). Las células que crecen bajo una atmósfera de $\text{N}_2\text{-O}_2$ (99: 1) en caldo infusión cerebro corazón con agitación duplican la población de 2 a 4 h, a una temperatura óptima de crecimiento de 39 a 42°C (Stanton *et al.*, 1997). Su nombre se debe a que las reacciones bioquímicas que produce esta espiroqueta están entre las que produce *B. hyodysenteriae* y *B. innocens*, son débilmente β hemolíticas e indol positivas.

Brachyspira intermedia ha sido aislada de cerdos y de aves con colitis moderada, también se ha inoculado a pollitos de un día de vida produciendo heces acuosas que contenían espiroquetas y con disminución del peso corporal en comparación con las aves del

grupo control. Gallinas sanas inoculadas presentaron diarrea y disminución de la producción de huevos (McLaren *et al.*, 1997; Stanton, 2006).

1.3.7. *Brachyspira aalborgi*

Brachyspira aalborgi tiene forma sigmoideal y sus extremos en forma cónica. Son cortas, miden de 2-6 μm de longitud y un espesor de 2 μm . Poseen 4 flagelos en cada extremo de la célula. Fue la primera especie incluida en el género *Brachyspira*, alrededor de 1982 (Hovind-Hougen *et al.*, 1982).

Brachyspira aalborgi, solo se ha identificado en humanos y, al igual que *B. pilosicoli*, se une en su extremo al enterocito en la colonización de la mucosa, un extremo de la espiroqueta se une a una célula epitelial y el otro extremo se extiende lejos de la superficie mucosal (Jensen *et al.*, 2000). La densidad de espiroquetas se ha estimado entre 20-80 células espiroquetales por enterocito (Stanton, 1997). La presencia de este aspecto como “falso ribete en cepillo” ha llevado a que se refiera a la colonización por esta especie como la espiroquetosis intestinal (Stanton, 2006) pero aparentemente no causan daño a la superficie de la mucosa (Sellwood y Bland, 1997), actualmente es considerada una especie comensal de la microbiota intestinal humana. La espiroquetosis intestinal humana (EIH) es producida por *B. aalborgi*, *B. pilosicoli* y especies no determinadas de *Brachyspira*. La prevalencia de EIH es mayor entre humanos con escasos recursos y entre pacientes inmunocomprometidos (Stanton, 2006).

1.3.8. *Brachyspira alvinipulli*

En 1998 se propone como *Serpulina alvinipulli* a una espiroqueta que causaba enfermedad en pollos. Tienen una ultraestructura típica de espiroqueta, las células miden 8-11 x 0,22-0,34 μm y tienen de 22-30 (media 24) flagelos periplásmicos envueltos alrededor del protoplasma (11-15 insertados en cada extremo de la célula, con extremos libres superpuestos en el centro). Son débilmente β hemolíticas en agar tripticosa soja con sangre ovina y duplican la población en caldo infusión cerebro corazón en 2-4 h con el agregado de suero (Stanton *et al.*, 1998).

Brachyspira alvinipulli coloniza el ciego y colon de los pollos, a través de agregados celulares irregulares adyacentes a las células epiteliales intestinales y dentro de las criptas de las vellosidades. Colonizan el ciego de pollitos de 1 día y de 14 meses de edad y produce una tiflitis leve con contenido cecal acuoso y descolorido (Stanton, 2006).

1.3.9. Otras *Brachyspiras*

1.3.9.1. "*Brachyspira pulli*"

Tienen de 5-12 flagelos periplásmicos insertados subterminalmente en una sola fila en cada extremo de la célula que finaliza en forma roma, miden de 10,6-26,6 μm de longitud, 0,2-0,4 μm de diámetro y 2,5-4,3 μm de longitud de onda. No hubo características consistentes fenotípicas a utilizar para identificarlas. Fueron incluidas dentro del grupo "d" cuando se identificaron primeramente provenientes de granjas avícolas con problemas productivos (McLaren *et al.*, 1997).

Jansson *et al.*, en el 2011, concluyeron que los patos salvajes de vida libre son hospedadores de una gran diversidad de especies del género *Brachyspira*, como *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli* y las propuestas especies "*B. suanatina*" y la comensal "*B. pulli*".

1.3.9.2. *Brachyspira suanatina*

En el año 2006 se aisló por cultivo una cepa de iguales características fenotípicas a *B. hyodysenteriae*, pero negativa a la PCR para la misma especie. Estudios posteriores comprobaron la similitud con cepas provenientes de patos salvajes, cuya inoculación en cerdos produjo una diarrea, mientras que la descarga con la cepa porcina produjo un cuadro similar a la DP se propone llamar a esta nueva especie provisionalmente "*Brachyspira suanatina*" (Råsbäck *et al.*, 2006; 2007). Sólo se la ha encontrado en la región de Escandinavia (Hampson *et al.*, 2015).

El estudio realizado por Mushtaq *et al.*, en el año 2015 define a la nueva especie *B. suanatina* como similar pero distinta de *B. hyodysenteriae*, son bacterias anaeróbicas pero tolerantes al oxígeno, Gram negativas, de una ultraestructura espiroquetal típica. Miden de $5,5 \pm 1,0 \mu\text{m}$ de longitud y de 0,3 μm de diámetro. El número de flagelos periplásmicos es de 14-18 (media 16) por célula insertados subterminalmente en los extremos de las células. El crecimiento bacteriano ocurre a 37 y 42°C pero no a 32 y 46°C. Cuando creció anaeróticamente en BHIS a 37°C los cultivos alcanzaron la fase logarítmica aproximadamente a las 31 h de inoculación y las máximas densidades de población, de aproximadamente 2×10^8 UFC / ml, a las 36-38 h después de la inoculación. En la fase log media, el tiempo de duplicación de la población es de aproximadamente 2 h. Las células crecen anaerobiamente con diseminación de las colonias y una β -hemólisis fuerte en agar tripticosa soja.

1.3.9.3. *Brachyspira hampsonii*

Una nueva especie de *Brachyspira*, ha sido designada provisionalmente como "*Brachyspira hampsonii*". Su nombre es en honor al Dr. David Hampson de la Universidad de Murdoch por su importante trabajo sobre el género *Brachyspira*. Los aislamientos, obtenidos de casos clínicos de diarreas mucohemorrágicas en EE. UU., eran diferentes de todas las *Brachyspira* spp. conocidas, en base a las secuenciaciones del gen *nox* y del ARN ribosómico 16S (rRNA), y de las pruebas bioquímicas. Se ha propuesto que esta nueva especie se compone de dos clados filogenéticos diferentes, compartiendo el 96% de identidad en la secuencia del gen NADH oxidasa (*nox*). (Chander *et al.*, 2012). Anteriormente, ya se había reportado la imposibilidad de determinar la especie a un grupo de *Brachyspira* también aisladas de casos clínicos y que presentaban una susceptibilidad menor a antibióticos de uso frecuente contra bacterias de este género (Clothier *et al.*, 2011). Como dijimos anteriormente, a partir del 2016, se reconoce a *Brachyspira hampsonii* sp. nov., como una especie única con genomas genéticamente diversos, pero fenotípicamente similares (I, II y III) (Mirajkar *et al.*, 2016).

El aislamiento de *Brachyspira* spp en aves migratorias en el Ártico Canadiense, compatibles con "*B. hampsonii*", que inoculadas en cerdos produjo eliminación, pero no enfermedad severa podría ser un factor potencial de diseminación, puesto que atraviesan por zonas productoras de cerdos de distintos países (Rubin *et al.*, 2013). Mientras que otra cepa identificada en Canadá como "*B. hampsonii*" clade I inoculada a cerdos, produjo una diarrea mucohemorrágica indistinguible de una DP producida por *B. hyodysenteriae* (Costa *et al.*, 2014). Ya se ha reportado esta nueva especie en Europa (Mahu *et al.*, 2014).

1.3.10. Factores de virulencia

El enfoque molecular de la patogénesis microbiana ha dado lugar a una impresionante cantidad de datos sobre los genes de virulencia bacteriana. Las secuencias del genoma bacteriano rápidamente añaden genes de virulencia candidatos a bases de datos electrónicas. La interpretación de esta abrumadora información es porque cada gen implicado en la patogenicidad se denomina un gen de virulencia, independientemente de su función en el complejo proceso de virulencia. En la actualidad el desafío es filtrar los genes de virulencia de genomas bacterianos, que ahora pueden ser secuenciados más rápido que el tiempo necesario para establecer el rol de un único gen en la virulencia (Wassenaar y Gaastra, 2001).

La secuencia del primer genoma representativo de una cepa de *B. hyodysenteriae* (cepa WA1 de *B. hyodysenteriae*), ha permitido ver las principales adaptaciones de la especie a su estilo de vida en el intestino grueso porcino. Los potenciales genes de virulencia en *B. hyodysenteriae* incluyen 15 proteasas implicadas en la virulencia a través de la destrucción de los tejidos del hospedador, y las proteínas de ankyrin, que se sabe que se unen a la cromatina del huésped y que desempeña un papel crítico en la interacción con las células del hospedador. Otras adaptaciones al medio entérico incluyeron la presencia de numerosos (84) genes asociados con la quimiotaxis y la motilidad (Bellgard *et al.*, 2009).

La motilidad ayudada por la quimiotaxis puede ser en sí misma un factor de virulencia de las espiroquetas. El movimiento en forma de “sacacorcho” permite que funcione mejor en medios viscosos y la motilidad mostrada por las espiroquetas es probable que sea dirigida por quimiotaxis para un sustrato específico. Se han visto diferencias si *B. hyodysenteriae* se encuentra en materia fecal, en cultivo de agar o en caldo. La motilidad se debe a los flagelos periplásmicos que se insertan en la parte terminal de la célula y se superponen en la parte media del cilindro protoplásmico. Distintos números (5-6) y tamaños (29-44 kDa) de proteínas forman los flagelos periplásmicos, una o dos proteínas componen la vaina flagelar y de 3 a 5 el núcleo, según distintos autores. El gen *flaA* codifica una proteína de la vaina de 44 kDa, el gen *flaB1* codifica una proteína de 32 kDa al igual que el gen *flaB2*, ambas forman parte del núcleo del flagelo periplásmico (Joens, 1997). La adherencia de *B. hyodysenteriae* a las criptas y al lumen del intestino se produce de manera aleatoria a diferencia de otras espiroquetas intestinales que pueblan la superficie de la mucosa unida por un extremo (Joens, 1997; Jensen *et al.*, 2000). Primero se encuentran en el lumen y luego tapizan las criptas, dentro de los 3 días posinfección. En *B. innocens*, considerada como no patógena, tal vez la falta de adhesión y subsiguiente colonización expliquen la avirulencia, o la incapacidad para producir la enfermedad (Joens, 1997).

Bellgard *et al.* (2009) identificaron siete genes potenciales de producción de hemolisina. La hemolisina es considerada como el mayor factor de virulencia de *B. hyodysenteriae*, la aparición de hemólisis en agar sangre se manifiesta como β hemolítica fuerte naturalmente. Esta expresión permite diferenciarla de otras especies de *Brachyspira* que son β hemolíticas débiles. El peso molecular de la hemolisina tiene discrepancias, ha sido reportado como de 19 kDa y en otros trabajos de 68-74 kDa, quizás debido al estado original de la toxina, al método de separación utilizado para purificar la toxina o a la posibilidad que hay más de una hemolisina. Los datos de la secuencia del gen *thyA* demostraron un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 26-27 kDa, cuyo

producto génico fue lítico para eritrocitos y citotóxico. Para determinar la patogenicidad de este gen se realizó un mutante, donde se reemplazó la hemolisina, la cepa mutante mostró una disminución de la zona hemolítica alrededor de colonias sobre placas de agar sangre. Cuando fueron inoculadas en cerdos no produjeron lesiones, pero sí se eliminaron por varios días (Joens, 1997). El trabajo de Barth *et al.*, en el 2012, se observó que en ninguno de los aislamientos de *Brachyspira* spp. débilmente hemolíticos fue positivo para la presencia del gen *tlyA*. En otro estudio reciente, se inocularon cerdos con cepas fuerte y débilmente β hemolíticas y los resultados revelaron que los aislados fuertemente β hemolíticos indujeron una tiflocolitis significativamente mayor que las otras, independientemente de la identificación genética del aislamiento (Burrough *et al.*, 2012a), mientras que diarreas mucohemorrágicas fueron producidas por una cepa de moderada hemólisis de *B. hyodysenteriae* (Mahu *et al.*, 2016). El gen *hlyA* es supuestamente responsable de la fuerte β hemólisis en *B. hyodysenteriae* (Hsu *et al.*, 2001), luego que la hemolisina fuera purificada y clonada en una *E. coli* no hemolítica, aunque fue esporádicamente encontrado en aislamientos débilmente hemolíticos como *B. pilosicoli* y otras *Brachyspira* spp débilmente hemolíticas (Barth *et al.*, 2012). Los genes que flanquean *hlyA* pueden afectar la composición química del lípido unido a la proteína *hlyA* de *B. pilosicoli* y resulta en una actividad hemolítica reducida (Zuerner *et al.*, 2004). En la comparación genómica de 20 cepas de *B. hyodysenteriae*, un subconjunto de cuatro cepas australianas, presentaron un 100% de conservación de algunos genes de hemolisinas. Además, todas las cepas contenían genes únicos y tenían variación en el contenido de la secuencia génica en varios genes importantes implicados en la virulencia y/o en la patogénesis que podrían conferir diferencias fenotípicas (Black *et al.*, 2015).

Otros autores también han identificado varios factores de estilo de vida de virulencia (por ejemplo, proteínas de membrana externa, NADH oxidasa, proteínas del metabolismo del hierro) con un papel predicho en la patogenicidad de *B. hyodysenteriae* (Wassenaar y Gaastra, 2001; Barth *et al.*, 2012). *Brachyspira hyodysenteriae* contiene NADH oxidasa, una enzima que reduce químicamente el oxígeno molecular a agua. Se demostró que cuando el gen *nox* fue mutado por genes resistentes a antibióticos y se inocularon en cerdos, las células de los mutantes fueron más sensibles a la exposición del oxígeno y en algunos animales produjo signos leves de enfermedad, por lo tanto, la NADH oxidasa sirve para proteger a las células de *B. hyodysenteriae* contra la toxicidad del oxígeno y que la enzima, en ese caso, contribuye a la patogenicidad de la espiroqueta. (Stanton *et al.*, 1999). Sobre 121 cepas de

distintas especies de *Brachyspira* se encontró el gen *nox* en todas las muestras (Barth *et al.*, 2012).

Otro factor asociado a la patogenicidad de *B. hyodysenteriae* es el LPS que forma parte de la pared celular de la espiroqueta y contribuye a la seroespecificidad (Joens, 1997).

Varias proteínas de membrana externa se habían identificado hasta el año 2001, SmpA (16kDa), Vsp family (39kDa), BmpB (30 kDa), entre otras (Trott *et al.*, 2001). Una lipoproteína de membrana externa de 29.7 kDa, llamada Bhlp29.7 (antes BmpB), esta codificada por el gen *bhlp*, éste estuvo presente en todas las cepas de *B. hyodysenteriae* testeadas y en una de *B. innocens*, mientras que en otras cepas de *B. innocens* y otras *Brachyspira* spp no se encontró. Esta lipoproteína se utilizó como antígeno para un ELISA que permitió identificar serológicamente granjas positivas, como complemento a otros métodos diagnósticos de DP (La, 2006). Mientras que Barth *et al.*, (2012) encontraron que el 58,1% fue positivo para Bhlp29.7. y el 97,3% poseían el gen *Bhmp39f* de aislados de campo de *B. hyodysenteriae*.

La *et al.* (2011) encontraron que la presencia del plásmido en cepas de *B. hyodysenteriae* contribuye a la virulencia. Otros genes involucrados con la virulencia también han sido estudiados, como el gen *clpX*, que codifica una proteasa localizada en la membrana interna, los genes *ftnA* y *bitC*, que codifican proteínas vinculadas con el metabolismo del hierro se detectaron principalmente en cepas de campo de *B. hyodysenteriae* (100% y 44,6%, respectivamente), pero difícilmente en las otras especies de *Brachyspira* (Barth *et al.*, 2012).

1.4. DETECCIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *BRACHYSPIRA*

Las espiroquetas fueron detectadas microscópicamente en el intestino de varias especies animales antes de ser cultivadas y caracterizadas. La primera espiroqueta capaz de crecer en cultivo puro fue la causante de la disentería porcina (Taylor y Alexander, 1971), llamada por entonces *Treponema hyodysenteriae* y luego *Serpulina hyodysenteriae* (Stanton, 1992).

Varios métodos y protocolos se han desarrollado para aislar, identificar y caracterizar la variedad de espiroquetas intestinales (EI) provenientes de diferentes hospederos (Jensen, 1997).

1.4.1. Bacterioscopía

Las EI se pueden observar mediante la tinción con distintas metodologías, entre las más comunes se encuentran la tinción de Gram, son entonces Gram negativas, una coloración más fuerte se obtiene con carbol-fucsina y una coloración aún más destacada se logra con Fontana-Tribondeau, donde sales de plata generan imágenes contundentes de las espiroquetas. Estas tinciones se pueden realizar sobre frotis de materia fecal o de cultivos de espiroquetas y luego se observan en microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x). También se pueden visualizar a través del microscopio de contraste de fases o en preparaciones frescas en el de campo oscuro.

La bacterioscopía se presenta como un recurso rápido para realizar un análisis presuntivo a partir de muestras de materia fecal o de mucosa colónica en casos clínicos de DP (Olson y Fales, 1983), pero *B. hyodysenteriae* y *B. innocens* parecieron idénticas cuando se las observó teñidas con carbol fucsina en microscopio óptico (Kinyon y Harris, 1979).

La tinción de Wartin-Starry permite visualizar las espiroquetas sobre el tejido afectado.

1.4.2. Cultivo y aislamiento

Los primeros aislamientos de EI se obtuvieron de contenido colónico filtrado sembrado en placas de agar sangre selectivo, en condiciones de anaerobiosis, a una temperatura entre 37-42°C, donde se observó una película fina después de tres o más días. Las espiroquetas no crecen a 32 o 47°C. El agregado de antibióticos al agar sangre facilitó la confirmación de los casos de DP. La espectinomina redujo el crecimiento de la mayoría de los microorganismos colónicos lo que permitió identificar las colonias β hemolíticas de *B. hyodysenteriae* y observar las espiroquetas microscópicamente levantadas de esas áreas. Esta metodología permitió también el aislamiento de otras especies de *Brachyspira* (Jensen, 1997).

Diferentes medios de cultivo sólidos permiten el aislamiento de distintas especies de *Brachyspira*. Estos medios están basados en la utilización de agar tripticasa soya o Columbia, con el agregado de sangre equina u ovina y de distintos antibióticos cuyo principal objetivo es el de inhibir otras bacterias presentes en la microbiota intestinal (Songer *et al.*, 1976). Entre los antibióticos que se utilizan, solos o en combinaciones, se encuentran la espectinomina, colistina, vancomicina, rifampicina, espiramicina, entre otros (Songer *et al.*, 1976; Kunkle y Kinyon, 1988; Calderaro *et al.*, 2001). Achacha y Messier (1992) obtuvieron muy buenos resultados utilizando estos 5 antibióticos comparados con otros 5

medios de cultivo y logrando la recuperación de *B. hyodysenteriae* en muestras de materia fecal refrigeradas hasta 10 días a 4°C. Varias cepas de *S. pilosicoli* (hoy *Brachyspira pilosicoli*) fueron moderadamente sensibles tanto a la rifampicina como a la espiramicina, así que no serían los óptimos para recuperar estas cepas por cultivo selectivo, mientras que *S. hyodysenteriae* permaneció insensible a ambos antibióticos (Trott *et al.*, 1996a). Las distintas especies de *Brachyspira* se multiplican a temperaturas entre 37-43°C, realizando la incubación a 42°C se logra disminuir de manera importante el crecimiento de microbiota intestinal indeseable en un sembrado para aislamiento de EI (Corona-Barrera *et al.*, 2004).

Un medio selectivo que había sido probado para el aislamiento de *B. pilosicoli* en humanos fue ensayado para muestras clínicas sospechosas de tener *B. hyodysenteriae*. Primero se realizó un pretratamiento en medio líquido (caldo cerebro-corazón + suero fetal bovino al 10% + espectinomicina + rifampicina) durante 15-30 min. Luego se plaqueó en el medio selectivo BAM –SR (agar base N°2 + extracto de carne + bacto peptona con el agregado de espectinomicina y rifampicina) y en la mayoría de las muestras se observó el crecimiento de espiroquetas entre los 3-5 días posteriores. Una reducción del tiempo de incubación para observar el crecimiento de espiroquetas como colonias aisladas y también del tiempo para obtener cultivos puros de los aislados se logró por el aumento en la selectividad usando el medio BAM-SR. De hecho, este medio no sólo fue selectivo, sino que también permitió el rápido crecimiento de espiroquetas debido a la presencia de extracto de carne y del 7% de sangre equina (Calderaro *et al.*, 2001). Esta misma metodología, aunque se cambió el caldo por tripticasa soya, permitió detectar *B. aalborgi* en muestras fecales y biopsias rectales de humanos a las 48 h de incubadas las placas (Calderaro *et al.*, 2003).

El cultivo a partir de materia fecal, contenido colónico y raspado de mucosa permite aislar a las EI, pero éste último fue más sensible para detectar *Brachyspira* spp que una PCR directa obtenida de la misma muestra (Burrough *et al.*, 2012a). Un estudio para identificar *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, que comparó la sensibilidad diagnóstica estimada de la PCR (IC del 95%) y del cultivo resultó en un 73,2% (62,3-82,9) y 88,6% (74,9-99,3), respectivamente, y la especificidad estimada de la PCR fue de 96,2% (90,9-99,8) (Hartnarck *et al.*, 2014).

1.4.2.1. Características de los antibióticos utilizados en los medios de cultivo

La rifampicina de acuerdo con su acción se la clasifica como bactericida, inhibe la síntesis bacteriana por formar un complejo estable con la subunidad β de la enzima RNA

polimerasa DNA dependiente de las bacterias (inhibiendo así la formación de esta), actúa sobre gérmenes Gram positivos y no contra Gram negativos o micoplasmas. Posee un amplio espectro de acción, pero es menos activa frente a los Gram negativos. Si bien tiene buena actividad frente a anaerobios, se conoce que las espiroquetas tienen una resistencia natural frente a la rifampicina (Paster y Dewhirst, 2000). La espectinomina pertenece a los aminocíclicos, son bactericidas, semejantes en propiedades y estructura a los aminoglucósidos, se ligan a receptores existentes en el ribosoma bacteriano, impidiendo la síntesis proteica, la acción bactericida es activa en medios alcalinos, actúan contra Gram negativas y *Staphylococcus* spp, tiene baja actividad frente a micoplasma y anaerobios. La colistina pertenece a las polimixinas, son bactericidas, actúan rompiendo la estructura de los fosfolípidos de la membrana celular de bacterias, con aumento de la permeabilidad, actúa prácticamente contra Gram negativas (*E. coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomona* spp). La espiramicina pertenece a los macrólidos, son bacteriostáticos, aunque en altas dosis pueden ser bactericidas, inhiben la síntesis proteica, por interferencia en la fase de translocación entre los sitios A y P de la unidad 50S del ribosoma bacteriano, es activa frente a Gram positivas. La vancomicina es bactericida, actúa principalmente contra bacterias Gram positivas, inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana, interfiere en la síntesis de RNA y daña la membrana celular bacteriana (Barcellos y Sobestiansky, 1998).

1.4.2.2. Cultivo en medio líquido

Los primeros ensayos para la multiplicación de *B. hyodysenteriae* en medios líquidos los realizaron Kinyon y Harris hacia 1974. Obtuvieron buenos resultados usando caldo tripticasa soya esterilizado anaeróticamente prerreducido, suplementado con 10% SFB y bajo distintas presiones de gases. El crecimiento se evidenció por la apariencia reluciente que presentó el medio después de agitar y observar a través de la luz luego de 24-48 h de incubación, se logró un incremento de 10 a 1000 UFC/ml de caldo.

Se utilizan distintos caldos para el crecimiento de *Brachyspira* spp en medios líquidos: cerebro-corazón, tripticasa soya, infusión cerebro-corazón, infusión corazón; con el agregado de distintos componentes que favorecen el crecimiento como suero fetal bovino, L cisteína-HCl (Stanton y Cornell, 1987) o extracto de levadura, glucosa, extracto fecal de cerdos y colesterol (Kunkle *et al.*, 1986). El caldo infusión cerebro-corazón suplementado con eritrocitos bovinos lavados, membranas de eritrocitos o colesterol, como fuentes de lípidos, fue un medio de cultivo excelente para cepas de *B. hyodysenteriae*. Trott *et al.*

(1996b) lograron duplicar en 1 a 2 horas una cepa de *B. pilosicoli* con un crecimiento máximo de 2×10^9 células/ml entre 37-42°C, utilizando caldo cerebro-corazón.

Brachyspira hyodysenteriae en caldo infusión cerebro corazón duplica la población de 3 a 4 h (Hampson *et al.*, 1997). La mezcla continua del cultivo de *B. hyodysenteriae* o el uso de recipientes que incrementen la superficie del radio del volumen del medio de cultivo son importantes para obtener una alta densidad celular (Kunkle *et al.*, 1986).

Calderaro *et al.*, en el 2005, lograron mejores resultados en el aislamiento de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* cuando realizaron un pretratamiento colocando la materia fecal en infusión cerebro-corazón con espectinomicina y rifampicina durante 30 minutos, antes del cultivo en medio agar sangre selectivo con el agregado de los mismos antibióticos. Anteriormente se habían obtenido resultados similares cuando se detectó e identificó rápidamente a *B. aalborgi* proveniente de muestras de humanos, donde el pretratamiento se realizó también en medio líquido de tripticasa soja (Calderaro *et al.*, 2003).

Con el objetivo de mejorar la detección de *B. hyodysenteriae* de casos subclínicos, donde puede estar presente en bajo número, se probaron distintos caldos como medios de transporte y distintos agares selectivos, en ambos casos con diferentes combinaciones de antibióticos, los resultados mostraron que los medios de transporte fueron ineficaces para ayudar a mejorar el aislamiento después de 24 h a 4°C (Bishop *et al.*, 2013).

1.4.2.3. Cultivo en medio sólido

Brachyspira hyodysenteriae crece en medios sólidos, formando colonias visibles luego de 48-96 h de incubación a 38°C, aunque también crece bien entre 37-42°C, siempre en anaerobiosis. En placas de agar sangre luego de 72 h de incubación se observan colonias planas y translúcidas de 5-8 mm de diámetro (Hampson *et al.*, 1997) es característico observar una delgada película o pátina en las zonas de hemólisis con crecimiento de espiroquetas (Jensen, 1997).

Brachyspira pilosicoli crece después de 3-5 días en agar tripticasa soja con sangre, forma una capa delgada (pátina) superficial que se extiende rodeada por una zona de débil β hemólisis. La recuperación de *B. pilosicoli* se puede mejorar si se realiza un corte en el agar antes de la inoculación (Hampson, 2012).

El cultivo ha permitido detectar nuevas especies, que dieron negativas a un D-PCR de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, ante la sospecha del agente de la DP (Råsbäk *et al.*, 2006).

1.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *BRACHYSPIRA*

1.5.1. Identificación fenotípica

Varias características fenotípicas son útiles para identificar las especies conocidas de *Brachyspira*. La hemólisis y las reacciones bioquímicas como la producción de indol, la hidrólisis del hipurato, la actividad α -galactosidasa y las actividades α y β -glucosidasa permiten diferenciar las especies de *Brachyspira*.

1.5.1.1. Hemólisis

El crecimiento de EI en placas de agar sangre permite observar zonas con fuerte o débil β hemólisis, en el cual los glóbulos rojos se lisan completa o parcial, respectivamente, sobre las áreas de crecimiento. Esta caracterización puede ser subjetiva, se ve influida por el origen de la sangre utilizada (ovina, equina, bovina) o los cambios en el medio básico utilizado (agar) que pueden afectar la determinación de la actividad hemolítica (Jensen, 1997).

Parecería que las características fenotípicas serían un indicativo más sensible al momento de determinar la virulencia de algunas cepas, ya que se encontró en *Brachyspira* spp no identificadas y *B. intermedia*, ambas con fuerte hemólisis, que indujeron una fuerte tiflocolitis en animales descargados con estas cepas (Burrough *et al.*, 2012a). Incluso estas cepas fuertemente β hemolíticas fueron inoculadas en ratones y produjeron lesiones en ciego indistinguibles de las producidas por *B. hyodysenteriae* (Burrough *et al.*, 2012b).

1.5.1.2. Pruebas bioquímicas

En 1995 Fellström y Gunnarsson, proponen agrupar distintos aislados de *Brachyspira* en 4 grupos (I-IV), de acuerdo con la caracterización por β hemólisis, producción de indol, hidrólisis de hipurato y la actividad α -galactosidasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa, con tres subgrupos en el grupo III (Tabla 1.1). Todos los aislados de los grupos I, II y III presentaron actividad β -glucosidasa y ninguno en la hidrólisis del hipurato. El grupo I incluyó la cepa de *B. hyodysenteriae*. El grupo II se diferenció de grupo I sólo por su débil β hemólisis. Las EI del grupo IIIa (subgrupo a) dieron débil β -hemólisis, reacción negativa de indol y sin actividad α -galactosidasa y α -glucosidasa. El grupo IIIb difiere del grupo IIIa por poseer actividad α -galactosidasa y el grupo IIIc las cepas dieron la misma hemólisis y reacción ante el indol que las anteriores, pero tuvieron actividad α -galactosidasa y α -glucosidasa, en este grupo se incluyó la cepa de *B. innocens*. El grupo IV incluyó una cepa patógena débilmente hemolítica, identificada más tarde como *B. pilosicoli* (Trott *et al.*,

1996b). Las espiroquetas del grupo IV se caracterizaron por su capacidad para hidrolizar el hipurato y por su falta de actividad β -glucosidasa.

Tabla 1.1: Diferenciación de cepas de *Brachyspira* spp y grupos según la especie.

Especie	Grupo	Test					
		Hemólisis	Indol	α -galactosidasa	α -glucosidasa	β -glucosidasa	Hipurato
<i>B. hyodysenteriae</i>	I	Fuerte	+ ^a	-	+/-	+	-
<i>B. intermedia</i>	II	Débil	+	-	+	+	-
<i>B. murdochii</i>	III	Débil	-	-	-	+	-
<i>B. innocens</i>	IIIb	Débil	-	+	-	+	-
	IIIc	Débil	-	+	+	+	-
<i>B. pilosicoli</i>	IV	Débil	-	+/-	-	-	+

(según Hommez *et al.*, 1998, basado en Fellström y Gunnarsson, 1995)

^a en ciertas regiones puede ocurrir *B. hyodysenteriae* indol negativa.

La clasificación bioquímica propuesta por Fellström y Gunnarsson (1995) fue respaldada por el estudio filogenético basado en la secuenciación del gen 16S rRNA (Fellström *et al.*, 1995, 1997). Oros estudios también la respaldaron y encontraron cepas de *B. hyodysenteriae* negativas a la reacción de indol (Hommez *et al.*, 1998).

Varias investigaciones manifiestan la simultaneidad de especies de *Brachyspira* en una granja, algunas identificadas en una misma muestra fecal (Rohde *et al.*, 2002; La *et al.*, 2003, Råsbäk *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010, Clothier *et al.*, 2011). La prueba del hipurato en combinación con la prueba de la actividad β -glucosidasa puede ser una forma de detectar cultivos mixtos en muestras en las que espiroquetas de grupo IV (*B. pilosicoli*) están presentes, porque los miembros de este grupo carecen de actividad β -glucosidasa (Fellström y Gunnarsson, 1995). El desarrollo de una PCR basada en el gen 16S rRNA confirmó la utilización de estas dos reacciones para identificar a *B. pilosicoli* (Fellström *et al.*, 1997). Pero se han reportado cepas negativas al hipurato, que no tiene relación con el genotipo, incluso dentro de un mismo clon puede haber cepas positivas y negativas a la hidrólisis, esto replantea el resultado del fenotipo para *B. pilosicoli* y podría utilizarse el método de la D-ribosa en su lugar (Fossi y Skrzypczak, 2006).

Algunas cepas de *B. hyodysenteriae* negativas al indol se han reportado en Bélgica, Alemania, Canadá y España (Hommez *et al.*, 1998; Fellström *et al.*, 1999; Hidalgo *et al.*, 2010).

1.5.2. Identificación por pruebas moleculares

Numerosos métodos se han desarrollado basados en ADN para el análisis de las especies de *Brachyspira*, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación de regiones anónimas de ADN mediante cebadores arbitrarios (RAPD), el análisis de ADN mediante endonucleasas de restricción (REA), el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la electroforesis en campo pulsante (PFGE), las sondas de ADN, la homología ADN-ADN, la tipificación mediante la secuenciación de multilocus (MLST), el ribotipado y la secuenciación génica.

Distintos PCR se han desarrollado para detectar e identificar bacterias patógenas, mediante la amplificación de secuencias microbianas específicas de género y de especie. En el género *Brachyspira* la identificación de las especies puede ser a partir de la materia fecal (Råsbäk *et al.*, 2006) o del aislamiento (Rohde *et al.*, 2002; Rohde y Habighorst-Blome, 2012) y a través de la amplificación de distintos genes como el *nox*, el *tlyA*, y el 16S rRNA, así como 23S rRNA. Así, hay PCR específica de especie para *B. hyodysenteriae* (Athey *et al.*, 1999), *B. pilosicoli* (Fellström *et al.*, 1997) y *B. intermedia* (Phillips *et al.*, 2010).

La identificación de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* por una dúplex-PCR (D-PCR) dio resultados comparables con la realización de cultivo y luego una PCR individual del cultivo primario, pero la D-PCR realizada sobre el ADN extraído de la materia fecal, fue capaz de detectar mayor número de cepas, incluso en muestras mixtas, a pocas horas del arribo de la muestra al laboratorio (La *et al.*, 2003). Aunque un trabajo presentado al poco tiempo mostró resultados contradictorios, cuando sobre una D-PCR utilizando genes y cebadores diferentes, encontró que para identificar estas especies patógenas el cultivo seguido de pruebas bioquímicas resultó más sensible para detectar *B. hyodysenteriae* (Råsbäk *et al.*, 2006). Recientemente una nueva Multiplex qPCR dirigida a una región de 128 pb del gen 23S rDNA permitió la detección sensible simultánea de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* y de tres especies apatógenas de *Brachyspira* spp en hisopados fecales (Borgström *et al.*, 2017).

En la técnica de PCR-RFLP la secuencia de ADN de interés es amplificada por PCR y el producto se somete a digestión con enzimas de restricción, se generan fragmentos que se separan según su tamaño, y se visualizan por electroforesis en gel de agarosa. Stanton *et al.* (1997), utilizando las enzimas *HinfI*, *TaqI*, *Sau3A* y *MboII* sobre un amplicón de 558 pb de ADN ribosómico (rDNA) que codifica 16S rRNA, diferenciaron a *S. murdochii* y *S. innocens* de las otras especies con la enzima de restricción *HinfI*. Mientras que las restricciones de *Sau3A* y *TaqI* diferenciaron fragmentos de *S. murdochii* y *S. pilosicoli*,

respectivamente. Pero la PCR-RFLP que utiliza el gen *nox* permitió diferenciar las 5 especies de *Brachyspira* que afectan a los cerdos con solo dos endonucleasas de restricción (*B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. murdochii*, *B. innocens*, *B. intermedia*) (Rohde *et al.*, (2002).

Tabla 1.2: Tamaño de los fragmentos predichos después de la digestión del producto de PCR *nox* específico con *DpnII* y *BfmI* para las cinco *Brachyspira* spp porcinas, tomado de Rohde *et al.*, 2002.

Especie	Fragmento (pb) de restricción predicho obtenido con	
	<i>DpnII</i>	<i>BfmI</i>
<i>B. hyodysneteriae</i>	684, 209, 24	741, 197
<i>B. pilosicoli</i>	896, 24	741, 197
<i>B. intermedia</i>	684, 209, 24	504, 238, 197
<i>B. innocens</i>	684, 209, 24	504, 210, 197, 25
<i>B. murdochii</i>	684, 157, 24	504, 210, 197, 25

*Los valores en negrita son fragmentos no visualizados en los geles con bromuro de etidio

Una actualización sobre la PCR-RFLP, realizada en el 2012, utilizando otras enzimas permitiría reconocer a “*B. suanatina*”, aunque nuevos patrones de digestión se observaron sobre *B. intermedia*, *B. innocens* y *B. murdochii*, lo que podría indicar cierto grado de inestabilidad genética (Rhode y Habighorst-Blome, 2012).

También los genes asociados con la virulencia podrían resultar interesantes para la detección y caracterización de *Brachyspira*. Estos genes incluyen los factores de virulencia verdadera (por ejemplo, toxinas como las hemolisinas), asociados a virulencia (por ejemplo, reguladores de virulencia), y de virulencia al estilo de vida (por ejemplo, proteínas de membrana externa, NADH oxidasa, proteínas del metabolismo del hierro) (Wassenaar y Gaastra, 2001).

Los estudios de homología ADN-ADN son complejos y laboriosos, por lo que pocos aislados de *Brachyspira* spp han sido analizados por esta técnica, por ejemplo *B. pilosicoli* se confirmó su taxonomía cuando se comparó a *B. hyodysenteriae* y *B. innocens* (Trott *et al.*, 1996a).

La aplicación de una hibridación *in situ* fluorescente sobre muestras fecales fijadas en formol permitió identificar a *B. hyodysenteriae* y “*B. hampsonii*” en muestras clínicas (Wilberts *et al.*, 2015).

Basado en una secuenciación parcial del gen que codifica para la enzima NADH oxidasa (*nox*), elegida por estar en todas las cepas del género *Serpulina* y ser relativamente conservada en las distintas especies, se compararon las secuencias de distintas especies y se diferenciaron distintas cepas de *S. hyodysenteriae*, *S. pilosicoli*, *S. intermedia*, *S. murdochii*, *S. innocens*, *S. alvinipulli* y *B. aalborgi*. También desarrollaron una PCR basada en el alineamiento de la secuenciación del gen *nox* que realizaron para diferenciar por secuenciación distintas especies de *Serpulina*. Hasta 1999 ninguna PCR identificaba las especies consideradas como no patógenas, *B. murdochii* y *B. innocens* (Atyeo *et al.*, 1999).

1.5.3. Serología

Como método indirecto para verificar la exposición a *Brachyspira* spp. se puede medir el título de anticuerpos (Ac) en el suero de animales infectados.

Varias técnicas serológicas están descritas para la detección de Ac contra *Brachyspira* spp., las que en general utilizan proteínas de células completas o LPS como antígeno, con la limitante de ser útiles para detectar la infección a nivel de granja, pero no son eficaces para la individualización y seguimiento de cerdos infectados. Entre las técnicas descritas que utilizan estos antígenos se encuentran el *test* indirecto de Ac fluorescentes, la hemoaglutinación, la aglutinación de microtitulación, la fijación de complemento y la ELISA (La y Hampson, 2001; La *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2012). Además, pueden dar reacciones cruzadas con otras especies de *Brachyspira*. Sin embargo, actualmente no se dispone de *test* comerciales para medir Ac en suero específicos (Hampson, 2012).

El *test* de aglutinación de microtitulación fue desarrollado por Joens *et al.* en 1978, para detectar Ac séricos contra antígenos de superficie de *B. hyodysenteriae*, mostrando alta sensibilidad y repetibilidad, aunque se encontraron títulos de Ac de reacción cruzada contra *B. innocens*. Diarra *et al.* (1995) compararon el *test* de microaglutinación (MAT), el *test* de hemólisis pasiva y el *test* de aglutinación indirecta para detectar Ac contra *B. hyodysenteriae* en suero porcino, y sólo la MAT fue capaz de detectar los Ac en cerdos enfermos. Además, el uso del antígeno hervido mejoró el diagnóstico de DP y redujo las reacciones cruzadas con *B. innocens*. Sin embargo, esta técnica es compleja para utilizarse como prueba diagnóstica de rutina, debido a lo dificultoso de la obtención del antígeno y a la variación de resultados entre cepas. La ELISA basada en LPS requiere conocer los serotipos presentes

en la granja para ser probados de modo que los LOS sean los antígenos adecuados para el revestimiento de la placa. Estudios recientes por serotipeado confirman un alto grado de heterogeneidad serológica en aislados de *B. hyodysenteriae* provenientes de distintos países (Herbst *et al.*, 2017).

Proteínas de membrana externa como la Bhlp29.7, como antígeno para un ELISA no tuvo un mejor desempeño para monitorear la dinámica de granjas infectadas con *B. hyodysenteriae* en comparación al ELISA con la célula completa (Song *et al.*, 2012).

Un relevamiento serológico sobre 30 granjas de Australia permitió identificar a 14 granjas positivas que no tenían antecedentes de *B. hyodysenteriae*, algunas de ellas catalogadas como de alta salud. Se utilizó un ELISA comercial, cuyo antígeno unido a la placa es una proteína recombinante (H114), ante la posibilidad de que fueran granjas “falsas positivas” se realizó un muestreo para cultivo y PCR, resultando en seis granjas positivas (Hampson *et al.*, 2016).

1.6. TIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *BRACHYSPIRA* SPP.

La ampliación por PCR de secuencias específicas están disponibles para detectar a *B. hyodysenteriae*, los fragmentos más usados pertenecen al gen 23S rRNA, al gen *nox* y al *tlyA*. También, hay técnicas moleculares como la Dúplex PCR que permiten identificar el género y la especie a partir de materia fecal y discriminan *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* (La *et al.*, 2003; Råsbäk *et al.*, 2006), o PCR-RFLP que amplifica el gen *nox* y utiliza dos enzimas que permiten distinguir entre *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. murdochii* y *B. innocens* (Rohde *et al.*, 2002).

La PCR dirigida hacia distintos genes como el 16S rRNA (Fellström *et al.* 1997), 23S rRNA (Leser *et al.*, 1997), o el *nox* (Atyeo *et al.*, 1999) cada día adquiere mayor utilización para detectar *B. pilosicoli*. Otras modalidades de PCR son aquellos Dúplex y Multiplex PCR que permiten detectar varios patógenos entéricos (La *et al.*, 2003; Råsbäk *et al.*, 2006). Los ensayos de PCR en tiempo real que permiten la cuantificación (qPCR) de las espiroquetas también están disponibles, un múltiplex qPCR, detecta la presencia de *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* y *B. intermedia* proporcionando un umbral de detección mejorado (10^2 a 10^3 células/0.2 g de heces) en comparación con las PCR estándar (Song y Hampson, 2009).

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es una herramienta muy útil para el estudio epidemiológico de la DP. Un estudio se realizó comparando distintas cepas de *B. hyodysenteriae* provenientes de Bélgica, Alemania y Suecia. Se obtuvo un alto poder discriminatorio por PFGE con el uso de dos enzimas, *MluI* y *SmaI*, que podría superar a la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE, *multilocus enzyme electrophoresis* por sus siglas en inglés), para la tipificación de *B. hyodysenteriae* (Fellström *et al.*, 1999).

El uso de la MLST (*multilocus sequence typing* por sus siglas en inglés) ha demostrado ser útil para estudios epidemiológicos moleculares, además de permitir la identificación y diferenciación de especies de *Brachyspira* (Råsbäk *et al.*, 2007) y un alto poder discriminatorio, ya que esta metodología evidencia la transmisión de cepas entre granjas como así también, de pequeños cambios entre cepas de la misma especie (*B. hyodysenteriae*) en granjas individuales. A través del análisis de 7 loci conservados, los genes *adh*, *pgm*, *est*, *glp*, *gdh*, *thi* y *alp* para el examen de gran número de cepas de diferentes orígenes geográficos, permite descubrir la diversidad y orígenes de esta especie patógena (La *et al.*, 2009). Así lo demuestra recientemente el trabajo realizado sobre 20 cepas de *B. hyodysenteriae* por Black *et al.* (2015), donde hubo dos grandes grupos en el árbol filogenético y, comparando las múltiples secuencias de alineación del genoma de la WA1 con las 19 cepas de distintos países, mostraron que la principal diferencia entre los grupos fueron las múltiples variaciones en el gen *thi*. También se realizó un estudio sobre cepas nuevas comparadas a cepas de décadas pasadas de Australia, que demostró que hubo una aparente evolución de las cepas durante este período. Se confirmó la transferencia de aislados que estaban presentes en una granja de reproductores y en otras granjas que recibieron cerdos de ella y una significativa presencia de múltiples cepas diferentes en algunas piaras, que rara vez ha sido reportado previamente (La *et al.*, 2016a).

Todos estos estudios confirman lo planteado por Hampson y Ahmed (2009) que a partir del conocimiento del primer genoma de *B. hyodysenteriae*, será posible para la comunidad científica embarcarse en la secuenciación de muchas especies diferentes derivadas de aislados de *Brachyspira* spp. Esto no será una tarea difícil dado que las nuevas plataformas de secuenciación han reducido el tiempo considerablemente y el costo de la secuenciación del genoma completo. Usando la genómica comparativa, será posible medir el alcance de la diversidad genómica en el género *Brachyspira* y las fuerzas que regulan dicha diversidad durante su colonización en el intestino y de varios nichos de éste.

1.7. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *BRACHYSPIRA* SPP

La DP, producida por *B. hyodysenteriae*, y la espiroquetosis intestinal porcina, producida por *B. pilosicoli*, han dejado de considerarse las únicas especies patógenas. Varios trabajos involucran a las otras especies débilmente hemolíticas (*B. intermedia*, *B. innocens* y *B. murdochii*) y a las nuevas fuertemente hemolíticas ("*B. suanatina*" y "*B. hampsonii*"), destacándose cada vez más el concepto de colitis brachyspiral (Hampson, 2012; Hammer y Gebhart, 2013). El reconocimiento de nuevas cepas, cambios en la susceptibilidad antimicrobiana, cambios en la virulencia de cepas de *B. hyodysenteriae*, entre otras causas demuestran la creciente complejidad en torno al género *Brachyspira* y de la necesidad de mantener una vigilancia (Hampson *et al.*, 2015).

1.7.1. Disentería porcina

La DP se registró por primera vez en el medio oeste de EE. UU., hacia el año 1920, pero el agente etiológico se descubrió 50 años después. La DP afecta principalmente a cerdos en desarrollo y terminación en los que se manifiesta con una colitis mucohemorrágica aguda y severa. Pero se puede presentar como una enfermedad leve y/o sin signología clínica en algunas piaras, en particular cuando se utilizan antibióticos regularmente.

La DP tiene una distribución mundial y es endémica en muchos países donde puede causar importantes pérdidas a través de una desigual y disminuida tasa de crecimiento, mortalidad, costos de tratamiento y dificultad para el comercio. A principios de los años setenta, se determinó que el agente etiológico era una espiroqueta fuertemente hemolítica llamada *Treponema hyodysenteriae*, luego el agente se reclasificó en distintos géneros: *Serpula hyodysenteriae* (Stanton *et al.*, 1991), *Serpulina hyodysenteriae* (Stanton, 1992) hasta la transferencia al género *Brachyspira* (Ochiai *et al.*, 1997).

La identificación reciente de *B. suanatina* y *B. hampsonii*, ambas fuertemente β hemolíticas, en cerdos con colitis mucohemorrágica y la reproducción experimental de una enfermedad similar a la DP luego de la infección con alguno de estos agentes, sugiere que la definición de DP debe ampliarse para abarcar a cerdos con signos clínicos y lesiones características junto con el aislamiento de cualquier *Brachyspira* spp fuertemente β hemolítica de tejidos o heces (Burrough, 2017).

Cuando la DP aparece por primera vez en una granja se presenta de forma severa con una tasa de mortalidad cercana al 50%, a menos que se realicen tratamientos inmediatos con antibióticos. Cuando la infección es endémica hay pocas presentaciones en reproductores y

lechones lactantes y los casos clínicos se observan en animales en desarrollo y en menor grado en lechones destetados. La prevalencia intrgranja es variable porque depende de diversos factores, en particular por las medidas profilácticas de la granja. Distintos estudios de granjas infectadas han determinado valores entre 0 y 27% de prevalencia (Hampson *et al.*, 1997).

La transmisión se produce por ingestión de heces infectadas y se mantiene endémica en granjas especialmente de un solo sitio, con flujo continuo de animales y con escasas medidas de bioseguridad (Hampson, 2012). La composición de la dieta también tendría importancia en la presentación de DP. Así lo demostró Jacobson *et al.*, (2004a) en cerdos en desarrollo, que fueron alimentados con grandes cantidades de harina de soja y que se mantuvieron agrupados en corrales. Hay factores estresantes que predisponen a mayor severidad de la enfermedad, como las bajas temperaturas, la densidad animal, el transporte y la introducción y mezcla de nuevos animales a la piara (Hampson *et al.*, 1997).

Los animales ingieren las heces que contienen *B. hyodysenteriae* y éstas sobreviven al ambiente ácido del estómago presumiblemente protegidas en mucus. Cuando llegan al intestino grueso comienzan con la colonización ayudadas por factores ambientales como la dieta y la microbiota residente (Hampson *et al.*, 1997). En un estudio realizado con inoculación orogástrica de *B. hyodysenteriae* se observó que colonizó dos sitios preferentemente: las criptas de Lieberkühn llenas de moco y el moco que cubría el epitelio. Además, no se encontró evidencia de adhesión específica o no al epitelio propiamente dicho, lo que sugiere que la penetración o atrapamiento en el moco puede ser el mecanismo predominante de asociación de la mucosa por *B. hyodysenteriae*. También, se observó que *B. hyodysenteriae* era altamente móvil en el moco intestinal, moviéndose más rápido que cualquier otro organismo presente, y esta motilidad de "alta velocidad" parece facilitar la penetración en la mucosa. El patrón de motilidad observado también es altamente sugestivo de quimiotaxis. Por lo tanto, se sugiere que la motilidad y la quimiotaxis son mecanismos importantes en la asociación y colonización de la mucosa intestinal porcina por *B. hyodysenteriae* (Kennedy *et al.*, 1988). Es posible que la colonización de la capa de mucus del intestino por *B. hyodysenteriae* sea tal vez una respuesta quimiotáctica para obtener nutrientes atrapados o constitutivos del mucus (Joens, 1997). Los cerdos infectados muestran un cambio en su flora colónica, los cerdos sanos tienen principalmente bacterias Gram positivas no móviles, y pasan a una composición predominante de Gram negativas. Las espiroquetas se adhieren y al entrar en las células epiteliales injuriadas, hay pérdida de la cohesión entre las células del epitelio colónico, especialmente en las criptas. La necrosis y

la descamación del epitelio expone a los vasos sanguíneos pequeños con la consecuente hemorragia, y también exponiendo a la mucosa a la invasión de otros microorganismos como el *Balantidium coli* (Hampson *et al.*, 1997).

En condiciones experimentales, las espiroquetas aparecen en las heces de 1-4 días antes de que comience la diarrea (Kinyon *et al.*, 1977). En un estudio de inoculación experimental de *B. hyodysenteriae*, en animales de 6 semanas de edad, a los 2 días comenzaron a eliminar por heces y la aparición de diarrea mucosa se produjo entre 5 a 10 días posinoculación (Jacobson *et al.*, 2004a).

La diarrea se caracteriza por heces blandas, de color amarillo a grisáceo, puede haber anorexia y aumento de la temperatura rectal (40-40,5°C). Un par de horas o días después de la infección, se observan grandes cantidades de moco y manchas de sangre en las heces. Este cuadro progresa a heces acuosas que contienen sangre, moco y exudado mucofibrinoso blanco, que mancha el periné. La diarrea conduce a la deshidratación y los animales se vuelven débiles y emaciados (Hampson, 2012). Las lesiones histopatológicas muestran un aumento de la permeabilidad mucosal, sin embargo, se ha demostrado que hay una alteración en el transporte de Na y Cl del lumen a la sangre, indicando que la diarrea se debe a una mala absorción colónica (Joens, 1997).

Cuando la DP se presenta en forma aguda se puede observar hiperemia y edema de las paredes del intestino grueso y mesenterio. Los ganglios linfáticos mesentéricos suelen estar aumentados de tamaño. La mucosa inflamada tiene pérdida de la rugosidad característica, está cubierta de moco y fibrina con manchas de sangre. El contenido de colon es blando a acuoso con exudados. A medida que progresa el cuadro, se puede disminuir el edema y las lesiones en mucosa son más severas, con aumento del exudado de fibrina y la formación de gruesas pseudomembranas mucofibrinosas que contienen sangre (Hampson, 2012).

Las lesiones microscópicas se observan en ciego, colon y recto. En cuadros agudos se caracterizan por una mucosa y submucosa engrosada por la congestión y salida de fluidos y leucocitos. Hay hiperplasia de células caliciformes y las espiroquetas se pueden observar dentro de ellas en las criptas del colon y penetrando en el espacio intercelular en el epitelio. Hay pérdida de cohesión entre los enterocitos del colon con necrosis y desprendimiento del epitelio. Las espiroquetas pueden encontrarse en el lumen y en el interior de las células epiteliales alteradas. También se encuentran en la lámina propia, particularmente alrededor de los vasos sanguíneos. El sangrado puede ocurrir en pequeños vasos cercanos al tejido epitelial erosionado (Hampson, 2012).

Los animales que mueren presentan emaciación, deshidratación, pelo hirsuto y el periné manchado. La lesión característica es una enteritis mucohemorrágica difusa que sólo afecta al intestino grueso (Hampson, 2012).

El diagnóstico de la DP se puede hacer por microbiología, el envío de contenido colónico de animales sintomáticos es una excelente muestra, pero también la materia fecal permite lograr el aislamiento. Si la enfermedad se presenta en forma leve o subclínica puede ser necesario tomar muestras a un mayor número de animales. Un frotis de mucosa colónica o materia fecal permite visualizar las espiroquetas, pero no diferencia entre especies de *Brachyspira*, la bacterioscopia se presenta como un recurso rápido para realizar en casos clínicos de sospecha de DP (Olson y Fales, 1983).

El diagnóstico de certeza se logra identificando a la especie de *Brachyspira* fuertemente hemolítica presente en el tejido colónico o en las heces. El aislamiento del microorganismo en medios selectivos en anaerobiosis y el análisis de las características fenotípicas permite identificar el agente. Burrough (2017) expresa que hasta que haya disponible una técnica molecular unificada que pueda identificar genes únicos de virulencia u otros objetivos genéticos específicos presentes en espiroquetas asociadas a DP, el cultivo selectivo en anaerobiosis debería formar parte integral para la detección de *Brachyspira* spp y para el diagnóstico de DP. Varios trabajos informan sobre el aislamiento de cultivos mixtos, es decir la presencia de más de una especie de *Brachyspira* en la misma muestra (Rohde *et al.*, 2002). Hidalgo *et al.* (2010) sobre 74 aislados que creían que todos eran *B. hyodysenteriae* consideran la importancia de las pruebas bioquímicas junto a las técnicas de PCR para el diagnóstico de rutina, porque encontraron entre ellos *B. innocens* y *B. murdochii*.

1.7.1.1. Control de la disentería porcina

Para controlar la DP en granjas infectadas se utilizan antimicrobianos, generalmente ingeridos junto al alimento. Diversos antibióticos se han utilizado con éxito como la tiamulina, carbadox, lincomicina, dimetridazole, tilosina, eritromicina y clindamicina (Fellström *et al.*, 1999) pero la resistencia a algunas de estas drogas cada vez es más común (Hampson *et al.*, 1997), como el estudio publicado por Hidalgo *et al.*, 2009, donde varias cepas de *B. hyodysenteriae* presentaron resistencia a la tiamulina.

La utilización de antibióticos en la ración es una práctica común en la mayoría de las granjas porcinas tanto para control de patógenos como también como promotores de

crecimiento. Barcellos *et al.* (2003) encontraron mayor prevalencia de EI en granjas que no medicaban a los animales en desarrollo.

Debido a las grandes pérdidas económicas que produce la DP hay que evitar que ingrese el agente en granjas no infectadas. La entrada de animales portadores, para reproductores o para engorde es la fuente de infección más común, se recomienda mantenerlos al menos durante 4 semanas en cuarentena en lugares separados al resto de la piara (Hampson *et al.*, 1997).

El control de la DP a través de la vacunación es una práctica poco común. La disponibilidad de la secuencia del genoma para *B. hyodysenteriae* permitirá el desarrollo de vacunas a subunidades proteicas (Hampson y Ahmed, 2009), aunque hasta el momento no hay vacunas comerciales. Entre los últimos ensayos realizados se utilizaron cepas avirulentas de *B. hyodysenteriae* débilmente hemolíticas que disminuyeron la diseminación de la DP y mejoraron el score fecal en animales inmunizados y luego desafiados con cepas virulentas (Mahu *et al.*, 2017b).

La eliminación de la *B. hyodysenteriae* podría lograrse utilizando niveles terapéuticos de antibióticos en todos los animales de la granja, pero se debe tener en cuenta los reservorios, como los desechos de los efluentes y los roedores que pueden estar infectados. La erradicación por despoblación puede ser exitosa si se realiza un vacío sanitario de hasta ocho semanas con limpieza y desinfección de las instalaciones y la repoblación se realiza con animales provenientes de granjas de alta salud (Hampson *et al.*, 1997). Aunque, se han encontrado piaras aparentemente sanas, incluso granjas de alto nivel de salud, que están colonizadas por *B. hyodysenteriae* y este hecho tiene alcances importantes para el control de DP (Hampson *et al.*, 2016).

1.7.2. Espiroquetosis intestinal porcina

La espiroquetosis intestinal porcina (EIP) es la enfermedad producida por *B. pilosicoli* (Hampson y Trott, 1995). Se caracteriza por la presencia de gran número de espiroquetas unidas en su parte terminal a la membrana celular del epitelio luminal (Sellwood y Bland, 1997). En 1980 fue descrita por primera vez luego de la inoculación de cerdos con cepas débilmente β hemolíticas, que desarrollaron una diarrea mucosa con manchas de sangre y presentaban colitis (Hampson, 2012). Los animales pierden su condición corporal y demoran más tiempo para alcanzar el peso de faena.

La transmisión se produce por la vía fecal/oral de animales portadores a animales susceptibles. El agente se mantiene en el ambiente y se transmite entre grupos de animales,

especialmente si las condiciones de higiene y desinfección no son las adecuadas. Pero la presencia de múltiples cepas de *B. pilosicoli* dentro de la granja podrían explicar la reinfección de animales convalecientes o tratados con antibióticos. En estos casos, la reinfección puede ser con cepas diferentes, posiblemente con diferentes determinantes antigénicos, susceptibilidades antimicrobianas o para colonizar y causar enfermedad (Hampson, 2012). Diferentes cepas de *B. pilosicoli*, provenientes de distintos huéspedes, mostraron diferencias en cuanto a la motilidad y atracción a la mucina, variaron en sus propiedades, esto apoyaría la probabilidad de que ocurra la transmisión entre especies (Naresh y Hampson, 2010).

En la EIP también influye el factor dieta. Los cerdos alimentados con dietas a base de arroz cocido (altamente digerible y bajo en fibra soluble) mostraron menor colonización con *B. pilosicoli* en comparación con cerdos alimentados con dietas convencionales. Pero si eran alimentados con una dieta pelletizada en lugar de harinas, aumentaba el riesgo de colonización. También se observó que la alimentación líquida fermentada o el ácido láctico no influyeron en la colonización (Lindecrona *et al.*, 2004).

La EIP se presenta después del destete o cuando los animales son mezclados durante el crecimiento con una nueva dieta. Puede ocurrir en animales en terminación y ocasionalmente en cerdas preñadas y reproductores recién introducidos. Distintas manifestaciones se pueden ver en cerdos destetados, en desarrollo o en terminación dentro de la misma granja. No todos los animales infectados desarrollan diarrea; sin embargo, las infecciones subclínicas pueden disminuir las tasas de crecimiento (Hampson, 2012).

Cuando *B. pilosicoli* llega a intestino grueso penetra en el moco que recubre la mucosa colónica. En la primera fase de infección numerosas espiroquetas pueden adherirse a la superficie luminal de las células epiteliales del ciego y del colon. La adhesión ocurre en la parte apical de los enterocitos maduros entre unidades de las criptas, pero no en las células inmaduras más profundas de las criptas (Trott *et al.*, 1996c). El período de incubación fue de 4 a 9 días en cerdos afectados clínicamente, después de una descarga experimental con *B. pilosicoli* (Thomson *et al.*, 1997). Los primeros signos clínicos son el hueco de los flancos y heces blandas. La consistencia fecal pasa a ser como cemento húmedo y puede brillar. Estos pueden ser los únicos signos en animales en terminación, pero los destetados y en desarrollo suelen tener una diarrea acuosa a mucosa de color verde o marrón, con restos de moco y a veces manchas de sangre (Hampson, 2012). Los cerdos pierden condición corporal y tienen manchado el periné, pueden tener fiebre, pero por lo general continúan comiendo. Cuando tienen las heces blandas pierden condición corporal, disminuyen la ganancia diaria

de peso, aumenta la tasa de conversión alimenticia con significativos efectos adversos sobre el crecimiento (Thomson *et al.*, 1997).

Las lesiones macroscópicas se limitan al ciego y al colon. Cuando comienzan los signos clínicos, el ciego y el colon se tornan flácidos, llenos de líquido con la superficie serosa edematosa y con agrandamiento de los ganglios linfáticos mesentéricos y colónicos. El contenido intestinal comúnmente es abundante, acuoso, verde o amarillo y espumoso. La mucosa puede estar congestiva e hiperémica, con algunas erosiones y focos necróticos. La inflamación en las etapas posteriores puede resultar en una colitis erosiva multifocal, ulcerativa o mucohemorrágica. En infecciones experimentales, sin embargo, no se han observado o solo hay algunas lesiones sutiles, que no harían sospechar de la presencia de *B. pilosicoli*, pero al examen de lesiones microscópicas la presencia tanto de lesiones características como del agente ponen de manifiesto la EIP (Jensen *et al.*, 2004).

Las lesiones microscópicas generalmente se limitan a la mucosa y submucosa (infiltración de células mononucleares), pero puede extenderse a la muscular. La mucosa suele estar edematosa y se caracteriza por áreas multifocales de erosión, congestión subepitelial, la dilatación, alargamiento de las criptas llenas de moco, restos celulares y células inflamatorias degeneradas. Hay un aumento evidente en el número de células caliciformes en las glándulas y en el epitelio superficial de la mucosa colónica. La presencia de *B. pilosicoli* dentro de las criptas y la lámina propia pueden asociarse con exocitosis neutrofílica (abscesos de cripta) y un infiltrado de neutrófilos y linfocitos en la lámina propia (Hampson, 2012). El epitelio superficial del colon puede estar cubierto por una franja oscura de espiroquetas unidas por un extremo de la célula que forma un "falso ribete en cepillo" característico, se puede presentar densamente poblado o en forma solitaria, sugiriendo que la EIP es independiente de la densidad del organismo sobre la superficie colónica (Jensen *et al.*, 2004). Pero parece que no siempre está presente (Thomson *et al.*, 1997). La colonización está en el epitelio luminal y en las glándulas colónicas. La tinción con plata del intestino grueso permite observar muchas espiroquetas sobre la superficie del epitelio y en las glándulas del colon. Las espiroquetas se ven en o sobre las células de criptas y pueden estar ocasionalmente en la lámina propia.

Diversos agentes pueden producir colitis similares a *B. pilosicoli*, como *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp, *Trichuris suis*, *E. coli*, *Yersinia* spp, *Circovirus* porcino tipo 2, como también colitis inespecíficas debidas a cambios en la dieta (Hampson, 2012). También, se puede presentar la EIP como secundaria a estos agentes o ambas al mismo tiempo, con los signos clínicos combinados con las otras enfermedades y aumento de la

mortalidad (Taylor y Trott, 1997). Según el estudio realizado por Jensen *et al.*, en el 2004, si se sospecha de EIP se deben tomar las muestras apropiadas aun cuando no se vean lesiones macroscópicas.

El diagnóstico definitivo requiere del aislamiento y/o la identificación por PCR de *B. pilosicoli*, proveniente de heces o hisopados de mucosa colónica. Al cultivo puro se le pueden realizar pruebas bioquímicas, generalmente *B. pilosicoli* se puede identificar mediante la fuerza de la β hemólisis, la hidrólisis del hipurato, el metabolismo de la ribosa y la falta de actividad β glucosidasa (Fellström y Gunnarsson 1995).

1.7.2.1. Control de la espiroquetosis intestinal porcina

El tratamiento con antibióticos puede utilizarse para controlar la infección por *B. pilosicoli*, mantener la productividad y mejorar el bienestar. El antibiótico se puede suministrar en el agua de bebida o con el alimento, en animales muy enfermos se puede colocar por vía parenteral. La susceptibilidad antimicrobiana de *B. pilosicoli* ha sido demostrada para tiamulina, carbadox, metronidazol y, en menor grado, lincomicina (Trott *et al.*, 1996a).

Las medidas de manejo que impidan el ingreso de los cerdos en ambientes contaminados pueden reducir el impacto de *B. pilosicoli*. Sustituir el sistema de flujo continuo por sistemas todo adentro/todo afuera también reduce el riesgo de infección. La modificación de la composición de la dieta también puede ayudar (Hampson, 2012). La diversidad genética de *B. pilosicoli* que puede estar presente en una misma granja podría influir en el control de EIP, ya que podría haber diferencias en sus propiedades biológicas como la susceptibilidad antimicrobiana y la virulencia (Oxberry y Hampson, 2003)

1.7.3. Otras colitis causadas por otras espiroquetas

Algunas de las especies de *Brachyspira* débilmente hemolíticas se cree que son capaces de causar colitis y contribuir a diarrea crónica en los cerdos. *Brachyspira innocens* y *B. murdochii* eran consideradas como no patógenas, aunque cepas de *B. innocens* inoculadas a cerdos gnotobióticos resultaron ser patógenas y produjeron presencia de moco en la materia fecal, sin alterar la consistencia (Neef *et al.*, 1994), pero *B. murdochii* parece ser la especie más frecuentemente asociada con lesiones de colitis leve. Algunos estudios han puesto en evidencia la presencia de estas bacterias tanto de casos clínicos como en trabajos experimentales (Weissenböck *et al.*, 2005; Wendt *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010), que permitieron inferir que solas o en presencia de más de una especie al mismo momento,

podrían producir distintos grados leves de colitis pudiendo asociarlos a pérdidas productivas. De manera similar, Komarek *et al.* (2009) y Jensen y Boye (2005) asociaron la presencia de *B. innocens*, *B. murdochii* y *B. intermedia* con cuadros patológicos de colitis de manera individual o asociados a otros agentes.

CAPITULO II

PREVALENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *BRACHYSPIRA* EN GRANJAS DE LA REGIÓN CENTRAL DE ARGENTINA

2.1. INTRODUCCIÓN

Brachyspira hyodysenteriae es la responsable de producir la disentería porcina (DP) en cerdos en desarrollo-terminación, que se caracteriza por una colitis mucohemorrágica de alta letalidad, mientras que *B. pilosicoli* produce la espiroquetosis intestinal porcina, que ocasiona graves pérdidas económicas por la colitis mucocatarral, la diarrea color cemento y su alta morbilidad (Hampson, 2012). Los otros miembros de este género como *B. innocens*, *B. murdochii* y *B. intermedia* que también se encuentran en el colon de cerdos, se los consideró durante mucho tiempo como comensales no patógenos. Sin embargo, posteriores investigaciones tanto de casos clínicos como en trabajos experimentales (Weissenböck *et al.*, 2005; Wendt *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010; Osorio *et al.*, 2013), permiten inferir que solas o en asociaciones interespecíficas, podrían producir distintos grados leves de colitis pudiendo asociarlos a pérdidas productivas. De manera similar, Komarek *et al.* (2009) y Jensen y Boye (2005) asociaron la infección por *B. innocens*, *B. murdochii* y *B. intermedia* con cuadros patológicos de colitis, ya sea por infecciones monoespecie o asociados a otros agentes, lo que ha motivado a los investigadores a determinar la presencia y prevalencia de estos agentes en las granjas porcinas (Clothier *et al.*, 2011).

La elección del método de detección de *Brachyspira* spp puede tener implicancia en la planificación de los programas de control (Patterson *et al.*, 2013), ya que si se utilizan métodos poco sensibles podría subestimarse la importancia de la infección en las granjas y por tanto disminuir la eficacia de los programas. Para el diagnóstico de estas espiroquetas, la bacterioscopia se presenta como un recurso rápido para realizar un análisis presuntivo a partir de muestras de materia fecal o de mucosa colónica en casos clínicos de DP (Olson y Fales, 1983). El aislamiento e identificación taxonómica del agente es complicado debido a las características y requerimientos para su cultivo que también condiciona la realización de pruebas bioquímicas. Como lo expresa Råsbäk *et al.*, (2006) este procedimiento es muy sensible pero laborioso y requiere mucho tiempo. Si bien, algunos autores destacan la importancia de realizar la caracterización fenotípica (Fellström *et al.*, 2008), otros admiten que puede haber dificultades para algunas identificaciones (Clothier *et al.*, 2011; Ohya *et al.*, 2008), por lo que son necesarias otras técnicas complementarias. Las técnicas moleculares como la PCR permiten identificar el género y la especie a partir de muestras de materia fecal (La *et al.*, 2003; Råsbäk *et al.*, 2006), pero a menudo se ven obstaculizadas por factores inhibidores que reducen su sensibilidad cuando se aplica directamente en las heces (Jacobson *et al.*, 2004b), o a partir del aislamiento por cultivo (Rohde *et al.*, 2002). La secuenciación del gen *nox* (NADH oxidasa) permite determinar rápidamente la diferencia entre especies,

si la muestra contiene suficiente cantidad de bacterias, lo que hasta el momento sólo se puede lograr a partir de cultivos. Por otro lado, con el uso complementario de estas técnicas se logran establecer relaciones epidemiológicas entre las cepas aisladas (Hidalgo *et al.*, 2010) y mantener una vigilancia activa ante la aparición de nuevas especies (Fellström *et al.*, 2008). De esta manera es que se han descrito 2 nuevas especies. Ambas son fuertemente hemolíticas recuperadas de animales con disentería, pero que fueron negativas ante una Dúplex PCR para *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, demostrando claramente las limitaciones del diagnóstico basado únicamente en métodos moleculares (Råsbäk *et al.*, 2007). El análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA y *nox* permitió observar un *cluster* separado de *B. hyodysenteriae* y, además la imposibilidad de obtener cualquier amplificación de fragmentos de PCR del gen *tlyA*, indicaron que debía considerarse una nueva especie dentro del género *Brachyspira*, designada provisionalmente "*B. suanatina*". En tanto en granjas de EE. UU., nuevos aislados de *Brachyspira* no tipeables fueron diferentes de todas las especies conocidas en base a la secuenciación de los genes *nox* y 16S rRNA y también por pruebas bioquímicas, lo que indicó una nueva especie de *Brachyspira*, provisionalmente designada como "*Brachyspira hamptonii*" (Chander *et al.*, 2012).

2.1.1. Primeros aislados de espiroquetas intestinales en Argentina

Los datos que describen la presencia de *Brachyspira* spp en Argentina son escasos. En 1995, se reporta el aislamiento de *B. hyodysenteriae* y *B. innocens* en cerdos con DP (Moredo *et al.*, 1995). También se han realizado estudios de susceptibilidad en distintas cepas de ratones SPF inoculados con *B. hyodysenteriae* mediante un análisis bacteriológico y anatomopatológico (Giacoboni *et al.*, 1998). Otro trabajo publicado fue acerca de la serotipificación de cepas de *B. hyodysenteriae* aisladas de granjas de la provincia de Buenos Aires (Moredo *et al.*, 1999).

Varios años después, se presentó un estudio realizado sobre 24 granjas porcinas donde se identificó *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* en el 8,3 y 16,6% de las granjas muestreadas, respectivamente, con la utilización de técnicas moleculares, como la Dúplex-PCR (Illanes *et al.*, 2008a). En ese mismo año, en otro trabajo se comienza a utilizar al aislamiento como metodología diagnóstica (Illanes *et al.*, 2008b). De esta misma forma, fueron identificadas *B. innocens* y *B. murdochii* de muestras de colon provenientes de cerdos en frigorífico (Carranza *et al.*, 2010a) y se realizaron estudios sobre la efectividad de distintos antibióticos para el tratamiento de la DP (Carranza *et al.*, 2010b). Recientemente,

se identificó en 2/8 granjas la presencia de *B. hyodysenteriae* en animales con diarrea, mediante PCR, pero en ninguna se encontró *B. pilosicoli* (Perez, 2016).

2.1.2. Presencia de espiroquetas intestinales en países de América

Acerca de la presencia de *Brachyspira* spp en otros países de nuestro continente, es de destacar que en EE. UU., hacia mediados de la década de los 90 prácticamente había desaparecido la DP por los tratamientos efectivos, las medidas de control y la eliminación de *B. hyodysenteriae* de las granjas porcinas. Sin embargo, en los últimos años hubo un incremento en la aparición de casos sugestivos de DP pero que eran negativos a la PCR de *B. hyodysenteriae* (Burrough et al., 2011). Como comentamos en párrafos anteriores surge como nueva especie "*Brachyspira hamptonii*", tal cual ha sido designada provisionalmente (Chander et al., 2012). Una prevalencia importante, por encima de *L. intracellularis* y *Salmonella*, se encontró de *Brachyspira* spp, en granjas de EE. UU., donde se destaca la alta prevalencia de *B. murdochii*, mientras que *B. hyodysenteriae* se mantuvo muy baja (Hammer y Gebhart, 2013).

Algunos datos sobre antecedentes en Latinoamérica se refieren a Brasil, cuyos trabajos sobre distintas regiones describen la prevalencia de patógenos intestinales, como *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella*, *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*. También evalúan la presencia de infecciones mixtas en granjas porcinas y el efecto del uso de antibióticos en cerdos en terminación (Barcellos et al., 2000; Baccaro et al., 2003; Barcellos et al., 2003; Viott et al., 2013). Mientras que en México se identificaron espiroquetas fuerte y débilmente hemolíticas en un 22% de granjas porcinas (Corona-Barrera et al., 2009).

A nivel mundial, hay pocos trabajos realizados para determinar la prevalencia y la presencia de las distintas especies de *Brachyspira* en un número significativo de granjas (Stegé et al., 2000; Jacobson et al., 2005), quizás debido a las características fastidiosas de este microorganismo.

Por lo planteado anteriormente, es necesario conocer la prevalencia de las distintas especies de *Brachyspira* y su distribución en nuestras granjas para evaluar su impacto.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Identificar a las distintas especies de los aislados de espiroquetas intestinales del género *Brachyspira* spp., en granjas de cerdos de distintas provincias del país.

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las distintas especies del género *Brachyspira* en granjas porcinas de la región de mayor producción porcina de la Argentina.

- Determinar la prevalencia de distintas especies de *Brachyspira* en granjas porcinas pertenecientes al área de mayor producción porcina del país.

- Asociar la presencia de *Brachyspira* spp con signología clínica evidenciada por heces de distinta consistencia.

- Construir una bacterioteca de diferentes especies de cepas autóctonas de *Brachyspira* spp.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Población de estudio

Para conocer el número de granjas existentes en el país se consultó al Sistema Integrado de Gestión Sanitaria en Salud Animal (2012), provisto por el SENASA de Argentina. La población de estudio en este trabajo fueron las granjas porcinas confinadas con más de 200 madres en producción. La existencia de estas granjas en Argentina fue de 322 con un total de 153.350 madres. El 85% (274 granjas) se encontraban ubicadas en las provincias de Buenos Aires (37%), Córdoba (24%), Santa Fe (16%) y Entre Ríos (8%) y un 4,3% en San Luis, San Juan y La Pampa. La estimación del número de granjas a muestrear para conocer la prevalencia de granjas positivas a *Brachyspira* spp se realizó considerando una prevalencia esperada del 50%, una precisión absoluta del 12% y un 95% de confianza, utilizando la fórmula propuesta por Thrusfield (2007) y calculada en Epidat 3.1. teniendo en cuenta una población total de 288 granjas con más de 200 madres en las provincias mencionadas.

El cálculo de tamaño de muestra estimado fue de 49 granjas, adicionalmente se incluyeron 4 granjas, con menos de 150 madres, que sumaban 440 cerdas, y estaban ubicadas en cada una de las 4 provincias de mayor producción de cerdos. Se realizó un muestreo no probabilístico intencionado, proporcional a la cantidad de granjas en las provincias de mayor producción porcina, considerando las granjas de mayor tamaño de la región y se completó con granjas cuyos productores aceptaron participar del estudio, tener un sistema confinado y no tener antecedentes registrados de aislamiento de *Brachyspira* spp.

Se muestrearon el 17% de las granjas con más de 200 madres de las provincias con mayor producción que involucraron un total de 41.025 cerdas en producción y se incluyeron 4 granjas pertenecientes a provincias lindantes, San Luis (1), San Juan (2) y La Pampa (1), con 4.500 madres en producción.

La mediana del número de madres por granja fue 500 (rango intercuartil= 300-1000).

Tabla 2.1: Identificación y ubicación de la granja, número de madres y año del muestreo.

Granja	Provincia	Nº de madres	Año de muestreo
1	Córdoba	500	2013
2	Córdoba	250	2010
3	Córdoba	700	2010
4	Córdoba	2500	2010
5	Córdoba	200	2010
6	Santa Fe	2300	2011
8	Entre Ríos	60	2011
9	Entre Ríos	200	2011
10	Córdoba	250	2011
11	Córdoba	110	2011
12	Córdoba	300	2011
13	Santa Fe	250	2011
14	Córdoba	500	2011
15	Córdoba	680	2011
17	Córdoba	500	2011
18	Córdoba	300	2012
19	Córdoba	650	2012
20	Córdoba	300	2012
21	La Pampa	1000	2012
22	Santa Fe	200	2012
23	Santa Fe	200	2012
24	Santa Fe	150	2012
25	Santa Fe	500	2012
26	Santa Fe	350	2012
27	B. Aires	120	2012
28	B. Aires	420	2012
29	B. Aires	350	2012
30	Córdoba	650	2012
31	Córdoba	1250	2012
32	Córdoba	500	2012

33	B. Aires	370	2012
34	B. Aires	280	2012
35	B. Aires	650	2012
36	B. Aires	330	2012
37	B. Aires	650	2012
38	B. Aires	1000	2012
39	San Juan	1000	2012
40	B. Aires	650	2012
41	San Juan	1200	2012
42	B. Aires	300	2012
43	B. Aires	214	2012
44	B. Aires	700	2012
45	B. Aires	1200	2012
46	B. Aires	370	2012
47	Córdoba	300	2012
48	San Luis	1300	2012
49	B. Aires	950	2012
50	Córdoba	521	2012
51	B. Aires	6300	2013
52	Córdoba	1000	2013
53	Santa Fe	3500	2013
54	Córdoba	1000	2013
55	Córdoba	1000	2013

2.3.2. Muestreo en granjas

En cada granja, se tomaron muestras de materia fecal a 30 cerdos de 22 semanas de edad. El cálculo del número de muestras a tomar se realizó mediante la fórmula para presencia-ausencia según Thrusfield (2007). Los cerdos fueron elegidos al azar entre la totalidad de animales de esa edad, según número de corrales y animales por corral. Las muestras fueron tomadas del recto por estímulo manual, se colocaron individualmente en bolsas de polietileno y se refrigeraron a 4°C hasta el momento del procesamiento dentro de las 48 h de extraídas. En total se obtuvieron 1556 muestras de materia fecal.

2.3.3. Procesamiento de la materia fecal

2.3.3.1. Registro de la consistencia de la materia fecal

En 20 de las 53 granjas, se registró la consistencia de la materia fecal en el laboratorio y se clasificaron en 2 tipos: normal y blanda. Se consideró consistencia normal cuando la materia fecal mantenía una forma definida, mientras que se consideró blanda cuando tenía mayor cantidad de líquido y no mantenía una forma definida.

2.3.3.2. Visualización de espiroquetas en frotis

Durante la preparación previa al estudio, se realizaron distintas tinciones con el objetivo de identificar correctamente a las estructuras espiroquetales compatibles con *Brachyspira* spp. Así, de muestras fecales o de cultivo se realizaron frotis, se fijaron con calor y se colorearon por Gram, por el método de impregnación de *Fontana-Tribondeau* (nitrato de plata) y/o por tinción de carbol-fucsina al 10%. Las últimas dos tinciones tornan más visibles a las espiroquetas. Luego se observó en microscopio óptico con aceite de inmersión a 100x.

Con cada muestra de materia fecal proveniente de las 53 granjas, se realizó un frotis, se fijó con calor y se coloreó por Gram. En microscopio óptico con aceite de inmersión a 100x se visualizaron 10 campos y se registró el número de espiroquetas presentes. Se consideró positivo cuando había al menos dos campos con una espiroqueta con características similares a las del género *Brachyspira* en lo que respecta a morfología y Gram negativas.

2.3.3.2.1 Impregnación de *Fontana-Tribondeau*

Este método es específico para espiroquetas porque produce engrosamiento de las estructuras y permite una mejor visualización de los contornos de estas. Consta de tres reactivos: fijador, mordiente y solución de nitrato de plata amoniacal.

-Fijador:

Ácido acético glacial	1ml.
Formol (formaldehído al 40%)	20ml.
Agua destilada	100ml.

-Mordiente:

Ácido tánico	5gr
Fenol	1gr
Agua destilada	100 ml

-Solución amoniacal:

Nitrato de plata	5 gr
Agua destilada	100 ml

-Hidróxido de amonio al 10% (cantidad necesaria).

Primero se preparó la solución de nitrato de plata. Se reservaron algunos mililitros y se guardaron. Se agregó la solución amoniacal al resto del nitrato de plata, gota a gota hasta que se disolvió el precipitado que se había formado. Se agregó la porción de nitrato de plata que se reservó antes hasta que se produjo una ligera opalescencia que se mantuvo después de la agitación.

Procedimiento: Se preparó el extendido y se dejó secar, luego se cubrió con el fijador y se dejó reaccionar durante 90 s. Se lavó con alcohol de 95° o absoluto (si hay mucha sustancia grasa se debe bañar previamente el extendido con éter y tratarlo después con el alcohol). Se agregó el mordiente y se calentó hasta que se desprendió vapor y se dejó reaccionar durante 30 s. Se lavó bien con agua y se enjuagó con agua destilada, se quitó el exceso de líquido sacudiendo el portaobjetos. Se cubrió el extendido con nitrato de plata durante algunos segundos. Se sacudió y se volvió a cubrir con la solución, se calentó hasta

desprender vapores durante 15-20 s. El extendido al presentar un color castaño, se lavó con agua destilada y se secó con papel. También se puede colocar en agitador durante algunos segundos para que se desprendan los restos de nitrato de plata que dificultan su observación en microscopio.

2.3.3.2.2 Tinción de Carbol-Fucsina

Una tinción simple se realizó con carbol-fucsina ya que permite destacar al microorganismo completo, para que se vean la forma y estructuras celulares básicas, mediante la utilización de un único reactivo. La preparación de la tinción se realizó de la siguiente forma:

-Solución A:

Fucsina básica (Anedra)	10 g
Fenol (Cicarelli)	20 ml
Alcohol 96° (Bioalcohol)	50 ml
Agua destilada	100 ml

-Solución B:

Ácido acético (Cicarelli)	0,2 ml
Agua destilada	100 ml

-Solución de trabajo:

Solución A	6,8 ml
Solución B	100 ml

La solución de trabajo se colocó en un recipiente con gotero y se mantuvo a temperatura ambiente. Para la tinción se colocó la solución de trabajo sobre un frotis durante 1 min, luego se lavó con agua corriente, se dejó secar y se observó al microscopio.

2.3.3.3. Aislamiento bacteriológico

Por cada muestra de materia fecal se sembraron 3 ansadas en agar selectivo *Brachyspira* con la siguiente concentración de antibióticos: colistina 25 mg/ml, vancomicina 25 mg/ml y espectinomicina 400 mg/ml. Se cultivaron en una jarra para anaerobiosis,

AnaeroJar de Thermo Scientific™ de 2,5 L de capacidad y que puede contener hasta 12 placas, colocando un sistema anaeróbico en bolsa (AnaeroGen™ AN25, OXOID, UK) a 42°C por 7 días. También se colocó un sobre indicador de anaerobiosis (Anaerobic Indicator, OXOID, UK). Cuando se observó sobre el agar una fina pátina y fuerte o débil β hemólisis, coincidente con la estría y sin relación con colonias, se realizó un frotis y se coloreó con Gram. Si se observaron estructuras espiroquetales Gram negativas compatibles con *Brachyspira* spp, se subcultivó en agar sangre-TSA, sin antibióticos, por 3-4 días con las mismas condiciones de cultivo, tantas veces como fue necesario hasta obtener cultivos puros.

2.3.3.3.1 Medios de cultivo

2.3.3.3.1.a Agar selectivo *Brachyspira* (ASB)

Este medio selectivo para *Brachyspira* contiene un suplemento con antibióticos agregados a un medio de agar sangre.

Preparación del suplemento selectivo:

Espectinomycinina	4 mg
Vancomycinina	125 mg
Colistina	125 mg
Agua destilada o deionizada	100 ml

Preparación de las placas:

Agar Base N° 2 o Columbia	20 g
Agua destilada o deionizada	450 ml
Sangre equina	40 ml
Suplemento selectivo	10 ml

Procedimiento: Mezclar los ingredientes selectivos (antibióticos) y disolver agregando de a poco el agua destilada o deionizada. Esterilizar por filtro de 0.45 μm y dispensar 10 ml en tubos estériles, sellar y guardar hasta usar a -20°C. Para la preparación de las placas se mezcló y disolvió los ingredientes del medio base usando un calentador suave, luego se autoclavó a 121°C por 15 min. Se dejó enfriar hasta los 56°C, se agregaron 40 ml de sangre equina desfibrinada y 10 ml del suplemento descongelado. Se mezcló y se

dispensó en placas. Se dejaron solidificar las placas por no más de 30 min y se guardaron a 4°C.

2.3.3.3.1.b Agar sangre-TSA

Se utilizó el medio TSA (Oxoid) con sangre ovina para ver hemólisis, de la siguiente manera:

Agar base Tripteína Soya	20 g
Sangre ovina desfibrinada	25 ml
Agua destilada	500 ml

Se suspendió 20 gr de medio base en 500 ml de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos y se disolvió a baño maría. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se enfrió entre 45-50 °C y se agregó 25 ml de sangre ovina desfibrinada. Se homogeneizó y se distribuyó en placas de Petri estériles.

2.3.4. Preservación de aislados

Todas los aislados fueron preservados. Se utilizaron distintas metodologías:

- 1- Caldo cerebro corazón con 15% de glicerol y conservados a -70°C.
- 2- Sangre ovina desfibrinada con 15% de glicerol y conservados a -70°C.
- 3- Caldo cerebro corazón o triptona soja con 10% suero fetal bovino, 15% de glicerol y conservados a -70°.
- 4- En tiras de papel de filtro estéril, colocadas en viales y mantenidos en refrigeración.

En criotubos de 1,5 ml se colocó 1 ml de caldo o sangre desfibrinada de acuerdo con las primeras 3 metodologías y se agregó 150 µl de glicerol estéril al momento de uso. El crecimiento bacteriano de una placa con un aislado puro se recogió con hisopo de algodón estéril y con movimientos giratorios se mezcló en el caldo o sangre. Se guardaron en freezer a -70°C.

La metodología 4 permitió preservar las bacterias para realizar posteriormente los distintos PCR. Se colocaron tiras de papel de filtro estéril sobre las zonas de crecimiento bacteriano, el papel adsorbió las bacterias, se levantaron los papeles, se colocaron en viales estériles y se mantuvieron refrigerados a 4°C. Para la extracción de ADN se suspendieron

los papeles de filtro con espiroquetas en 1 ml de agua bidestilada estéril colocados en viales de 1.5 ml. Se pipeteó para humedecer todo el papel, se vortexeo y se dividió en dos alícuotas: una para seguir con la extracción y otra de resguardo. Luego se continuó con el protocolo de extracción de DNAzol (Invitrogen).

2.3.4.1 Infusión Cerebro-Corazón

Se preparó el medio de la siguiente manera:

Infusión C-C (Oxoid)	3,7 g
Agua destilada	100 ml

Se mezcló bien y se distribuyó 1 ml en tubos de Khan. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se mantuvo refrigerado a 4°C hasta su uso.

2.3.4.2 Caldo de triptona y soja

El caldo de triptona y soja (TSB) se preparó de la siguiente forma:

TSB (Oxoid)	3 g
Agua destilada	100 ml

Se mezcló y esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se mantuvo refrigerado a 4°C hasta su uso.

2.3.4.3 Medio para preservar cepas de *Brachyspira*

El medio para preservar las muestras se realizó de la siguiente manera:

Caldo TSB o CC	45 ml
Suero Fetal Bovino	5 ml

El SFB fue agregado cuando el caldo tenía una temperatura de 45-50°C, se homogeneizó y se fraccionó 1 ml en tubos estériles que se mantuvieron a 4°C.

2.3.5. Identificación de especie por pruebas bioquímicas

Se incubó cada placa con cultivo puro de cada especie de *Brachyospira* durante 3 a 4 días, se chequeó la pureza a través de un frotis teñido con Gram, luego se pasó un hisopo estéril, se levantó la pátina y fue colocada en un tubo de vidrio con solución fisiológica estéril hasta obtener un valor de turbidez equivalente a McFarland 4. Se colocaron 250 µl de esta dilución en 5 tubos con tapa a rosca estériles, a cada uno se le colocó una tableta (Lab. Rosco Diagnostica, Dinamarca) para las siguientes reacciones bioquímicas: hidrólisis del hipurato, α glucosidasa, α galactosidasa y β glucosidasa y se incubaron en estufa a 37°C durante 4 h, luego se interpretaron los resultados de acuerdo con las indicaciones del producto. Para la prueba de hidrólisis del hipurato se colocaron 5 gotas de solución de ninhidrina, se incubó 10 min más y se realizó la lectura. Para la producción de indol se colocaron 3 gotas de reactivo de Kovac's. La clasificación de especie se realizó de acuerdo con Hommez *et al.*, 1998.

2.3.6. Identificación de especie por PCR

El crecimiento bacteriano puro fue recogido de la placa con hisopo estéril y colocado en 1 ml de agua destilada estéril. El ADN de los aislados fue extraído con kit comercial (DNAzol, Invitrogen). Para la estandarización de las técnicas se utilizó ADN de cepas de referencia provistas por Dr. Enrique Corona-Barrera (México).

2.3.6.1. Extracción de ADN a partir de papel de filtro con espiroquetas utilizando DNAzol

Se suspendieron los papeles de filtro con espiroquetas en 1 ml de agua bidestilada estéril colocados en viales de 1.5 ml. Se realizó pipeteo para humedecer todo el papel, se vortexó y se dividió en dos alícuotas: una para seguir con la extracción y otra de resguardo. Luego se agregó DNAzol (500 µl) al vial con el papel, se pipeteó, vortexó y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se centrifugó a 14.000 rpm 10 min a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo estéril (1.5 ml), se agregó 500 µl de etanol al 100%, se colocó a -20°C durante al menos 1 h, se centrifugó a 14.000 rpm 4 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Después se realizó un primer lavado con etanol al 75%: se colocó 1ml sobre el pellet en el vial y se mezcló de 3-6 veces. Se centrifugó 4 min a 14.000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado con etanol al 75%: igual al anterior con la misma centrifugación. Se colocaron a escurrir los tubos boca abajo sobre papel

absorbente (hasta que solo quedó el pellet). Por último, eluir en agua bidestilada estéril o OHNa 0,8 Mm (20-50 μ l).

2.3.6.2. Extracción de ADN a partir de placas de cultivo con espiroquetas

Con un hisopo de dacrón se realizó el hisopado de toda la superficie de la placa en la cual se observa crecimiento con débil o fuerte β hemolisis tipo *Brachyspira* y pátina. Los hisopos con espiroquetas se suspendieron en 1 ml de agua bidestilada estéril colocados en viales de 1.5 ml. Se vortexeó y se retiró el hisopo escurriéndolo bien contra los bordes del vial de 1,5 ml. (con una pinza de mano izquierda esterilizando la misma en mechero entre muestra y muestra) para que deje todo su contenido en suspensión. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. para concentrar las espiroquetas en suspensión en el fondo del vial en un pellet. Se descartó el sobrenadante y se agregó DNAzol (500 μ l) al vial con el pellet. Luego se continuó de igual forma a los pasos descritos en el apartado 2.3.6.1.

2.3.7. Identificación y confirmación de aislados por Dúplex PCR

Para la confirmación de las cepas patógenas identificadas mediante pruebas bioquímicas se realizó una Dúplex PCR (D-PCR), mediante la amplificación de un fragmento de 354 pb (H1: 5'-ACTAAAGATCCTGATGTATTTG-3' y H2: 5'-CTAATAAACGTCTGCTGC-3') perteneciente al gen NADH oxidasa (*nox*) para detectar *B. hyodysenteriae* y de un fragmento de 823 pb (P1: 5'-AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC-3' y P2: 5'-GCACCTATGTAAACGTCCTTG-3') del gen 16S rRNA para la detección de *B. pilosicoli* (La *et al.*, 2003) (Tablas 2.2; 2.3). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % y teñido con bromuro de etidio (1 μ g/ml).

2.3.8. Identificación de aislados por PCR -RFLP

Para la especiación de aquellas cepas que no pudieron ser identificadas mediante pruebas bioquímicas se realizó una PCR-RFLP, mediante la amplificación de un fragmento de 939 pb (F: 5'-TAGCCTTGCGGTATCTGCATCTTTGG-3', R: 5'-CTTCAGACCACTCCAGTAGAAGCC-3') perteneciente al gen *nox* de *Brachyspira* spp. (Rohde y col., 2002; Rohde y Habighorst-Blome, 2012) (Tablas 2.4;2.5), con algunas modificaciones. Una alícuota del producto de PCR se digirió con las enzimas *Dpn* II y *Scf*I, y los fragmentos de restricción se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% conteniendo bromuro de etidio (Tabla 2.6; 2.7). Esta técnica permite diferenciar todas las especies presentes en los cerdos.

Tabla 2.2: Mezcla de reacción para Dúplex-PCR

Reactivo	Concentración Final	Volumen (μl)
H ₂ O Bidestilada Up		11,3 μl
Tampón de PCR 10x	1x	2,5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	1,5 μl
Solución de dNTPs (10 mM)	0,2 mM	2 μl
Cebador directo (F) B Hyo (10 μM)	0,5 μM	1,25 μl
Cebador directo (R) B Hyo (10 μM)	0,5 μM	1,25 μl
Cebador directo (F) B pilo (10 μM)	0,3 μM	0,75 μl
Cebador directo (R) B pilo (10 μM)	0,3 μM	0,75 μl
Albumina bovina (5 μg/μl)	0,2 μg/μl	1 μl
Taq (5UI/ μl)	1 UI	0,2 μl
ADN problema		2,5 μl
Volumen final		25 μl

Tabla 2.3: Condiciones de Ciclado:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	
Annealing	59°C	40 s	30
Elongación	72°C	54 s	
Elongación final	72°C	10 min	1
Final	15°C	∞*	

∞*hasta la retirada de las muestras del termociclador.

Tabla 2.4: Mezcla de reacción para PCR (gen *nox*) *Brachyspira* spp (Rohde *et al.*, 2002)

Reactivo	Concentración Final	Volumen (μl)
H ₂ O Bidestilada Up		10,3 μ l
Tampón de PCR 10x	1x	2,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	1,5 μ l
Solución de dNTPs (2,5 mM)	0,2 mM	2 μ l
Cebador directo (F) (10 μ M)	0,5 μ M	1,25 μ l
Cebador directo (R) (10 μ M)	0,5 μ M	1,25 μ l
Albumina bovina (5 μ g/ μ l)	0,2 μ g/ μ l	1 μ l
Taq (5UI/ μ l)	1 UI	0,2 μ l
ADN problema		5 μ l
Volumen final		25 μl

Tabla 2.5: Condiciones de Ciclado:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	
<i>Annealing</i>	59°C	40 s	30
Elongación	72°C	54 s	
Elongación final	72°C	10 min	1
Final	15°C	∞ *	

∞ * hasta la retirada de las muestras del termociclador.

Tabla 2.6: Mezcla de reacción con enzimas de restricción (Rohde *et al.*, 2002)

Reactivo	Cantidad con BfmI	Cantidad con DpnII
H ₂ O Bidestilada Up	6 µl	4,5 µl
Tampón de RFLP 10X	2,5 µl	2,5 µl
Dithiothreitol	2,5 µl	2,5 µl
DpnII	-	3 µl
BfmI	1,5 µl	-
Producto de PCR Bnox	12,5 µl	12,5 µl
Volumen final	25 µl	25 µl

Tabla 2.7: Condiciones de incubación

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Digestión enzimática	37°C	2 horas	1

2.3.9. Identificación por secuenciación

Para aquellos aislados en los que se observó fuerte hemólisis y/o las pruebas bioquímicas dieron resultados inciertos y también para aquellas que fueron levantadas en papel de filtro (y que no se les realizó PCR-RFLP) se realizó una amplificación del gen *nox* específico de *Brachyospira* (F y R), utilizando los cebadores propuestos por Rhode *et al.*, 2002 (punto 2.3.6.3.) y Chander *et al.*, 2012 (F: 5'-GTTCTTGGCCTGTAACCTCCTAT-3'; R: 5'-GCAACAATACCCATTCTTACAG-3'), dando un producto de 550 pb aproximadamente, según las especificaciones de las Tablas 2.4 y 2.5, se purificó el ADN con el kit comercial Puriprep S (InbioHighway), luego se cuantificó (NanoDrop, ND 1000) y se secuenció (ABI 3130xl, Applied Biosystem), en los laboratorios del INTA Castelar (Bs As).

Para el análisis de las secuencias los cromatogramas se visualizaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, se eliminaron las primeras y últimas bases de cada cromatograma, se comprobó la calidad de las secuencias a través de la observación

de que los picos fueran bien definidos y estrechos. En caso de ser necesario, fueron alineadas F y R (Clustal W). Luego se creó un archivo en formato FASTA y se comparó con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el programa BLAST. La identificación de la especie correspondió a aquellas secuencias que presentaron al menos un 99% de identidad con cepas del GenBank.

También se incluyeron todas las cepas de *B. hyodysenteriae* identificadas previamente y las obtenidas de casos clínicos de DP.

2.3.9.1. Purificación de ADN a partir de productos de PCR en solución (Puriprep S)

Se colocó 10 a 100 µl del producto final de PCR a un microtubo, se agregaron 5 volúmenes de buffer BGP (Max. 500 µl) y se mezcló bien. Luego se transfirió en la minicolumna, montada sobre un tubo colector de 2 ml y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 min a 12000 g y se descartó el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector. Se lavó la minicolumna con 600 µl de buffer BLav, se centrifugó por 1 min a 12000 g y se descartó el filtrado colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector. Se repitió el lavado del paso anterior en las mismas condiciones. Se vació el tubo colector y se colocó la minicolumna nuevamente en él. Se centrifugó por 3 min a 12000 g y se dejó la minicolumna destapada 15 min. para evaporar los restos de etanol. Se colocó la minicolumna en un microtubo de 1,5 ml, se agregaron 30-50 µl de BE (equilibrado a 70°C) sobre el centro de la membrana de sílica. Se incubó por 5 a 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó por 2 min a 12000 g. El ADN purificado eluiró al microtubo, en el cual fue enviado para su secuenciación.

2.3.10. Análisis estadístico

Los datos fueron cargados en Excel y analizados utilizando el programa Infostat y Epidat 4.1 (OMS). La frecuencia de presentación de *Brachyspira* spp. y de las distintas especies fue determinada mediante la estimación de la prevalencia cruda y específica según las provincias y el tamaño de la granja.

Las granjas visitadas fueron categorizadas según los cuartiles del número de madres y en cada categoría se describió la prevalencia de *Brachyspira* spp para determinar la asociación entre el tamaño de la granja y la presencia de *Brachyspira* spp y se evaluó si había diferencias significativas mediante una prueba de Chi cuadrado.

La asociación entre la consistencia de la materia fecal de los cerdos muestreados y la visualización de espiroquetas en frotis y el aislamiento fue evaluada comparando las prevalencias mediante una prueba de Chi cuadrado.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Procesamiento de la materia fecal

2.4.1.1. Visualización de espiroquetas en frotis

Se procesaron 1556 muestras de materia fecal provenientes de las 53 granjas, dentro de las 12 hs de arribo al laboratorio, en una granja se tomaron 20 muestras mientras que en otras 7 fueron entre 23 y 29 muestras. El promedio de las 53 granjas fue de 29,4 muestras por granja. De cada muestra se realizó un frotis y se observaron al microscopio óptico 1439, en total y se visualizaron espiroquetas compatibles con *Brachyspira* spp. en 504 extendidos (36,2%). Previamente se realizaron distintas tinciones sobre cultivos puros de *Brachyspira*, de manera de observar la morfología compatible a través de lo que ofrecen las tinciones, y así no confundir con otras formas espiroquetoides que pueden estar presentes en la materia fecal (Fig. 2.1)

De los 1439 frotis se obtuvo la información de cultivo positivo o negativo a espiroquetas en 1391 muestras (Tabla 2.8).

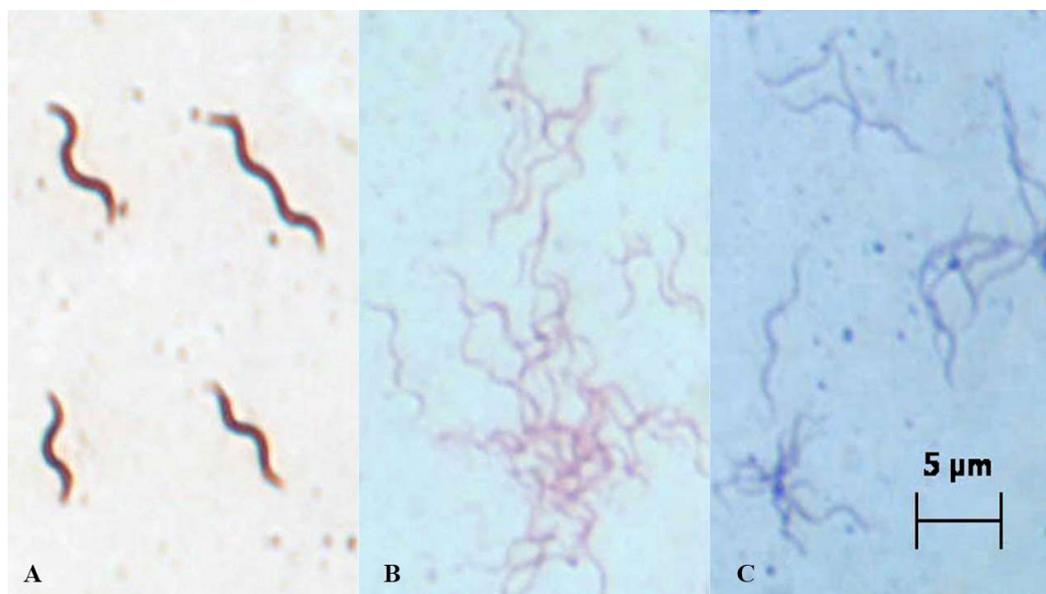
Tabla 2.8: Resultado de cultivo y visualización de espiroquetas con tinción de Gram en 1391 muestras de materia fecal de 53 granjas de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Juan, San Luis y La Pampa entre los años 2010 y 2013.

	Cultivo +	Cultivo -	Total
Frotis +	131	373	504
Frotis -	136	751	887

La probabilidad de visualizar espiroquetas mediante frotis en una muestra de materia fecal con cultivo positivo fue del 49%, mientras que el 67% de las muestras con cultivo negativo fueron clasificadas como negativas al frotis.

En el 26% (131/504) de los frotis positivos hubo aislamiento de espiroquetas, mientras que solo en el 15% (136/887) de los frotis negativos se aislaron espiroquetas.

Fig. 2.1: Distintas tinciones aplicadas a frotis de *Brachyspira* spp. A: *Fontana-Tribondeau*, B: Gram, C: Carbol-Fucsina.



2.4.1.2. Relación consistencia fecal con el aislamiento de *Brachyspira* spp.

En 20 granjas se registró la consistencia de la materia fecal (n= 600) y se evaluó la relación entre la visualización de espiroquetas en frotis y el aislamiento y la consistencia de la materia fecal (heces normales o blandas) (Tabla 2.9), se descartaron 22 muestras que no tenían todos los datos necesarios (n=578).

Tabla 2.9: Relación entre la consistencia fecal y la presencia de espiroquetas en frotis en muestras de materia fecal procedentes de 20 granjas de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, San Juan y San Luis durante el período 2011-2013.

Consistencia	Frotis		Aislamiento		Total
	+	(%)	-	(%)	
heces					
Blanda	49	(62,0)	30	(38,0)	79
Normal	193	(38,7)	306	(61,3)	499

La frecuencia de visualización de espiroquetas identificados mediante frotis fue significativamente mayor en heces blandas (62%) en relación con heces normales (38,7%), con una razón de prevalencias de 1,60 (IC 95% 1,31-1,97).

La frecuencia de aislados identificados como *Brachyspira* spp fue significativamente mayor en heces blandas (40,5%) en relación con heces normales (26%), con una razón de prevalencias de 1,55 (IC 95% 1,15-2,11).

Se obtuvieron 162 cultivos positivos y todas las especies de *Brachyspira* que se identificaron fueron débilmente β hemolíticas, 17,3% fueron *B. innocens*, el 25,9% *B. murdochii* mientras que el restante 56,8% de los aislados no fueron identificados.

2.4.2. Aislamiento bacteriológico e identificación de especies

Todas las muestras fueron sembradas en ASB e incubadas a 42 °C por 7 días. Antes de abrir la jarra se verificó la anaerobiosis a través del indicador de anaerobiosis observando la coloración blanca del mismo, eso indica que la atmosfera en anaerobiosis contiene menos de 1% de O₂. En aquellas placas en que se observaron zonas de crecimiento “tipo *Brachyspira*” en avanzada, es decir con fuerte o débil β hemólisis que seguían la línea de siembra y no de colonias, tipo oleada (Fig. 2.2) con o sin pátina, se realizó un frotis, se coloreó con Gram, se observó en microscopio óptico y si había espiroquetas se subcultivaron en agar sangre-TSA.

Fig. 2.2: Placa de agar sangre TSA comparando tipo de hemólisis. A: zonas con fuerte β hemólisis de un aislado de *B. hyodysenteriae*, B: zonas con débil β hemólisis de un aislado de *B. pilosicoli*.



Se obtuvieron 290 (18,6%) cultivos positivos a espiroquetas, todos fueron subcultivados en agar sangre-TSA para su purificación para poder realizar las pruebas bioquímicas, PCR, PCR-RFLP y/o secuenciación.

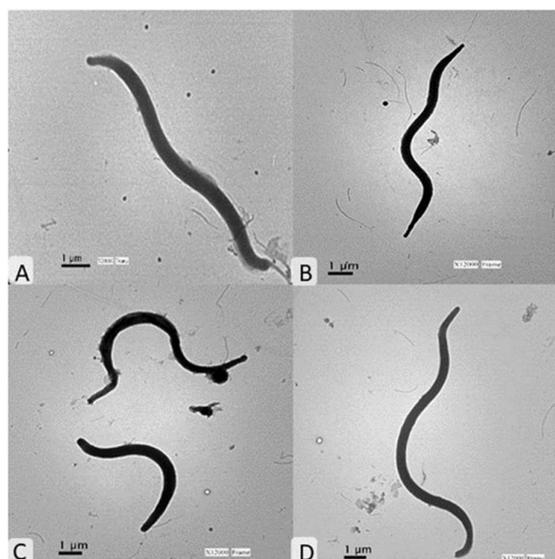
Se purificaron 99 cepas, la purificación requirió entre 1 y 12 subcultivos. El 76.2% de las cepas se lograron purificar entre 2 a 5 pases (subcultivos), lo que llevó entre 15 y 27 días. Pero para el 95.2% de las cepas puras el tiempo para determinar la especie osciló entre 11 y hasta 43 días.

Los aislados puros se guardaron en caldo CC, con y sin SFB, o en sangre desfibrinada, a todos se les agregó glicerol al 15% y se mantuvieron a -70°C. Algunos aislados fueron preservados en papel de filtro y refrigerados a 4°C.

2.4.2.1. Identificación por pruebas bioquímicas

Se identificaron 61/99 cepas puras, entre las que se reconocieron las especies *B. pilosicoli* (4), *B. hyodysenteriae* (4), *B. murdochii* (14) y *B. innocens* (39). Los 38 aislados restantes fueron dudosos por lo que los asignamos como *Brachyspira* spp. Mediante microscopio electrónico se pudo ver la morfométrica de cada especie (Fig. 2.3).

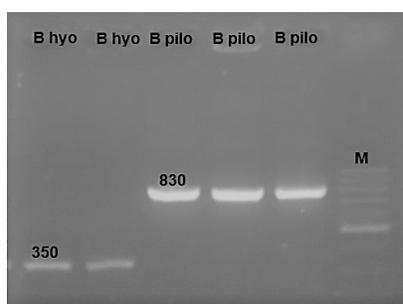
Fig. 2.3: Morfología externa de las distintas especies de *Brachyspira* observadas por microscopía electrónica de transmisión, técnica tinción negativa. A: *B. hyodysenteriae* (granja H11) 20.000x, B: *B. pilosicoli* (granja endémica) 12.000x, C: *B. innocens* (granja 22) 12.000x, D: *B. murdochii* (granja 20) 12.000x. Se puede observar en A, C y D que los extremos de la espiroqueta son romos, mientras que en B son puntiagudos.



Las cuatro cepas identificadas como *B. hyodysenteriae* pertenecían a la misma granja, todas presentaron fuerte β hemólisis y resultaron negativas a la prueba de indol.

A las cepas identificadas como *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* por las pruebas bioquímicas se les realizó una Dúplex PCR de confirmación. (Figura 2.4). Otra cepa fuertemente hemolítica, sospechosa de *B. hyodysenteriae* por pruebas bioquímicas, se confirmó por Dúplex-PCR.

Fig. 2.4: Dúplex PCR especie específico. B. hyo: *B. hyodysenteriae*. B. pilo: *B. pilosicoli*. M: marcador de peso molecular. 100-1000 pb



2.4.2.2. Identificación por PCR-RFLP

En aquellos aislados en que las pruebas bioquímicas dieron resultados dudosos se realizó una PCR-RFLP y se identificaron 21 aislados de *B. murdochii*.

2.4.2.3. Identificación por secuenciación

Los aislados que no fueron identificados ni por pruebas bioquímicas ni por PCR-RFLP, además de los aislados preservados en papel de filtro se les realizó una PCR para amplificar el gen *nox* y luego secuenciar. También se tuvo especial interés en procesar aquellos aislados que habían crecido como cepas fuertemente hemolíticas, aún si ya tenían identificación de especie por las otras técnicas. Se analizaron 69 secuencias y se identificaron 41 cepas más, 9 pertenecientes a *B. innocens*, 30 a *B. murdochii* y 2 cepas a *B. pilosicoli*.

De las 61 especies de *Brachyspira* identificadas por pruebas bioquímicas, entre las cuales se encontraban cepas fuertemente hemolíticas, 20 fueron confirmadas entre las cuatro especies encontradas mediante la secuenciación del gen *nox* (Fig. 2.5). Una cepa de *B. hyodysenteriae*, identificada por pruebas bioquímicas y Dúplex PCR, mediante la secuenciación se confirmó que era *B. murdochii* y otra cepa que por pruebas bioquímicas resultó *B. innocens*, a la secuenciación se identificó como *B. murdochii*. Una cepa

identificada como *B. pilosicoli* por D-PCR, a la secuenciación se identificó como *B. innocens*. Mientras que cinco cepas de *B. murdochii* identificadas por RFLP-PCR, fueron confirmadas por secuenciación. Un mismo aislado fue secuenciado dos veces, primero cuando tenía un solo pasaje (p1) resultó en *B. innocens* con un 99% de identidad, pero luego se secuenció en el pasaje 7 y resultó en *B. murdochii* con un 100% de identidad en el GenBank.

Fig. 2.5: Secuencia del gen *nox* de un aislado de *B. murdochii* en formato FASTA

>21996-29-

```
CAGAGCTCTTGAATATACAGTAGCACAGTCTCCTATAGCAAATACATTAGGATCTTTTGTAGTTTTTC
ATAGTAGTATCTACTTTTATAGCACCATTAGGCAAAGTTTCTAAATAATCTTTGTAAAGTTTCGCTATTAGGTC
TGAAACCAACAGACATAACTACCATATCTACATCATAAGAACCTTTGtcaGTAACAACCTTTTAACTCTGTC
ATCACCTTCAAATTTTTAACAGTTTCGCCTAAATGCATTTCTATACCAGCTTCTTTGATTCTTTTTTCAGCTTC
ATCAGTTATTTCTTTATCAAAGTAGTTAGCCATAACTCTAGGCATAGCTTCCATTAAGATAACTTCTTTGCCA
TGATTTTTGAATGCTTCTATAAGTTCAACACCTATGTAACCAGCACCAACTACCATAACTTTTTTtACTTCTGG
TTTAGCTATTTTCATCAATAATTTcTGACCTTGCTGGAATAGTTTAGAGAAGAAtATACCTTTTTTAAGTCCGT
ATTCAGTACCTTCTGCATTAAACCTTCTATAGGAG
```

También se secuenciaron todas las cepas de *B. hyodysenteriae* disponibles que se analizarán para los factores de virulencia y MLST, confirmando la especie.

En resumen, se pudieron identificar 128 cepas entre las especies mencionadas.

Muestras positivas (método)			
Pruebas Bioq.	PCR*	Secuenciación	Brachyspira spp
61	23	44	166

*Se incluyen las D-PCR y PCR-RFLP

2.4.3. Prevalencia de *Brachyspira* spp en granjas porcinas

De las 53 granjas muestreadas en este estudio, en el 75,5% (IC 95% 62,9-87,99) se aislaron EI y en cada una de las provincias muestreadas hubo al menos una granja positiva. En la provincia de Córdoba se observó la mayor proporción de muestras positivas y las más altas prevalencias intra-prediales (Tabla 2.10).

Tabla 2.10: Prevalencia provincial e intrapredial de *Brachyspira* spp en granjas de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Juan, San Luis y La Pampa durante el período 2010-2013.

Provincia	Granjas visitadas	Granjas positivas (%)	Muestras de materia fecal	Muestras positivas (%)	Prevalencia intra-predial (rango)
Buenos Aires	17	10 (58,8)	510	102 (20)	20 (0-60)
Córdoba	22	20 (90,9)	637	130 (20,4)	20,2 (0-62,1)
Entre Ríos	2	2 (100)	60	10 (16,7)	16,7 (10-23,3)
La Pampa	1	1 (100)	30	3 (10)	10 (10-10)
San Juan	2	1 (50)	60	3 (5)	5 (0-10)
San Luis	1	1 (100)	30	6 (20)	20 (20-20)
Santa Fe	8	5 (62,5)	229	36 (15,7)	15,2 (0-37,9)

Las categorías de granjas visitadas de acuerdo con el número de madres fueron establecidas según los cuartiles en menos de 300, entre 301 y 500, entre 501 y 1000 y mayores de 1000 madres. La prevalencia de *Brachyspira* spp fue menor para la categoría con granjas de mayor tamaño (Chi Cuadrado Pearson = 7,36, valor p = 0,0613) (Tabla 2.11).

El porcentaje promedio de cultivos positivos a *Brachyspira* spp dentro de cada granja fue de 18.5% (DS = 17.3, rango = 0-62.1). Las granjas con mayor prevalencia intrapredial (50-62%) tenían entre 680 a 1200 madres (n=4) (Tabla 2.12).

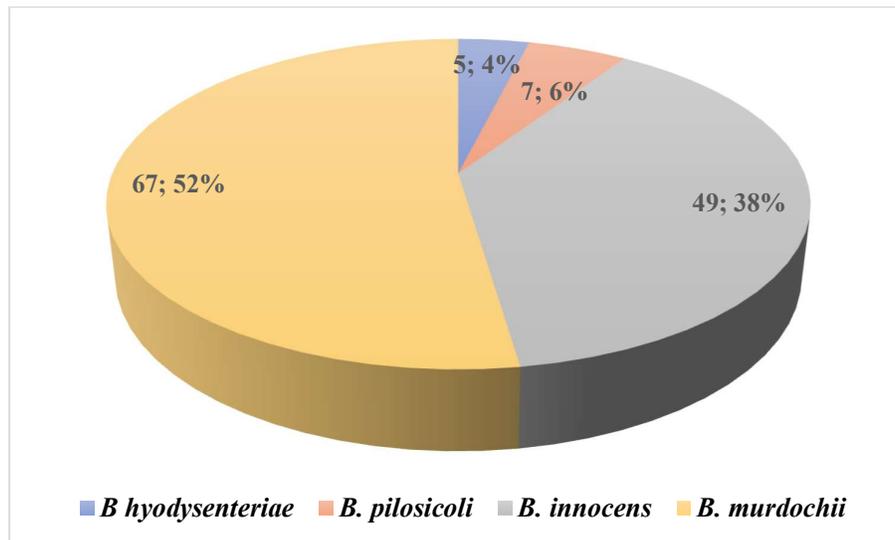
Tabla 2.11: Prevalencia predial e intra-predial de *Brachyspira* spp según el tamaño de la granja de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Juan, San Luis y La Pampa durante el período 2010-2013.

Tamaño de granja (madres)	N	Granjas positivas (%)	Muestras de materia fecal	Promedio de muestras/granja (rango)	Muestras positivas (% del total)	Aislamientos identificados (% de muestras positivas)	Promedio de muestras positivas/granja (rango)
≤ 300	18	15 (83,3)	524	29,11 (24-30)	97 (18,6)	47 (48,5)	18,41 (0-43,3)
301-500	11	9 (81,8)	323	29,36 (23-30)	66 (20,4)	26 (39,4)	20,27 (0-46,7)
501-1000	16	13 (81,3)	479	29,94 (29-30)	101 (21,1)	44 (43,6)	21,18 (0-62,1)
>1000	8	3 (37,5)	230	28,75 (20-30)	26 (11,3)	11 (42,3)	10,84 (0-60)

En 124 de los 290 aislamientos se pudieron identificar las especies de *Brachyspira*. En total se identificaron 4 especies de *Brachyspira*, siendo *B. murdochii* la más frecuente (Fig. 2.6). En 22,5% (9/40) de las granjas positivas se encontró presente más de una especie de *Brachyspira* en la materia fecal. Mientras que en ocho granjas positivas no se pudo identificar ninguna especie del género *Brachyspira*, sobre un total de 30 cultivos positivos.

Las especies patógenas *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* se encontraron con baja prevalencia (1,9 y 7,5% respectivamente), mientras que para *B. innocens* y *B. murdochii* la misma fue del 34 y 39,6% sobre las granjas estudiadas, respectivamente.

Fig. 2.6: Especies de *Brachyspira* identificadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, San Juan, San Luis y La Pampa durante el período 2010-2013.



En la granja donde se identificó *B. hyodysenteriae* también estaban presentes *B. innocens* y *B. murdochii* (Tabla 2.12). El porcentaje de muestras positivas a *B. hyodysenteriae* fue del 16,7% mientras que para el total de las especies de *Brachyspira* en la granja fue de 43,3%.

En 4 granjas se identificaron *B. pilosicoli* (Tabla 2.12). En la que estaba como única especie la prevalencia intragranja de *Brachyspira* fue del 16,7%, mientras que en las otras 3, junto a *B. murdochii* y/o *B. innocens* fue superior, rango= 23-46%.

Brachyspira innocens y *B. murdochii* fueron las cepas más frecuentemente aisladas, entre las granjas positivas (n=40) las mismas fueron encontradas en 45 y 53%,

respectivamente, y entre los aislamientos identificados (n=128) estas cepas representan el 38,3% y 52,3%, respectivamente (Fig. 2.6).

Tabla 2.12: Distribución de especies de *Brachyspira* como única o combinada con otras especies por granja y por provincia durante el período 2010-2013.

Especies de <i>Brachyspira</i> encontradas	N° Granjas (%)	Provincias		
<i>B. pilosicoli</i>	1 (2.5)	Córdoba		
<i>B. innocens</i>	10 (25)	Buenos Aires		
		Córdoba		
		La Pampa		
<i>B. murdochii</i>	12 (30)	Buenos Aires		
		Córdoba		
		Santa Fe		
		San Juan		
		San Luis		
<i>B. pilosicoli</i> <i>B. murdochii</i>	1 (2,5)	Santa Fé		
<i>B. murdochii</i> <i>B. innocens</i>	5 (12,5)	Buenos Aires		
		Córdoba		
		Santa Fe		
<i>B. hyodysenteriae</i> <i>B. murdochii</i> <i>B. innocens</i>	1 (2,5)	Córdoba		
		<i>B. pilosicoli</i> <i>B. murdochii</i> <i>B. innocens</i>	2 (5)	Buenos Aires
		Córdoba		
Sin identificar	8 (20)	Córdoba Entre Ríos		

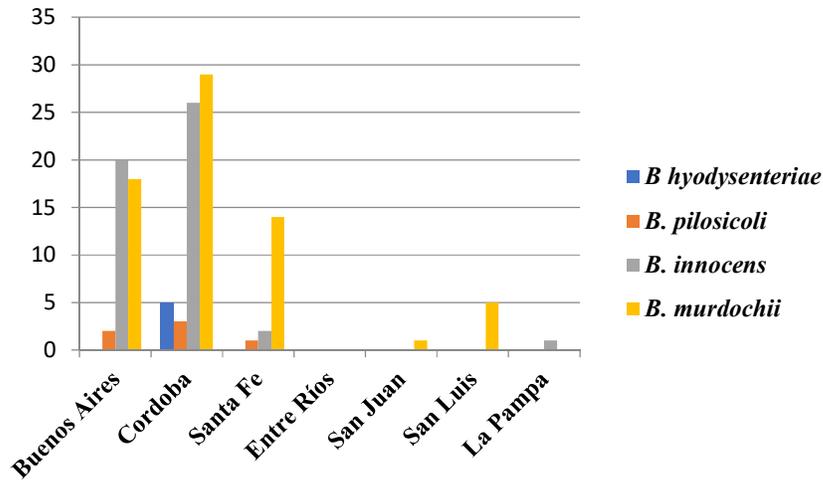
Brachyspira innocens se encontró en 18 granjas, en 10 de éstas como única especie, con un rango de frecuencia de aislamientos intrgranja entre 3,3 y 62,1%. En la Tabla 1.12 se observa la combinación con otras especies dentro de una misma granja.

Brachyspira murdochii se identificó como única especie en 12 granjas con un rango de frecuencia de aislamientos intrgranja entre el 10 al 50%. En las granjas que estuvo junto a otras especies el porcentaje de muestras positivas intrgranja tuvo un rango entre 16,7-50%.

No se identificó *B. intermedia* por ningún método diagnóstico utilizado en este estudio.

En la Figura 2.7 se puede observar la distribución de las especies de *Brachyspira* por provincia y el número de aislados identificados en cada una de ellas..

Fig. 2.7: Número de especies aisladas de *Brachyspira* y distribución por provincia.



2.4.4. Preservación de los aislados

Se guardaron 96 cepas en los distintos procedimientos detallados anteriormente (CC, TSB, más suero fetal bovino y glicerol) y conservados a -70 °C y 136 en papeles filtro (Tabla 2.15).

Tabla 2.13: Número de *Brachyspira* spp guardadas a -70 °C y en papel de filtro refrigeradas.

Especie guardada	-70°C	Papel de filtro refrigerado
<i>B. hyodysenteriae</i>	3	-
<i>B. pilosicoli</i>	4	3
<i>B. innocens</i>	40	32
<i>B. murdochii</i>	50	39
<i>Brachyspira. spp</i>	5	62

2.5. DISCUSION

Las enfermedades producidas por distintas especies de *Brachyspira*, han presentado cambios en los últimos años. Por un lado, han surgido nuevas especies, como *B. suanatina* y *B. hampsonii* que producen un cuadro indistinguible de DP; por otro lado, fue también relevante la reaparición de esta enfermedad en países que la habían controlado desde hace muchos años, quizás debido a la resistencia antimicrobiana, como así también la confirmación de especies consideradas no patógenas como *B. murdochii*, *B. innocens* y *B. intermedia* en tejidos lesionados. Todos estos puntos indican que debemos estar atentos tanto en las metodologías diagnósticas como para su control, ya que el género *Brachyspira* demuestra una variabilidad que lleva a que la vigilancia deba ser de rutina.

2.5.1. Prevalencia de granjas infectadas por distintas especies del género *Brachyspira* y su comparación con datos mundiales

Este estudio se realizó en la zona de mayor producción de cerdos de Argentina, en donde se concentran el mayor número de cerdas en confinamiento y de la cual no había datos previos sobre prevalencia de *Brachyspira* spp. También se incluyeron 4 granjas de provincias vecinas con menor número de madres productivas, es decir se abarcó toda la zona central del país. En todas las provincias incluidas en este relevamiento se aislaron *Brachyspira* spp en muestras de materia fecal, llegando casi al 76% de prevalencia en granjas confinadas con más de 200 madres en producción. Los trabajos publicados de distintas partes del mundo sobre prevalencia de *Brachyspira* spp. en granjas están enfocados hacia las especies patógenas, solo algunos pocos informan sobre todas las especies. En el año 2000, Stege *et al.*, encontraron sobre 79 granjas dinamarquesas, un 50% de granjas positivas a espiroquetas, entre otros patógenos intestinales. En Brasil, Barcellos *et al.* (2003) encontraron espiroquetas en 24 (63.2%) de 38 granjas muestreadas en el estado de Rio Grande do Sul, pero en 22 granjas que no medicaban en la ración, el 100% tenían espiroquetas. En México sobre un total de 73 granjas de las regiones con mayor producción porcina en 16 (21.9%) se aislaron cepas con fuerte y débil hemólisis (Corona-Barrera *et al.*, 2009).

La prevalencia obtenida en nuestro estudio es mayor a lo encontrado en los países mencionados en el párrafo anterior y debemos considerar que las muestras fecales no sólo pertenecían a animales con diarrea. Resultados similares fueron obtenidos por Jacobson *et al.* (2005), sobre 105 granjas suecas el 80% presentaron espiroquetas, pero un 18-48% de los animales positivos tenían diarrea. En el estudio realizado por Biksi *et al.* (2007) sobre 31

granjas de Hungría, en animales de terminación con y sin diarrea pero que no medicaban con antibióticos durante la semana del muestreo, se encontró en el 45,16% presencia de *B. hyodysenteriae* mientras que para *B. pilosicoli* la prevalencia fue del 61,29%.

La mayoría de los estudios publicados sobre la prevalencia de *Brachyspira* se han basado en el muestreo dirigido de los cerdos con diarrea clínica en las granjas (Patterson *et al.*, 2013). Carvajal *et al.* (2006) encontraron una prevalencia del 30,2% de granjas españolas positivas a *B. hyodysenteriae* con cerdos con diarrea. En Brasil no se detectó ninguna granja positiva para *B. hyodysenteriae* en establecimientos que medicaban y fue del 6,25% la prevalencia para *B. pilosicoli*. Aunque resultados muy distintos encontraron en granjas que no medicaban con un 31,8 y 45,5%, respectivamente, para ambos patógenos (Barcellos *et al.*, 2003). Una prevalencia similar a nuestro trabajo (7,5%) sobre granjas de ese país también se encontró para *B. pilosicoli*. Fue del 4,36% entre 46 predios con historia de diarrea, pero ninguna fue positiva a *B. hyodysenteriae*. El estudio se realizó en el estado de Minas Gerais, donde se hizo un relevamiento de patógenos intestinales (Viott *et al.*, 2013). En granjas suecas que no recibían promotores de crecimiento ni medicación, la prevalencia de granjas positivas para *B. pilosicoli* fue del 32,4% (Jacobson *et al.*, 2005). Anteriormente, Møller *et al.* (1998) sobre 72 granjas con antecedentes diarreicos encontró un 14% de granjas con *B. hyodysenteriae* y 39% con espiroquetas débilmente hemolíticas, pero en granjas sin problemas de diarrea el 9% tenía *B. hyodysenteriae* y el 19% con las otras espiroquetas, en cerdos en desarrollo. En nuestro país, en el trabajo realizado por Illanes *et al.* (2008a) encontraron prevalencias del 8,3 para *B. hyodysenteriae* y del 16,6% para *B. pilosicoli* de un total de 24 granjas, con una edad de los animales muestreados menores a los de nuestro trabajo (60, 100 y 150 días de vida). En otro estudio realizado poco tiempo atrás, permitió detectar la presencia de *B. hyodysenteriae* en 2/8 granjas entre animales con signos clínicos, mientras que en los animales sin diarrea no se encontró ninguna *Brachyspira*, cuando se realizó una Dúplex PCR buscando también *B. pilosicoli* (Perez, 2016).

Tanto *B. hyodysenteriae* como *B. pilosicoli* se han encontrado en granjas con y sin diarrea (Viott *et al.*, 2013; Carvajal *et al.*, 2006; Møller *et al.*, 1998), pero parecería que la medicación con antibióticos juega un papel importante para su detección (Biksi *et al.*, 2007; Barcellos *et al.*, 2003), como así también la metodología utilizada para encontrarlas (bacteriología, PCR).

También la edad de los animales en que se realizó el muestreo podría influir en los resultados de prevalencia. En todas las etapas de la producción porcina, salvo en los lechones lactantes, se ha encontrado que los cerdos eliminan *Brachyspira* spp por heces (Patterson *et*

al., 2013). *Brachyspira hyodysenteriae* produce la DP en cerdos en desarrollo-terminación, mientras que *B. pilosicoli* afecta a cerdos más cercanos al destete, pero también en desarrollo y terminación podría haber, incluso, presentaciones subclínicas que podrían disminuir la tasa de crecimiento (Hampson, 2012).

Nuestro estudio se realizó en granjas que no necesariamente tenían problemas de diarrea, pero al encontrarnos con la presencia de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* podría ocurrir que la DP o la EIP se hayan presentado en edades anteriores al muestreo, en forma subclínica o estén controladas por la medicación de antibióticos, que es una práctica de rutina en nuestras granjas. Es común medicar a los animales en las etapas de desarrollo y terminación, debido a problemas respiratorios y/o digestivos, hasta poco tiempo antes de salir hacia la faena. En animales en desarrollo se encontró colitis, ante la presencia de *B. pilosicoli*, *B. intermedia* y *B. innocens* junto a otros agentes bacterianos que podrían colaborar en el cuadro al igual que lo observado con *B. murdochii* (Komarek *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010). Es decir, todas las especies de *Brachyspira* tienen antecedentes de patogenicidad en animales más jóvenes a los muestreados en este trabajo, pero la alta prevalencia (76%) y la variedad de especies encontradas a una edad más avanzada nos permite suponer que quizás el uso de antibióticos o el no alcanzar un número significativo de espiroquetas en el organismo sean la causa de no sospechar que tenemos problemas entéricos por estas bacterias.

2.5.2. Caracterización de las granjas infectadas con distintas especies del género *Brachyspira*

El tamaño de la granja, de acuerdo con el número de madres en producción, no presentó diferencias significativas en cuanto a la infección por *Brachyspira* spp. En las provincias muestreadas hay un total de 20 granjas con más de 1000 madres (Promedio=2000), que corresponden al 7% del total de granjas, en nuestro estudio este segmento de granjas corresponde al 15% de las granjas estudiadas y fue donde se observó un menor número de granjas positivas y en algunas de ellas también se obtuvo el mayor porcentaje de muestras positivas (60%). En los últimos años la producción de Argentina se ha incrementado por aumento del número de madres por granja y en este tipo de producción a gran escala, las medidas de bioseguridad son más estrictas (higiene, desinfección, control de roedores, etc.) por lo que se podría suponer que hay más controles teniendo en cuenta la inversión y los riesgos en juego.

En todas las categorías de tamaño evaluadas hubo granjas positivas y negativas, con una mayor prevalencia en aquellas que tenían menos de 1000 madres y con mayor frecuencia de muestras positivas. En las granjas que tenían más de 500 madres fue mayor el rango de prevalencia intragranja, mostrando valores entre 0-62,1%, evidenciando una mayor diseminación de *Brachyspira*. Decíamos anteriormente que la baja prevalencia en granjas con más de 1000 madres se podía deber a mayores medidas de bioseguridad, pero la alta frecuencia de eliminación de bacterias debería estar influida por la falta de medicación en esta etapa o falta de control de roedores, entre otros factores que podrían colaborar en estas producciones intensivas (Backhans *et al.*, 2011).

Otros autores indican la presencia de *Brachyspira* spp en granjas de distinto tamaño, *B. pilosicoli* fue detectada en una granja que tenía entre 101-500 madres al igual que en otra que tenía más de 500 hembras en ambos casos junto a *L. intracellularis* (Viott *et al.*, 2013). En un estudio sobre 105 granjas suecas, con más de 100 madres (rango 96-600), encontraron *B. pilosicoli*, *B. innocens/B. murdochii* y *B. intermedia*, en cerdos de nueve semanas de edad (promedio) con prevalencias del 14 al 78% para las distintas especies (Jacobson *et al.*, 2005)

2.5.3. Asociación entre visualización de espiroquetas en frotis, consistencia fecal y detección de *Brachyspira* spp

Se conoce que la bacterioscopía se puede realizar como un recurso rápido y presuntivo de la presencia de EI. La visualización de espiroquetas en frotis de materia fecal ha sido reportada por Olson y Fales (1983) como de alta correlación con el aislamiento de *Brachyspira* en casos de disentería porcina. Esta diferencia con nuestro trabajo, quizás se deba a que dichos autores trabajaron exclusivamente con casos clínicos producidos por *B. hyodysenteriae* donde la eliminación de espiroquetas por materia fecal suele ser alta.

La bacterioscopía con tinción de Gram, por ser una técnica práctica, económica y rápida podría ser utilizada como prueba de tamizaje; sin embargo, al comparar ésta con el aislamiento positivo en granjas donde no está probada la importancia de *Brachyspira*, podría no ser conveniente utilizar esta sola metodología para descartar la presencia de *Brachyspira*, ya que el desempeño para detectar muestras positivas fue bajo, sólo un 26% de frotis con espiroquetas dieron aislados de *Brachyspira* spp. Pero hay que destacar que ante la ausencia de espiroquetas en frotis hay un 85% de probabilidad de que no haya presencia de ellas, valores similares fueron obtenidos por Patterson *et al.* (2013).

Ante la observación de frotis con espiroquetas donde el cultivo fue negativo, podría deberse a que formas espiroquetoides no pertenecientes al género *Brachyspira*, podrían ser

visualizadas por el mismo, o que, siendo pertenecientes al género, no estén capacitadas para reproducirse cuando fueron sembradas (Patterson *et al.*, 2013), las EI son consideradas como fastidiosas, difíciles de trabajar en el laboratorio ya que no siempre crecen.

Sobre las 20 granjas donde se registró la consistencia se pudo comprobar que el aislamiento de *Brachyspira* spp como la visualización de espiroquetas fueron posible tanto en heces blandas como de consistencia normal. Así, debemos destacar que fue 1,60 y 1,55 veces más probable encontrar espiroquetas en frotis y aislar *Brachyspira* spp, respectivamente, en heces blandas en comparación con heces de consistencia normal. No debemos descartar que en esa materia fecal blanda podrían estar presentes otros agentes patógenos que afectan a esta edad como *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp, parásitos, etc., que no fueron buscados en este trabajo. Se identificaron *B. innocens* y *B. murdochii*, como lo encontrado en otros trabajos que identificaron cepas débilmente hemolíticas en muestras de animales con sintomatología clínica (Clothier *et al.*, 2011; Osorio *et al.*, 2013), sin embargo, en cerdos que no tenían diarrea, aunque estas especies estaban presentes, se observó que habían provocado lesiones superficiales en el intestino grueso (Wendt *et al.*, 2008). Pero también, una diversidad de *Brachyspira* spp fueron aisladas de cerdos sanos (Patterson *et al.*, 2013). Es decir que la presencia de *Brachyspira* spp débilmente hemolíticas, tanto en materia fecal blanda como normal no predice su patogenicidad, pero es importante conocer si están presentes en la granja ya que suponen un riesgo potencial de enfermedad, ante un crecimiento exacerbado ayudado por otros factores.

2.5.4. Descripción de las especies de *Brachyspira* encontradas

En las muestras fecales fueron identificadas *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. murdochii* y *B. innocens*, ninguno de los métodos utilizados permitió identificar *B. intermedia*. Incluso la secuenciación de aislados que presentaron fuerte o dudosa β hemólisis hicieron descartar el hallazgo de las nuevas especies identificadas como *B. suanatina* y *B. hampsonii*.

En las siete provincias incluidas en el muestreo se encontraron *Brachyspira* spp, La especie con mayor distribución en granjas de la región central del país fue *B. murdochii*, se la identificó en cinco provincias, mientras que a *B. innocens* en cuatro. Sin entrar en mayores detalles, podríamos decir que estas especies se presentaron tanto en regiones húmedas como en áridas. Mientras que *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* sólo en regiones húmedas.

La prevalencia de *B. hyodysenteriae* fue del 1,9% de granjas estudiadas. Solo en una granja se aisló *B. hyodysenteriae*, siendo todas las cepas negativas a la prueba de indol. Si

bien, están descriptas este tipo de cepas en distintos países (Hommeze *et al.*, 1998; Fellström *et al.*, 1999, Hidalgo *et al.*, 2010), la identificación de especie se confirmó con la realización del Dúplex- PCR y la secuenciación. El bajo porcentaje encontrado, incluso menor al 8.3% de un relevamiento anterior realizado en nuestro país (Illanes *et al.*, 2008a), quizás es debido a que las muestras eran de animales con y sin diarrea, en etapa de terminación y, si hubo presentaciones clínicas, se pudo haber medicado antes del muestreo. De hecho, en varios casos clínicos de disentería porcina hemos aislado cepas de *B. hyodysenteriae* de distintas granjas (Carranza *et al.*, 2012), de igual forma que en dos granjas con problemas de diarrea se identificó *B. hyodysenteriae* recientemente (Pérez, 2016), aunque podría haber granjas con esta especie en animales aparentemente sanos (Hampson *et al.*, 2016). En Brasil también se encontró una baja frecuencia de *B. hyodysenteriae* (1,4%) pero de animales con diarrea provenientes de varias regiones con importante producción de ese país (Baccaro *et al.*, 2003). En otro sentido, en un trabajo realizado por Clothier *et al.* (2011) sobre 79 cepas obtenidas de animales con diarrea, el 30.4% eran *B. hyodysenteriae*, mientras que las otras especies de *Brachyspira* estaban en menor proporción. La prevalencia intragránja para *B. hyodysenteriae* fue del 16.7%, este porcentaje es mayor al encontrado por Pérez (2016) en dos granjas argentinas con un 7,4% y 10,4% en animales con diarrea en cada granja, respectivamente. Pero la prevalencia intragránja fue aún mayor, también en un muestreo de animales con diarrea donde Carvajal *et al.*, (2006) encontraron el 50,2% de las muestras fecales positivas. Mientras que un 12,37% en muestras fecales pooleadas se encontró en otro trabajo en condiciones similares sobre un total de 31 granjas (Biksi *et al.*, 2007). La identificación de *B. hyodysenteriae* a partir del cultivo de la materia fecal podría ser una de las causas de una mayor detección con respecto a las PCR utilizada en estos otros estudios.

Brachyspira pilosicoli tuvo una prevalencia del 10% sobre granjas infectadas, con una frecuencia de presentación muy baja (7 aislados). Baccaro *et al.* (2003) encontraron en un 1% de muestras diarreicas la presencia de *B. pilosicoli* sobre 70 granjas de la zona de mayor producción de Brasil y la presencia de *B. hyodysenteriae* también fue baja. Ellos reconocen que el bajo porcentaje de presentación se puede deber al uso de antibióticos, del mismo modo el 5,2% encontrado por Carvajal *et al.* (2006). Quizás, Biksi *et al.* (2007) encontraron una prevalencia del 28,49% de muestras positivas porque, al momento del muestreo, no recibían antibióticos.

Acerca de estas variaciones sobre las prevalencias, no solo se debe tener en cuenta la administración de antibióticos, sino que además la estructura y el manejo de la producción,

como así también los protocolos de muestreo y los métodos de laboratorio para la detección de *Brachyspira* spp. podrían variar los resultados (Carvajal *et al.*, 2006).

La prevalencia intragranja de *B. pilosicoli* en dos granjas fue 2,4 y 12,2%, respectivamente, en cerdos con y sin diarrea en desarrollo terminación (Oxberry y Hampson, 2003), estos valores son menores que los encontrados en este trabajo. Varios factores podrían influir en estos porcentajes como la presencia de otras especies de *Brachyspira*, el tamaño muestral, o la presencia de diarrea, mientras que un 23,9% encontraron Carvajal *et al.*, (2006).

Las especies más prevalentes fueron *B. innocens* y *B. murdochii*. Los registros obtenidos para *B. innocens* mostraron un 34% de granjas positivas a esta especie y en un 19% como única especie presente, estos resultados son similares a los encontrados por Stege *et al.* (2000) donde esta espiroqueta estuvo presente en el 34.2% de las granjas y en un 19%, respectivamente, de un total de 79 granjas dinamarquesas y cuyos animales muestreados en desarrollo no presentaban diarrea. El porcentaje de *B. murdochii* fue algo mayor al encontrado para *B. innocens*. Algunos trabajos indican que *B. murdochii* fue la más prevalente entre las *Brachyspiras* débilmente hemolíticas encontradas sobre 4 estados de Austria (Komarek *et al.*, 2009). También fue la más frecuente, después de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, entre animales con enfermedad clínica (20/79 cepas testeadas) según lo descrito por Clothier *et al.* en el 2011, sobre granjas de 10 lugares de EE. UU. En el trabajo realizado por Osorio *et al.* (2013) sobre 67 cepas débilmente hemolíticas, recuperadas de animales con diarrea, entre los años 2001 y 2009, determinaron que la especie más prevalente fue *B. murdochii* con un 46.6% y un 38.8% para *B. innocens*. Sin embargo, sobre un total de 2050 cepas de *Brachyspira* identificadas durante 3 años en el norte de Alemania, *B. hyodysenteriae* fue la más prevalente con un 25%, mientras que *B. pilosicoli* abarcó el 5% de los aislados y, entre las no patógenas, *B. innocens* se presentó con 24% y un 21% para *B. murdochii* (Rohde y Habighorst-Blome, 2012).

Ante el desarrollo de fuerte β hemólisis en algunas cepas que se identificaron como especies débilmente hemolíticas o que no se habían identificado, se realizó la secuenciación del gen *nox*, para descartar las nuevas especies *B. suanatina* y *B. hampsonii*. Al no identificarse estas nuevas especies quizás como todos estos aislados se cultivaron en las mismas condiciones, es probable que las diferentes propiedades hemolíticas observadas se deben a una diferencia genética subyacente y no a una característica asociada con diferentes condiciones de cultivo (Patterson *et al.*, 2013).

2.5.5. Descripción de cultivos mixtos

Es de destacar que en 9 granjas se encontró más de una especie y, excepto una granja, todas tuvieron en común la presencia de *B. innocens*. Otras investigaciones manifiestan la simultaneidad de especies en una granja, algunas identificadas en una misma muestra fecal (Rohde *et al.*, 2002; Råsbäk *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010, Clothier *et al.*, 2011). En nuestro trabajo se detectaron distintas especies en una misma granja, aunque solo se encontraron cuatro muestras mixtas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Råsbäk *et al.*, 2006, que no encontraron cultivos mixtos de *B. pilosicoli* y *B. hyodysenteriae* en 200 muestras de cerdos con diarrea. Las infecciones mixtas fueron ocasionalmente por *B. pilosicoli* y *Brachyspira* spp apatógenas, tales como *B. innocens* y *B. intermedia*. Sin embargo, 12 muestras provenientes de diez granjas presentaron ambos patógenos, *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* (Carvajal *et al.*, 2006).

Para Thompson *et al.* (1997), la presencia de *B. innocens* no pareció aumentar el efecto de *B. pilosicoli* en los animales desafiados ni tampoco protegerlos, ya que se recuperó *B. innocens* antes de realizar una descarga con *B. pilosicoli*, indicando que este organismo estaba presente naturalmente en algunos de los cerdos. Pero la presencia de una o más especies de *Brachyspira*, consideradas como no patógenas, podría complicar el diagnóstico de *B. hyodysenteriae* y/o *B. pilosicoli* (Hampson, 2012).

2.5.6. Importancia de la presencia de cepas débilmente β hemolíticas

Varios estudios asocian la infección por *B. innocens* y *B. murdochii* en cerdos con diarrea y colitis catarral con la presencia del agente en el tejido (Jensen y Boye, 2005; Weissenböck *et al.*, 2005; Clothier *et al.*, 2011), incluso con la realización de reproducciones experimentales (Wendt *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010).

Jensen *et al* (2010) encontraron en 2/8 cerdos descargados con *B. murdochii* una colitis catarral leve con un gran número de espiroquetas estrechamente asociadas con la mucosa, lo que sugiere que *B. murdochii* es de baja patogenicidad bajo estas circunstancias. Aunque también *B. pilosicoli*, *B. intermedia* y *B. innocens* fueron encontradas en gran número en varios cerdos con colitis (Komarek *et al.*, 2009). Por lo tanto, el diagnóstico sólo por cultivo de la bacteria de las heces no permitiría inferir la importancia de su presencia porque el método no es cuantitativo. Entonces el uso de métodos cuantitativos como la PCR en tiempo real podría dar respuesta a esta situación. En EE. UU. se encontró que un 70% de las muestras tenían *B. murdochii*, provenientes de animales con diarrea, caracterizando a la presentación clínica como una diarrea mucosa leve a moderada y prolongada, a diferencia

de la diarrea mucohemorrágica severa de las especies más virulentas de *Brachyspira* (Hammer y Gebhart, 2013).

Por ello, la alta prevalencia encontrada de granjas positivas a *B. innocens* y *B. murdochii* plantean la necesidad de nuevos estudios para determinar ese potencial patogénico de estas espiroquetas en cerdos sanos y enfermos, tal lo planteado por Osorio *et al.* (2013) y bajo qué situaciones todos los miembros del género *Brachyspira* lo podrían tener para multiplicarse ampliamente (Weissenböck *et al.*, 2005).

2.5.7. Dificultades para la identificación de especies

Por bacteriología se obtuvieron 290 cultivos positivos y se identificaron por especie a 128 cepas, correspondiendo solo al 44% de los aislados. Acorde al trabajo realizado por Råsbäk *et al.*, (2006), donde el cultivo presentó mayor sensibilidad comparado a la PCR de materia fecal al momento de detectar *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, es que se consideró como positiva a aquellas granjas donde se observó la hemólisis característica en agar y la presencia de formas espiroquetales por tinción, aunque no se haya identificado la especie cultivada. Sin embargo, se conoce que es difícil identificar *Brachyspira* spp si son cultivos mixtos o si se encuentran en baja concentración en las heces (Råsbäk *et al.*, 2005) sobre todo si hay presencia de *Brachyspira* débilmente hemolíticas. Es así como en varias granjas (8) no se logró identificar ninguna especie, quizás porque pocas muestras, dentro de una misma granja, dieron cultivo positivo y con escaso crecimiento, tornándose difícil la multiplicación de ese aislado que impidió su identificación. Sin embargo, en algunas granjas esta misma situación no fue un impedimento y se identificó la especie sin problemas. En otros casos no se pudo purificar la cepa después de reiterados subcultivos, perdiéndose viabilidad. Debemos considerar también la metodología diagnóstica, considerando que la PCR podría ser capaz de identificar mayor número de *Brachyspira* sobre todo si son débilmente hemolíticas y hay más de una especie (Komarek *et al.*, 2009). También la combinación de cultivo de materia fecal seguido de PCR para determinar especie y la secuenciación del gen *nox* permite identificar las *Brachyspira* spp que eliminan cerdos sanos (Patterson *et al.*, 2013)

La realización de las distintas técnicas diagnósticas complementarias permitió la identificación de un mayor número de aislados. Una importante cantidad de aislamientos no pudieron ser identificados por dificultades en el proceso de purificación, quizás a la presencia de más de una especie en la misma muestra, sumado a los resultados inciertos de las pruebas bioquímicas o fenotípicas, como la determinación de la fuerte o débil β hemólisis. Ohya *et al.* (2008), consideran que la identificación de cepas hemolíticas débiles

por las pruebas bioquímicas presenta dificultades por su poca actividad bioquímica o por ser cepas fenotípicamente atípicas y proponen a la PCR-RFLP y a la PCR específica de especie como técnicas necesarias para una correcta identificación. Clothier *et al.* (2011). identificaron cepas fuertemente β hemolíticas, como *B. intermedia* y *B. pilosicoli*, a través de PCR y otra débil hemolítica a una cepa *B. hyodysenteriae*, sugiriendo que estas alteraciones fenotípicas podrían ser evidencias de los cambios en la ecología de *Brachyspira* y de su potencial patógeno. Sin embargo, el aislamiento es un procedimiento necesario ya que permite obtener la cepa y/o evitar la extracción de ADN de la muestra fecal que puede tener inhibidores de la PCR (Jacobson *et al.*, 2004b) y además es costosa.

Varios trabajos mostraron inconvenientes en identificar gran cantidad de aislados, de 156 EI débilmente β hemolíticas, se asignaron 23 aislamientos al grupo III, 47 aislamientos al grupo IV, mientras que 86 cepas no pudieron ser biotipificadas debido al crecimiento débil y a menudo combinado con bacterias contaminantes (Møller *et al.*, 1998). También, Corona-Barrera *et al.* (2009) que, de 67 aislamientos, de 876 cultivos, solo pudo identificar a *B. pilosicoli* de algunos aislados debido a la variación obtenida en las pruebas bioquímicas. En este sentido, Rohde *et al.* en el 2002, consideraron que como hay variaciones conocidas y discrepancias en las descripciones de las especies basadas en pruebas bioquímicas, se hace necesaria la identificación por genotipo. Sin embargo, por PCR Clothier *et al.*, 2011, no pudieron identificar el 15% de los aislados estudiados y podría deberse a alteraciones genéticas en el género o nuevas especies. Pero la combinación de estas técnicas se ha destacado en distintos trabajos, tanto sea con resultados contrapuestos (Råsbäk *et al.*, 2006), o que permitieron detectar cultivos mixtos (Hidalgo *et al.*, 2010), o identificar una nueva especie, como *B. suanatina*, con igual fenotipo que *B. hyodysenteriae* (Råsbäk *et al.*, 2007). Por eso, para Fellström *et al.* (2008), entre otras causas como la heterogeneidad genética y los problemas para identificar ciertas cepas, como *B. intermedia* o la reciente *B. suanatina*, justifican la realización de pruebas bioquímicas junto con sistemas de PCR específicos de especie para mantener una vigilancia de los nuevos genotipos emergentes de *Brachyspira*. La última especie identificada como *B. hamptonii* primeramente fue clasificada como “no tipificable”, ya que las técnicas moleculares utilizadas (Dúplex PCR) no permitían su identificación. De allí a que se realizara un protocolo nuevo de PCR y secuenciación de los genes *nox* y 16S rRNA para estudios filogenéticos y determinar esta nueva especie (Chander *et al.*, 2012, Mirajkar *et al.*, 2016). Pero otras metodologías combinadas para la identificación de *Brachyspira*, en donde en una granja con antecedentes de *B. hamptonii*,

con identificación de especies conocidas, tampoco pudieron identificar todas las especies, indicando lo compleja que es la ecología de *Brachyspira* (Patterson *et al.*, 2013).

Es importante combinar métodos moleculares con cultivo y pruebas bioquímicas para la detección y clasificación de todas las especies patógenas de *Brachyspira* spp (Råsbäk *et al.*, 2007). Aunque posiblemente se necesiten nuevas evaluaciones que permitan mejorar la determinación de especies (Hammer y Gebhart, 2013).

2.5.8. Banco de cepas

Se pudieron preservar 96 cepas a -70 y 136 en papel de filtro. Sin embargo, cada tipo de preservación tiene riesgos con respecto a la recuperación tanto para lograr cultivar como para realizar estudios moleculares directamente en el caso de los aislados guardados en papel de filtro. Otra metodología de preservación a largo tiempo se describe en Stanton (2006) que coloca dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector y sumerge los criotubos en alcohol para lograr un congelamiento uniforme de las células.

La obtención de cepas puras implica mucho tiempo, pero es necesario ya que permite realizar estudios de susceptibilidad microbiana como así también para estudios epidemiológicos a gran escala (Fellström *et al.*, 1999).

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* RECUPERADAS DE GRANJAS DE ARGENTINA

3.1 INTRODUCCIÓN

Distintas cepas de *B. hyodysenteriae* pueden presentar diferentes grados de virulencia y por tanto comportarse como cepas de alta o cepas de baja virulencia. En parte, esto se puede deber a la presencia de un plásmido de 36kb (La *et al.*, 2011) en las cepas de alta virulencia. Por otra parte, la ausencia de algunos genes de localización plasmídica puede reducir el potencial patogénico de las cepas (La *et al.*, 2014, 2016b). Por lo tanto, es probable que genes plasmídicos en *B. hyodysenteriae* estén relacionados con atributos de virulencia que determinen por ej: la colonización del hospedador y/o la expresión de la enfermedad.

Los diferentes serotipos podrían también estar relacionados con los distintos grados de virulencia de *B. hyodysenteriae*. Esto se demostró de forma experimental cuando la cepa de referencia B204 del serotipo 2 fue altamente virulenta en cerdos SPF, a diferencia de cepas de los serotipos 3, 5, 6 y 7 que fueron moderadamente virulentas, mientras que de los serotipos 1 y 4 se mostraron como avirulentas. Sin embargo, estos distintos grados de virulencia podrían deberse a mutaciones espontáneas producidas por pasajes múltiples en el laboratorio (Achacha *et al.*, 1996).

El trabajo realizado por Barth *et al.* (2012) sobre 121 cepas alemanas de campo de *Brachyspira* spp y su comparación con cepas americanas y australianas permitió demostrar distintos genes que codifican factores de virulencia y de estilo de vida de virulencia. Así, el gen *nox* fue detectado en todos los aislados, mientras que la presencia de los genes de las hemolisinas *tlyA* y *hlyA/ACP* en forma simultánea solo fueron encontrados en cepas de *B. hyodysenteriae*, aunque en algunas *Brachyspira* débilmente hemolíticas también estuvo presente el gen *hlyA*. Los genes que codifican a las proteínas de membrana externa *bhlp29.7* y *bhmp39F* estaban presentes en un 58,1% y 97,3%, respectivamente, de los aislamientos de campo de *B. hyodysenteriae*, pero no se encontraron los genes *bhlp17.6* y *bhmp39h*. Estos genes podrían estar involucrados en la adhesión o interacción con células del hospedador. El estudio reveló una alta heterogeneidad genética entre los aislados de *B. hyodysenteriae* de distinta procedencia y no recomiendan la diferenciación de *Brachyspira* fuerte y débilmente hemolíticas por medio de la identificación de sus genes de hemolisinas. Sin embargo, estudios recientes sobre 116 cepas de *B. hyodysenteriae* alemanas revelaron que ocho hemolisinas y la proteína de membrana externa *bhlp29.7* estaban presentes en todas las cepas, mientras *bhlp17.6* y *bhmp39h* no fueron encontrados en ninguna de ellas (Joerling *et al.*, 2018).

Mahu *et al.*, (2016) luego de evaluar las secuencias de siete hemolisinas provenientes de 10 cepas de *B. hyodysenteriae*, las cuales fueron productoras de hemólisis fuerte a casi

ausente, encontraron que una cepa débilmente hemolítica mostró cambios en la secuencia de cinco genes asociados a hemólisis (*tlyA*, *tlyB*, *hemolisina III*, *proteína de activación de hemolisina* y *canal de proteína de la hemolisina III*) que resultaron en sustituciones de aminoácidos, aunque consideraron que son necesarios otros estudios para responsabilizar la hemólisis débil producida por esta cepa a estos cambios genéticos. También, La *et al.* (2016b) encontraron sustituciones de aminoácidos en los genes de la *hemolisina III* y de la *proteína de activación de hemolisina* en cepas débilmente hemolíticas de *B. hyodysenteriae* en comparación con la cepa de referencia WA1, y tuvo una interrupción en el sitio promotor del gen *hlyA*. Además, estos autores atribuyen a que probablemente a esto se deba la debilidad hemolítica fenotípica y una supuesta falta de virulencia.

La tipificación de secuencia de múltiples locus (denominado MLST-*Multi Locus Sequence Typing*) se ha desarrollado como una alternativa para el análisis de la estructura poblacional bacteriana, así como para diferenciar entre cepas. Se utilizan genes que codifican enzimas metabólicas (genes *housekeeping*) porque son genes que están sometidos a una fuerte selección estabilizadora y, por consiguiente, la variación detectada es selectivamente neutra. La utilización de varios *loci* es esencial para lograr la valoración requerida de proporcionar relaciones significativas entre las cepas y es particularmente importante porque los clones se diversifican con la edad, como consecuencia de mutaciones o recombinaciones, y pueden clasificarse incorrectamente si solo se examinaron *loci* individuales. El más simple de estos análisis permite establecer los alelos presentes en cada *locus*, se les asignan números arbitrarios y se construyen dendrogramas a partir de las diferencias por pares en los perfiles alélicos múltiple *locus* por análisis de conglomerados (*clusters*). Una secuencia tipo (ST) se refiere a una combinación única de alelos y mediante un algoritmo de agrupación para determinar las relaciones entre cepas con diferencia entre sus perfiles alélicos. Para especies altamente clonales, las relaciones filogenéticas entre los aislados pueden ser inferido del dendrograma derivado de las diferencias de a pares entre ST e independientemente del árbol consenso construido a partir de las secuencias del gen (Maiden *et al.*, 1998). Estos autores fueron los primeros en realizar este esquema MLST que se puede aplicar a casi todas las especies bacterianas, incluidas aquellas que son difíciles de cultivar. La mayor ventaja del MLST, sobre otros métodos de tipificación molecular, es que los datos de secuencia se pueden compartir entre los laboratorios, entonces se pudo realizar una base de datos global en expansión por especie colocada en un sitio web, lo que permite intercambiar datos de tipificación molecular para epidemiología global a través de Internet, llamado PubMLST (<http://pubmlst.org/brachyspira/>).

En el género *Brachyspira* el primer trabajo lo realizó Råsbäk *et al.* (2007), sobre un análisis de 8 genes para la identificación de especies de *Brachyspira* y la determinación de las relaciones entre las cepas individuales y las especies del género. Las enzimas y los genes que las codifican seleccionados fueron: alcohol deshidrogenasa (*adh*), fosfatasa alcalina (*alp*), esterasa (*est*), glutamato deshidrogenasa (*gdh*), glucosa quinasa (*glpK*), fosfoglucomutasa (*pgm*), acetil-CoA acetiltransferasa (*thi/yqi*) y proteína reparadora de los emparejamientos erróneos de ADN (*mutS*). El locus *mut* fue excluido del análisis debido a la falta de calidad de las secuencias y demasiadas posiciones ambiguas. Este sistema MLST fue diseñado para todo el género *Brachyspira* para ayudar a entender las relaciones entre especies y cepas de *Brachyspira*, como así también para proporcionar un método fácil y confiable para la identificación y la clasificación. A través de los *clusters* obtenidos en los dendogramas se observó la concordancia con los resultados para identificar las especies por aislamiento y pruebas bioquímicas, de cepas provenientes de distintas especies animales.

Los mismos genes fueron analizados para investigar la epidemiología molecular y la diversidad de *B. hyodysenteriae*. El MLST permitió poner en evidencia sobre la posible transmisión de cepas entre granjas, además de la ocurrencia de la "microevolución" temporal de las cepas en granjas individuales (La *et al.*, 2009).

Posteriormente, Osorio *et al.* (2012) mediante un esquema MLST con los mismos siete loci, permitió caracterizar correctamente a cepas de *B. hyodysenteriae* y encontró similitudes con cepas provenientes de distintos países, recomendando al MLST como una herramienta de tipificación de rutina que permite rápidamente las comparaciones de aislamientos. A través de un nuevo esquema de MLST, se encontraron 20 genotipos de *B. hamptonii* agrupados en cuatro grupos genéticos, utilizando sólo seis genes metabólicos, ya que esta especie no posee el gen *alp*, estas cepas pertenecían a distintos países americanos y europeos (Mirajkar *et al.*, 2015).

Recientemente, se compararon los perfiles alélicos de cepas de *B. hyodysenteriae* australianas provenientes de décadas pasadas ('80, '90, '2000) con aislamientos recientes y se encontró que son diferentes e incluso diferentes con las de otros países (La *et al.*, 2016a). Pocos años antes Mirajkar *et al.* (2014) analizaron la epidemiología de cepas de *B. hyodysenteriae* de EE. UU. y de otros países, un total de 341 cepas. Incluyeron en el estudio cepas norteamericanas de las décadas del '70, '80 y '90, es decir previas el resurgimiento de la DP en EE. UU., y cepas de la década del 2010. Encontraron una ST predominante (ST93) y doce ST más entre las cepas de la actual década, algunas de las cuales mostraban similitud genética con las ST preemergentes, sugiriendo así su probable papel en la reaparición de

DP. Pero a su vez eran distintas de las ST identificadas a nivel mundial. También Joerling *et al.* (2018) compararon cepas alemanas de distintas décadas y encontraron una ST que se mantuvo en el tiempo.

En tanto que cepas de *B. hyodysenteriae* de tres granjas multiplicadoras de alta salud alemanas sin DP y nueve granjas con DP presentaron ST diferentes, aunque en una misma granja se presentaba un solo perfil alélico y cada uno de ellos tenía un mismo perfil de genes de virulencia (La *et al.*, 2016b). Aunque Joerling *et al.* (2018) no encontraron relación entre ST y presencia de genes de virulencia también en cepas alemanas.

Estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *B. hyodysenteriae* permitió encontrar un nuevo complejo clonal con ST no identificadas anteriormente que agrupan a cepas multirresistentes (Mahu *et al.*, 2017a). En tanto Gasparrini *et al.* (2017) en un estudio sobre cepas italianas de *B. hyodysenteriae* demostraron resultados comparables con respecto al poder discriminatorio entre el MLST y el MLVA, mostraron una reducción en la susceptibilidad a las pleuromutilinas con el correr de los años y una asociación débil entre la susceptibilidad a la valnemulina y la inclusión en un complejo clonal.

En nuestro país hace relativamente poco tiempo que se aíslan *Brachyspira* spp, esto ha permitido recuperar algunas cepas de *B. hyodysenteriae* de casos clínicos de DP y otras provenientes del monitoreo de las 53 granjas. En consecuencia, no hay antecedentes de estudios genotípicos publicados previamente.

3.2. OBJETIVO GENERAL:

Identificar factores de virulencia y la relación genotípica en cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* presentes en granjas de cerdos de distintas provincias del país.

3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1.a Detectar factores de virulencia en *Brachyspira hyodysenteriae* recuperadas de granjas porcinas del país.

- Detectar los genes *nox*, *tlyA*, *hlyA*, *Bhlp 29,7* y *Bhmp 39F* en cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* identificadas en granjas porcinas argentinas.

3.2.2.b Comparar genotípicamente distintas cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* recuperadas de granjas porcinas del país.

-Determinar las diferencias genotípicas entre cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* aisladas de granjas porcinas argentinas a través de la información obtenida de un estudio molecular por MLST.

3.3. MATERIALES Y METODOS

3.3.1. Cepas de *B. hyodysenteriae* para estudios moleculares

Se seleccionaron 10 aislados de *B. hyodysenteriae*, dos (2) provenientes de la granja N°2 y ocho (8) aislados obtenidos a partir de distintas muestras clínicas (materia fecal y/o trozo de colon) que llegaron al Departamento de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto provenientes de granjas porcinas con disentería. Tres de las muestras clínicas pertenecen a la misma granja y el resto son de establecimientos distintos (Tabla 3.1.). Además, se incluyó el ADN de 2 cepas de *B. hyodysenteriae* cedidas por la Universidad de Minnesota (EE. UU.). Todas las cepas seleccionadas fueron aisladas según la metodología del punto 2.3.3.3, identificadas por pruebas bioquímicas según punto 2.3.5 (con las características de fuerte β hemólisis, positivas a α y β glucosidasa, negativas a indol, α galactosidasa e hidrólisis del hipurato), por Dúplex-PCR según punto 2.3.6.2 y por secuenciación del gen *nox* según punto 2.3.7 y preservadas según el punto 2.3.4.

Tabla 3.1: Identificación, origen y provincia de la que provienen las cepas de *B. hyodysenteriae*

Identificación	Origen	Provincia
H2	Caso clínico*	Córdoba
H3	Granja 2	Córdoba
H4	Granja 2	Córdoba
H5	Caso clínico*	Córdoba
H9	Caso clínico	S/D
H10	Caso clínico	Córdoba
H11	Caso clínico	Córdoba
H15	Caso clínico*	Córdoba
H20	Caso clínico	Buenos Aires
H28	Caso clínico	Córdoba
1Bh	EE. UU.	No corresponde
2Bh	EE. UU.	No corresponde

*Aislados de una misma granja, durante los años 2008 y 2009.

S/D sin dato

3.3.1.1. Extracción del ADN cromosómico

Los aislados se encontraban en CC con glicerol guardadas a -70°C y se les extrajo ADN para el estudio de los factores de virulencia y de MLST con el kit QIAamo stool mini kit (QIAGEN, Alemania) para extracción de ADN de materia fecal. Se decidió trabajar con este kit comercial, por la calidad de ADN que se obtiene, además de que se puede contar con un volumen final de $200\ \mu\text{l}$ lo que nos permite realizar varias determinaciones de PCR por muestra. Lo cual es fundamental teniendo en cuenta que no todas las cepas estudiadas en este trabajo estaban viables y con posibilidad de cultivo.

Se sembraron placas de agar sangre con las distintas cepas de *B. hyodysenteriae*, luego de la incubación por 4 días a 37°C en anaerobiosis se levantaron los cultivos con un hisopo estéril directamente de las placas sembradas y se suspendieron en $200\ \mu\text{l}$ de solución fisiológica estéril. Para las cepas que no pudieron ser recuperadas luego de varios intentos de siembra, se tomaron $200\ \mu\text{l}$ directamente del criovial del cepario, para realizar la extracción de ADN. En ambos casos, se centrifugó a $18630\ \text{g}$ por 3 min, se descartó el sobrenadante, luego se agregó $1,4\ \text{ml}$ de buffer ASL y se vortexeó por 1 min o hasta que la muestra estuviera totalmente disuelta. Posteriormente se incubó la suspensión por 5 min a 70°C (en bloque seco), se vortexeó por 15 s, se centrifugó a $18630\ \text{g}$ por 1 min y se transfirió $1,2\ \text{ml}$ del sobrenadante a un tubo nuevo de $1,5\ \text{ml}$. Después se colocó una tableta de inhibitEX, se vortexeó hasta disolverla totalmente, se incubó por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a $18630\ \text{g}$ por 3 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se centrifugó a $18630\ \text{g}$ por 3 min, se colocó $15\ \mu\text{l}$ de proteinasa K en un tubo nuevo, se agregó $200\ \mu\text{l}$ del sobrenadante en el tubo que contiene la proteinasa K, se agregó $200\ \mu\text{l}$ de buffer AL, se vortexeó por 15 s y se incubó a 70°C durante 10 min (en bloque seco). Se agregó $200\ \mu\text{l}$ de etanol al 100%, se vortexeó y se transfirió el contenido a un tubo nuevo (QIAamp Spin Column) sin mojar los bordes. Se centrifugó a $18630\ \text{g}$ por 1 min y se transfirió la columna a un tubo nuevo (QIAamp 2 ml). Se agregó $500\ \mu\text{l}$ de buffer AW1, se centrifugó a $18630\ \text{g}$ por 1 min y se transfirió la columna a un tubo nuevo (QIAamp 2 ml). Se agregó $500\ \mu\text{l}$ de buffer AW2, se centrifugó a $18630\ \text{g}$ por 3 min y se transfirió la columna a un tubo nuevo de $1,5\ \text{ml}$. Se agregó $200\ \mu\text{l}$ de buffer AE directamente sobre la membrana, se incubó por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 1 min a $18630\ \text{g}$ y se guardó en el tubo de $1,5\ \text{ml}$ a -20°C hasta su utilización en las reacciones de PCR.

3.3.2. PCR para detectar factores de virulencia

Todas las cepas de *B. hyodysenteriae* seleccionadas fueron analizadas para la detección de cinco genes que codifican factores de virulencia: *nox_{hyo}*, *hly*, *ACP*, *tlyA*, *bhlp 29,7* y *bhmp 39f*. Las PCRs se realizaron en formato single o múltiplex según lo descrito por Barth *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción para cada gen (Tabla 3.2), cambiando el cebador, según correspondía. Para el ciclado se utilizó un protocolo general (Tabla 3.4), modificando la temperatura de *annealing* y tiempo de extensión según el gen. Los cebadores utilizados para cada gen y sus condiciones particulares de ciclado se muestran en la Tabla 3.3.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml).

Tabla 3.2: Mezcla de reacción para PCR

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µl)
H ₂ O Bidestilada Up		12,8 µl)
Tampón de PCR 10x	1x	2,5 µl)
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	1,5 µl)
Solución de dNTPs (2,5 mM)	0,2 mM	2 µl
Cebador (F) (10 µM)	0,4 µM	1 µl
Cebador (R) (10 µM)	0,4 µM	1 µl
Albumina bovina (5 µg/µl)	0,2 µg/µl	1 µl
Taq (5UI/µl)	1 UI	0,2 µl
ADN problema		3 µl µl)
Volumen final		25µl

Tabla 3.3: Cebadores utilizados para cada gen y sus condiciones particulares de ciclado.

Gen	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	TAmp (pb)	TA (°C)	TExt (s)
<i>fabG/hlyA</i>	ACP1	AGGIGAAGTIATAGCIGTTGACG	533	54	60
	<i>/fabF</i>	GAAACACCATTAAGIAIATTATCCCA			
<i>TlyA</i>	BhtlyAF	GCAGATCTAAAGCACAGGAT	527	59	60
	BhtlyAR	GCCTTTTGAAACATCACCTC			
<i>nox_{hyo}</i>	Bhyo1	GCTAGTCCTGAAAGTTTGAGAGG	435	59	60
	Bhyo2	AGCTTCATCAGTGATTTCTTTATCA			
<i>hlyA</i>	hlyA1	TCGATGAAATTAAGATGTTGTT	176	59	60
	hlyA2	TTTTTCTTGATCTTCTTGAGGA			
<i>bhlp 29,7</i>	bhlp29,7F	AAATGAAAAAATTTTTATTATTGGTATCATCAGC	854	68	90
	bhlp29,7R	AGCGCTTTTCCAAGTAGGAAGATAAGAACCCTAAG			
<i>bhmp 39F</i>	bhmp39Ff	AAATGAAAAAAGTTTTATTGACAGCTATGGC	1202	68	90
	Bhmp39Fr	AGCGCTATTGAAAGCAGGTAAATACCAAGTTA			

TAmp= tamaño del amplicón, TA= temperatura de *annealing*; TExt= tiempo de extensión.

Tabla 3.4: Condiciones de Ciclado

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	
Annealing	X	60 s	30
Extensión	72°C	Y	
Extensión final	72°C	10 min	1
Final	15°C	∞*	

La temperatura de *annealing* (X) y el tiempo de extensión (Y) fueron particulares para cada gen y se indica en la Tabla 3.3.

3.3.3. Análisis genotípico de *B. hyodysenteriae*

3.3.3.1. Análisis de secuenciación multilocus (MLST)

Para determinar diferencias genotípicas entre aislados de *B. hyodysenteriae* se realizó un análisis MLST previamente propuesto por Råsbäk *et al.* (2007) y La *et al.* (2009). Para ello se amplificaron los genes *adh*, *pgm*, *est*, *glp*, *gdh*, *thi* y *alp*, que codifican para las siguientes enzimas:

Gen	Enzima que codifica
<i>adh</i>	Alcohol deshidrogenasa
<i>alp</i>	Fosfatasa alcalina
<i>est</i>	Esterasa
<i>gdh</i>	Glutamato deshidrogenasa
<i>glpK</i>	Glucosa quinasa
<i>pgm</i>	Fosfoglucomutasa
<i>thi</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa

3.3.3.1.a Cebadores utilizados para MLST de *Brachyspira* spp

Para la amplificación de los genes se utilizaron los cebadores listados en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Cebadores utilizados para la amplificación de los genes utilizados en el análisis MLST.

Gen	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	T Amp (pb)
<i>adh</i>	ADH-F206	GAAGTTTAGTAAAAGACTTTAAACC	492
	ADH-R757	CTGCTTCAGCAAAAGTTTCAAC	
<i>alp</i>	ALP-F354	TCCAGATGAGGCTATACTTC	783-788
	ALP-R1262	TATGCTCTTTTGTCTAATATTG	
<i>est</i>	EST-F229	GATGCTTCAGGCGGAGTTATG	569-587
	EST-R847	CCACACTCATAGCATAAATACTG	
<i>gdh</i>	GDH-F514	GGAGTTGGTGCTAGAGAGAT	585-588
	GDH-R1157	ATCTCTAAAGCAGAAGTAGCA	
<i>glp</i>	GLP-F123	AGGCTGGGTAGAACATAATGC	793-797
	GLP-R1158	TCTTTACTTTGATAAGCAATAGC	
<i>pgm</i>	PGM-F172	GTTGGTACTAACAGAATGAATA	909-913
	PGM-R1220	CCGTCTTTATCGCGTACATT	
<i>thi</i>	THI-F163	TGTGTTATACAATCAGCACTTC	810-822
	THI-R1079	GTAGTAAGTATTCTAGCTCCAG	

3.3.3.1.b Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante PCR se amplificaron los fragmentos internos de los genes metabólicos en estudio a partir del ADN cromosómico obtenido de cada aislado. Se utilizó un termociclador T21 (Ivema Desarrollos, Argentina). La mezcla de todos los componentes necesarios para la amplificación se detalla en la Tabla 3.6 y las condiciones para el ciclado en la Tabla 3.7.

Tabla 3.6: Mezcla de reacción para PCR

Reactivos	Cantidad
H ₂ O Bidestilada Up	12,75 µl
Tampón de PCR 10x	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
Solución de dNTPs (2,5mM)	2 µl
Cebador (F)* (10mM)	1,5 µl
Cebador (R)* (10mM)	1,5 µl
Taq (5UI/µl)	0,25 µl
ADN problema	3 µl
Volumen final	25 µl

Cebador directo (F) y (R)*: de cada uno de los genes (*adh*, *alp*, *est*, *glp*, *gdh*, *pgm*, *thi*).

Tabla 3.7: Condiciones de ciclado:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	
Annealing	52-46°C ¹	15 s	33
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min	1
Final	15°C	∞*	

∞* Hasta la retirada de las muestras del termociclador

¹°C¹Touch Down (baja la temperatura de *annealing* de ciclo a ciclo en 0,2°C, desde los 52°C a los 46°C).

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (1µg/ml).

Los amplicones obtenidos fueron purificados con el kit comercial Puriprep-GP (Inbio highway, Argentina), según protocolo del punto 2.3.7.1.

3.3.3.1.c Secuenciación

Los productos de PCR fueron secuenciados en los laboratorios del INTA Castelar (ABI 3130xl, Applied Biosystem) con los cebadores que figuran en la Tabla 3.5.

3.3.3.1.d Análisis de las secuencias

Para el análisis las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas para cada gen se visualizaron, editaron y alinearon utilizando el programa ClustalW Multiple Alignment incluido en el paquete BioEdit Sequence Alignment Editor. De esta manera, se generó una secuencia consenso para cada uno de ellos.

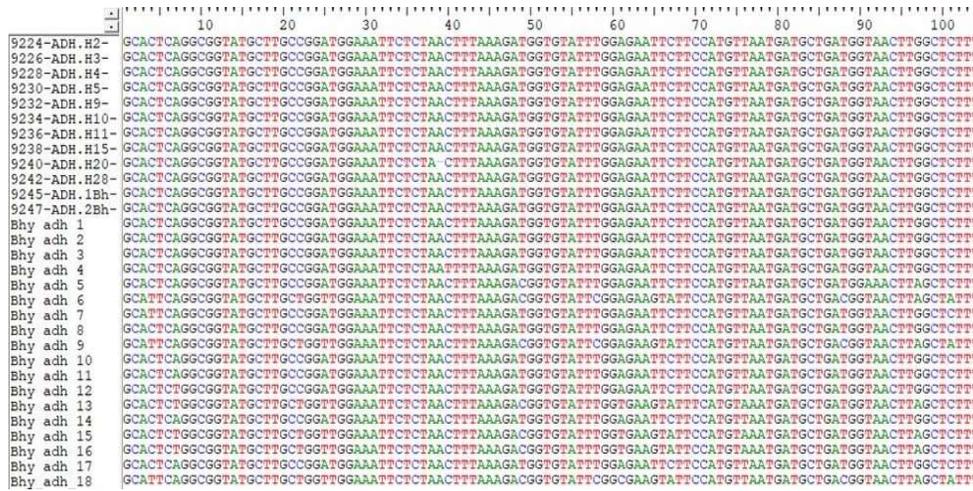
Posteriormente, se generó un alineamiento incluyendo las secuencias consenso obtenidas para cada uno de los genes y las disponibles en la base de datos *Brachyspira MLST Database* del PubMLST (<https://pubmlst.org/brachyspira/>) que incluye las diferentes secuencias alélicas de los genes analizados para las especies del género *Brachyspira*. Las secuencias fueron comparadas con todos los alelos de *B. hyodysenteriae* disponibles en la base de datos (Tabla 3.8). Además, se incluyó entre 1 y 3 secuencias de otras especies de *Brachyspira*, como grupo externo para la construcción de los árboles filogenéticos.

Tabla 3.8: Número de alelos publicados sobre *Brachyspira hyodysenteriae* en el PubMLST y tamaño del fragmento analizado para cada gen.

Locus	Alelos	Tamaño (pb)
<i>adh</i>	19	345
<i>pgm</i>	25	744
<i>est</i>	30	503
<i>glp</i>	42	687
<i>gdh</i>	32	415
<i>thi</i>	39	745
<i>alp</i>	35	647

Las secuencias alineadas de las diferentes cepas para cada uno de los genes fueron cortadas en fragmentos de igual longitud al de los alelos de referencia del PubMLST (Fig. 3.1). El tamaño de los fragmentos finales se muestra en la Tabla 3.8.

Fig. 3.1: Fragmento de las secuencias alineadas del gen *adh* de las 10 cepas argentinas, dos de EE. UU y el resto pertenecen a los alelos publicados en el PubMLST.



Para cada *locus* se compararon todas las secuencias obtenidas, y la designación de los alelos se realizó según la nomenclatura del sitio web PubMLST. Aquellas secuencias que diferían de las presentes en la base de datos (aun cuando difirieran en una sola posición), fueron asignadas a un nuevo perfil y designadas arbitrariamente. Para cada cepa, la combinación de alelos obtenida para todos los *loci* estudiados definió su perfil alélico. A los distintos genotipos identificados en la población estudiada se les denominó Secuencias Tipo (ST) o perfiles alélicos. Dos aislados se consideraron genéticamente idénticos y por lo tanto, pertenecientes al mismo ST o perfil alélico, cuando fueron idénticos para las secuencias de los 7 *loci*.

3.3.3.1.e Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando el paquete informático MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Detección de factores de virulencia en cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* recuperadas de granjas porcinas argentinas

Las diez cepas seleccionadas de *B. hyodysenteriae* fueron positivas para la PCR específica basada en el gen *nox* y las secuencias de estos genes de todos los aislados mostró un 100% de identidad con las correspondientes a cepas de *B. hyodysenteriae* previamente descritas en el GenBank. La excepción corresponde a la cepa H9, que sólo presentó 98% de identidad. Sin embargo, la comparación para esta cepa sólo se realizó con la secuencia *reverse*, ya que no fue posible obtener la secuencia *forward*.

Posteriormente se realizaron las PCR para la identificación de los genes asociados a virulencia: *tlyA*, *nox_{hyo}*, *hlyA*, *ACP*, *Bhlp 29,7* y *Bhmp 39F*. Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9: Factores de virulencia identificados en cepas de *B. hyodysenteriae*

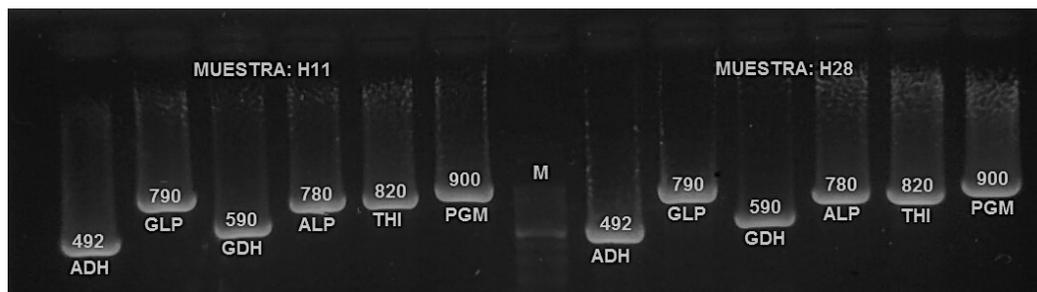
<i>Cepa/Gen</i>	<i>tlyA</i>	<i>nox_{hyo}</i>	<i>hlyA</i>	<i>ACP</i>	<i>Bhlp 29,7</i>	<i>Bhmp 39F</i>
H2	+	+	+	-	-	-
H3	+	+	+	+	-	-
H4	+	+	+	+	-	-
H5	+	+	+	-	-	-
H9	+	+	+	+	-	-
H10	+	+	+	+	-	-
H11	+	+	+	-	-	-
H15	+	+	+	+	-	-
H20	+	+	+	+	-	-
H28	+	+	+	+	-	-
1Bh	+	+	+	+	-	-

La identificación de los seis genes estudiados permitió obtener sólo dos patrones diferentes de genes, el patrón 1 que abarca a las cepas H3, H4, H9, H10, H15, H20, H28 y Bh1 y el patrón 2 que abarca a H2, H5 y H11 (Tabla 3.11).

3.4.2. Análisis de secuenciación multilocus en cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* recuperadas de granjas porcinas argentinas

Para el análisis de diversidad genética de los aislamientos, se amplificaron por PCR fragmentos internos de 7 genes en las 10 cepas de *B. hyodysenteriae* recuperadas de granjas argentinas y también de las dos cepas cedidas por la Universidad de Minnesota (Fig. 3.2; 3.3). De este modo, se obtuvo un total de 84 productos de PCR que fueron enviados a secuenciar.

Fig. 3.2: Resultados de PCR para la amplificación de los genes *adh*, *glp*, *gdh*, *alp*, *thi* y *pgm* de las cepas de *B. hyodysenteriae* H11 y H28 (Muestra: H11; Muestra: H28). M: marcador de peso molecular.



Las secuencias obtenidas fueron analizadas según se detalla en la sección Materiales y Métodos y luego se construyeron árboles filogenéticos para cada uno de los *loci* analizados (Figuras 3.1 a 3.7). Para la construcción de los árboles, se incluyeron todos los alelos de *B. hyodysenteriae* publicados en el PubMLST y también los pertenecientes a cepas de otras especies del género *Brachyspira*.

En conjunto, el análisis de los árboles obtenidos sugiere que las cepas de *Brachyspira* obtenidas de nuestro país se encuentran filogenéticamente emparentadas entre sí y con las cepas analizadas de origen norteamericano. El análisis de la topología de los árboles indica una relación filogenética cercana entre las cepas analizadas.

Fig. 3.3: Resultados de PCR para la amplificación de los genes *adh*, *alp*, *glp* y *gdh* de todas las cepas de *B. hyodysenteriae* en estudio. M: marcador de peso molecular

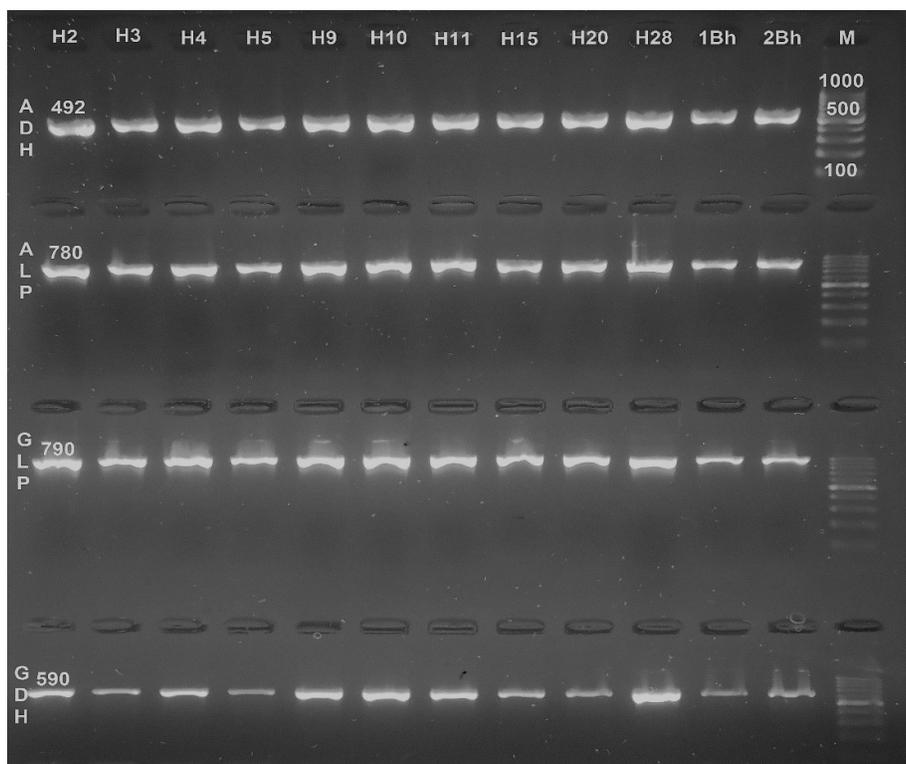


Fig. 3.4: Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 345 pb del gen *adh* de las 12 cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* en estudio (señaladas en negrita), de los 19 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de *B. intermedia* (subrayada). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

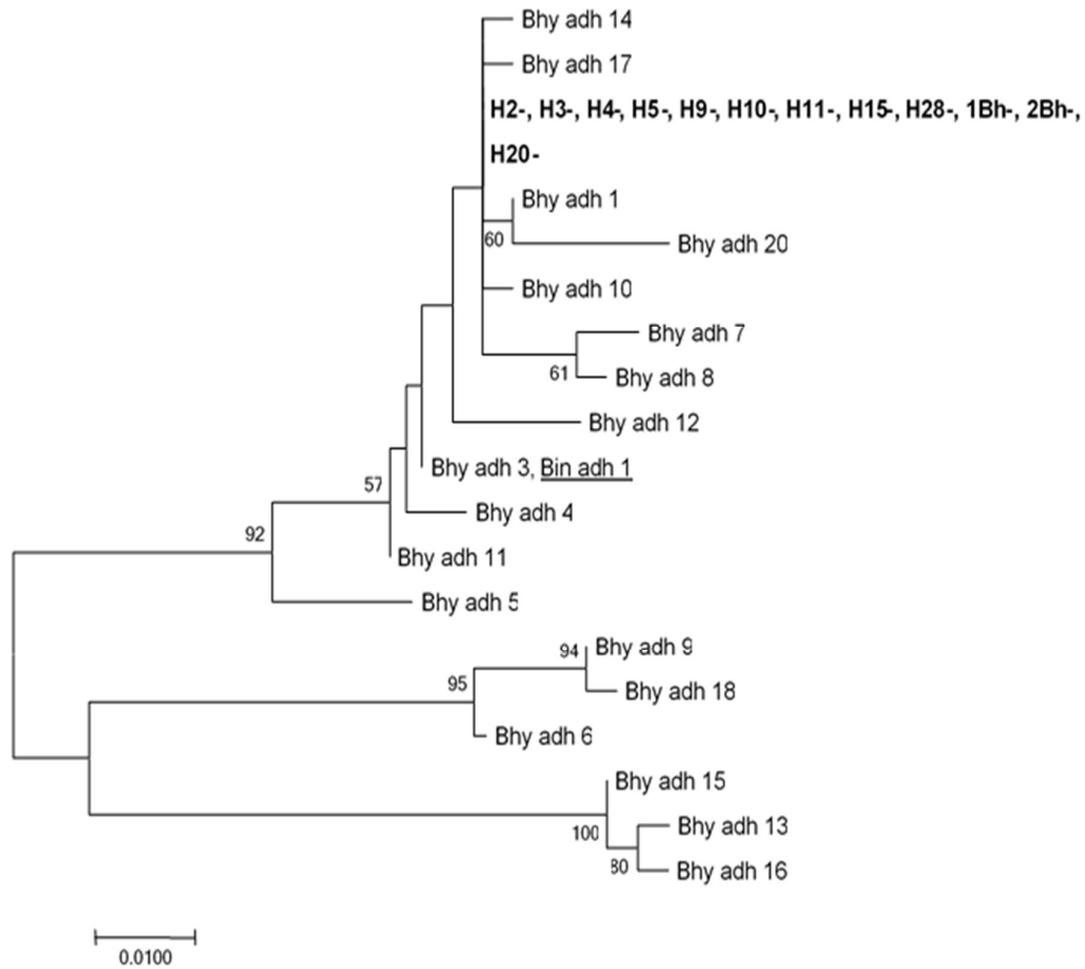


Fig. 3.5: Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento 647 pb del gen *alp* de las 12 cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* en estudio (señaladas en negrita), de los 35 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de *B. intermedia* y uno de *B. pilosicoli* (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.



Fig. 3.6: Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 503 pb del gen *est* de las 12 cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* en estudio (señaladas en negrita), de los 30 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de *B. intermedia* y de "*B. hampsonii*" (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

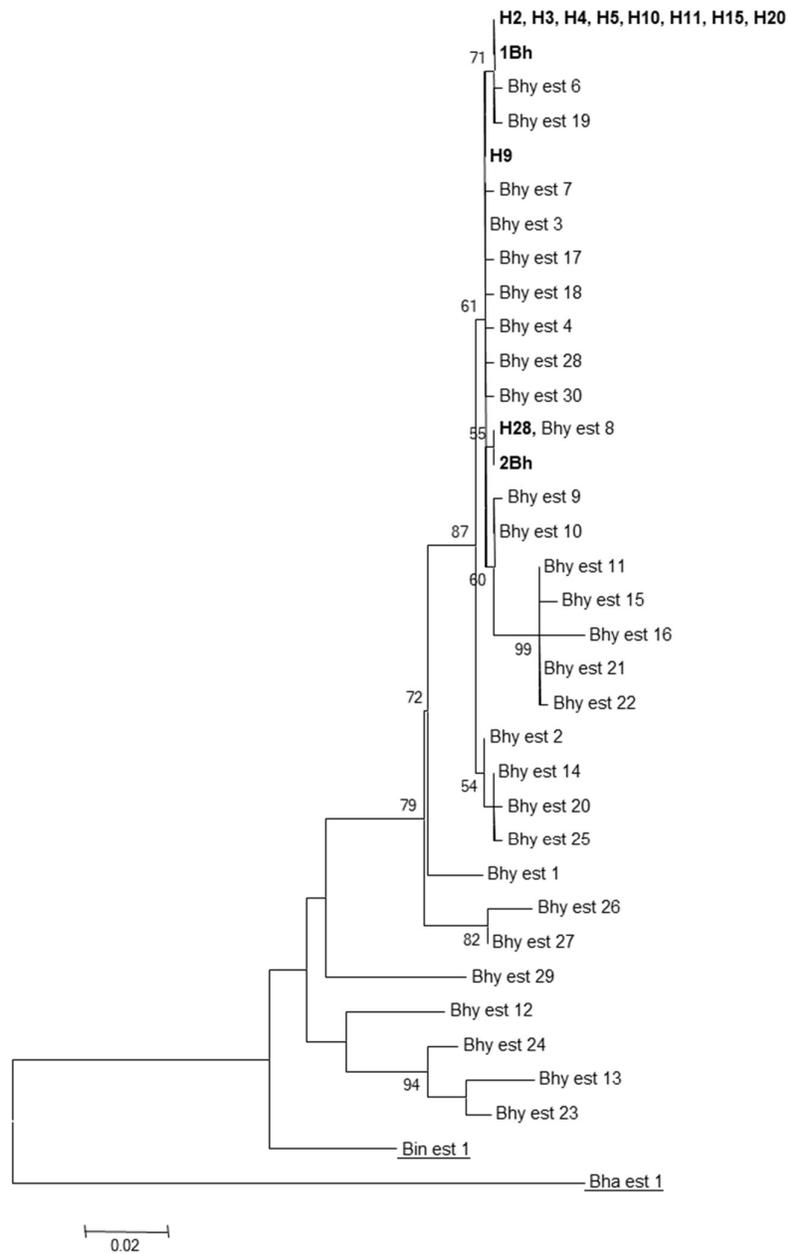


Fig. 3.7: Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 415 pb del gen *gdh* de las 12 cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* en estudio (señaladas en negrita), de los 32 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de *B. intermedia*, *B. pilosicoli* y “*B. hamptonii*” (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

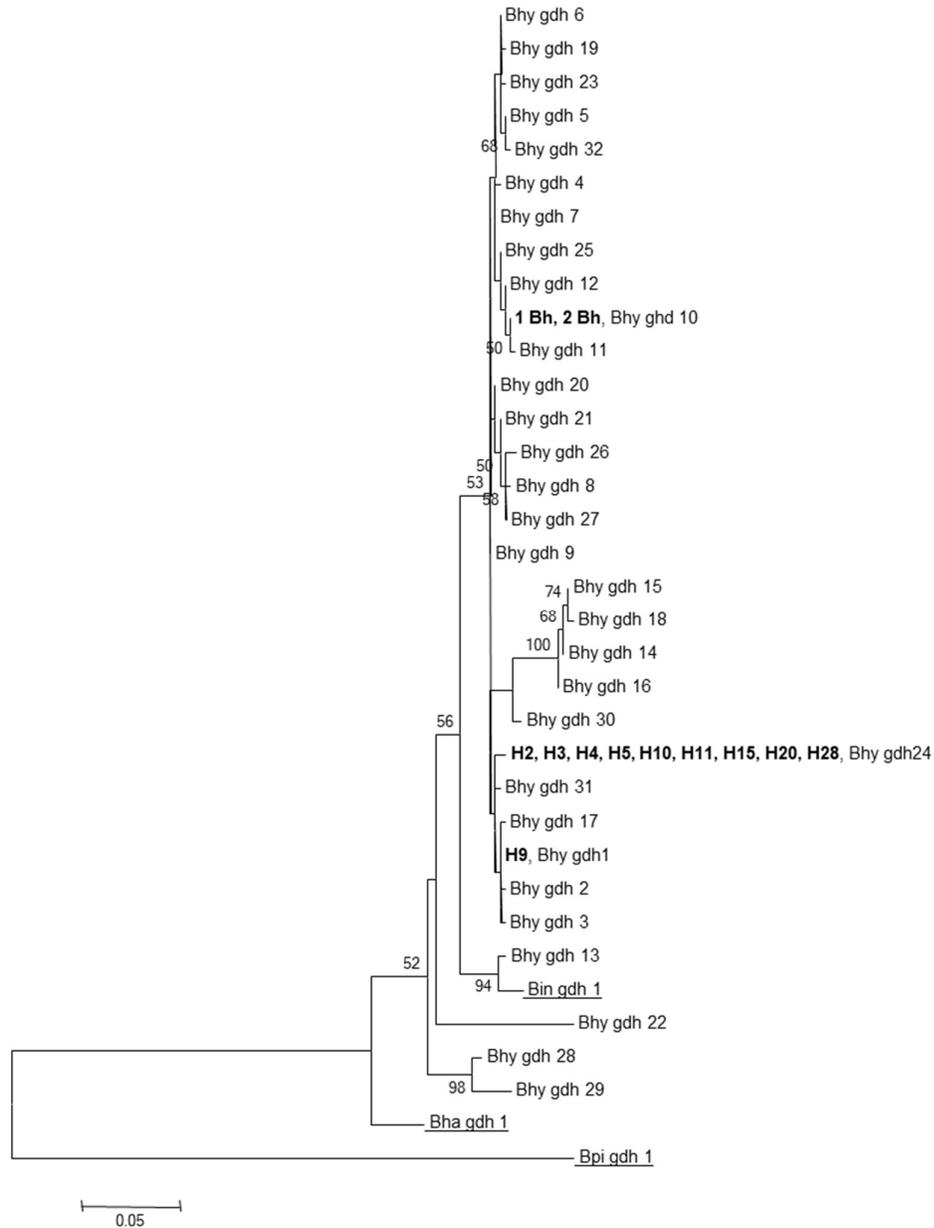


Fig. 3.8: Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 687 pb del gen *glpK* de las 12 cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* en estudio (señaladas en negrita), de los 42 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de *B. intermedia*, “*B. hamptonii*” y *B. pilosicoli* (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

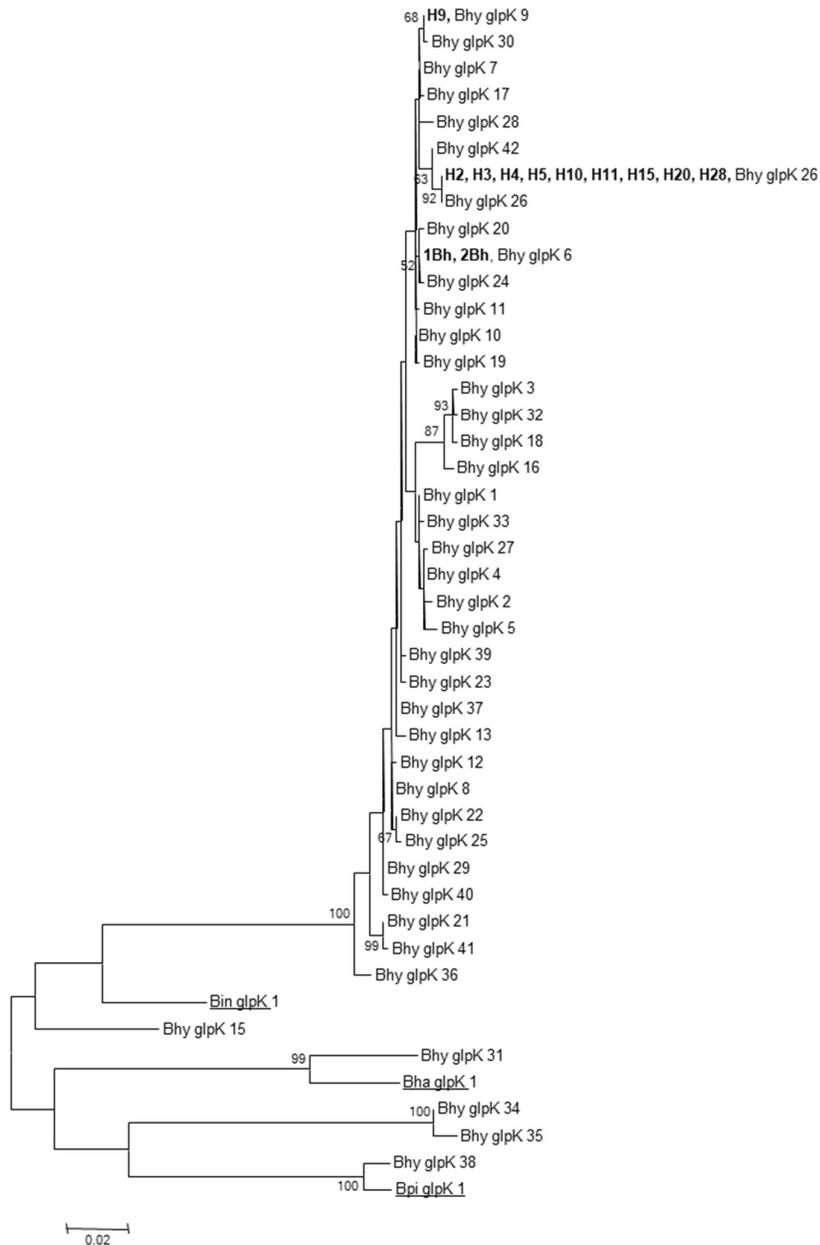


Fig. 3.9: Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 744 pb del gen *pgm* de las 12 cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* en estudio (señaladas en negrita), de los 25 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de *B. intermedia*, *B. pilosicoli* y "*B. hampsonii*" (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

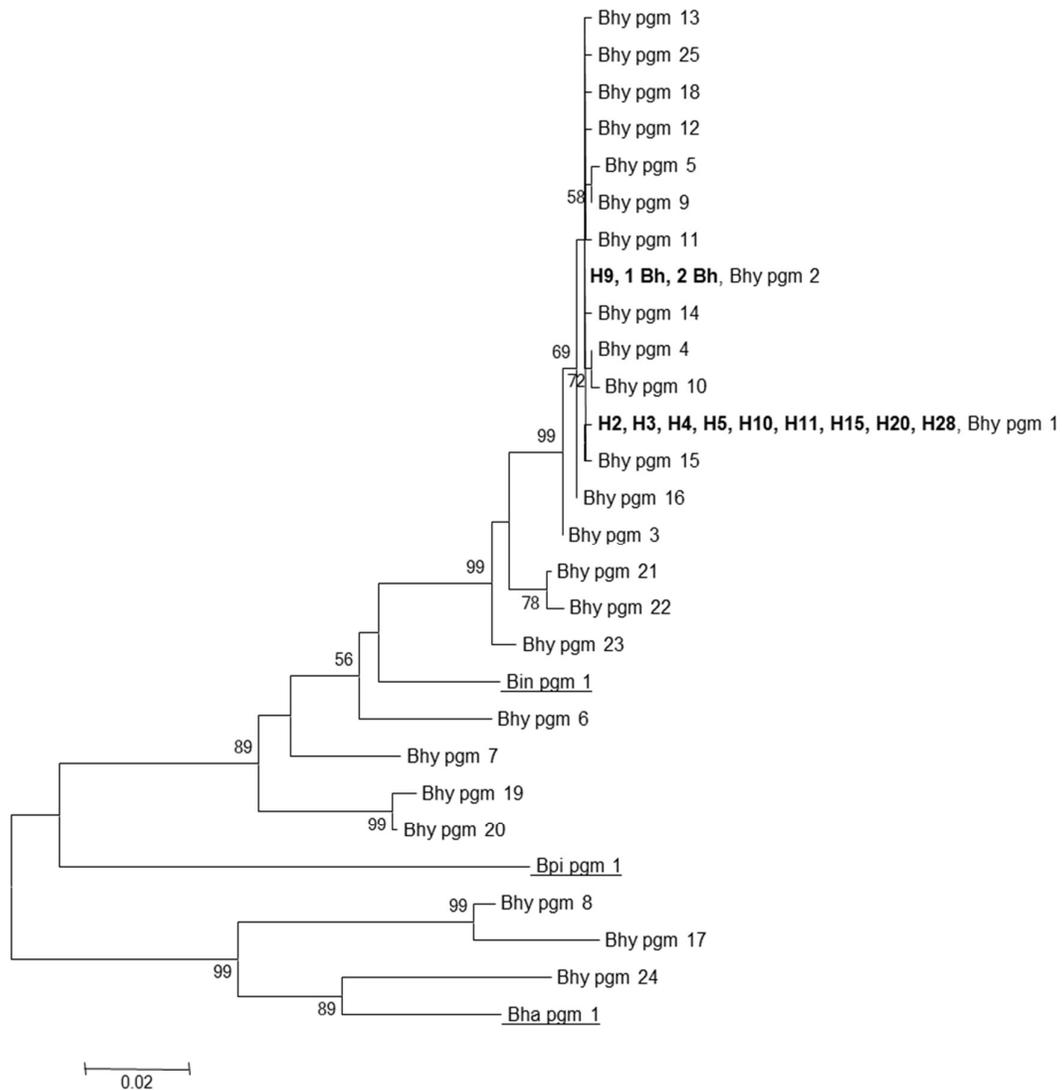
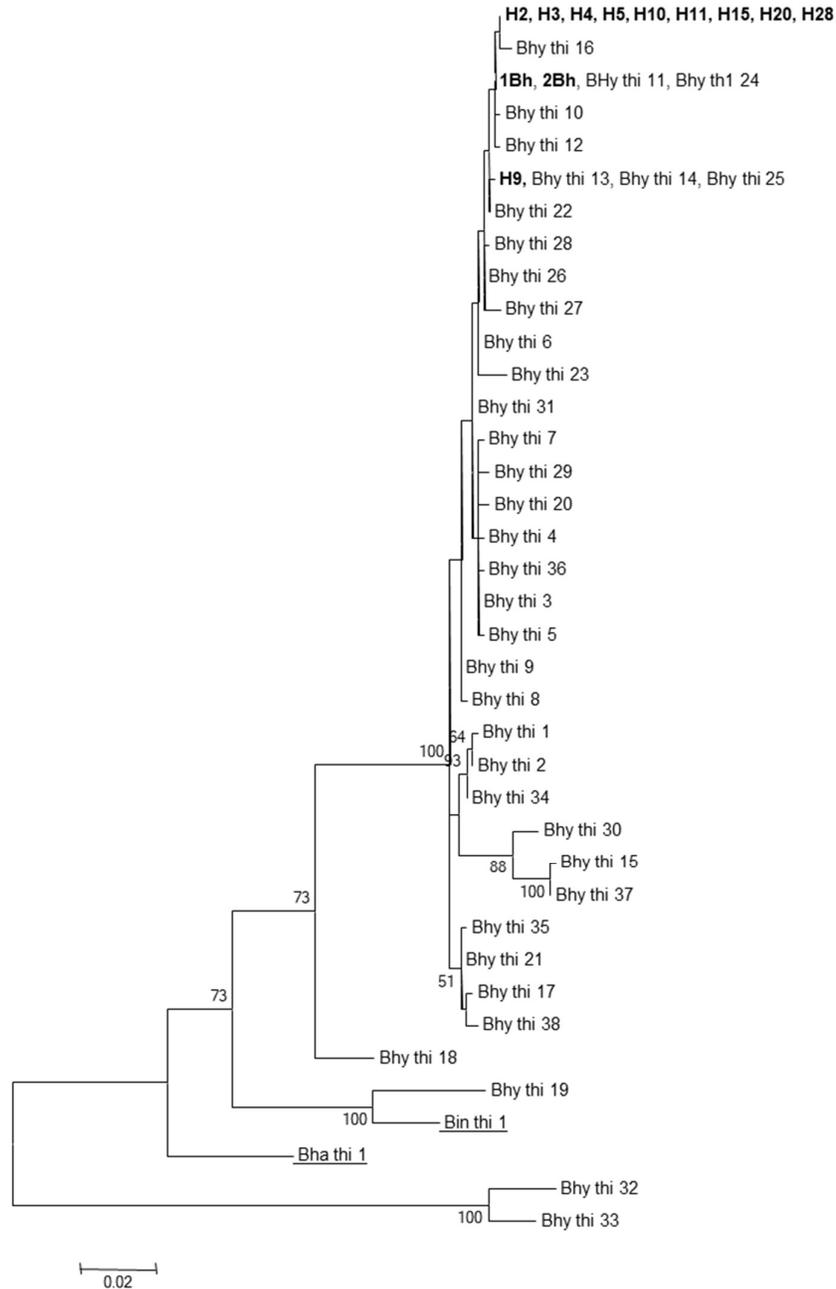


Fig. 3.10: Dendrograma basado en secuencias de ADN de un fragmento de 745 pb del gen *thi* de las 12 cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* en estudio (señaladas en negrita), de los 39 alelos publicados en PubMLST y de un alelo de *B. intermedia* y “*B. hampsonii*” (subrayadas). Los valores de Bootstrap se muestran para nodos estables ($\geq 50\%$). La longitud de la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.



Posteriormente, se realizó la comparación de las secuencias de los genes analizados con la de los alelos publicados en el PubMLST. El análisis indicó la existencia de un único perfil para el gen *adh*, 3 para el gen *alp*, 3 para el gen *est*, 3 para *gdh*, 3 para *glpK*, 2 para *pgm* y 3 para *thi* en los aislamientos analizados (Tabla 3.10).

Al analizar los datos de los diferentes genes en conjunto se determinó que una de las cepas cedidas por la Universidad de Minnesota posee un perfil genético idéntico al designado como N°107 de ST, mientras que el gen *thi* no coincidió con ninguno de los publicados para 9 cepas (Tabla 3.10). Sin embargo, la secuencia de ese gen fue idéntica en todas aquellas cepas para las que no se encontró similitud (H2, H3, H4, H5, H10, H11, H15, H20, H28).

Tabla 3.10: Identificación alélica de las 12 cepas de *B. hyodysenteriae* en relación con las publicadas en el PubMLST

Gen	<i>adh</i>	<i>alp</i>	<i>est</i>	<i>gdh</i>	<i>glpK</i>	<i>pgm</i>	<i>thi</i>	ST
Cepa								
H2	2	16	5	24	26	1	-	NN3
H3	2	16	5	24	26	1	-	NN3
H4	2	16	5	24	26	1	-	NN3
H5	2	16	-	24	26	1	-	NN3*
H9	2	11	3	1	9	2	25	NN2
H10	2	16	5	24	26	1	-	NN3
H11	2	16	5	24	26	1	-	NN3
H15	2	16	5	24	26	1	-	NN3
H20	2	-	5	24	26	1	-	NN4
H28	2	16	8	24	26	1	-	NN5
1Bh	2	11	5	10	6	2	11	NN1
2Bh	2	11	8	10	6	2	11	107

*faltan 7 nucleótidos en el gen *est* para ser idénticos a los otros NN3

El análisis de los alelos presentes permitió obtener perfiles diferentes a los presentes en la base de datos, que fueron denominados como NN1 a NN5 (Tabla 3.10). El perfil alélico más frecuente incluyó a los aislamientos H2, H3, H4, H10, H11 y H15, que se consideraron genéticamente idénticos y por lo tanto de la misma ST (designada como NN3). Estos

aislamientos fueron obtenidos a partir de 4 granjas distintas localizadas en la provincia de Córdoba. Por otra parte, los restantes perfiles alélicos propuestos están conformados por una única cepa, cada una obtenida a partir de una granja diferente y de una provincia distinta.

Tabla 3.11: Patrones de genes de virulencia de diez cepas argentinas de *B. hyodysenteriae* aisladas entre 2008 y 2013.

<i>Patrón</i>	<i>tlyA</i>	<i>nox_{hyo}</i>	<i>hlyA</i>	<i>ACP</i>	<i>bhlp 29,7</i>	<i>bhmp 39F</i>	ST
1	+	+	+	+	-	-	107, NN2, NN3, NN4, NN5
2	+	+	+	-	-	-	NN3

3.5. DISCUSIÓN

Está demostrado que *B. hyodysenteriae* posee más genes implicados en la biosíntesis de lipopolisacáridos, motilidad y quimiotaxis, y proteínas de adherencia y/o superficie que *B. pilosicoli* y *B. murdochii* (Wanchanthuek *et al.*, 2010). La selección de los genes que codifican factores de virulencia para identificarlos en las cepas de *B. hyodysenteriae* se realizó teniendo en cuenta que algunos de ellos estaban presentes en todas las cepas de esa especie, mientras que otros se presentaban indistintamente en varias especies de *Brachyspira*.

El patrón 1 obtenido coincide con los patrones N°2 y 7 informados por Barth *et al.* (2012), aunque sólo una cepa en cada uno de los patrones, de las 74 *B. hyodysenteriae* testeadas, se correspondió con ellos. La diferencia entre ambos patrones lo dieron las proteínas de membrana externa *bhlp16* y *bhlp17.6*, no incluidos en este análisis. En nuestro trabajo fueron 8 cepas provenientes de distintas granjas, incluyendo la cepa americana las que coincidieron con este patrón. El patrón 2 no coincide con ningún otro, ya que el gen *ACP* estuvo presente en todas las cepas *B. hyodysenteriae* de ese trabajo.

La presencia del gen *tlyA* en cepas de *B. hyodysenteriae* ha sido descrito en varios trabajos en coincidencia con el nuestro (Fellström *et al.*, 2001; Råsbäk *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010, Barth *et al.*, 2012). Estos últimos autores (Barth *et al.*, 2012) identificaron en todas las *B. hyodysenteriae* la presencia de *tlyA*, *hlyA/ACP* reconociendo a este complejo como indicativo de esta especie. Sin embargo, en nuestro trabajo el gen *ACP* no fue identificado en tres cepas, dos de ellas de una misma granja y, por lo tanto, no puede descartarse que podrían ser variantes autóctonas de la especie. En cuanto a los genes que codifican las proteínas de membrana externa, los autores antes mencionados encontraron que la mayor frecuencia de detección fue de *bhmp39F* ya que un 97.3% de las cepas de *B. hyodysenteriae* estudiadas por ellos poseían el gen mientras que sólo dos cepas tenían el gen *bhmp39h*. Entre nuestras cepas no detectamos ninguno de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa, *bhmp39F* y *bhlp29.7*, en contraposición de lo informado por Joerling *et al.* (2018). Debido a su variabilidad, los genes *bhmp39* parecen no ser objetivos adecuados para ensayos de diagnóstico (Barth *et al.*, 2012). Aunque cualquier hallazgo negativo podría ser el resultado de una PCR falsamente negativa debido a variaciones en los sitios de unión del cebador, esto podría ocurrir en el caso de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa que están implicados en la variabilidad antigénica (Joerling *et al.*, 2018; Witchell *et al.*, 2006).

Los genes empleados por la técnica de MLST son genes altamente conservados, de esta forma esta técnica mide la variación que se acumula lentamente en la población, debido a que es selectivamente neutra (Osorio, 2011).

La mayoría de los estudios realizados en distintas partes del mundo incluyen la comparación de más de 50 cepas de *B. hyodysenteriae*. Distintas razones, como el corto periodo que hace que se estudia a la especie en el país, así como la ausencia de este servicio diagnóstico en laboratorios privados que permitan la recuperación de distintas cepas, impidieron que la colección de aislados sea mayor a la analizada en este trabajo. De todos modos, se incluyeron en los análisis los alelos publicados en PubMLST.

El análisis filogenético de los genes sugiere que las cepas de nuestro país analizadas están filogenéticamente emparentadas. Estos análisis sugieren una limitada diversidad genética en los genes de las cepas de *B. hyodysenteriae* analizados en el MLST. Resultados similares se obtuvieron con cepas norteamericanas (Mirajkar *et al*, en el 2014).

La comparación de los perfiles MLST con los disponibles en la base de datos sugiere que los aislamientos no corresponderían con los perfiles publicados previamente. Sólo se identificó un perfil genético idéntico a los ya publicados en una de las cepas cedidas por la Universidad de Minnesota (Bh2). La otra cepa de origen norteamericano (Bh1) mostró ST muy similar (idéntica en un 99,6%), presentando sólo una diferencia de 2 sustituciones en la secuencia del gen *est* en comparación con la cepa Bh2. Entre las cepas analizadas por Mirajkar *et al*, en el 2014, se encuentran cepas con ST 107 confirmando el origen de la *B. hyodysenteriae* Bh2 norteamericana.

Nueve cepas (H2, H3, H4, H5, H10, H11, H15, H20, H28) presentaron un alelo de *thi* no descrito previamente en la base de datos PubMLST. Sin embargo, todas estas secuencias resultaron idénticas entre ellas. Los resultados sugieren que las secuencias obtenidas podrían representar un nuevo alelo.

Se identificaron un total de cinco nuevos perfiles MLST. Por lo descrito hasta aquí, las diez cepas argentinas no tienen relación con alguna otra cepa publicada anteriormente, ya que ninguna corresponde con alguna de las 241 ST presentes en el PubMLST. Sin embargo, es posible encontrar cepas con la misma ST en distintos países (Joerling *et al.*, 2018), aunque sólo dos ST estaban presentes en más de un país, sobre un total de 110 ST pertenecientes a cepas de diez países (Mirajkar *et al.*, 2014). También se demostró que hay una diseminación internacional de clones y que la aparición en España de algunas cepas de *B. hyodysenteriae* de otros países demuestra la expansión global (Osorio, 2011). Las

secuencias correspondientes a los nuevos perfiles MLST descritas en este trabajo serán enviadas al PubMLST para su análisis y publicación.

La presencia de una misma ST en una granja, ya sea de un sitio o múltiples sitios de un origen común, fue encontrado en el análisis realizado sobre cepas americanas (Mirajkar *et al.*, 2014). De la misma manera, nosotros lo encontramos en las dos granjas en que se analizaron más de una cepa. Es de destacar que las cepas de *B. hyodysenteriae* pertenecientes a la ST NN3 fueron obtenidas en distintos muestreos, que abarcaron unos pocos años, desde el 2008 al 2013. Algunos trabajos informan que se ha encontrado la misma ST en aislados realizados en distintas décadas mientras que en otros las ST de la mayoría de las cepas analizadas eran diferentes e incluso distintas con las de otros países (Mirajkar *et al.*, 2014; La *et al.* 2016a).

La falta de coincidencia en los patrones que identifiquen específicamente a cepas de *B. hyodysenteriae* a través de algunos genes de factores de virulencia y/o de estilo de vida de virulencia no permitirían la utilización de estos datos con fines diagnósticos, y en coincidencia con Joerling *et al.*, (2018) tampoco se podría determinar cualquier vínculo entre la ST y la detección de distintos genes de virulencia; así, los aislados que pertenecen a la misma ST no necesariamente comparten el mismo patrón de genes de virulencia. Según estos autores se debe considerar que la PCR tiene una sensibilidad menor que la secuenciación del genoma completo y que los datos publicados recientemente sobre la secuenciación del genoma completo podrían mostrar una conformidad entre ST con los genes asociados a virulencia (La *et al.*, 2016b).

Los avances en el conocimiento molecular de cepas de *Brachyspira* spp permiten abrir nuevos caminos en favor del mejoramiento diagnóstico como así también para su tratamiento y control.

CAPÍTULO 4

ENSAYOS PARA EL CRECIMIENTO RÁPIDO DE *BRACHYSPIRA* SPP EN MEDIOS LÍQUIDOS

4.1. INTRODUCCIÓN

Ante la sospecha de la presencia de *Brachyspira* spp se realizan cultivos en agar sangre con antibióticos. El diagnóstico de certeza se obtiene cuando identificamos la especie presente, ya sea por aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas, que luego pueden ser confirmadas por PCR de especie, o directamente llevando a cabo una PCR de materia fecal o mucosa colónica, o luego de realizar una incubación primaria de esas muestras en placas de agar sangre. La diferencia entre una u otra metodología radica en que en la primera es necesario llegar a la purificación de la cepa para poder realizar las pruebas bioquímicas, mientras que, en la segunda opción, este procedimiento no es necesario. Sin embargo, las cepas puras siguen siendo necesarias para los estudios posteriores como antibiogramas o estudios de caracterización molecular. De allí la necesidad de obtener una metodología que pueda reducir el tiempo requerido para llegar a la purificación, ya que en nuestra experiencia fueron necesarios 27 días en promedio hasta llegar a la purificación de los cultivos.

Se han realizado varios estudios sobre propagación de *B. hyodysenteriae* en caldos incorporando distintos sustratos que favorecen el crecimiento de estas espiroquetas, pero generalmente se realizaron utilizando cepas puras (Stanton, 2006). Existe una mayor cantidad de investigaciones sobre el crecimiento en medios sólidos como en agar sangre agregando distintos antibióticos y concentraciones (Songer *et al.*, 1976; Achacha y Messier 1992; Stanton, 2006; Lugsomya *et al.*, 2012).

El primer medio líquido para el crecimiento de *B. hyodysenteriae*, fue desarrollado por Kinyon y Harris (1974) utilizando TSB (*Tryptone soya broth*), suero fetal bovino (SFB), suero de conejo, cisteína hidrociorada, glucosa, bicarbonato de Na y espectinomicina. Luego, en el trabajo realizado por Kunkle *et al.* (1986) a un caldo TSB con glucosa, bicarbonato de Na, monohidrato hidrociorado de cisteína y extracto de levadura, le incorporaron SFB y/o solución de colesterol y/o extracto de heces. Los autores realizaron tres medios líquidos (autoclavables antes del uso) y les incorporaron una barra magnética para dar movimiento y aumentar la aireación del cultivo durante la incubación. Lograron buenos resultados en todas las combinaciones realizadas.

Otros trabajos realizados incluyen la complementación de caldo con agar sangre, como lo realizado por Calderaro *et al.* (2001), basados en el aislamiento que realizaban para *B. pilosicoli* en muestras humanas, probando la misma metodología en heces porcinas para el aislamiento de *B. hyodysenteriae*. Colocaron gotas de materia fecal o contenido colónico en caldo cerebro-corazón (CC) con SFB, rifampicina y espectinomicina por 30 min, y luego sembraron en placa a un medio modificado de agar sangre equina con rifampicina y

espectinomicina (BAM-SR), y extracto de carne. Ese pretratamiento permitió que los desechos se sedimenten en el fondo del tubo y que los antibióticos actúen sobre la microbiota de la materia fecal. Lograron obtener crecimiento de las espiroquetas entre los 3-5 días, disminuyendo también el tiempo para obtener las cepas puras. Esta metodología fue comparada con otros medios sólidos ya probados e incluso le agregaron el pretratamiento antes de la siembra, pero la combinación del BAM-SR con el pretratamiento fue la única metodología que logró purificar la cepa en 5 días. Mientras que con los otros medios de agar se necesitó entre 15-18 días para lograr el objetivo (Calderaro *et al.*, 2005).

Si se dispone de cepas puras de *Brachyspira* spp se pueden realizar estudios de tipificación y de susceptibilidad antimicrobiana, necesario para el diseño estratégico de medidas de control. Es por ello que nos propusimos desarrollar una metodología que permita el aislamiento y la obtención de aislados puros en el menor tiempo posible.

4.2. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo bacteriológico que favorezca el crecimiento rápido de *Brachyspira spp.*

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar los medios de cultivo líquidos que permitan el crecimiento rápido de espiroquetas del género *Brachyspira*.
- Comparar distintos protocolos de medios líquidos complementados con medios sólidos.

4.3. MATERIALES Y METODOS

4.3.1. Cepas utilizadas de *Brachyspira* spp

Los distintos protocolos para la propagación de espiroquetas se realizaron con cepas de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*. Estas cepas estaban guardadas a -70°C en CC y glicerol. Fueron obtenidas por aislamiento e identificación de la especie por pruebas bioquímicas a partir de muestras de casos clínicos de colitis. Su identidad fue confirmada luego por Dúplex-PCR y por secuenciación del gen *nox*. Para su utilización las cepas se plaquearon en agar sangre-TSA y se incubaron por al menos tres días.

Para la inoculación en los caldos se levantó la pátina de crecimiento con hisopo estéril en tres formas: 1- hisopado de 1x1 cm, 2- hisopado de 3x2 cm y 3- hisopado de toda la placa diluida en 1 o 2 ml de CC, y se medía la turbidez a través de la escala de McFarland.

4.3.2. Medios líquidos

Se utilizaron cinco medios líquidos: infusión CC, caldo TSB, medio Kunkle, caldo suplementado y un caldo modificado.

Los caldos infusión CC y TSB fueron preparados de acuerdo con los apartados 2.3.4.1., 2.3.4.2., 2.3.4.3. Se fraccionaron en 2 y 3 ml en tubos estériles y mantenidos a 4°C.

A los otros medios líquidos se les agregó distintos sustratos que favorecen la multiplicación de *Brachyspira* spp., como el medio Kunkle (Kunkle *et al.*, 1986), caldo suplementado (Calderaro *et al.*, 2001) y el caldo modificado.

4.3.2.1. Medio Kunkle

TSB	3 g
Glucosa 0,5%	0,5 g
NaHCO ₃	0,2 g
Cisteína hydroclorido monohidrato 0,05%	0,05 g
Extracto de levadura 1%	1 g
SFB 2%	2 ml
Extracto de heces porcinas 5%	5 ml
H ₂ O destilada	100 ml

Se mezcló el TSB, glucosa, bicarbonato de sodio, extracto de levadura y extracto de heces con agua destilada y se llevó a pH 6,85. Se llevó a ebullición durante 10 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se agregó la cisteína y el SFB y se fraccionó en frascos de antibiótico, a razón de 5 ml en cada uno. Se realizaron modificaciones al medio original en el proceso de esterilización y generación de anaerobiosis. A la mitad de los frascos se le colocaron magnetos y se taparon con tapones de goma y de metal, y se introdujeron agujas 25/8 en el tapón de goma. Se esterilizó en autoclave 15 minutos a 1 atmósfera. Apenas se abrió la autoclave se retiró la aguja y se tapó bien con tapa de metal hasta su uso, según Rodríguez-Cavallini y de la Cruz (1999).

4.3.2.1.1. Preparación del extracto de heces porcinas (Kunkle *et al.*, 1986)

Se utilizó materia fecal de un cerdo en etapa de terminación que consumía alimento sin antibióticos. Se realizó un cultivo en anaerobiosis siendo negativo para *Brachyspira* spp. Se colocó una parte de materia fecal (30 gr aproximadamente) y cuatro partes de PBS pH 7.2 (120 ml aproximadamente) en un vaso de precipitado y se mezcló con una varilla magnética por 24 h a 7°C. Se mantuvo 24 h más en heladera y luego se centrifugó a 4000 rpm en 10 tubos de 14 ml. El sobrenadante, aproximadamente 100 ml fue centrifugado a 10000 g por 30 min a 23°C en viales de 1,5 ml. Se descartó el pellet y el sobrenadante fue congelado a -20°C hasta su utilización.

4.3.2.2. Caldo suplementado

Otro medio líquido que se utilizó fue un caldo suplementado de acuerdo con Calderaro *et al.* (2001 y 2003) realizado de la siguiente manera:

Preparación de la suspensión de antibióticos:

Espectinomycin (Sigma S9007)	0.5 g
Rifampicina	0,01875 g
Agua destilada	100 ml

Se filtró con filtro de jeringa de 0,22 μ y se fraccionó 4 ml de la suspensión en tubos estériles.

La composición del medio líquido suplementado fue la siguiente:

Caldo TSB o infusión CC (Oxoid)	50 ml
Suspensión de antibióticos	4 ml
SFB	5 ml

Luego de la preparación del caldo utilizado, descritos en los apartados **2.3.4.1.**, **2.3.4.2.**, se enfrió entre 45-50°C y se agregó 5 ml de suero fetal bovino (SFB) y 4 ml de suspensión de antibióticos (rifampicina 15µg/ml, espectinomicina 400 µg/ml). Se homogeneizó y fraccionó 3 ml en tubos estériles que se mantuvieron a 4°C.

4.3.2.3. Caldo modificado

TSB	3 g
Glucosa 0,5%	0,5 g
Cisteína al 0,05%	0,25 ml
SFB 2%	2 ml
H ₂ O	100 ml

Se mezcló el TSB, glucosa y cisteína en 100 ml de agua destilada. Se llevó a pH 6,85. Se esterilizó en autoclave 15 minutos a 1 atmósfera. Se enfrió y se agregó SFB. Se almacenó a 4°C por un período no superior a dos semanas. Antes de su uso se agregó extracto de levadura 1%.

4.3.3. Ensayos para el cultivo de *Brachyspira* en medios líquidos

En una primera etapa se realizaron varios ensayos con infusión CC, TSB y Kunkle para observar el crecimiento bacteriano en los distintos medios líquidos y luego, en una segunda etapa se aplicaron distintos protocolos que combinaban un primer crecimiento en medio líquido de materia fecal inoculada con *B. hyodysenteriae* y luego en placas de agar sangre.

Primeramente, se realizaron diversos ensayos para poner a punto el crecimiento de *B. hyodysenteriae* con los caldos infusión CC, TSB y Kunkle, con y sin movimiento durante la incubación, tanto con *shaker* como en agitador con magneto y con distintas concentraciones de bacterias (Tabla 4.1). Mientras que para *B. pilosicoli* se inoculó el hisopado de una placa cultivada en 10 ml caldo CC+SFB en un erlenmeyer con magneto, se colocó dentro de la jarra para anaerobiosis y con el agitador magnético dentro de la estufa a 42°C.

La falta de crecimiento de *Brachyspira spp* fue corroborada en todos los casos porque los caldos se sembraron en placas de agar sangre-TSA, por lo menos, durante tres días de incubación.

El medio Kunkle contenido en los frascos con presión negativa fue inoculado con 200 µl de una suspensión McFarland 1 de *B. hyodysenteriae* utilizando una jeringa.

En la otra etapa, se realizaron distintos protocolos en los que se varió: a) recipiente de cultivo, b) volumen y tipo de caldo, c) adición o no de materia fecal y d) periodo de incubación.

4.3.3.1. Protocolo 1: cultivo de materia fecal inoculada con espiroquetas en tubos de vidrio con caldo suplementado y diferentes periodos de incubación

Preparación del inóculo: *B. hyodysenteriae* fueron levantadas de una placa e inoculadas en 1 ml de CC, realizándose inmediatamente diluciones en base 10.

Preparación de la materia fecal: Se pesaron 10 g de materia fecal libre de espiroquetas por cultivo y PCR y se introdujeron en una bolsa plástica estéril. Se agregó 1 ml de inóculo con una concentración de espiroquetas de 3×10^8 /g de materia fecal y se mezcló manualmente.

Siembra en caldos: Se utilizaron los caldos suplementados del apartado 4.3.2.2. tanto de infusión CC como con TSB: Se fraccionaron en tubos de vidrio con 3 ml.

Procedimiento: En cada uno de 3 tubos de infusión CC y de TSB se colocaron 3 anzadas de materia fecal con espiroquetas, se agitaron en vortex por 30 s y se colocaron en tres jarras. La jarra N°1 fue puesta a incubar por 4 h, la N°2 por 8 h y la N°3 por 24 h, todas a 37°C.

Controles: En cada jarra se colocaron los siguientes controles (C): 1 tubo con infusión CC sin inóculo (C-), un tubo con infusión CC sembrado con inóculo primario (C+), 1 tubo con TSB sin inóculo (C-) y un tubo con TSB sembrado con inóculo primario (C+).

A las 4 h se abrió la jarra N°1 y se sembró cada tubo inoculado con materia fecal en 2 placas de ASB (apartado 2.3.3.3.1.a.). Se sembraron los controles (C+ y C-) en una misma placa por tipo de caldo.

Se armó una Jarra Control con el método convencional de siembra: se sembraron 2 placas de ASB con la materia fecal inoculada (con espiroquetas), se colocó una placa sin sembrar (C-), se sembraron 2 placas con la materia fecal sin inocular (sin espiroquetas) y se sembraron 2 placas con el inóculo 1/10.

A las 8 h se abrió la jarra N°2 y a las 24 h se abrió la jarra N°3. Por cada una se sembraron cada tubo inoculado con materia fecal en 2 placas de ASB. Se sembraron los controles (C+ y C-) en una misma placa por tipo de caldo.

Las 4 jarras con placas se incubaron a 42 °C hasta que la jarra N°3 cumplió con 3 días de incubación. La Jarra Control se abrió a los 6 días.

4.3.3.2. Protocolo 2: cultivo de espiroquetas y de materia fecal inoculada con espiroquetas en *flask* con caldo suplementado

Ensayo N° 1. Se utilizaron *flasks* de 125 ml para colocar 10 ml de caldo TSB+SFB (apartado 2.3.4.3.) y otros con 10 ml del caldo suplementado (apartado 4.3.2.2). A cada *flask* se le agregó 1 ml de una suspensión de *B. hyodysenteriae* en TSB con una turbidez McFarland 2. Como control + se sembró la suspensión de *B. hyodysenteriae* en agar sangre-TSA. Los *flasks* con las tapas flojas y las placas se colocaron en una jarra para anaerobiosis a 37°C durante cuatro días. Luego se plaquearon todos los caldos y se colocaron en una jarra para anaerobiosis a 41°C durante tres días.

Ensayo N°2. En otro ensayo se agregó a tres matraces Erlenmeyer 50 ml del caldo suplementado más 0,5 g de materia fecal libre de espiroquetas y se agregó 50 µl de una suspensión de *B. hyodysenteriae* en 3 diluciones: 1- puro (DOA_{540nm}= 1), 2- puro diluido 1/10 y 3- puro diluido 1/100. Es decir que cada dilución en los 50 ml de caldo suplementado fue repartida en tres *flasks*. Como controles+ se sembraron 3 placas, cada una se dividió en 2 partes, en una se sembró la dilución (puro, 1/10, 1/100) y en la otra mitad el caldo suplementado con materia fecal inoculado con la dilución correspondiente de espiroquetas. Se colocaron en jarras para anaerobiosis a 42°C durante tres días. Luego se plaquearon en agar sangre-TSA y se colocaron en jarra con anaerobiosis durante tres días a 42°C.

4.3.3.3. Protocolo 3: cultivo de espiroquetas en *flask* con medio líquido modificado

A cada *flask* se le agregaron 9 ml del caldo preparado en el apartado 4.3.2.3. y 1 ml de inóculo de *B. hyodysenteriae* en infusión CC McFarland 4. El medio inoculado quedó con una turbidez de McFarland 0,5. Se colocaron los *flasks* con las tapas flojas en una jarra de anaerobiosis por tres días a 37°C. Al campo oscuro se observaron espiroquetas que se sembraron en agar sangre-TSA y se incubaron durante tres días a 42°C.

Se repitió el mismo esquema con la diferencia que una jarra con los *flasks* se incubó por 24 h y otra por 48 h, luego se plaquearon y se incubaron por dos a seis días a 39°C.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Ensayos para el cultivo de *Brachyspira* en medios líquidos

En la Tabla 4.1 se encuentra un resumen de los distintos ensayos realizados para el crecimiento de *Brachyspira* spp en medios líquidos.

Para el caldo TSB+SFB+hisopado de *B. hyodysenteriae* no se obtuvo crecimiento con las distintas concentraciones de espiroquetas en incubaciones entre 2 a 4 días de duración.

Para el caldo infusión CC+SFB+hisopado de *B. hyodysenteriae* no se obtuvo crecimiento en concentraciones bajas de espiroquetas, < 1 de McFarland (hisopados de 3x2 cm), cuando fueron incubados desde 2 hasta 4 días, con y sin movimiento con magneto (1 cm de longitud) o *shaker* y temperatura de incubación de 37° y 42°C. Hubo crecimiento pero con distintos resultados, en cuanto a cantidad de multiplicación de espiroquetas, cuando la concentración del medio inoculado fue de 1,5 de McFarland, se incubaron por 3 días a 42°C y se sembraron en placas de agar sangre -TSA por tres días a 42°C (Tabla 4.1).

El medio Kunkle contenido en frascos con presión negativa fue incubado con y sin movimiento en estufa convencional sin lograr un crecimiento bacteriano. También fueron colocados los frascos con medio Kunkle en jarra para anaerobiosis y se observó crecimiento de *B. hyodysenteriae* (Tabla 4.1).

Varios ensayos que se realizaron a partir de hisopados de placas cultivadas incubados por 2-5 días en TSB o infusión CC se contaminaron.

En el ensayo realizado con *B. pilosicoli* se observó crecimiento luego de 5 días de incubación y se visualizaron pocas espiroquetas en campo oscuro.

4.4.1.1 Protocolo 1: cultivo de materia fecal inoculada con espiroquetas en tubos de vidrio con caldo suplementado y diferentes periodos de incubación

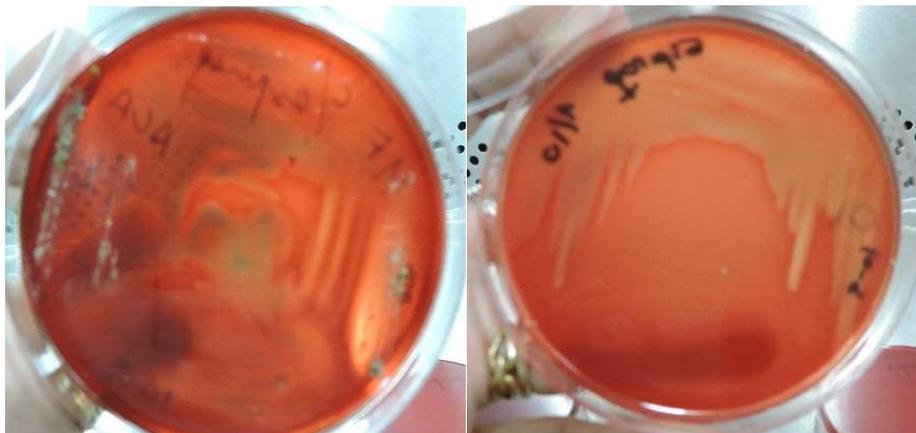
Este protocolo no permitió el crecimiento de *B. hyodysenteriae* en ningún tipo de incubación aplicado con cualquiera de los tipos de caldos utilizados. En las placas de la Jarra Control, se obtuvo un buen crecimiento luego de seis días en aquellas sembradas con la materia fecal inoculada con espiroquetas (Fig. 4.1) y en las placas sembradas con el inóculo (CC 1/10) espiroquetas).

Tabla 4.1: Medios líquidos y procedimientos para el cultivo de *Brachyspira* spp

Medio	Inóculo	Días y T° de incubación	Resultado
2 ml TSB+SFB+hisopado de <i>B. hyo</i> *	Se levantó con hisopo una superficie de 1x1 cm de placa cultivada en 1ml TSB	4 días a 42°C	Sin crecimiento
2 ml TSB+SFB+200µl CC con <i>B. hyo</i> (Mc Farland 1)	Hisopado de placa de <i>B. hyo</i> en 2ml de CC (Mc Farland 1)	2 días a 42°C	Sin crecimiento
2 ml CC+SFB+200µl CC con <i>B. hyo</i>	Se levantó con hisopo una superficie de 3x2 cm de placa cultivada en 2ml CC	4 días a 42°C en movimiento con magneto	Sin crecimiento
2 ml CC+SFB+200µl CC con <i>B. hyo</i>	Se levantó con hisopo una superficie de 3x2 cm de placa cultivada en 2ml CC	4 días a 37°C en <i>shacker</i>	Sin crecimiento
2 ml CC+SFB+200 µl CC con <i>B. hyo</i> (Mc Farland 1)	Hisopado de placa de <i>B. hyo</i> en 2ml de CC (Mc Farland 1)	2 días a 42°C	Sin crecimiento
2 ml CC+SFB+ <i>B. hyo</i> (el medio inoculado queda con Mc Farland 1.5)	Hisopado de una placa de <i>B. hyo</i>	3 días a 42°C	Creció muy bien
2 ml CC+SFB+ <i>B. hyo</i> (el medio inoculado queda con Mc Farland 1.5)	Hisopado de una placa de <i>B. hyo</i>	3 días a 42°C	Creció muy poco luego de 3 días de incubación en placa.
5 ml Kunkle+200µl CC con <i>B. hyo</i> (Mc Farland 1)	Hisopado de placa de <i>B. hyo</i> en 2ml de CC (Mc Farland 1)	2 días a 41°C en movimiento con magneto	Creció en placa luego de 5 días de incubación
5 ml Kunkle+200µl CC con <i>B. hyo</i> (Mc Farland 1)	Hisopado de placa de <i>B. hyo</i> en 2ml de CC (Mc Farland 1)	2 días a 41°C con y sin movimiento	Sin crecimiento
10 ml CC+SFB+ <i>B. pilosicoli</i>	Alta carga de bacterias	5 días a 42°C	Creció, luego se plaqueó con buen crecimiento

**B. hyo*= *B. hyodysenteriae*

Fig 4.1: Protocolo 1: Controles positivos de la materia fecal inoculada (1) y del inóculo CC 1/10 (2).



4.4.1.2. Protocolo 2: cultivo de espiroquetas y de materia fecal inoculada con espiroquetas en *flask* con caldo suplementado

En el primer ensayo tanto el caldo con y sin antibióticos permitieron un buen crecimiento de *B. hyodysenteriae*, luego de siete días (cuatro en caldo + tres en agar). El control positivo tuvo un buen crecimiento a los cuatro días de cultivo.

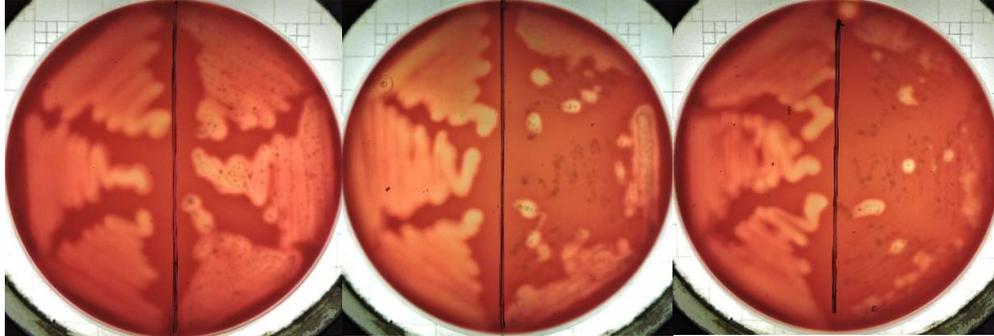
En el segundo ensayo realizado con el agregado de materia fecal y con distintas diluciones del inóculo de espiroquetas a los tres días de incubación de los caldos, se observó una hemólisis fuerte en todas las placas de control positivo, tanto de la dilución del inóculo como del caldo con el inóculo (Fig 4.2). Todos los flasks fueron plaqueados y sólo se recuperó *B. hyodysenteriae* del flask de control positivo con el inóculo puro a los tres días de incubación posteriores.

4.4.1.3. Protocolo 3: cultivo de espiroquetas en *flask* con medio liquido modificado

Se observó escaso crecimiento de *B. hyodysenteriae* en las placas, obteniéndose crecimiento de especies contaminantes (3 días en caldo + 3 días en placa). Se repitió con otro inóculo y a los tres días de incubación de las placas se observaron solo contaminantes.

Cuando se incubó el caldo por 24 h no hubo crecimiento en placa ni a los 2 o 6 días. Cuando se incubó el caldo por 48 h y luego de los 3 días de incubación todas las placas desarrollaron especies contaminantes.

Fig 4.2: Controles positivos de *B. hyodysenteriae* con dilución puro, 1/10 y 1/100, de izquierda a derecha. A la derecha de cada placa está sembrada la materia fecal inoculada, a la izquierda solo el inóculo con la misma dilución.



4.5. DISCUSIÓN

Para el diagnóstico de *Brachyspira* spp patógenas se han desarrollado diversas metodologías basadas en la detección molecular en materia fecal, mucosa o contenido de colon o en el cultivo primario en placa que en pocas horas permite identificar el agente presente. La identificación mediante pruebas bioquímicas ha demostrado resultados inciertos y para ello primero tenemos que tener colonias puras de la cepa. En la práctica este procedimiento se realiza cada vez con menor frecuencia, sin embargo, la necesidad de obtener las cepas puras sigue siendo muy importante para otros estudios, como por ejemplo, pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

La práctica nos llevó a conocer que para purificar 99 cepas (datos no presentados) se necesitaron entre 1 y 12 subcultivos. El 76.2% de las cepas se lograron purificar luego de ser subcultivadas entre 2 y 5 veces, que implicó entre 15 y 27 días, pero para llegar al 95.2% de las cepas puras se necesitaron entre 11 y 43 días de trabajo en el laboratorio. De allí nuestra inquietud en lograr un medio de cultivo que permita un crecimiento rápido de espiroquetas, mediante la disminución de la carga bacteriana de la materia fecal junto a un medio que favorezca el crecimiento de *Brachyspira* spp. Es de destacar que las heces provenían de animales con y sin diarrea, lo que determina que pueda haber una carga baja de espiroquetas en la materia fecal, al no realizarse sobre muestras de casos clínicos.

Se conoce que para duplicar la masa bacteriana de *B. hyodysenteriae* se necesitan de 3-5 h de cultivo en caldo, mientras que *B. pilosicoli* demanda de 1-2 h (Stanton, 2006). Por ello se realizaron diversos ensayos con distintas horas de incubación.

En los caldos con infusión CC y TSB con el agregado de SFB mostraron que hubo desarrollo de *Brachyspira* spp, aunque el agregado de otros componentes como la cisteína, glucosa, extracto de levadura y de heces que favorecen el crecimiento de las espiroquetas (Achacha y Messier, 1992; Kunkle y Kinyon, 1988, Kunkle *et al.*, 1986), no se vio reflejado en ninguno de los protocolos realizados, tal lo planteado por varios autores. Es probable que no se haya logrado la anaerobiosis propuesta por Rodriguez-Cavallini y de la Cruz (1999) luego de la esterilización del medio de Kunkle, esta podría ser una forma económica de proveer anaerobiosis para el crecimiento de *B. hyodysenteriae*. Con ese medio hubo crecimiento cuando fue colocado en jarra para anaerobiosis luego de varios días de incubación. Diferencias en cuanto a la cantidad de medio, el tipo de recipiente y la forma de proveer el ambiente anaeróbico podrían marcar los resultados opuestos con los otros autores. El caldo que denominamos modificado no permitió un buen desarrollo de espiroquetas, la

contaminación observada quizás se daba a fallas en la preparación de alguno de sus componentes, se obtuvo un resultado positivo luego de 3 días en caldo y 3 días en placa, pero parecería que el agregado de otros componentes al caldo TSB no mejoró la multiplicación.

El tamaño del recipiente donde se realiza el cultivo en caldo también podría influir en el crecimiento de las espiroquetas, no se obtuvieron buenos resultados en los caldos inoculados en tubos de vidrio con 2-3-ml. Los flasks ofrecen una mayor superficie para el desarrollo bacteriano, pero en el protocolo que se obtuvieron cultivos positivos, éstos estuvieron 3-4 días en incubación lo que ayudaría a un mayor desarrollo. La incubación con movimiento también podría favorecer la propagación, lo que se observó en los ensayos donde sólo hubo crecimiento cuando se incubó a *B. pilosicoli* con agitación magnética en un erlenmeyer y a *B. hyodysenteriae* en caldo Kunkle en jarra para anaerobiosis.

Se obtuvieron buenos resultados con el cultivo de *B. hyodysenteriae* realizado en caldo suplementado que contenía rifampicina y espectinomicina cuando se usaron flasks, con siete días en total para observar el desarrollo bacteriano, pero estos resultados no se repitieron cuando se le agregó materia fecal inoculada con espiroquetas. Este medio si bien fue propuesto como pretratamiento antes del plaqueo en medio BAM-SR (que también contiene esos antibióticos) no es solo un medio selectivo, sino también un medio que apoya el crecimiento rápido de espiroquetas debido a la presencia de extracto de carne y 7% de sangre equina (Calderaro *et al.*, 2001). Con el pretratamiento (Calderaro *et al.*, 2005) se obtuvo un cultivo puro en cinco días; sin embargo, debemos tener en cuenta que las placas se observaban diariamente para purificarlas a partir de los tres días, esto lo permite la estufa de anaerobiosis. Pero si no se tiene ese equipamiento, la visualización de las placas colocadas en jarras en anaerobiosis implica que hay que proveer nuevo sistema anaeróbico de Gas Pack cada vez que se abra, lo que lleva a un costo importante.

La especie de *Brachyspira* que se quiere aislar también podría influir en la selección del medio. Según Calderaro *et al.* (2003), *B. aalborgi* creció luego de 48 h utilizando la metodología anterior, aunque el caldo fue TSB en lugar de CC, mientras que para Kunkle *et al.* (1986) el agregado de extracto de heces porcinas favoreció el crecimiento de *B. hyodysenteriae*.

Por cultivo se ha podido detectar un mínimo de 10^5 células de *B. hyodysenteriae* por gramo de materia fecal (Kunkle y Kinyon, 1988) por lo tanto la falta de crecimiento en el protocolo en que se colocó 3×10^8 espiroquetas/g de materia fecal, quizás se debió al tiempo de incubación o al medio de cultivo utilizado. En el otro protocolo con materia fecal

(alrededor de 10^5 espiroquetas/ml) tampoco se recuperaron *B. hyodysenteriae* de los caldos inoculados, aunque se observó en los controles la viabilidad de las espiroquetas, la incubación en caldo no permitió ninguna propagación mayor de esta especie.

Es probable que una de las principales causas de falta de crecimiento en los primeros ensayos se debió a que la superficie de cultivo de espiroquetas que se levantó de la placa era muy pequeña, lo que probablemente tenían un bajo título total de bacterias inoculadas. Quizás también se debió a que se realizaron en tubos de vidrio con 2 ml de caldo, no obstante, sólo hubo crecimiento en estos recipientes cuando se colocó mayor concentración de espiroquetas.

Los controles positivos de los ensayos con materia fecal y que se plaqueron directamente dieron buenos resultados, por lo tanto, las espiroquetas estaban viables y en suficiente cantidad. Por lo tanto, es probable que ante situaciones de bajo título de bacterias solo se debiera sembrar la materia fecal en un medio sólido con antibióticos.

En el protocolo con caldo modificado crecieron, pero se contaminaron, quizás por no tener antibióticos, quizás se deberían tomar mayores precauciones sobre el mantenimiento de la esterilidad al realizar las siembras y un estricto control de los medios líquidos para evitar las contaminaciones.

Los resultados mas alentadores se obtuvieron con la utilización de flask con infusión CC o TSB con el agregado de SFB, con o sin el agregado de espectinomicina y rifampicina porque se pudo comprobar el crecimiento de *Brachyspira* spp. Pero cuando se hicieron ensayos con el agregado de materia fecal inoculada con espiroquetas no crecieron. Por lo tanto, no fue posible lograr *in vitro* la propagación de *B. hyodysenteriae* en caldo con materia fecal y llegar a establecer el tiempo en días hasta purificar la cepa.

Nuevos ensayos son necesarios para obtener un crecimiento rápido de *Brachyspira* spp, para luego aplicarlo en muestras fecales obtenidas de animales en granja.

CAPÍTULO V

CONSIDERACIONES FINALES

La disentería porcina una enfermedad con casi cien años de historia desde su aparición en 1921. La identificación de su agente *B. hyodysenteriae* llegó, luego de muchos años, en 1972. Hoy en día se considera que otras dos especies pueden producirla, "*B. suanatina*" y "*B. hamptonii*". La espiroquetosis intestinal porcina producida por *B. pilosicoli* emergió varios años después, hacia 1980. En tanto que las especies como *B. intermedia*, *B. murdochii* y *B. innocens*, que fueron consideradas como comensales o apatógenas en los primeros tiempos luego de su identificación, cada vez hay más estudios que detectan su presencia en casos de colitis leves.

Todos estos cambios relacionados al agente causal junto al desarrollo tecnológico que permiten realizar estudios moleculares y llevan al conocimiento mas profundo de las espiroquetas permiten su diagnóstico rápido lográndose tratamientos efectivos y medidas de control preventivas certeras.

La escasa información existente en nuestro país no permitía un análisis objetivo sobre la importancia de las especies del género *Brachyspira* en las granjas porcinas argentinas.

El relevamiento de 53 establecimientos ubicados en la zona central de Argentina y que incluyó a las provincias de mayor producción nacional permitió conocer que en casi el 76% de ellos estaban infectados con alguna especie de *Brachyspira* y que en todas las provincias muestreadas se encontraron granjas confinadas con más de 200 madres cuya población estaba infectada con EI.

Las especies que se identificaron fueron *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. murdochii* y *B. innocens* en las muestras de materia fecal de animales con y sin diarrea de 22 semanas de edad, siendo las especies más prevalentes *B. murdochii* y *B. innocens*, tanto por el número de granjas infectadas como en la cantidad de muestras fecales encontradas.

Hubo presencia de *Brachyspira* spp en granjas de distinto número de hembras, pero en aquellas que tenían más de 1000 madres la prevalencia fue menor, aunque sin diferencias significativas, pero a la vez con una mayor proporción de animales diseminadores intrgranja.

No sería conveniente utilizar la bacterioscopia con tinción de Gram como prueba tamiz en muestras de materia fecal para la determinación de *Brachyspira* spp debido a que sólo el 26% de frotis positivos a espiroquetas resultaron también positivos al cultivo, identificándose en ellos aislados de *Brachyspiras* spp. Sin embargo existe una alta probabilidad (85%) de que frotis negativos a espiroquetas sean verdaderamente negativos a *Brachyspiras* spp.

La consistencia de la materia fecal no predice acerca de la presencia de *Brachyspira* spp, pero es más probable que se visualicen espiroquetas en frotis de materia fecal y que se aislen cuando la materia fecal es blanda.

La caracterización de las diez cepas de *B. hyodysenteriae* recuperadas de casos clínicos y del relevamiento realizado en este estudio, permitió confirmar la detección de los genes *nox_{hvo}*, *thyA* y *hlyA* en todas las cepas. En tanto que la detección del gen *ACP* y de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa, *bhmp39F* y *bhlp29.7*, presentan diferencias con referencia a otros estudios.

El análisis filogenético de los genes estudiados a partir del MLST sugiere que las cepas de *B. hyodysenteriae* de nuestro país están filogenéticamente emparentadas y sugieren una limitada diversidad genética. Sin embargo, las ST obtenidas indican que son diferentes a las publicadas en el PubMLST.

El crecimiento de las EI del género *Brachyspira* es complejo, de lento desarrollo, asociado a numerosos agentes bacterianos y necesita de un ambiente anaeróbico, son consideradas bacterias fastidiosas. Todo esto no permite que se identifiquen todos los aislamientos recuperados de materia fecal o durante su purificación. También complica el hecho de que es probable que más de una especie esté presente como en el 17% de las granjas de este estudio.

El crecimiento de *Brachyspira* spp en caldo parecería que necesita de un alto título inicial de bacterias para su multiplicación y la utilización de recipientes que ofrezcan una superficie similar a los *flasks* con por lo menos 10 ml de caldo. Los tiempos obtenidos para multiplicar *B. hyodysenteriae* en los medios de cultivo experimentales que utilizamos que eran por cultivo en caldo y luego en agar sangre no mejoraron en comparación a los ya publicados para lograr purificar la cepa.

El banco de cepas logrado consta de *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. murdochii* y *B. innocens*. Esto permitirá realizar estudios de tipificación y su comparación con cepas nacionales e internacionales, mientras que la susceptibilidad bacteriana, como la determinación de CMI, que se puede realizar sobre las cepas patógenas colaborará en el conocimiento sobre resistencia bacteriana que resulta ser de suma importancia en la salud animal y en la salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-Achacha M, Messier S. (1992) Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology* 249-251.

-Achacha M, Messier S, Mittal K. (1996) Development of an experimental model allowing discrimination between virulent and avirulent isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 60: 45-49.

-Atyeo RF, Stanton TB, Jensen NS, Suriyaarachichi DS, Hampson DJ. (1999) Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. *Veterinary Microbiology* 67:47-60.

-Baccaro MR, Moreno AM, Shinya LT, Sabatini Dotto D. (2003) Identification of bacterial agents of enteric disease of multiplex PCR in growing-finishing pigs. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 225-229.

-Backhans A, Jansson DS, Aspán A, Fellström C. (2011) Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Veterinary Microbiology* 153 (1-2): 156-162.

-Barcellos D, Sobestiansky J. (1998). *Uso de antimicrobianos em suinocultura*. Goiânia, Brasil. Art 3 Impressos Especiais.

-Barcellos D, Mathiesen M, De Uzeda M, Kader I, Duhamel G. (2000) Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Veterinary Record* 146: 398-403.

-Barcellos D, Razia L, Borowski S. (2003) Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte industrial de duas regiões criatórias do estado do Rio Grande do Sul, em relação à medicação da ração. *Ciência Rural* 33 (4): 725-729.

-Barth S, Gömmel M, Baljer G, Herbst W. (2012) Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. *Veterinary Microbiology* 155 (2-4): 438-443.

-Bellgard M, Wanchanthuek P, La T, Ryan K, Moolhuijzen P, Albertyn Z, Shaban B, Motro Y, Dunn D, Schibeci D, Hunter A, Barrero R, Phillips N, Hampson D. (2009) Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS ONE* 4 (3):1-12.

-Biksi I, Lőrincz M, Molnár B, Kecskés T, Takács N, Mirt D, Cizek A, Pejsak Z, Martineau GP, Sevin JL, Szenci O. (2007) Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in hungarian finishing pigs. *Acta Veterinaria Hungarica* 55 (2): 219-227.

-Bishop B, Kinyon J, Burrough E, Pierdon M. (2013) Comparison of the isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* from various transport and selective media. *American Association of Swine Practitioners* 91-95.

-Black M, Moolhuijzen P, Barrero R, La T, Phillips N, Hampson D, Herbst W, Barth S, Bellgard M. (2015) Analysis of multiple *Brachyspira hyodysenteriae* genomes

confirms that the species is relatively conserved but has potentially important strain variation. *PLoS ONE* 10 (6): e0131050. doi:10.1371/journal.

-Borgström A, Scherrer S, Kirchgässner C, Schmitt S, Frei D, Wittenbrink M. (2017) A novel multiplex qPCR targeting 23S rDNA for diagnosis of swine dysentery and porcine intestinal spirochaetosis. *BMC Veterinary Research* 13:42. DOI 10.1186/s12917-016-0939-6

-Burrough E, Madson D, Schwartz K. (2011) *Brachyspira* Colitis-Re-emergence of Swine Dysentery? *ISU Swine Disease Conference for Swine Practitioners*. Iowa. 27-31.

-Burrough ER, Strait EL, Kinyon JM, Bower LP, Madson DM, Wilberts BL, Schwartz KJ, Frana TS, Songer JG. (2012a) Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24 (6): 1025-1034. DOI: 10.1177/1040638712457927

-Burrough E, Strait E, Kinyon J, Bower L, Madson D, Schwartz K, Frana T, Songer JG. (2012b) Comparison of atypical *Brachyspira* spp. clinical isolates and classic strains in a mouse model of swine dysentery. *Veterinary Microbiology* 160: 387-394.

-Burrough ER. (2017) Swine Dysentery: Etiopathogenesis and diagnosis of a reemerging disease. *Veterinary Pathology* 54(1): 22-31.

-Calderaro A, Maerialdi G, Perini S, Ragni P, Guégan R, Dettori C, Chezzi C. (2001) A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with dysentery in Italy. *Veterinary Microbiology* 80: 47-52.

-Calderaro A, Villanacci V, Conter M, Ragni P, Piccolo G, Zuelli C, Bommezzadri S, Guégan R, Zambelli C, Perandin F, Arcangeletti MC, Medici MC, Manca N, Dettori G, Chezzi C. (2003) Rapid detection and identification of *Brachyspira aalborgi* from rectal biopsies and faeces of a patient. *Research in Microbiology* 154: 145-153.

-Calderaro A, Bommezzadri S, Piccolo G, Zuelli C, Dettori G, Chezzi C. (2005) Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. *Veterinary Microbiology* 105: 229-234.

-Carranza A, Parada J, Tamiozzo P, Milanesio L, Di Cola G, Pelliza B, Busso J, Bautista S, Ambrogi R, Illanes N. (2010a) Especies de *Brachyspira* aisladas de cerdos en frigorífico. *Memorias XVIII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico*. Corrientes. B11. 51.

-Carranza A, Bautista S, Illanes N, Tamiozzo P, Ambrogi A. (2010b) Effectiveness of two antibiotics against *Brachyspira hyodysenteriae*: a field study. *21th International Pigs Veterinary Society Congress*. Vancouver, Canadá. P.425.

-Carranza A, Illanes N, Tamiozzo P, Chanique A, Parada J, Di Cola G, Dolso I, Busso J, Ambrogi A. (2012) Características bioquímicas de cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* aisladas en Argentina. *Memorias XI Congreso Nacional Producción Porcina*. Salta. S12, 170.

-Carvajal A, de Arriba ML, Rodríguez H, Vidal AB, Duhamel GE, Rubio P. (2006) Prevalence of *Brachyspira* species in pigswith diarrhoea in Spain. *Veterinary Record* 158: 700-701. doi: 10.1136/vr.158.20.700

-Chander Y, Primus A, Olivera S, Gebhart CJ. (2012) Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated “*Brachyspira hampsonii*”. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24(5): 903-910.

-Charon NW, Goldstein SF. (2002) Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The Spirochetes. *Annual Review of Genetics* 36: 47-73. doi: 10.1146/annurev.genet.36.041602.134359

-Clothier KA, Kinyon JM, Frana TS, Naberhaus N, Bower L, Strait EL, Schwartz K. (2011) Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23: 1140-1145.

-Corona-Barrera E, Smith D, Murray B, Thomsom J. (2004) Efficacy of seven disinfectant sanitizers on field isolates of *Brachyspira pilosicoli*. *Veterinary Record* 154: 473-474.

-Corona-Barrera E, Munguía J, Rivera K, Jiménez F, Fajardo R, Pradal-Roa P, Thomson J. (2009) Isolation and identification of intestinal spirochaetes from pigs farms from the northern, central and southern areas of México. *Proceeding 5th Spiroconference International Conference on Colonic Spirochaetales Infections in Animals and Humans*. España. 19-20.

-Costa MO, Hill JE, Fernando C, Lemieux HD, Detmer SE, Rubin JE, Harding JC. (2014) Confirmation that “*Brachyspira hampsonii*” clade I (Canadian strain 30599) causes mucohemorrhagic diarrhea and colitis in experimentally infected pigs. *BMC Veterinary Research* 10:129. doi:10.1186/1746-6148-10-129

-Diarra AT, Achacha M, Mittal KR. (1995) Evaluation of different serological tests or detection of antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* in pig sera. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 18 (3): 215-221.

-Fellström C, Gunnarsson A. (1995) Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Research in Veterinary Science* 59: 1-4.

-Fellström C, Petterson B, Uhlén M, Gunnarsson A, Johansson KE. (1995) Phylogeny of *Serpulina* based on sequence analyses of the 16S rRNA gene and comparison with a scheme involving biochemical classification. *Research in Veterinary Science* 59, 5-9.

-Fellström C, Petterson B, Thomson J, Gunnarsson A, Persson M, Johanson K. (1997) Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemicals analysis and PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35:462-467.

-Fellström C, Karlsson M, Petterson B, Zimmerman U, Gunnarsson A, Aspan A. (1999). Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology* 70: 225-238.

-Fellström C, Zimmerman U, Aspan A, Gunnarsson A. (2001) The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Animal Health Research Reviews* 2: 37-43.

-Fellström C, Råsbäck T, Johansso, K, Tobias O, Aspán A. (2008) Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. *Journal of Microbiological Methods* 72: 133-140.

-Fossi M, Skrzypczak T. (2006) D-ribose utilisation differentiates porcine *Brachyspira pilosicoli* from other porcine *Brachyspira* species. *Anaerobe* 12 (2): 110-113.

-Gasparrini S, Alborali GL, Pitozzi A, Guarneri F, Giacomini E, Baldo V, Scali F, Lazzaro M, Boniotti MB. (2017). Characterization of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italy by multilocus sequence typing and multiple locus variable number tandem repeat analysis. *Journal of Applied Microbiology* 123: 340-351.

-Giacoboni G, Moredo F., Risso M., Perfumo C. (1997) Evaluación de actividad antibacteriana “*in vivo*” e “*in vitro*” frente a *Serpulina hyodysenterie*. *Revista de Medicina Veterinaria* 82 (4): 212-215.

-Giacoboni G. (1998) *Susceptibilidad de diferentes cepas de ratones libre de patógenos específicos a la infección experimental por Serpulina hyodysenterie agente productor de la Disentería Porcina*. Tesis Doctoral, Méd. Vet. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

-Hammer JM, Gebhart C. (2013) The evolving world of *Brachyspira*-associated colitis. *American Association of Swine Veterinarians* 229-230.

-Hampson DJ, Trott DJ. (1995) Intestinal spirochetel infections of pigs: an overview with an Australian perspective. En Hennessy DP y Cranwell PD(Eds), *Manipulation pig production* (pp 139-169). Werribee. Australia. V. Australasian Pig Science Association.

-Hampson DJ, Atyeo RF, Combs BG. (1997) Swine dysentery. En: Hampson DJ, Stanton TB (Eds), *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans* (pp 175-209). New York, USA. CAB Internacional.

-Hampson DJ, Ahmed N. (2009) Spirochaetes as intestinal pathogens: Lessons from a *Brachyspira* genome. *Gut Pathogens* 1:10. doi:10.1186/1757-4749-1-10

-Hampson DJ. (2012) Brachyspiral colitis. En: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (Eds.), *Diseases of swine* (pp 680-698) 10th ed., Iowa, USA. Wiley-Blackwell.

-Hampson DJ, La T, Phillips ND. (2015) Emergence of *Brachyspira* species and strains: reinforcing the need for surveillance. *Porcine Health Management* 1:8. DOI 10.1186/s40813-015-0002-1

-Hampson DJ, La T, Phillips ND, Holyoake PK. (2016) *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from apparently healthy pig herds following an evaluation of a prototype commercial serological ELISA. *Veterinary Microbiology* 191: 15–19.

-Hartnack S, Nathues C, Nathues H, Grosse Beilage E, Lewis FI. (2014) Estimating diagnostic test accuracies for *Brachyspira hyodysenteriae* accounting for the population structure in food animals. *PLoS ONE* 9 (6): e98534. doi:10.1371/journal.

-Herbst W, Schneider S, Baljer G, Barth S. (2017) An update of *Brachyspira hyodysenteriae* serotyping. *Research in Veterinary Science* 111: 135–139.

-Hidalgo A, Carvajal A, Pringle M, Rubio P, Fellström C. (2010) Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiology and Infection* 138: 76-85.

-Holt S. (1978) Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiological Reviews* 42 (1): 114-160.

-Hommeiz J, Castryck F, Haesebrouck F, Devriese LA. (1998) Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Veterinary Microbiology* 62: 163-169.

-Hovind-Hougen K, Birch-Andersen A, Henrik-Nielsen R, Orholm M, Pedersen JO, Teglbjaerg PS, Thaysen EH. (1982) Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 16(6): 1127-1136.

-Hsu T, Hutto DL, Minion C, Zuerner R, Wannemuehler MJ. (2001) Cloning of a beta-hemolysin gene of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 69 (2): 706-711 DOI: 10.1128/IAI.69.2.706-711.2001

-Illanes N, Pereyra N, Carranza A, Pelliza B, Ambrogi R, Tamiozzo P, Ambrogi A. (2008a) Presence of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hyodysenteriae* in Argentina. 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa. P 03.024, 244.

-Illanes N, Bertone J, Romanini S, Pelliza B, Di Cola G, Ambrogi A, Tamiozzo P, Chanique A, Carranza A. (2008b) Métodos de diagnóstico para *Brachyspira spp* . IX Congreso Nacional de Producción Porcina. San Luis. Argentina. 205.

-Jacobson M, Fellström C, Lindberg R, Wallgren P, Jensen-Waern M. (2004a) Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *Journal of Medical Microbiology* 53, 273-280.

-Jacobson M, Aspan A, Heldtander Königsson M, Hardaf Segerstad C, Wallgren P, Fellström C, Jensen-Waern M, Gunnarson A. (2004b) Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. *Veterinary Microbiology* 102: 189-201.

-Jacobson M, Gerth Löfstedt M, Holmgren N, Lundehei N, Fellström C. (2005) The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Sweden piglet producing herds and wild boar population. *Journal of Medical Microbiology B* 52, 386-391.

-Jansson DS, Persson M, Zimmerman U, Johansson KE. (2011) Phenotypic and genetic diversity among intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) in free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*) sampled in southern Sweden. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 566– 575.

-Jensen NS. (1997) Detection, identification and subspecific differentiation of intestinal spirochaetes. En: Hampson DJ, Stanton TB (Eds), *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans* (pp 323-341). New York, USA. CAB Internacional.

-Jensen T, Møller K, Boye M, Lesser T, Jorsal S. (2000) Scanning electron microscopy and fluorescent *in situ* hybridization of experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* infection growing pigs. *Veterinary Pathology* 37: 22-32.

-Jensen T, Boye M, Møller K. (2004) Extensive intestinal spirochaetosis in pigs challenges with *Brachyspira pilosicoli*. *Journal of Medical Microbiology* 53: 309-312.

-Jensen TK, Boye M. (2005) Application of immunohistochemistry and fluorescent *in situ* hybridization for the detection of the porcine large intestinal agents *Lawsonia intracellularis*, Porcine Virus type 2, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira innocens*, *Brachyspira murdochii* and *Brachyspira intermedia*. *Proceeding 3th International Conference on Colonic Spirochaetales Infections in Animals and Humans*. Parma, Italy. 64-65.

-Jensen TK, Christensen AS, Boye M. (2010) *Brachyspira murdochii* colitis in pigs. *Veterinary Pathology* 47: 334-338.

-Joens LA, Harris DL, Kinyon JM, Kaeberle L. (1978) Microtitration agglutination for detection of *Treponema hyodysenteriae* antibody. *Journal of Clinical Microbiology* 8: 293-298.

-Joens LA (1997) Virulence factors associated with *Serpulina hyodysenteriae*. En: Hampson DJ, Stanton TB (Eds), *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans* (pp 151-172). New York, USA. CAB Internacional.

-Joerling J, Barth SA, Schlez K, Willems H, Herbst W, Ewers C (2018) Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence gene profiles of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from pigs in Germany. *PLoS ONE* 13(1): e0190928. <https://doi.org/10.1371/journal>.

- Kennedy MJ, Rosnick DK, Ulrich RG, Yancey RJ. (1988) Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. *Journal of General Microbiology* 134: 1565-1576.
- Kinyon JM, Harris DL. (1974) Growth of *Treponema hyodysenteriae* in liquid medium. *Veterinary Record* 95: 219.
- Kinyon J, Harris D, Glock RD. (1977) Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *American Society for Microbiology*. 638-646.
- Kinyon JM, Harris DL. (1979) *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29 (2): 102-109.
- Komarek V, Maderner A, Spargser J, Weissenböck H. (2009) Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. *Veterinary Microbiology* 134: 311-317.
- Kunkle RA, Harris DL, Kinyon JM. (1986) Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology* 24 (4): 669-671.
- Kunkle RA, Kinyon JM. (1988) Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology* 26 (11): 2357-2360.
- La T, Hampson DJ. (2001) Serologic detection of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* infections. *Animal Health Research Reviews* 2 (1): 45-52. DOI: 10.1079/AHRR200115
- La T, Phillips N, Hampson D. (2003) Development of a Duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in Pig faeces *Journal of Clinical Microbiology* 41: 3372-3375.
- La T. (2006) *Characterisation, recombinant expression and immunogenicity of bhlp29.7, an outer membrane lipoprotein of Brachyspira hyodysenteriae*. Tesis Doctor Philosophy. School of Veterinary and Biomedical Science. Universidad de Murdoch. Australia.
- La T, Phillips ND, Harland BL, Wanchanthuek P, Bellgard MI, Hampson DJ. (2009) Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology* 138: 330-338.
- La T, Phillips ND, Wanchanthuek P, Bellgard MI, O'Hara AJ, Hampson DJ. (2011) Evidence that the 36 kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence, *Veterinary Microbiology* 153 (1-2): 150-155. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.053
- La T, Phillips ND, Thomson JR, Hampson JD. (2014) Absence of a set of plasmid-encoded genes is predictive of reduced pathogenic potential in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Research* 45:131.

-La T, Phillips ND, Hampson DJ. (2016a) An investigation into the etiological agents of swine dysentery in Australian pig herds. *PLoS ONE* 11 (12): e0167424. doi:10.1371/journal.

-La T, Rohde J, Phillips ND, Hampson DJ. (2016b) Comparison of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates recovered from pigs in apparently healthy multiplier herds with isolates from herds with swine dysentery. *PLoS ONE* 11(8): e0160362. doi:10.1371/journal

-Leser TD, Møller K, Jensen TK, Jorsal SE. (1997) Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Molecular and Cellular Probes* 11: 363-372.

-Lindecrona RH, Jensen TK, Møller K. (2004) Influence of diet on the experimental infection of pigs with *Brachyspira pilosicoli*. *Veterinary Record* 154(9): 264-7.

-Ludwig W, Euzéby J, Whitman WB. (2010) Road map of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. En: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NK, Ludwig W, Whitman WB (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, 4, New York, USA. Springer.

-Lugsomya K, Tummaruk P, Hampson DJ, Prapasarakul N. (2012) Development of a modified selective medium to enhance the recovery rate of *Brachyspira hyodysenteriae* and other porcine intestinal spirochaetes from faeces. *Letters in Applied Microbiology* 54: 330-335.

-Mahu M, de Jong E, De Pauw N, Vande Maele L, Vandebroucke V, Vandersmissen T, Miry C, Pasmans F, Haesebrouck F, Martel A, Boyen F. (2014) First isolation of "*Brachyspira hampsonii*" from pigs in Europe. *Veterinary Record* 174(2):47. doi: 10.1136/vr.101868

-Mahu M, De Pauw N, Vande Maele L, Verlinden M, Boyen F, Ducatelle R, Haesebrouck F, Martel A, Pasmans F. (2016) Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Veterinary Research* 47:66. DOI 10.1186/s13567-016-0353-x

-Mahu M, Pasmans F, Vranckx K, De Pauw N, Vande Maele L, Vyt P, Vandersmissen T, Martel A, Haesebrouck F, Boyen F. (2017a) Presence and mechanisms of acquired antimicrobial resistance in Belgian *Brachyspira hyodysenteriae* isolates belonging to different clonal complexes. *Veterinary Microbiology* 207: 125–132.

-Mahu M, Boyen F, Canessa S, Zavala Marchan J, Haesebrouck F, Martel A, Pasmans F. (2017b) An avirulent *Brachyspira hyodysenteriae* strain elicits intestinal IgA and slows down spread of swine dysentery. *Veterinary Research* 48: 59. DOI 10.1186/s13567-017-0465-y

-Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3140–3145.

-Margawani KR, Robertson ID, Brooke CJ, Hampson DJ. (2004) Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of *Brachyspira pilosicoli* in humans on the island of Bali, Indonesia. *Journal of Medical Microbiology* 53: 325-332. DOI 10.1099/jmm.0.05415-0

-McLaren AJ, Trott DJ, Swayne DE, Oxberry SL, Hampson DJ. (1997) Genetic and Phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (2): 412-417.

-Mirajkar NS, Gebhart CJ. (2014) Understanding the molecular epidemiology and global relationships of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: A multi-locus sequence typing approach. *PLoS ONE* 9 (9): e107176. doi:10.1371/journal.pone.0107176

-Mirajkar NS, Bekele AZ, Chander YY, Gebhart CJ. (2015) Molecular epidemiology of novel pathogen “*Brachyspira hampsonii*” reveals relationships between diverse genetic groups, regions, host species, and other pathogenic and commensal *Brachyspira* species. *Journal of Clinical Microbiology* 53: 2908-2918. doi:10.1128/JCM.01236-15

-Mirajkar NS, Phillips ND, La T, Hampson DJ, Gebhart CJ. (2016) Characterization and recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 54:2942–2949. doi:10.1128/JCM.01717-16.

-Møller K, Jensen T, Jorsal S, Leser T, Cartensen B. (1998) Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly-beta haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica* and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growings pigs. *Veterinary Microbiology* 62: 59-72.

-Moredo F, Giacoboni G, Sanguinetti R, Yamasaki T. (1995) Aislamiento de *Serpulina hyodysenteriae* e *innocens* de cerdos con cuadros de Disenteria Porcina. *Analecta Veterinaria* 15 (01-02): 23-25.

-Moredo F, Giacoboni G, Perfumo C, Mittal R. (1999) Serotyping of strains of *Serpulina hyodysenteriae* isolated from swine with porcine dysentery symptoms in the province of Buenos Aires. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41 (2): 63-66.

-Mushtaq M, Zubair S, Råsbäck T, Bongcam-Rudloff E, Jansson DS. (2015) *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics. *BMC Microbiology* 15:208. DOI 10.1186/s12866-015-0537-y

- Naresh R, Hampson DJ. (2010) Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. *Microbiology* 156, 191-197. DOI 10.1099/mic.0.030262-0
- Neef NA, Lyson RJ, Trott DJ, Hampson DJ, Jones PW, Morgan JM. (1994) Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotics pigs. *Infection and Immunity* 62: 2395-2403.
- 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. *Journal of Microbiology and Immunology* 41(6): 445-452.
- Ohya T, Araki H, Sueyoshi M. (2008) Identification of weakly beta-hemolytic porcine spirochetes by biochemical reactions, PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis and species-specific PCR. *Journal of Veterinary Medical Science* 70(8): 837-840.
- Olson L, Fales W. (1983) Comparison of stained and culturing for identification of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology* 18(4): 950-955.
- Osorio JM. (2011) *Disentería porcina: análisis de secuencias multilocus (MLST) de Brachyspira spp y evaluación de dos preparados vacunales*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de León. España.
- Osorio J, Carvajal A, Naharro G, La T, Phillips ND, Rubio P, Hampson DJ. (2012) Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries. *PLoS ONE* 7(6): e39082. doi:10.1371/journal
- Osorio J, Carvajal A, Naharro G, Rubio P, La T, Phillips ND, Hampson DJ. (2013) Identification of weakly haemolytic *Brachyspira* isolates recovered from pigs with diarrhoea in Spain and Portugal and comparison with results from other countries. *Research in Veterinary Science* 95(3): 861-869.
- Oxberry SL, Hampson DJ. (2003) Epidemiological studies of *Brachyspira pilosicoli* in two Australian piggeries. *Veterinary Microbiology* 93: 109–120.
- Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg y WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, Zablen L, Mandelco L, Woese CR. (1991) Phylogenetic analysis of the spirochetes. *Journal of Bacteriology* 173 (19): 6101-6109.
- Paster BJ, Dewhirst FE. (1997) Taxonomy and phylogeny of intestinal spirochaetes. En: Hampson D J, Stanton TB (Eds.) *Intestinal Spirochaetes of Domestic Animals and Humans* (pp 47–61). New York, USA. CAB International.
- Paster BJ, Dewhirst FE. (2000) Phylogenetic foundation of spirochetes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2 (4): 341-344.

-Patterson AH, Rubin JE, Fernando C, Costa MO, Harding JCS, Hill JE. (2013) Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of “*Brachyspira hamptonii*”-associated colitis. *BMC Veterinary Research* 9: 137.

-Perez EM. (2016) *Estudio clínico, anatomopatológico y de biología molecular de cuadros entéricos en cerdos de crecimiento y terminación*. Tesis Doctoral, Méd. Vet. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

-Phillips ND, La T, Amin MM, Hampson DJ. (2010) *Brachyspira intermedia* strain diversity and relationships to the other indole-positive *Brachyspira* species. *Veterinary Microbiology* 143 (2-4): 246-254.

-Råsbäk T, Fellström C, Bergsjø B, Cizek A, Collin A, Gunnarsson A, Jensen SM, Mars A, Thomson J, Vyt P, Pringle M. (2005) Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test. *Veterinary Microbiology* 109: 229-243.

-Råsbäk T, Fellström C, Gunnarsson A, Aspán A. (2006) Comparison of culture and biochemical test with PCR detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *Journal of Microbiological Methods* 66: 347-353.

-Råsbäk T, Janson D, Johansson K, Fellström C. (2007) A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated “*Brachyspira suanatina*” sp. Nov. *Environmental Microbiology* 9 (4): 983-991.

-Rodriguez-Cavallini E, de la Cruz E. (1999). Un método sencillo para generar anaerobiosis en tubos de cultivo. *Revista Biomédica* 10: 103-106.

-Rohde J, Rothkamp A, Gerlach GF. (2002) Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2598-600.

-Rohde J, Habighorst-Blome K. (2012) An up-date on the differentiation of *Brachyspira* species from pigs with *nox*-PCR-based restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 158: 211-215.

-Rubin JE, Harms NJ, Fernando C, Soos C, Detmer SE, Harding JCS, Hill JE. (2013) Isolation and characterization of *Brachyspira* spp. including “*Brachyspira hamptonii*” from lesser snow geese (*Chen caerulescens caerulescens*) in the Canadian Arctic. *Microbial Ecology* 66:813-822. DOI 10.1007/s00248-013-0273-5

-Sellwood R, Bland AP. (1997) Ultrastructure of intestinal spirochaetes En: Hampson D J, Stanton TB (Eds.) *Intestinal Spirochaetes of Domestic Animals and Humans* (pp 109-149). New York, USA. CAB International.

- Soler C, Goossens T, Bermejo A, MiguraGarcía L, Cusco A, Francino O, Fraile L. (2018) Digestive microbiota is different in pigs receiving antimicrobials or a feed additive during the nursery period. *PLoS ONE* 13(5): e0197353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197353>

- Song Y, Hampson DJ. (2009) Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. *Veterinary Microbiology* 137: 129–136.
- Song Y, Frey B, Hampson DJ. (2012) The use of ELISAs for monitoring exposure of pig herds to *Brachyspira hyodysenteriae*. *BMC Veterinary Research* 8: 6.
- Songer JG, Kinyon JM, Harris DL. (1976) Selective medium for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology* 4 (1): 57-60.
- Stanton TB, CP Cornell. (1987) Erythrocytes as a source of essential lipids for *Treponema hyodysenteriae*. *Infection and Immunity*. 55 (2): 304-308.
- Stanton TB, Jensen NS, Casey TA, Tordoff LA, Dewhirst FE, Paster BJ. (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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(1): 50-58.
- Stanton TB (1992) Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1):189-90.
- Stanton TB. (1997). Physiology of ruminal and intestinal spirochaetes. En: Hampson DJ, Stanton TB (Eds.) *Intestinal Spirochaetes of Domestic Animals and Humans* (pp 7-45). New York, USA. CAB International.
- Stanton TB, Fournie-Amazouz E, Postic D, Trott DJ, Grimont PAD, Baranton G, Hampson DJ, Saint Girons I. (1997) Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(4): 1007-1012.
- Stanton TB, Postic D, Jensen NS. (1998) *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 669-676.
- Stanton TB, Rosey EL, Kennedy MJ, Jensen BS, Bosworth BT. (1999) Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11): 5028-5034.
- Stanton TB. (2006). The genus *Brachyspira*. En: *The Prokaryotes* (pp 330-356). New York, USA. Springer-Verlag.
- Stephens, C. and Hampson, D. 2001. Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Animal Health Research Reviews* 2: 83-91.
- Stege H, Jensen TK, Møller K, Bækbo P, Jorsal SE. (2000) Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Preventative Veterinary Medicine* 46: 279-292.

- Stege H, Jensen T, Møller K, Bækbo P, Jorsal S. (2001) Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pigs herds. *Preventative Veterinary Medicine* 50: 153-164.
- Tamura, K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Taylor DJ, Alexander TJL. (1971) The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *British Veterinary Journal* 127: 58-61.
- Taylor DJ, Trott DJ. (1997) Porcine intestinal spirochaetosis and spirochaetal colitis. En: Hampson DJ, Stanton TB (Eds.) *Intestinal Spirochaetes of Domestic Animals and Humans* (pp 211-241). New York, USA. CAB International.
- Thomson JR, Smith WJ, Murray BP, McOrist S. (1997) Pathogenicity of three strains of *Serpulina pilosicoli* in pigs with a naturally acquired intestinal flora. *Infection and Immunity* 65 (9): 3693–3700.
- Thrusfield M. (2007) *Veterinary epidemiology*. 3th ed. New York, USA. Wiley.
- Trott DJ, Stanton TB, Jensen NS, Hampson DJ. (1996a) Phenotypic characteristics of *Serpulina pilosicoli* the agent of intestinal spirochaetosis. *FEMS Microbiology Letters* 142: 209-214.
- Trott DJ, Stanton TB, Jensen NS, Duhamel GE, Johnson JL, Hampson DJ. (1996b) *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(1): 206-215.
- Trott DJ, Huxtable CR, Hampson DJ. (1996c) Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infection and Immunity* 64(11): 4648-4654.
- Trott DJ, Alt DP, Zuerner RL, Wannemuehler MJ, Stanton TB. (2001) The search for *Brachyspira* outer membrane proteins that interact with the host. *Animal Health Research Reviews* 2 (1): 19-30.
- Viott AM, Lage AP, Cruz Junior ECC, Guedes RMC. (2013) The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(1): 145-151.
- Wanchanthuek P, Bellgard MI, La T, Ryan K, Moolhuijzen P, Chapman B, Black M, Schibeci D, Hunter A, Barrero R, Phillips ND, Hampson DJ. (2010) The complete genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* and comparison with other *Brachyspira* genomes. *PLoS ONE* 5 (7): e11455. doi:10.1371/journal.pone.0011455
- WassenaarTM, Gaastra W. (2001) Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiology Letters* 201: 1-7.

-Weissenböck H, Maderner A, Herzog A, Lussy H, Nowotny N. (2005) Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of *nox* using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Australian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Veterinary Microbiology* 111: 67-75.

-Wendt M, Nguyen Thi TL, Rothkamp A, Seeliger F, Baumgärtner W. (2008) Experimental challenge of pigs with weakly haemolytic *Brachyspira innocens*, *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira murdochii* in comparison to *Brachyspira hyodysenteriae* infection. 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban. South Africa. OR.03.13.

-Wilberts BL, Warneke HL, Bower LP, Kinyon JM, Burrough ER. (2015) Comparison of culture, polymerase chain reaction, and fluorescent in situ hybridization for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and “*Brachyspira hampsonii*” in pig feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 27(1) 41-46. DOI: 10.1177/1040638714563064

-Witchell TD, Coutts SAJ, Bulach, DM, Adler B. (2006) Differential expression of the Bhmp39 major outer membrane proteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Infection and Immunity* 74 (6): 3271-3276. doi:10.1128/IAI.02000-05

-Zuerner RL, Stanton TB, Minion FC, Li C, Charon NW, Trott DJ, Hampson DJ. (2004) Genetic variation in *Brachyspira*: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish *B. pilosicoli* from *B. hyodysenteriae*. *Anaerobe* 10: 229-237.