



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA  
MAESTRIA EN SALUD Y PRODUCCION PORCINA

IMPACTO PRODUCTIVO DE *Brachyspira hyodysenteriae* EN CERDOS  
TRATADOS Y NO TRATADOS CON ANTIBIOTICOS EN EL PERIODO  
DESTETE-TERMINACION

M.V. ROBERTO MARTIN AMBROGI

DIRECTOR: Mag. Gabosi Horacio  
CO-DIRECTOR: Dra. Mag. Carranza, Alicia Isabel

Rio Cuarto, 2019

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha.....

Calificación.....

## JURADO

Firma.....Aclaración.....

Firma.....Aclaración.....

Firma.....Aclaración.....

## AGRADECIMIENTO

## ÍNDICE

	Pag N°
DETALLE	
AGRADECIMIENTO	II
Índice de Tablas	V
Índice de Figuras	VI
SIGLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1.-INTRODUCCIÓN	
2.-REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	
2.1.-Signos clínicos y epidemiología	1
2.2.-Etiopatogenia	4
2.4.-Control de la enfermedad	9
2.5.-Impacto productivo	12
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	
Hipótesis	15
Objetivo General	15
Objetivo Específicos	15
3.-MATERIALES Y METODOS	
3.1.-Descripción de las granjas	16
3.1.1-Granja D	16
3.1.2-Granja L	17
3.1.3-Granja C	18
3.2.-Diseño del experimento	19
3.3.-Toma de muestras de los animales	20
3.4.-Análisis Estadísticos	25
4.-RESULTADOS	
4.1.-Granja D	27
4.1.1- Índices productivos	27
4.1.2- Hallazgos clínicos	28
4.1.3-Bacteriología	28
4.2.-Granjas L	30

4.2.1- Índices productivos	30
4.2.2- Hallazgos clínicos	30
4.2.3- Bacteriología	31
4.2.4- Hallazgos macroscópicos y microscópicos	31
4.3.-Granjas C	
4.3.1.- Índices productivos	32
4.3.2.- Hallazgos clínicos	33
4.3.3.- Bacteriología	33
4.3.4.- Hallazgos macroscópicos y microscópicos	34
5.-DISCUSIÓN	38
6.-CONCLUSIONES	48
7.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Detalle	Pag N°
1	Promedios en D de GDP, IC, edad y peso a faena y mortalidad de las cohortes	27
2	Hallazgos clínicos de diarrea según tratamiento	28
3	Bacteriología y PCR género <i>Brachyspira</i> y Dúplex- PCR	29
4	Hallazgos macroscópicos y microscópicos de colon	30
5	Promedios en L de GDP, IC, EDAD Y PESO A FAENA Y MORTALIDAD DE LAS COHORTES	30
6	Hallazgos clínicos de diarrea según tratamiento	31
7	Bacteriología y PCR género <i>Brachyspira</i> y PCR <i>B. hyodysenteriae</i>	31
8	Hallazgos macroscópicos y microscópicos de colon	32
9	Promedios en C de GDP, IC, edad y peso a faena y mortalidad de las cohortes	33
10	Hallazgos clínicos de diarrea según tratamiento	33
11	Bacteriología y PCR género <i>Brachyspira</i> y PCR <i>B. hyodysenteriae</i>	34
12	Hallazgos macroscópicos y microscópicos de colon	34
13	GB 1 GRANJA L-D-C	35
14	GB 2 GRUPO A-B-C	36
15	GP1 Hallazgos macro y microscópicos	37
16	GP2 Hallazgos macro y microscópicos	37

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Detalle	Pag N°
1	Imagen satelital de la Graja D	16
2	Imagen satelital de la Graja L	17
3	Imagen satelital de la Graja C	18
4	Edema de la pared del Colon, color blanco	21
5	Edema de la pared del colon con tinte rojizo de la mucosa Exudado mucocatarral.	22
6	Colitis hemorrágica	22
7	Frotis de mucosa de colon para Gram	23
8	Histopatología WS Grado 3	23
9	Gram- Cultivo x 100	24
10	Gram- Materia fecal x100	24

## SIGLAS

GDP: Ganancia Diaria de Peso

IC: Índice de Conversión

DP: disentería porcina

GA: Grupo A

GB: Grupo B

GC: Grupo C

FT: Fontana-Tribondeau

R: Recría

D-T: Desarrollo-Terminación

*B. hyodysenteriae*: *Brachyspira hyodysenteriae*

AIV: Tartrato de acetil isovaleril tilosina

## RESUMEN

La disentería porcina es una enfermedad caracterizada por una colitis mucohemorrágica, que produce deterioro en los índices productivos en los cerdos de terminación en granjas que poseen el agente etiológico, *Brachyspira hyodysenteriae*, el único agente reconocido como causal de esta enfermedad al comienzo de esta tesis y desde los tiempos de la descripción del agente, su control ha sido orientado al uso de antibióticos por la falta de respuestas de las vacunas.

Por ello el objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de dos antibióticos específicos contra *Brachyspira hyodysenteriae*, sobre los índices productivos en tres granjas porcinas con antecedentes de infecciones digestivas.

Para ello, tres (3) granjas fueron seleccionadas con antecedentes de diarrea. En cada una de ellas los cerdos destetados en 9 semanas consecutivas, fueron divididos en 3 grupos y tratados con antibióticos recomendados contra este agente. El grupo A, fue tratado con tartrato de acetil isovaleril tilosina al pase a recría y una semana después del pase a terminación. De manera similar el grupo B fue tratado con tiamulina. Mientras que el grupo C fue considerado control. Cada semana, 5 cerdos eran sacrificados una semana después de finalizados cada tratamiento, donde se registraban los hallazgos patológicos, se tomaban muestras para histopatología y detección del agente por aislamiento y PCR. Esto mismo fue realizado en los animales enviados a matadero. Se registraron los eventos de diarrea y los índices de GDP, IC y muertes en recría y terminación.

En una granja no se pudo demostrar la presencia de *Brachyspira hyodysenteriae*, mientras que en las otras sí. En una de ellas tanto los índices productivos, como los hallazgos patológicos y etiológicos, así como los hallazgos de matadero mostraron diferencias significativas a favor del grupo A con el B y el C.

Teniendo en cuenta que, en los diseños a campo, múltiples factores pueden incidir en los resultados y que hacen difícil abordar a todos ellos, como en esta tesis, los resultados obtenidos permiten inferir que el tartrato de acetil isovaleril tilosina puede ayudar a disminuir las pérdidas productivas ocasionadas por *Brachyspira hyodysenteriae*, así como el estado de portador de este agente.

## ABSTRACT

Swine dysentery is a disease characterized by a mucohemorrhagic colitis, which produces deterioration in the productive parameters in finishing pigs from farms that possess the etiological agent, *Brachyspira hyodysenteriae*, the only agent recognized as causative of this disease when this thesis began to be conducted, whose control has been oriented to the use of antibiotics due to the lack of vaccine responses.

Therefore, the objective of this thesis was to evaluate the effect of two specific antibiotics against *B. hyodysenteriae*, on the productive parameters in pig from three farms with antecedents of digestive infections

Thus, 3 farms with a antecedents of diarrhea were randomly selected. In each of them pigs weaned in 9 consecutive weeks, were divided into 3 groups and treated with antibiotics recommended against *B. hyodysenteriae*. Group A was treated with tylvalosin tartrate after the weaning and one week after the center to finishing stage. Similarly, group B was treated with tiamulin, while group C was considered control. Each week, 5 pigs were sacrificed one week after the end of each treatment, where pathological findings were recorded and samples were collected for histopathology and detection of the agent by isolation and PCR. The same methodology was performed on pigs sent to slaughter. Also, diarrhea events and ADG, FCR and mortality were recorded.

In one, farm the presence of *B. hyodysenteriae* could not be demonstrated, while the others did. In one of them both, the productive indices, the pathological and etiological findings, and the slaughterhouse findings showed significant differences of group A versus groups B and C.

Taking into account that the field study designs, multiple factors can affect the results and make it difficult to address all of them, as in this thesis, the results obtained allow us to infer that the tylvalosin tartrate can help to diminish the productive losses caused by *B. hyodysenteriae*, as well as the bearer status of this agent.



## **INTRODUCCIÓN:**

La disentería porcina es una enfermedad descrita hace casi 100 años, caracterizada por diarrea con sangre, debido a una colitis mucohemorrágica, y al momento de comenzar esta tesis, el único agente reconocido como causal de esta enfermedad era la *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyodysenteriae*), sin embargo luego de tomar las muestras, obtener los resultados y analizar los mismos, se ha demostrado de manera certera que otras especies que afectan a los cerdos, llamadas *B. suanatina* y *B. hampsonii*, son capaces de producir cuadros clínicos, epidemiológicos y patológicos indistinguibles de los de *B. hyodysenteriae* (Rubin *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014, Mushtaq *et al.*, 2015, Mirajkar *et al.*, 2016). Por ello en esta tesis el uso del término disentería porcina (DP) se referirá solo al agente causal como *B. hyodysenteriae*.

Otras especies de *Brachyspira* fueron identificadas en el ciego y colon o materia fecal de los cerdos, como *B. pilosicoli*, *B. murdochii*, *B. intermedia* y *B. innocens* de las cuales no se conocía una acción patógena específica y se las consideraba como comensales, pero últimamente se las involucra en procesos de colitis no hemorrágicas (Weissenbok *et al.*, 2005).

### **Signos clínicos y epidemiología**

La DP es una grave enfermedad entérica mucohemorrágica de los cerdos causada por *B. hyodysenteriae*, que si bien fue descrita hace mas de 100 años, sigue teniendo en la actualidad un gran impacto en los índices productivos en las granjas porcinas debido a las pérdidas por mortalidad, disminución en la ganancia diaria de peso (GDP) y un rendimiento subóptimo en la conversión del alimento (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013). La DP puede afectar a cerdos de todas las edades, pero su mayor impacto se da principalmente en los cerdos que están en los períodos de crecimiento y terminación, con signos clínicos, que van desde una diarrea mucosa leve y un estado general inalterado, a la diarrea mucohemorrágica grave que puede producir una letalidad del 50-90%. Estas presentaciones pueden aparecer en una granja de forma cíclica cada 3 a 4 semanas, en general asociadas al retiro de los antibióticos usados como terapéuticos o a medidas higiénicas inadecuadas en los vacíos de las salas (Hampson *et al.*, 2006).

Los reproductores pueden afectarse de manera esporádica y su rol en la transmisión del agente ha sido investigado en 5 granjas infectadas de manera endémica, donde se observó que el porcentaje de cerdas eliminadoras de *B. hyodysenteriae* varió

entre el 0 al 5% y el 1.88% de sus lechones fueron positivos en sus materias fecales. Si bien los porcentajes son bajos, estos podrían ser útiles en el diseño de muestreos en maternidad y en programas de erradicación según lo señalado por los autores (Duff *et al.*, 2014).

Los cerdos enfermos pueden eliminar más de 100 bacterias por gramo de heces, lo cual se ha demostrado puede ser suficiente para infectar a otros cerdos. Si esta materia fecal se encuentra en un ambiente a temperatura de 10°C puede mantenerse viable más de 70 días. Sin embargo, si estas heces están a 25°C solo por 7 días se mantendrán viables y sólo 24 horas a 37°C. También *B. hyodysenteriae* es muy sensible a la desecación y a la acción de la mayor parte de los desinfectantes, principalmente fenólicos y compuestos con cloro (Schultz *et al.*, 1999).

*Brachyspira hyodysenteriae* infecta principalmente al cerdo, pero puede infectar a otras especies de forma transitoria y sin cuadro clínico, como los ratones, las ratas, los perros y aves como los estorninos. Se han descrito cuadros clínicos en granjas de ñandúes (Carvajal *et al.*, 2000). El ratón juega un papel importante en la epidemiología de la enfermedad porque puede infectarse con dosis bajas de bacterias y excretarlas en las heces durante 6 meses (Lapuente y Rosell, 2004). Los otros portadores tienen un papel epidemiológico menos importante. El perro es portador durante 13 días, la rata durante 2 días y los estorninos durante sólo 8 horas (Thompson *et al.*, 2002). Según Rodríguez (Rodríguez *et al.*, 2008) la principal fuente de infección son los cerdos portadores que pueden tener cuadro clínico o ser asintomático. En los cerdos que dejan de presentar los signos clínicos pueden continuar eliminando la bacteria en las heces durante más de 70 días, aunque generalmente esta excreción es mucho más corta, de forma que sólo un 20% de los cerdos siguen siendo eliminadores por más de 20 días. El mismo autor indica que una vez infectada una granja, la infección se hace enzoótica y las cerdas madres contaminan a sus camadas durante la lactancia, aunque el cuadro clínico no se suele observar hasta la fase de engorda probablemente debido a las características del mucus en estos animales. La transmisión a través de fómites también es muy fácil debido a la resistencia de la bacteria a las condiciones ambientales. Los vehículos, la ropa, el calzado o los utensilios contaminados con heces pueden transportar la bacteria desde granjas infectadas a granjas libres o bien de un sitio o sala a otra parte de la granja (Rodríguez *et al.*, 2008).

La infección se produce por vía fecal-oral (Thompson *et al.*, 2002). El principal riesgo de introducción de la infección lo constituyen los cerdos infectados a nivel subclínico, los camiones que transportaron cerdos infectados y las botas. Cuando *B. hyodysenteriae* se introduce por primera vez en una granja susceptible, pueden verse afectados los cerdos de todas las edades, desde 6 semanas de edad en adelante incluidos los adultos, sin embargo, reiteramos que en las granjas que presentan la infección en forma endémica, la enfermedad se observa principalmente en cerdos de crecimiento y engorde (entre 2 y 5 meses de edad) (Grahofer *et al.*, 2016).

La enfermedad no siempre se expresa clínicamente a pesar de la presencia de la bacteria en la granja (Canibe *et al.*, 2005). La incidencia y severidad de la enfermedad en un rebaño afectado varía con la dosis infectiva, inmunidad del grupo de animales, la virulencia de la cepa actuante, presencia o ausencia de antibióticos, manejo, sanidad o factores estresantes favorecedores para la supervivencia o multiplicación de *B. hyodysenteriae*. Se ha comprobado que el frío, la sobrepoblación, el transporte y la mezcla de cerdos son factores predisponentes. El estrés del parto también puede hacer que una cerda portadora no eliminadora, comience a excretar la bacteria en las heces y contamine a sus lechones (Lapuente y Rosell, *et al.*, 2004). Otro factor importante es la virulencia de la cepa, se han encontrado cepas en cerdos sanos que son completamente avirulentas en condiciones experimentales y otras que tienen una gran capacidad patógena. Las condiciones de alojamiento de los cerdos también pueden hacer que el cuadro sea más o menos grave, si existe un gran contacto con heces, las dosis infectantes son mucho más elevadas y, en consecuencia, el cuadro clínico puede ser más grave (Rodríguez *et al.*, 2008). El empleo de promotores del crecimiento puede dificultar la observación de la enfermedad.

La DP es una enfermedad ampliamente distribuida en todo el mundo, aunque los estudios con respecto a la epidemiología son diversos, la prevalencia varía significativamente entre ellos habiéndose descrito prevalencias que oscilan entre el 0% y el 40%. Estas variaciones pueden deberse a la utilización de diferentes métodos de diagnóstico, las diferencias entre los países, la gestión empresarial en las granjas, los regímenes de alimentación, entre varias otras causas. Un dato importante es el que señaló que el uso de antibióticos puede ser causal de las divergencias de resultados sobre prevalencias, así como que la prohibición del uso de los mismos en algunos países

sea el responsable del incremento de la prevalencia de DP en esos estados (Giacoboni *et al.*, 1998).

En España, la DP está implicada en más del 30% de los brotes de diarrea en las granjas de cerdos comerciales. En Argentina se ha demostrado la presencia de distintas especies de *Brachyspira*, *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. murdochii* y *B. innocens*, aisladas de colon de cerdos con diarrea y sin diarrea (Carranza *et al.*, 2010).

Se investigó en el estado de Minas Gerais, Brasil, la prevalencia de *L. intracellularis*, *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae*, *Salmonella* spp., *E. coli* enterotoxigénica, *Trichuris suis* y la ocurrencia de infección mixta, para ello se tomaron muestras aleatorias de 46 rebaños con diarrea o antecedentes de diarrea, demostrando que la infección mixta puede ocurrir, pero no pudieron concluir en una exacta prevalencia de cada una de ellas (Cruz *et al.*, 2013) (Viott *et al.*, 2013)

### **Etiopatogenia**

La enfermedad se describió por primera vez en 1921, pero su etiología exacta no se aclaró hasta 1968 cuando Terpstra comprobó que los sueros de cerdos que habían padecido la DP reaccionaban con espiroquetas procedentes del intestino de los cerdos enfermos. El mismo año el español Tesouro observó mediante microscopía óptica y electrónica del contenido de colon y de heces de cerdos enfermos espiroquetas asociadas con los signos clínicos y lesiones de la disentería. En 1971 Taylor y Alexander aislaron por primera vez espiroquetas beta hemolíticas anaerobias de las heces de cerdos enfermos y reprodujeron la enfermedad. Simultáneamente en Estados Unidos, Harris *et al.*, 1972 llegaron a las mismas conclusiones y denominaron al agente *Treponema hyodysenteriae*. Stanton *et al.*, en 1991 utilizaron análisis genómicos para demostrar que esta bacteria era distinta a otras del género *Treponema* y propusieron la denominación de *Serpulina hyodysenteriae*. En 1997, Ochiay *et al.* demostraron que esta bacteria tenía una homología mayor con bacterias del género *Brachyspira* que con las del género *Serpulina* y propusieron la denominación actual de *B. hyodysenteriae*.

Como para cualquier enfermedad, el aislamiento del agente causal es la prueba de oro para hacer un diagnóstico de certeza, si bien hoy en día se reconoce que un verdadero diagnóstico de certeza, desde el punto de vista científico, requiere que se demuestre la presencia del agente en las lesiones patológicas (Segalés *et al.*, 2013). Sin embargo, dado un cuadro clínico y patológico compatible con DP, el aislamiento del

agente es suficiente para que el colega de campo comience a tomar medidas para su control.

Para el aislamiento es necesario utilizar medios enriquecidos con sangre, atmósfera anaerobia y antibióticos que inhiban el crecimiento de otra flora generalmente presente en el intestino de los cerdos y por un tiempo de incubación no menor a los 4 días. Los bacteriólogos experimentados reconocen lo fastidioso que resulta el aislamiento de este agente (Schultz *et. al.*, 1999; Rodríguez, 2008 Harris *et.al.*,1972b). Se debe reconocer que en el cultivo, las cepas que crecen lo hacen en forma de pátina y no de colonias típicas como la mayoría de las bacterias, lo cual acrecienta su dificultad y hace más tediosos los trabajos de investigación relacionados a este agente.

La clasificación de las distintas especies de *Brachyspira* puede hacerse por medios de pruebas bioquímicas, requiriendo para ello un cultivo puro, lo cual puede lograrse en repiques de las pátinas antes señaladas, demorando aún más el tiempo de confirmación del agente.

Una ayuda que tuvieron los bacteriólogos que trabajaron con este género de bacterias, es que producen hemólisis y con ello pudieron identificar más fácilmente las pátinas de crecimiento. Esta hemólisis ha sido investigada por sus implicancias no solo en identificar a estas bacterias en los cultivos, sino también porque tiene implicancias clínicas y patológicas.

En ese sentido un estudio de (Burrough *et al.* 2012), con 8 aislamientos de *Brachyspira* spp. de casos clínicos, 5 de ellos fuertemente beta-hemolíticos y 3 cepas de *Brachyspira* débilmente beta-hemolíticas, y una cepa de referencia de *B. hyodysenteriae* (B204) se inocularon en cerdos (n=6 por aislamiento) para comparar el potencial patogénico después de la inoculación oral. Los resultados revelaron que las cepas fuertemente beta-hemolíticas indujo significativamente mayor tiflocolitis que las que son débilmente beta-hemolíticas, independientemente de la identificación genética del aislado, y que por ello las cepas aisladas producen lesiones similares a la DP asociadas a *B. hyodysenteriae*. Los resultados sugieren que las características fenotípicas del cultivo de *Brachyspira* spp., puede ser un indicador más sensible de potencial para inducir la enfermedad disentérica, que la identificación molecular, mientras que las no productoras de esta beta hemolisina podrán producir la enfermedad clínica típica de colitis porcina sin sangre.

Es así que cuando se investigan los factores de virulencia más importantes de *B. hyodysenteriae* estos se relacionan a su motilidad y capacidad beta-hemolítica (fuerte hemólisis) lo cual es determinada por hemolisinas, con lo cual se ha demostrado su capacidad citotóxica sobre las células epiteliales a la que se responsabiliza de producir los daños originales de la enfermedad que termina con una inflamación (Hutto *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que esta hemolisina en realidad está expresada al menos en 4 genes: *tlyA*; *tlyB*; *tlyC* y *hlyA*, por lo cual se considera que se pueden producir 4 hemolisinas, la importancia de conocer esto según los autores, está en las consideraciones prácticas que ellos hacen en relación al diagnóstico, puesto que a campo pueden ocurrir diarreas sin sangre producidas por *B. hyodysenteriae*, pues la cepa actuante no posee o está modificada el gen *tlyA*, lo que hace al bacteriólogo sospechar de otras especies de *Brachyspira* menos patógenas como *B. murdochi*, *B. pilosicoli*, entre otras (Mahu *et al.*, 2016).

Todo este complejo escenario para el aislamiento e identificación del agente llevó a los investigadores a desarrollar pruebas moleculares que permitieran una identificación más rápida, manteniendo los criterios de sensibilidad y especificidad necesarias. En un trabajo realizado por Hartnack *et al.* (2014), quien compara la sensibilidad del PCR con el aislamiento de la bacteria, porque si bien este último es la prueba de oro, los autores señalan que el aislamiento es dificultoso, y tedioso demorando en general entre 5 a 7 días, mientras que los resultados de PCR lo obtuvieron en un máximo de 2 días. Estos mismos autores obtuvieron una sensibilidad del 95% con PCR versus 73,2% para el aislamiento cuando procesaron 239 muestras de materia fecal de cerdos cursando con casos clínicos provenientes de 103 granjas en Alemania (Judith *et al.*, 2002).

Sobre aislados de *B. hyodysenteriae*, varios autores realizaron trabajos de investigación tendientes a determinar cómo el agente producía la DP. Así se comprobó que la mucina, principal componente del mucus, sufría cambios cuando los cerdos eran inoculados con *B. hyodysenteriae* a diferencia de los controles y que estas mucinas facilitaban la adhesión del agente a las células epiteliales del intestino grueso y que este tipo de mucina era producida principalmente en animales adultos (Quintana-Hayashi *et al.*, 2015).

Como en varias enfermedades, la patogenia de los agentes etiológicos puede ser demostrada por fenómenos inmunopatológicos, en el caso particular de *B.*

*hyodysenteriae*, Hontecillas *et al.* (2005) demostraron que la mucosa de colon de cerdos infectados con este agente, tenían una marcada proliferación de células CD4+ y que ellas serían responsables de los fenómenos inmunopatológicos que producen las lesiones características de esta enfermedad.

Según Diarra *et al.* (1995), dentro de la especie *B. hyodysenteriae* y en función de la composición de los lipopolisacáridos de la membrana externa, se distinguen 11 serogrupos denominados con letras de la A a la K, cada uno de los cuales puede contener diferentes serovares. La prevalencia de los serovares varía con cada país y en cada serovar puede haber cepas de distinta virulencia.

De lo expuesto en etiopatogenia, queda entendido que la identificación del agente requiere cierta complejidad lo que hace dificultoso y costoso un estudio a campo como el que aquí se pretende. Para ello en un diseño muy apropiado de una tesis de posgrado, Illanes *et al.* (2008) propone la comparación de métodos de detección del agente que sean más accesibles a las condiciones de investigaciones prácticas y concluye que tanto la coloración de Gram, como la de Fontana Tribondeau (FT) resultaron con muy buen nivel de concordancia y propone su uso para los colegas de campo y laboratorios de baja complejidad cuando la diarrea es un problema en las granjas y se requiere de un diagnóstico presuntivo rápido.

Diferencia en las tasas de detección de *Brachyspira* spp. entre los cultivos, la tinción de Gram o el PCR en muestras de hisopos rectales tienen implicancias para la elección de métodos de detección y métodos de vigilancia que pueden ser más eficaces en las estrategias de control de *Brachyspira* spp. (Patterson *et al.*, 2013).

## Patología

Cualquiera fuera la especie del género de *Brachyspira* que produzca enfermedad, las lesiones estarán principalmente ubicadas en el colon, por lo cual hoy día se llama Colitis Brachyspiral a todas las afecciones producidas por las distintas especies de *Brachyspira*. El colon y el ciego pueden estar afectados.

Los hallazgos patológicos fueron descriptos desde hace mucho tiempo, mostrando que las diferencias están en relación con cepas fuertemente hemolíticas que producen colitis hemorrágica y las débilmente hemolíticas que producen colitis mucocatarral. (Joseph *et al.* 2013).

Como señalamos en patogenia, las bacterias de género *Brachyspiras* usan distintos mecanismos de virulencia para adherirse a las células epiteliales y luego producir lesiones según posean determinados factores de patogenicidad, dentro de los cuales hemos señalado distintas hemolisinas codificadas en los genes según la especie de *Brachyspira* presente.

Desde el punto de vista experimental (Wilcock y Olander *et al.* 1979) suponen que transcurre un tiempo desde que el agente llega al colon hasta producir las lesiones. Así los autores demuestran que la bacteria fue excretada en materia fecal 4 días antes que aparezcan signos clínicos y que estos signos eran muy marcados entre 7 a 10 días posinfección, donde el 90% fue afectado hasta las 3 semanas. (Jacobson M *et. al.* 2007). Indicaron también que al principio existe una disminución en la secreción del mucus por lo menos durante 3 a 5 días posinfección y la hiperplasia de células caliciformes comienza después de ese período. Por ello a la necropsia de un cerdo con signos recientes de diarrea, mostraron principalmente una colitis catarral, caracterizada por engrosamiento de la pared del colon debido al edema inflamatorio y el desprendimiento de epitelio que se generan por la infección de *Brachyspira spp.* Dependiendo de la presencia de genes que codifiquen fuertes o débiles hemolisinas, se empezará a notar una coloración rosada a un rojo intenso si produce fuerte hemolisinas, a lo que empieza a agregarse aumento de mucus. Si bien no es tema de esta tesis, se conoce que la mucina producida depende de las especies de *Brachyspira* actuante.

De esta forma se comprende como la lesión de colitis puede ir variando dependiendo de los factores de virulencia que presentan las *Brachyspiras*, donde las especies que producen **hemolisinas fuertes**, como *B. hyodysenteriae* entre otras, será de una colitis mucohemorrágica, con la consecuente disentería observada clínicamente. Si la respuesta inflamatoria es aguda con marcada hiperemia, puede observarse presencia de fibrina en la luz del órgano sin adhesión al epitelio, es decir pseudomembranosa y no diftérica.

Los hallazgos histopatológicos que serán considerados en esta tesis, están en relación con los descritos por Wilcock y Olander *et al.* (1979). La mucosa del colon muestra necrosis (desprendimiento) de los enterocitos e hiperplasia de células caliciformes principalmente de las criptas, las que pueden estar engrosadas e hiperplásicas. Por otro lado, es frecuente la presencia de neutrófilos en la lamina propia y aumento del mucus en la luz de las criptas y en el lumen, así como presencia de

hemoglobina y glóbulos rojos sobre la mucosa, con marcada hiperemia de los vasos de la submucosa. Estas lesiones son observadas cuando se realizan cortes de colon para histopatología y coloreadas por H&E. Mientras que se ha descrito que coloraciones de plata como la Warthin-Starry (WS) en cortes histopatológicos permiten ver los cambios microscópicos y además las estructuras espiroquetales, siendo ésta una técnica de bajo costo y sencilla de realizar según lo descrito por Illanes (2008) en su tesis cuando comparó distintas técnicas de diagnóstico.

Sin embargo, estos hallazgos que ayudan al diagnóstico no son determinantes puesto que observar estructuras espiroquetales no significa necesariamente que son *Brachyspiras*, para ello se debe realizar técnicas de inmunohistoquímica, donde se usan anticuerpos específicos contra *Brachyspira* spp, marcados con enzimas, que permiten observarse con microscopios de luz. Otra técnica de mayor especificidad es la hibridación *in situ* con sondas de secuencia de genes que reconocen el género y especies de *Brachyspira*. Sin embargo, estas técnicas requieren de un mayor costo y complejidad, que dado las características de esta tesis son imposibles de implementar.

### **Control de la enfermedad**

Desde los tiempos de la descripción del agente como productor de esta enfermedad, su control ha sido orientado al uso de antibióticos, principalmente por el fracaso de vacunas que se desarrollaron hace tiempo atrás.

Una investigación realizada por Mirajkar *et al.*, en 2016, demostró una alta sensibilidad de *B. hyodysenteriae*, *B. hamptonii*, *B. pilosicoli* y *B. murdochii* aisladas en EE. UU. a la tiamulina, valnemulina y carbadox y heterogénea susceptibilidad a la doxiciclina y baja sensibilidad a la lincomicina y tilosina. Esta sensibilidad fue diferente cuando se usaron cepas europeas, lo cual muestra la necesidad de realizar pruebas antimicrobianas con aislamientos regionales.

En EE. UU., se realizó un trabajo de investigación con tres grupos de cerdos que recibieron 0,006% de tiamulina, 0,018% de tiamulina o ningún medicamento. Ambos niveles de tiamulina resolvieron la enfermedad clínica dentro de las 24 h del inicio del tratamiento y se eliminó el arrojamiento de espiroquetas dentro de las 72 h del inicio del tratamiento y resolvieron y/o evitaron lesiones histológicas en cerdos infectados con *Brachyspira* spp. (Wilberts *et al.*, 2014).

Si no se realiza un tratamiento, esta enfermedad resulta en tasas altas de mortalidad. Una tendencia hacia la resistencia a los antimicrobianos se ha detectado en *B. hyodysenteriae* aisladas desde 2000-2007 a nivel mundial y de aislamientos españoles en particular con sensibilidad reducida a varios productos antimicrobianos que fueron usados contra la DP en esos períodos. Tales cepas se han detectado en muchos países de producción de cerdos y representan una grave amenaza para la industria porcina. En consecuencia, la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos de *B. hyodysenteriae* se ha convertido en esencial para ayudar a los profesionales en la selección de las estrategias de tratamiento de DP. Por otra parte, un programa de monitoreo puede ayudar a detectar las nuevas tendencias de la resistencia y así evaluar la utilidad de los pocos medicamentos disponibles a nivel nacional en España según Hidalgo *et al.* (2011).

En los cerdos, la tiamulina y valnemulina se utilizan para tratar la DP, así como otras patologías asociadas a diferentes especies del género *Brachyspira*, a la enteropatía proliferativa porcina, la neumonía enzoótica y otras infecciones en los que haya *Mycoplasma spp.* Existen dudas acerca de los aumentos en las concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) de tiamulina y valnemulina para *B. hyodysenteriae* aisladas de porcinos, registrados en los países europeos de ingresos medios, ya que hay sólo un número limitado de antimicrobianos disponibles para el tratamiento de la DP, donde la resistencia a estos antimicrobianos ya es común y extendida.

Una herramienta eficaz para el tratamiento de la DP son las pleuromutilinas; debido a nuevos aumentos en la resistencia a viejos antibióticos o como consecuencia de las restricciones implementadas en algunos países, lo que contribuye a mejorar la salud de los cerdos, el bienestar y la productividad (van Duijkeren *et al.*, 2014).

En Italia se realizó un estudio para determinar los cambios temporales en distintas líneas genéticas y la susceptibilidad a la pleuromutilina entre los aislados de *B. hyodysenteriae*. Se aislaron 108 cepas de *B. hyodysenteriae* de 87 granjas en diferentes regiones de Italia desde el 2003 al 2012, y se determinaron sus MICs para tiamulina y valnemulina. Se realizó una regresión logística para evaluar las asociaciones entre la susceptibilidad a los dos agentes antimicrobianos y el grupo genético, el año y la región de aislamiento. Mas del 50% de los aislamientos eran resistentes a ambas pleuromutilinas (MIC > 2,0 µg / mL para la tiamulina y > 1,0 µg / mL para la valnemulina). Se encontraron asociaciones significativas entre la proporción de cepas

sensibles a la pleuromutilina y el grupo genético y el año de aislamiento. También se observó una tendencia significativa en la reducción de la susceptibilidad a lo largo del tiempo (Rugna *et al.*, 2015).

Cabe pensar que, en un futuro próximo, cuando se prohíban los promotores del crecimiento que aún están autorizados, la incidencia de la disentería aumente. En EE. UU., donde aun se puede emplear el carbadox, la incidencia de DP es 14 veces menor que en Europa, donde no se puede emplear este producto, el cual tiene una eficacia muy elevada contra *B. hyodysenteriae* (Rodríguez *et al.*, 2008).

Los estudios de resistencia mencionados anteriormente son de importancia para los programas de erradicación, los que se han constituido en una tendencia mundial no solo para este agente sino para otros como la neumonía enzoótica porcina y pleuroneumonía porcina, entre otros.

Los dinamarqueses, preocupados por el uso indiscriminado de antibióticos en el tratamiento de enfermedades intestinales después del destete, realizaron una investigación en conjunto con los colegas de campo, estos asumían que las decisiones sobre la medicación con antibióticos por lotes a menudo se basan en la inspección clínica de charcos diarreicos en el suelo de los boxes. En algunos de estos brotes de diarrea tratados, los investigadores demostraron que los patógenos intestinales sólo se pudieron demostrar en un pequeño número de cerdos en el grupo antes de ser tratados, por lo cual definieron a estos brotes como diarreas con bajo número de patógenos. La pregunta fue si era necesario el uso de antibióticos en esos casos, puesto que no usarlos podría reducir el consumo de antibióticos en la industria porcina. Por lo cual sugirieron a los colegas de campo criterios para el diagnóstico de lotes con diarrea con bajo número de patógenos en cerdos en crecimiento. Los datos recogidos previamente a partir de 20 rebaños daneses fueron utilizados para crear una serie de casos de brotes de diarrea clínica, sometidos a un tratamiento con antibióticos. En el presente estudio, estos brotes de diarrea fueron clasificados como de baja patogenicidad (<15% de los cerdos que tienen enfermedad intestinal bacteriana) (n=5) o brotes de patógenos alta ( $\geq 15\%$  de los cerdos que tienen enfermedad intestinal bacteriana) (n=15 brotes). Basado en la serie de casos, se exploraron diferentes procedimientos de diagnóstico, y se sugirieron criterios para el diagnóstico de lotes de diarrea con bajo número de patógenos para, de esta forma, no tratarlos. El efecto de la variación del muestreo fue explorado por simulación (Pedersen *et al.*, 2014).

Mirajkar *et al.*, en 2016, demostraron que cepas de *B. hyodysenteriae*, *B. hamptonni*, *B. pilosicoli* y *B. murdochii* presentaban distintos grados de sensibilidad a la tiamulina, valnemulina y carbadox dependiendo del sistema de producción, el programa de bioseguridad y las prácticas de manejo, posiblemente por diferencias genómicas de las cepas.

En el año de comienzo de este trabajo, se presenta en el mercado nacional una nueva droga llamada Aivlosin del laboratorio ECO HEALTHLH del Reino Unido, que será distribuido por una empresa nacional, Vetanco S.A., cuya composición es el tartrato de acetil isovaleril tilosina (85%). Según los trabajos realizados por Atsuko y Kido (1998) en cerdos, relacionados a la farmacocinética del compuesto, este acetil isovaleril tilosina posee una biodisponibilidad tres veces superior a la tilosina.

Estudios sobre cinética, de acuerdo a su productor (ECO HEALTHLH) mencionan que la absorción en cerdos es rápida y que los niveles séricos se obtienen a las 2 horas, posterior a la aplicación de una dosis de 50 mg/kg y en pollos con treinta mg/kg, el nivel pico (c. max) se obtiene a la hora.

Este antibiótico recientemente fue puesto en el mercado y ha sido recomendado para el tratamiento de *Mycoplasma spp*, *Lawsonia intracellularis* y *Brachyspira spp.*, entre otros agentes.

### **Impacto productivo:**

En una granja suiza núcleo de cría con 170 cerdas/600 cerdos jóvenes de engorde, se llevó a cabo un programa para intentar erradicar la DP, para ello se realizó una despoblación parcial modificada en etapas, durante un período de 12 semanas en 2011 después de que *B. hyodysenteriae* fue detectada en cerdos con cuadros clínicos. Además de la administración de medicamentos por vía oral (8,1 mg de tiamulina/kg de peso corporal) durante 4 semanas a los cerdos restantes en la granja, los establos se limpiaron a fondo y la suspensión residual se desinfectó, mientras que las superficies se desinfectaron. Al mismo tiempo se intensificó el control de roedores y moscas. Al término del programa de erradicación, la granja se controló durante 6 meses por la realización de análisis de frotis fecales de cerdos con diarrea. Todas las muestras fecales fueron negativas para *B. hyodysenteriae*. Los costes de erradicación ascendieron a aproximadamente €96.121,66. La erradicación produjo significativamente mayor ganancia diaria de peso vivo (+ 23,8 g ± 10,1 g, p <0,0001). Este rendimiento mejorado

dio como resultado un beneficio económico adicional de €17.016,75 por año. (Figi *et al.*, 2014).

Como vimos recién el beneficio de la erradicación fue medido como la mejora en la GDP, puesto que al tener mayor ganancia diaria los cerdos alcanzarán el peso a faena más rápido y el retorno de capital más rápido y mayor. Además, como el uso de las instalaciones es de menor tiempo, estas pueden ser usadas nuevamente en menor tiempo y con ello mejorar el costo de amortización.

Si bien la GDP es uno de los índices más usados por su practicidad en la aplicación, también es muy considerado en varios trabajos el índice de conversión (IC) de alimento, es decir cuántos kg de alimento necesita consumir un cerdo para producir un kg de carne. Ello tiene relación con el presupuesto general que se asume en una granja, donde el costo del alimento puede representar entre el 70 a 80% del total del costo de producir un cerdo. Entonces queda claro que, si la GDP aumenta, pero es a costa de mayor consumo de alimento, puede que el balance económico general quede igual o hasta puede dar pérdidas. Estos 2 parámetros (GDP e IC) son los más usados para evaluar ventajas y desventajas económicas tanto en el uso de antibióticos, como vacunas, cambios de manejos del alimento, las instalaciones, entre otras pruebas.

Cada granja tiene sus metas definidas en cuanto a los índices antes señalados que pretende lograr, puesto que la genética, el tipo de alimentación, el manejo de los animales son responsables, entre otras muchas causas, de lograr esas metas. Si bien los objetivos en cada granja pueden ser distintos, no es lo mismo un núcleo genético que el destinado a producir carne, siempre consideraremos como prioritarios la eficiencia productiva, es decir cuánto cuesta en plata producir y cuánto ingresa por ello.

Entonces la GDP y el IC, son variables que no solo se pueden medir, sino que también se pueden cuantificar de manera económica. Si bien en varias investigaciones se usa un grupo control para compararlo con uno o dos tratados, a veces esto resulta muy costoso para el proyecto, por lo que pueden usarse índices reconocidos provenientes de distintos orígenes, en Argentina varias empresas genéticas venden sus productos genéticos a través de planillas, las que indican los índices productivos que se deberían lograr con ellos, por ejemplo la empresa PIC (De la Llata *et al.*, 2001) dice que a los 21 días de vida los lechones deberían pesar 6,22 kg, cuando estos nacen con 1,500 kg y que a los 63 días de edad deberían pesar 24.8 Kg con una GDP para ese período de recría de 0,440 kg o pesar 29,6 kg. a los 70 días con una GDP destete terminación de

0,477 kg. Esta misma empresa menciona que si los animales son pasados a los 70 días de vida con 29,6 kg, deberían pesar 115,6 kg a una edad de 161 días, por lo cual deberían tener una GDP de 0,920 kg. Deberíamos reiterar que estos índices son dependientes de varios factores como hemos señalado, a los que podríamos agregar casi todas las enfermedades que pueden afectar a los cerdos en cada etapa (Overland *et al.*, 1993).

Hipótesis:

Cerdos con antecedentes de diarrea producida por *Brachyspira hyodysenteriae* mejoran sus índices productivos cuando son tratados con antibióticos específicos.

Objetivo general:

Evaluar el efecto de dos antibióticos específicos contra *B. hyodysenteriae* a través de los índices productivos en cerdos con antecedentes de infecciones digestivas en tres granjas.

Objetivos específicos

1. Comparar los hallazgos clínicos y los índices productivos (GDP, IC, edad y peso a faena) entre cerdos tratados con distintos antibióticos y no tratados, desde la recría hasta la terminación.
2. Determinar los hallazgos patológicos macro y microscópicos en colon de cerdos tratados con distintos antibióticos y no tratados, desde la recría hasta la terminación.
3. Determinar por distintas metodologías la presencia de *B. hyodysenteriae* en colon de cerdos tratados con los diferentes antibióticos y no tratados, desde la recría hasta la terminación.
4. Determinar los hallazgos patológicos y bacteriológicos en cerdos enviados a faena, tratados con los diferentes antibióticos y no tratados.
5. Comparar los índices productivos de los cerdos tratados y no tratados en relación a la presencia o ausencia de *B. hyodysenteriae*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS:**

### **Descripción de las granjas**

Varias granjas confinadas con sistema parto terminación y alojamientos diferenciados para gestación, maternidad, recría y desarrollo-terminación que estaban próximas a la Universidad Nacional de Río Cuarto y en las cuales habíamos participado en diagnóstico de enfermedades, fueron invitadas a participar de este proyecto y de las que aceptaron, 3 fueron seleccionadas por tener antecedentes de diarrea en desarrollo y se las denominó granja D, L y C por conveniencia.

#### **Granja D:**

La granja contaba con 550 hembras totales, de 2 líneas genéticas diferentes. Semanalmente destetaba a los 21 días de edad entre 200-210 lechones, los que permanecían en una sala de recría hasta los 62 días de edad, para luego pasar a galpones de desarrollo-terminación hasta los 110 Kg, aproximadamente, cuando se enviaban a faena. En esta granja el día 11 de diciembre del 2008 se comenzó con el primer grupo destetado según se describirá más adelante.

Fig. 1: Vista aérea de la granja D.



## Granja L

La granja contaba con aproximadamente 500 hembras totales, semanalmente destetaba a los 21 días entre 240-250 lechones los que eran alojados en 4 boxes en una misma sala hasta los 71 días de vida donde se los pasaba a un galpón de desarrollo-terminación hasta los 110 Kg. aproximadamente. La genética era de una sola empresa. El día 27 de noviembre del 2008 la granja comenzó con la prueba como se describirá. Está granja era la única que tenía antecedentes de *Brachyspira hyodysenteriae* que fue aislada del ciego de animales con diagnóstico clínico de disentería porcina en nuestro laboratorio del Dpto de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Fig. 2: Vista aérea de la granja L.



### Granja C

La granja contaba con 482 hembras totales, semanalmente destetaba a los 21 días de edad unos 220 lechones y se pasaban a los 75 días de edad al área de desarrollo-terminación. La genética era de un solo origen. El día 4 de diciembre del 2008 la granja comenzó con la prueba.

Fig. 3: Vista aérea de la granja C.



## Diseño del experimento

En cada uno de los establecimientos se conformaron al menos 6 cohortes, cada una de ellas estaba representada por el total de cerdos destetados por semana. De tal forma que la primera semana de destete de comenzado el proyecto en cada granja, se consideró cohorte 1 y así sucesivamente por 6 semanas consecutivas hasta llegar a la cohorte 6. Las cohortes 1, 2 y 3 de cada granja fueron consideradas como pertenecientes al grupo A (GA) y las cohortes 4, 5 y 6 como grupo B (GB). Cuando fue posible se construyeron las cohortes 7, 8 y 9, a las que se identificó como grupo control (GC).

Todos los cerdos pertenecientes al GA en cada granja, recibieron desde el día 21 a los 42 días de vida, *ad libitum* un alimento que contenía AIV (25 ppm), amoxicilina (400 ppm) y colistina (100 ppm), durante ese mismo período, todos los cerdos integrantes del GB recibieron amoxicilina (400 ppm), colistina (100 ppm) y tiamulina (100 ppm). El alimento para las 3 granjas fue preparado con los mismos componentes por la misma empresa de nutrición, la cual se encargó de agregar los suplementos señalados provenientes de una sola empresa farmacológica.

Durante la estadía en recría, se registró a los días 43 y 51 de vida el número de animales con diarrea sobre el total de presentes. La media entre ambas observaciones fue registrada como porcentajes de lechones con diarrea para cada grupo y para esa etapa.

Para determinar los índices productivos en la etapa de recría se procedió en cada granja y con cada cohorte a pesar los animales que ingresaban al destete y luego al pase a desarrollo. La diferencia de peso entre el primer y segundo pesaje dividido el número de días de estancia en recría fue considerado como la GDP para cada cohorte y sobre los 3 valores obtenidos para cada grupo se extrajo la media de GDP. La diferencia de animales ingresados en relación con los pasados a desarrollo se consideró como animales muertos para el período.

Cada cohorte que era pasada a desarrollo, recibió un alimento sólido preparado en cada granja según las recomendaciones del mismo nutricionista desde el pase hasta la

terminación. Las 3 cohortes del GA, en cada granja, recibieron una semana después del pase y durante 10 días consecutivos el alimento conteniendo AIV 50 ppm + 400 ppm de clortetraciclina y el GB 100 ppm de tiamulina y 400 ppm de clortetraciclina, todos proporcionados por un mismo laboratorio. Así el tratamiento para la granja D fue desde los 72 a 82, la granja L desde los 81 a 91 y la granja C desde los 85 hasta los 95 días de vida, respectivamente

De la misma forma la diferencia de peso al ingreso de desarrollo con el del peso a faena dividido los días de estancia se consideró como la GDP para ese período para cada cohorte y se sacó el promedio de los 3 valores para cada grupo. La diferencia de animales ingresados con relación a los enviados a faena fue considerada como mortalidad.

Cuando los cerdos tuvieron 83, 100 y 150 días de vida fueron inspeccionados para determinar el número de animales con diarrea sobre el total de cerdos presente en cada cohorte. El promedio de las 3 inspecciones fue registrado como proporción de animales con diarrea para cada cohorte y el promedio de las 3 cohortes que integraban cada grupo quedó registrado como el promedio de cerdos con signos de diarrea para el GA y GB.

#### Toma de muestras de los animales

En cada una de las granjas y a los 43 días de vida (momento de finalizar el 1er tratamiento) fueron seleccionados al azar 5 lechones de cada cohorte (15 del GA y 15 del GB en cada granja) los que fueron llevados a la sala de necropsia del Departamento de Patología Animal y sacrificados por electrocución.

De manera similar a los 82, 91 y 95 días de vida en la granja D, L y C respectivamente (momento de finalizado el 2do tratamiento) fueron seleccionados al azar 5 lechones de cada cohorte (15 del GA y 15 del GB en cada granja) y llevados al Departamento de Patología Animal y sacrificados por electrocución.

A todos los animales sacrificados se les realizó una necropsia. Para la apertura de la cavidad abdominal se procedió a realizar un corte por línea media ventral hasta la región perianal, pasando por paramedial en los genitales masculinos. Luego se comenzó a separar la piel hacia ambos lados dejando expuesto el tejido celular subcutáneo observando color, cambios vasculares u otras alteraciones. A continuación, se incidió el peritoneo comenzando de esta manera con la inspección y descripción de las lesiones

macroscópicas que se observaban en los distintos órganos de la cavidad abdominal. Posteriormente se extrajo el paquete intestinal y se identificó el ciego, tomando a este como punto de inicio para la inspección del colon el cual sería revisado externamente para la observación de hallazgos que puedan considerarse patológicos. Con el mismo sentido se realizó una apertura completa del colon registrándose los distintos hallazgos en la mucosa, los que fueron identificados como 1. Normales; 2. Cuando, además del edema en la pared del colon, la mucosa se veía enrojecida y con aumento de mucus y 3. Cuando además de lo anterior la coloración del mucus era color ocre a rojo. Luego de ello se tomaron muestras de 2 cm de longitud a 20 cm de distancia de la válvula ileocecal, las que fueron colocadas en formalina bufferada al 10% para histopatología y procesadas con H&E e impregnación argéntica. Los cortes coloreados con H&E fueron revisados por microscopio de óptica común y los hallazgos registrados como: 1. normal; 2. hiperplasia de las criptas y de células caliciformes con cúmulos de neutrófilos y 3. las mismas lesiones y que con impregnación argéntica hubo observación de espiroquetas en la superficie de células epiteliales tanto en criptas como vellosidades.

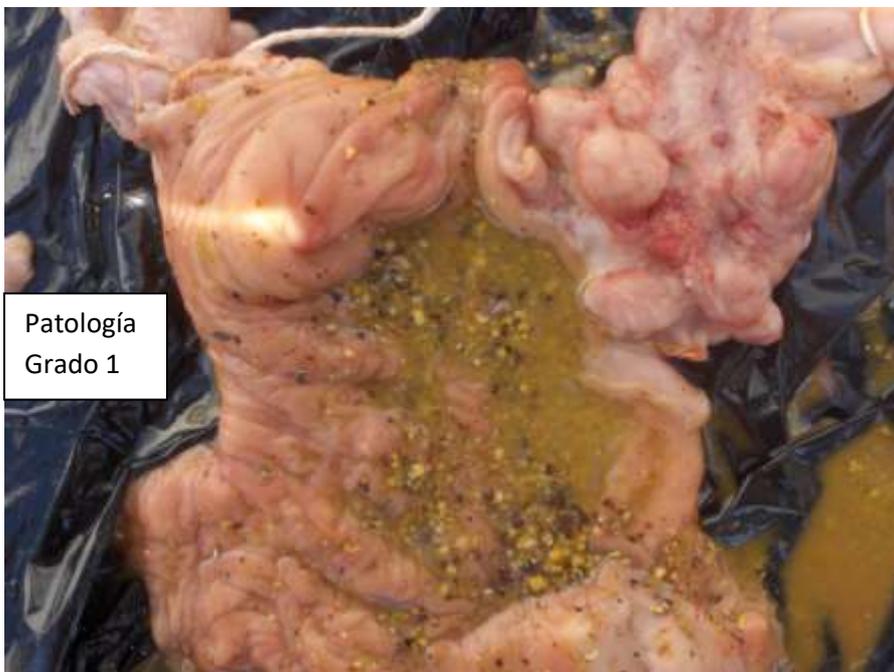


FIG. 4: Edema de la pared del Colon, color blanco nacar normal.



Fig. 5: Edema de la pared del colon con tinte rojizo de la mucosa. Aumento de líquido mucocatarral.

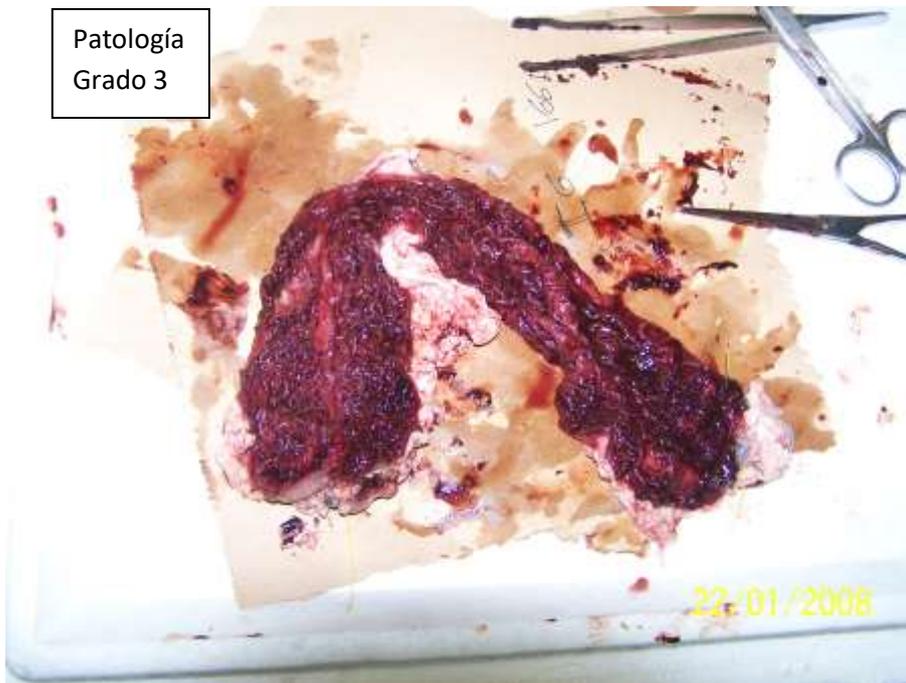


Fig. 6: Colitis hemorrágica

Además sobre la superficie adyacente a la muestra obtenida para histopatología se raspó la mucosa con el borde de un portaobjetos, con los cuales se realizaron dos extendidos finos. Uno de los extendidos fue coloreado por la técnica de Gram utilizando como colorantes el violeta de genciana y safranina. El otro extendido fue coloreado por el método de impregnación argéntica FT, específica para espiroquetas. Las muestras fueron observadas al microscopio óptico registrando presencia o ausencia de espiroquetas de color rosa en el Gram y negras en FT.



Fig. 7: Frotis de mucosa de colon para Gram

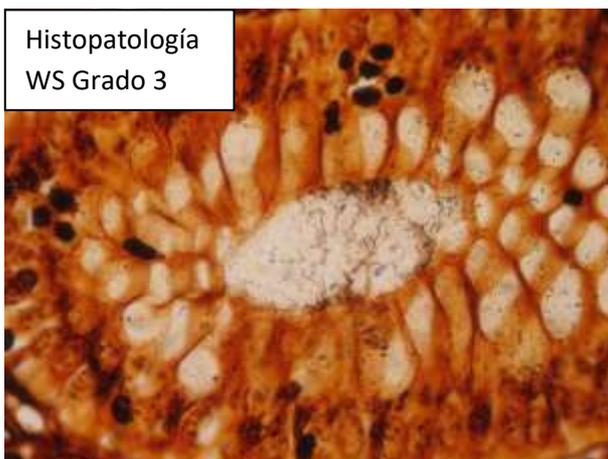


Fig.8: Histopatología WS Grado 3

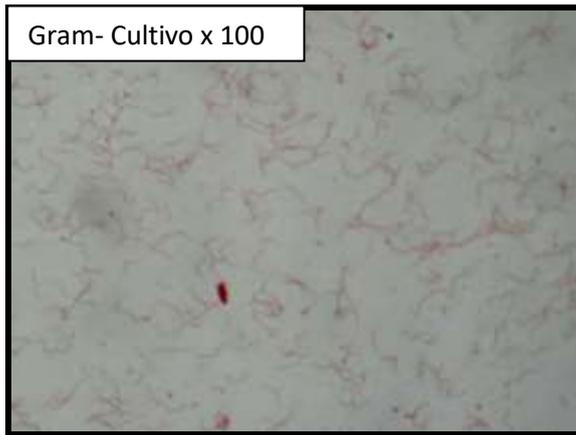


Fig. 9: Gram- Cultivo x 100

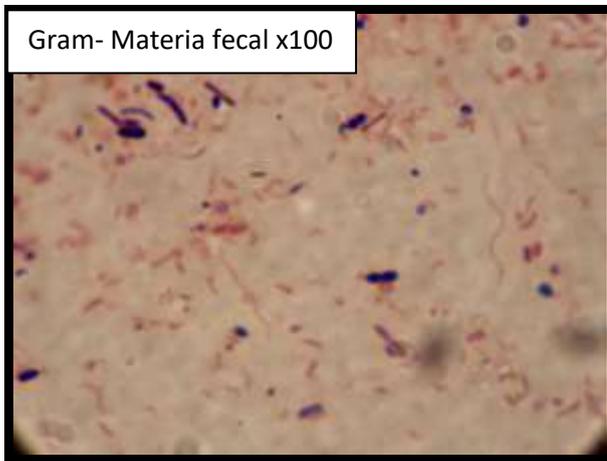


Fig. 10: Gram- Materia fecal x100

También se tomó una muestra de 5 cm de longitud de colon que fue colocada en bolsas de plástico y mantenidas a 4°C para aislamiento bacteriológico. Estas fueron sembradas en placas de agar sangre equina (8%) con los siguientes antibióticos: vancomicina (25 mg/ml), colistina (25 mg/ml) y espectinomicina (400 mg/ml) y colocadas para su cultivo en jarras de Mac Kington utilizando un sistema anaeróbico en bolsa (AnaeroGen<sup>TM</sup> AN25, Oxoid) a 42 °C por 7 días. También se colocó un sobre de control de la anaerobiosis (Oxoid). Posteriormente se abrió la jarra registrándose presencia o ausencia de pátinas con o sin hemólisis, en caso de encontrarse, se realizó una tinción de Gram para la observación de espiroquetas. Si al microscopio se encontraban elementos espiroquetales se registraron como cultivo positivo (C+) y se

repicaban en otra placa de agar sangre sin antibiótico, colocándola nuevamente en jarra por 4-5 días, tantas veces hasta purificar la cepa.

Pasado este tiempo se abrió la jarra y si se observaron cultivos puros de espiroquetas, estas se procesaron por pruebas bioquímicas de indol, hidrólisis del hipurato,  $\alpha$  glucosidasa,  $\alpha$  galactosidasa y  $\beta$  glucosidasa utilizando tabletas del Laboratorio Rosco. Se levantaron de las placas con un ansa y se colocaron en agua destilada estéril para ser procesadas por PCR. A las muestras así enviadas se les extrajo el ADN con Dnazol, estas muestras de ADN se sometieron a las siguientes técnicas de PCR, single PCR de género (Rohde *et. al.*, 2002) y las positivas fueron registradas como género *Brachyspira*. y dúplex PCR según La *et al.*, 2003, para detectar bandas de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, si dió positivo a una banda de 354 pb perteneciente a un fragmento del gen noz que codifica para la enzima NADH oxidasa, se registraron como *B. hyodysenteriae*.

Cada animal sacrificado era identificado individualmente: así en la granja D los animales sacrificados en recría del grupo A pertenecientes a la cohorte 1, fueron identificados como DA1I, DA1II, DA1III, DA1IV y DA1V, de manera semejante fueron registrados los 5 cerdos sacrificados en cada una de las cohortes pertenecientes a ambos grupos. Los animales sacrificados en desarrollo fueron identificados de manera similar, pero con los números VI, VII, VIII, IX y X.

En cada granja se logró acordar con los dueños el envío de cada cohorte a frigorífico y el día de faena. Todas las cohortes se inspeccionaron en matadero para determinar hallazgos patológicos en intestino grueso y se tomaron las mismas muestras que fueron señaladas en la necropsia de los animales sacrificados en recría y desarrollo.

## ANALISIS ESTADISTICOS

Se calculó el promedio de los valores de ganancia diaria de peso (GDP), índice de conversión alimenticia (IC) y porcentaje de mortalidad en recría (R) y desarrollo-terminación (D-T) para los grupos A, B y C en cada una de las granjas (L,D y C). También se calculó el promedio del peso a faena en frigorífico para los grupos A, B y C en cada una de las granjas (L,D y C).

Se calculó la proporción de animales con diarrea en recría (R) y desarrollo-terminación (D-T) para los grupos A, B y C en cada una de las granjas (L, D y C).

Respecto a las lesiones macro y microscópicas se calculó la proporción de animales de acuerdo al grado de lesión (1, 2 o 3) en recría (R), desarrollo-terminación (D-T) y a faena, para los grupos A, B y C en cada una de las granjas (L,D y C).

Respecto a las técnicas diagnósticas utilizadas se calculó la proporción de positivos a la tinción de gran, tinción FT, bacteriología, PCR de género y Dúplex –PCR. Para ello se utilizó el software R.

## RESULTADOS

Dado la disparidad de resultados en cada granja con relación a los objetivos planteados para este trabajo relacionados al género *Brachyspira* spp en general y a *Brachyspira hyodysenteriae* en particular, se presentan los resultados por granja, intentando hacer una discusión en cada una de ellas y al final se discutirán todos los resultados en conjunto.

### RESULTADOS en Granja D:

#### Índices productivos:

En la Tabla D.1.- se puede observar para los distintos grupos, la media de GDP y los índices de mortalidad en las etapas de recría (R) y desarrollo-terminación (DT), además del peso y edad a faena. Los índices de conversión (IC) no fueron tomados (ND). Las diferencias de GDP, para los Grupos A, B y C, en R y en DT no presentan diferencias así como la edad y peso a faena. La mortalidad en R y DT fue mayor en el GB y en el GA que en el GC.

	GDP (kg)		IC		Mortalidad (%)		Peso faena en Kg	Edad faena
	R	D-T	R	D-T	R	D-T		
GA	0,325	0,783	ND	ND	1,96	3,59	115,04	180
GB	0,315	0,801	ND	ND	1,15	5,22	119,3	181
GC	0,318	0,787	ND	ND	0,97	2,21	117,1	181

**Hallazgos clínicos:**

Se determinó el porcentaje de animales que presentaron signos de diarrea en la etapa de R, a los 43 y 51 días, y en DT a los 83, 100 y 150 días de edad, el promedio de los hallazgos en cada etapa se expresa en la Tabla D.2.- No se observan diferencias “significativas”.

	% DIARREA	
	R	D-T
GA	3.3	10.1
GB	4.6	11.1
GC	3.5	8.1

**Bacteriología:**

En la tabla D.3.- puede observarse que en ninguno de los 15 cerdos sacrificados luego del primer y segundo tratamiento se detectó *B. hyodysenteriae* ó *B. pilosicoli*, si bien en 5 cerdos del GA y 1 del GB presentaron espiroquetas del género *Brachyspira* mientras que el GC no fue procesado por cuestiones de costo. Sin embargo, en las muestras de matadero 15/44; 21/51 y 5/29 de los GA; GB y GC fueron positivos al género *Brachyspira* y ninguno a *B. hyodysenteriae* ó *B. pilosicoli*. No todos los C+ pudieron ser purificados, las que si lo fueron y dieron género positivo en D-T se pudieron clasificar como *B. innocens*.

TABLA D.3.-: Bacteriología y PCR género *Brachyspira* y Dúplex- PCR

	42 días de edad			62 días de edad			Frigorífico		
	C +	Br. género	Br hyo	C+	Br. Genero	Br hyo	C+	Br. genero	Br hyo
GA	3/15	1/3	0/1	7/15	5/7	0/5	17/44	15/17	0/17
GB	3/15	0/3		3/15	1/3	0/1	24/51	21/24	0/21
GC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6/29	5/6	0/5

En la tabla D.4.- se muestran los resultados macro y microscópicos hallados en los ciegos de los 15 cerdos procesados luego del primer y segundo tratamiento. Se puede resumir que solo 1 animal de los 15 sacrificados tanto en GA como en el GB en el período de recría mostraron estructuras espiroquetales en la histopatología con coloración de W-S. Mientras que este mismo hallazgo se encontró en un solo animal del GA luego del segundo tratamiento. Siendo 29 normales desde el punto de vista macro y microscópicos del total de 30 inspeccionados en ese momento pertenecientes a ambos grupos.

Como se indicó más arriba el GC no fue procesado por cuestiones de presupuesto. De los 124 cerdos enviados a faena en todos se pudo tomar muestras para bacterioscopía (Tabla D.3.), pero el frigorífico no autorizó la revisión macroscópica, ni la toma de muestras para histopatología (Tabla D.4.).

**Tabla D.4.-Hallazgos macroscópicos y microscópicos de colon**

	42 días de edad						62 días de edad						Faena					
	Macro			Micro			Macro			Micro			Macro			Micro		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GA	13	2	0	12	2	1	14	1	0	14	0	1						
GB	14	1	0	14	0	1	15	0	0	15	0	0						
GC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND						

**RESULTADOS OBTENIDOS EN GRANJA L.**

**Índices productivos:**

En la Tabla L.1.- se puede observar la media de GDP, los IC, la mortalidad y los animales retrasados en recría, que son eliminados antes del paso a D-T. Mientras que, en D-T la GDP para GA es 43 gr mayor a GB y 74 gr. con relación a GC, todas con diferencias significativas entre GA con GB y GC. Logrando una menor edad a faena de 5 días comparado con GB y 10 días comparado con GC.

**TABLA L.1.-: Promedios en GL de GDP, IC, EDAD Y PESO A FAENA Y MORTALIDAD DE LAS COHORTES**

	GDP/Kg		IC		Mortalidad			Faena	
	R	D-T	R	D-T	Recría		terminación	Kg	Edad
					Atrasados	Muertos			
GA	0,316	0,809a	2,13	2,15	6%	2,17%	3.9%	105,2	176
GB	0,335	0,757b	1,82	2,19	11,3%	1,73%	4,0%	105,3	181
GC	0,333	0,727c	1.84	2,25	4%	1,91%	3,05%	105,2	186

**Hallazgos clínicos:**

En las inspecciones clínicas para detectar diarrea realizadas en recría (R), a los 43, 60, y en D-T a los 83, 100 y 150 días de edad, se determinó el porcentaje de animales que

presentaban signos y se los promedió para cada etapa, cuyos resultados se expresan en la Tabla L.2.-

Tabla L.2.-: Hallazgos clínicos de diarrea según tratamiento

	% DIARREA	
	R	D-T
GA	0,66	4
GB	1,33	7,33

### Resultados de bacterioscopía y bacteriología

En la tabla L.3.- Se muestran los resultados de bacterioscopía C+ y bacteriología de género y especie para los GA y GB en R y DT y para los 3 grupos a faena. El GC no fue procesado en R y D-T por cuestiones económicas que involucran el costo de los animales. De los resultados obtenidos se puede inferir que en la etapa de R, de los 15 lechones procesados en solo 1 animal del GB se encontró una *B. hyodysenteriae*. Mientras que en DT de los 15 animales sacrificados en GA 2 fueron género *Brachyspira* y solo 1 *B. hyodysenteriae*. Mientras que en el GB 5/15 fueron *B. hyodysenteriae*. A faena solo 4/48 (8,3%) fueron *B. hyodysenteriae* en el GA, mientras que 15/54 (27,7%) lo fueron en el GB y 11/29 (37,9%) para el GC.

TABLA L.3.-: Bacteriología y PCR género *Brachyspira* spp y PCR *B. hyodysenteriae*

	42 días de edad			83 días de edad			Frigorífico		
	C +	Br. Genero	Br hyo	C+	Br. genero	Br hyo	C+	Br. Genero	Br hyo
GA	5/15	0/5	0/0	2/15	2/2	1/2	8/48	6/8	4/6
GB	3/15	1/3	0/1	5/15	5/5	5/5	20/54	17/20	15/17
GC							12/29	12/12	11/12

### Hallazgos macro y microscópicos

En la tabla L.4.- Se describen los hallazgos macro y microscópicos encontrados en las muestras de colon de los cerdos de los distintos grupos.

En ningunos de los 30 cerdos pertenecientes al GA y GB en la etapa de R se encontraron lesiones tipo 3 por macro o microscopia, compatibles con *B. hyodysenteriae*. Por otro lado, en D-T lesiones macro y micro igual a 2 y 3 se encontró en al menos 5 animales del GA y en 10 del GB. Mientras que a faena, en el frigorífico

donde fueron enviados estos animales no prohibió la revisión macroscópica de colon como ocurrió en la granja D, pero sí la restringió, de tal forma que de los 131 cerdos enviados a faena por la granja L, solo 84 y 96 animales pudieron ser evaluados para hallazgos macroscópicos y microscópicos respectivamente. En esta granja de los cerdos que se pudieron inspeccionar, se pudo determinar que lesiones microscópicas tipo 2 y 3, fueron encontradas en 7/49 (14,3%) de las muestras de colon observadas en el GA y 18/54 (33,3%) en el GB y 11/29 (37,9%) en el GC.

Tabla L.4.- Hallazgos macroscópicos y microscópicos de colon

	Recría						D-T						Faena					
	Macro			Micro			Macro			Micro			Macro			Micro		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GA	14	1	0	15	0	0	11	1	3	10	5	0	39	10	0	42	6	1
GB	14	1	0	15	0	0	5	1	9	5	9	1	30	20	4	36	16	2
GC													15	10	4	18	9	2

## RESULTADOS OBTENIDOS EN Granja C

### Índices productivos:

En la Tabla C.1.-. se puede observar la media de GDP, los IC y la tasa de mortalidad para las etapas de recría y terminación, además del peso de faena a los 170 días de edad. En la recría observamos que la GDP para el grupo GA es 10 gr mayor a GB y 24 gr. en relación a GC; mientras que en la etapa de terminación la GDP para GA es 70 gr mayor que GB, pero 22 gr. inferior a GC. Cuando se evalúa el peso de los animales a los 170 días de edad, se observa mas de 6 kg. de diferencia a favor del GA y GC con relación al GB.

TABLA C.1.-: Promedios en GC de GDP, IC, EDAD Y PESO A FAENA Y MORTALIDAD DE LAS COHORTES

	GDP/Kg		IC		% mortalidad			Faena	
	R	D-T	R	D-T	Recría		Kg	Edad	
					Atrasados	muertos			D-T
GA	0.442	0.755	1.85	2.87	4.20	1.22	6.23	100.36	170
GB	0.432	0.685	1.79	3.60	4.25	1.18	6.71	94.19	170
GC	0.418	0.787	1.93	2.80	3.85	0.30	4.70	101.07	170

### Hallazgos clínicos:

Los resultados encontrados en las inspecciones clínicas para detectar diarrea se muestran en la tabla C2.- y corresponden al promedio de las observaciones realizadas a los 43 y 60 días de edad en recría (R) y a los 83, 100 y 150 días de edad en desarrollo-terminación (D-T). Donde se puede observar que la diarrea solo estuvo presente en el período D-T y fue mayor en un 5% en el GB que el GA.

	R	D-T
GA	0	8.7
GB	0	13.7

### Bacterioscopía y Bacteriología

En la tabla C.3.- se muestran los resultados de bacterioscopía y bacteriología de género y especie obtenidas de las muestras tomadas en la granja C. Ninguna muestra fue positiva para *B. hyodysenteriae* en recría ni D-T. Mientras que a faena 6/42 (14,3%); 7/37 (18,9%) y 16/30 (53,3%) fueron positivas para el GA; GB y GC respectivamente para el género *Brachyspira*. Cuando se analizaron las muestras positivas a *B. hyodysenteriae* a la faena sobre el total de animales inspeccionados, se encontró el 2,4% en el GA, 5,4% en el GB y en la GC un 6,7%.

TABLA C.3.-: Bacteriología y PCR género *Brachyspira* spp y PCR *B. hyodysenteriae*

	R			D-T			Frigorífico		
	C +	Br. Genero	Br hyo	C+	Br. genero	Br hyo	C+	Br. Genero	Br hyo
GA	3/15	0/3	0	5/15	1/5	0	6/42	6/6	1/6
GB	3/15	0/3	0	5/15	1/5	0	8/37	7/8	2/7
GC							18/30	16/18	2/16

### Hallazgos macro y microscópicos:

En la tabla C.4.- puede observarse que lesiones típicas grado 3 macro y microscópicas no fueron halladas en ningún grupo en las 3 etapas (R; D-T y Faena) inspeccionadas. Mientras que, a faena el frigorífico donde fueron enviados estos animales no prohibió la revisión macroscópica de colon como ocurrió en la granja D, pero sí la restringió, de tal forma que de los 109 cerdos enviados a faena por la granja C, solo 96 y 71 animales pudieron ser evaluados para hallazgos macroscópicos y microscópicos, respectivamente. Ninguno de los cerdos sacrificados en recría o en los enviados a matadero se pudo detectar lesiones compatibles con el tipo 3 por macro o microscopía, pero en 14 y 39 animales, respectivamente, se observó el grado 2. Lesiones microscópicas grado 2 fueron encontradas a faena en 14/29 (48,3%) en la GA; 15/22 (68,2%) en la GB y 10/20 (50,3%) en GC.

Tabla C.4.-: Hallazgos macroscópicos y microscópicos de colon

	42 días de edad						83 días de edad						Faena					
	Macro			Micro			Macro			Micro			Macro			Micro		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GA	14	1	0	14	1	0	7	8	0	15	0	0	38	5	0	29	14	0
GB	7	7	0	14	1	0	10	5	0	15	0	0	33	4	0	22	15	0
GC													25	5	0	20	10	0

## Comparación de las granjas L, D y C

Como señalamos al comienzo de resultados, primero se expusieron los resultados por granja porque cada una representa una realidad distinta y permite una discusión particular para cada de ellas y a continuación se expondrán los resultados en conjunto de todas las granjas, haciendo principal hincapié en el tipo de tratamiento, para intentar hacer una discusión general relacionada al objetivo de la tesis cual es la de determinar el efecto del AIV (Grupo A), la tiamulina (Grupo B) y el grupo control (GC). A estos resultados lo llamaremos generales, por lo cual las tablas estarán identificadas con la letra G. Los de bacteriología serán GB y los de hallazgos patológicos GP.

En la tabla GB1, se muestran los resultados bacteriológicos obtenidos en total de animales enviados a faena por cada granja, 131 cerdos la granja L, 124 la granja D y 109 la granja C. Indicando además la cantidad de cerdos que correspondían a cada grupo de tratamiento.

Tabla GB1. Distintos grupos tratados (A, B y C) por granja (L, D y C) con el total de animales enviados a faena, número de animales positivos a Gram espiroquetas negativas (G-), a PCR género (género) y PCR *B. hyodysenteriae* (B.hyo).

Grupo tratado	Granja L				Granja D				Granja C			
	Total	G-	Genero	B.hyo	Total	G-	Genero	B.hyo	Total	G-	Genero	B.hyo
A	48	6	6	4	44	17	15	0	42	6	6	1
B	54	20	17	15	51	21	21	0	37	8	7	2
C	29	12	12	11	29	5	5	0	30	18	16	2
Total	131	38	35	30	124	43	41	0	109	32	29	5

En la tabla GB2, se muestran los resultados bacteriológicos obtenidos en faena, sobre el total de animales enviados por las 3 granjas para cada grupo de tratamiento. Tratados con AIV (GA), con tiamulina (GB) y no tratados (GC).

Tabla GB2. Total de cerdos enviados a faena por las 3 granjas en cada grupo (A, B y C), con los resultados bacteriológicos.

	Total	Gram-/ total%	Género/ G-%	B.hyo/ genero%	%genero - % B hyo/total
A	134	29 (21,6)	27 (93,1)	5 (18,5)	20,1 – 3,7
B	142	49 (34,5)	45 (92,0)	17 (37,8)	31,7 – 12,0
C	88	35 (39,7)	33 (94,3)	13 (39,4)	37,5 – 14,7
TOTAL	364	113 (31,1)	105 ( 93,0)	35 (33,3)	28,8 – 9,6

En las tablas GP1 y GP2, se muestran los resultados patológicos obtenidos de los animales enviados a matadero. Se puede observar que la granja D, no figura por que como hemos indicado no se nos permitió inspeccionar los órganos, así como el total de animales inspeccionados para la granja L y C son menos que los enviados por esas granjas, como figura en las tablas GB1 y GB2, por la misma limitación del frigorífico. Estas limitaciones de la Granja D, ningún animal inspeccionado, y el menor número en las otras granjas tiene que ver con los tiempos que demandan las distintas tareas de este muestreo. Es decir tomar las muestras para bacteriología es sencillo y escaso el tiempo insumido, mientras que hacer una revisión de todo el colon lleva más tiempo. A mayor tiempo demandado más difícil se le hace a los operarios del frigorífico poder seguir la rutina de sus tareas.

La tabla GP1, se muestran los resultados de los hallazgos patológicos macro y microscópicos ponderados según se describió en materiales y métodos, para el total de animales que se pudieron inspeccionar pertenecientes a las granjas L y C, correspondiente a cada grupo de tratamiento en ellas.

TABLA GP1-Hallazgos macro y microscópicos en frigorífico en las granjas (L y C) según el número de animales inspeccionados en cada uno de los grupos tratados (GA, GB) y control (GC).

Grupo	GRANJA L						GRANJA C					
	MACRO			MICRO			MACRO			MICRO		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	39	10	0	42	6	1	38	5	0	29	14	0
B	30	20	4	36	16	2	33	4	0	22	15	0
C	15	10	4	18	9	2	25	5	0	20	10	0
TOTAL	84	40	8	96	31	5	96	14	0	71	39	0

En la tabla GP2, se muestran los resultados patológicos macroscópicos y microscópicos en cada grupo tratado (GA, GB y GC) obtenidos para el total de animales inspeccionados pertenecientes a las granjas L y C. Los resultados están expresados como 1, 2 y 3, según se describió en materiales y métodos.

Tabla GP2. Hallazgos macroscópicos y microscópicos por grupo de tratamiento del total de animales inspeccionados a faena enviados por las granjas L y C.

Grupo Tratado	Macroscopía			Microscopía		
	1	2	3	1	2	3
A	77	15	0	71	20	1
B	63	24	4	58	31	2
C	40	15	4	38	19	2
Total	180	54	8	167	70	5

## Discusión

Varios agentes etiológicos como los pertenecientes al género *Brachyspira* y en especial *B. hyodysenteriae* son capaces de producir cambios patológicos en el intestino grueso de los cerdos y con ello enfermedad que afectan los índices productivos como GDP, IC, edad y peso a faena, por lo cual el uso de antibióticos específicos para estos agentes, son recomendados para el control de los mismos y de esta forma reducir el impacto productivo y económico que puedan producir en granjas porcinas.

Las pleuromutilinas como la tiamulina y la acetil valeril tilosina (AIV) han sido recomendadas en el control de varios agentes entre ellos la *B. hyodysenteriae*, la cual se ha reconocido como agente etiológico capaz de producir diarrea mucohemorrágica principalmente en cerdos de más de 70 días de vida, es decir después de la etapa de recría (Burrough 2012).

En las tres granjas aquí estudiadas, los animales fueron sometidos a dos tratamientos distintos con pleuromutilinas como la tiamulina grupo B (GB) y el AIV grupo A (GA) en dos etapas de la crianza distintas, uno en recría y otro en desarrollo.

Cuando uno analiza los resultados productivos en la etapa de recría y los compara con los de referencia publicados por la empresa genética (PIC 2015) en la cual se señala que la GDP para esta etapa debería ser de 440 gr/día., esto solo pudo observarse en la granja C donde la GDP fue de 430 gr/día en promedio para los 1.800 lechones que integraban los 3 grupos, independiente de que fueran tratados o no. Quizás ello tenga correlación con que en esta granja, los resultados clínicos de la diarrea mostraron que ninguno de los cerdos de recría presentaron diarrea independientemente de si fueron o no tratados, una pequeña mejora de 14 y 24 gr/día en la GDP del GB y el GA respectivamente en relación al GC fue encontrada posiblemente atribuible a que estas pleuromutilinas actúen de manera inespecífica como factor de crecimiento como señala Hidalgo 2011.

Mientras que en la granja D con 1980 lechones y la granja L con 2.205 cerdos presentes en la recría durante todo este estudio, tampoco hubo diferencias significativas entre las GDP de cada grupo, pero el promedio de la GDP 319gr/día de la Granja D fue

menor a los 430 gr de la granja C, posiblemente porque en la granja D se dio el mayor porcentaje de cerdos con diarrea, en promedio un 4%, independiente de si los grupos de esta granja fueron tratados o no. Algo similar se puede observar en la granja L, donde la diarrea estuvo presente en la etapa de recría en menos del 1% de los cerdos pero cuya GDP promedio fue de 328gr/día, algo superior a la granja D, pero mucho menor a los 430gr de la granja C, en concordancia con Thonsom y Friendship (D of swine 2012) cuando señalan que los cambios fisiopatológicos que ocasionan la diarrea, llevaran a pérdidas productivas, independiente de la causa de la misma.

Reforzando este concepto en relación a los resultados obtenidos en la etapa de recría, se puede decir que en los trabajos realizados en Dinamarca por Pedersen KS 2014, demostraron que cuando se presenta diarrea en un lote, el tratamiento no se justifica si no se demuestra que al menos el 15% o más de los cerdos del lote presentan signos de enfermedad, porque ellos no pudieron demostrar la presencia de agentes biológicos cuando este porcentaje es menor al 15%. Aquí los animales con signos de diarrea tanto de la granja D, como de la L fueron siempre inferior a ese porcentaje, lo que podría justificar que tuvieran mayor o menor GDP pero que no fuera relacionado con el uso de cualquiera de los 2 antibióticos específicos elegidos para esta prueba. También la diferencia en las GDP de cada granja podría estar relacionada no solo a la presencia o ausencia de diarrea, si no como señalamos en la introducción a diferencias en el manejo de los animales, las instalaciones y la alimentación entre otros factores (Canibe 2005) que no fueron estudiados en este proyecto.

Pero si en este estudio se pudo demostrar, en concordancia con el párrafo anterior, es que en ninguna de las granjas y de los grupos que constituían las mismas se detectó *B. hyodisenteriae*. De los 30 animales sacrificados en recría, luego de finalizado el primer tratamiento en cada granja, se pudo observar que en los 90 frotis, 20 de ellos fueron positivos a espiroquetas por la técnica Gram negativas, pero de estos solo 2 fueron género *Brachyspira spp*, uno en la granja D perteneciente al GA y otro en la granja L perteneciente al GB, pero no a *B. hyodisenteriae* por las técnicas de PCR desarrolladas en este trabajo. En ninguna de las 3 granjas fueron muestrados los grupos no tratados por cuestiones de costo como ya fue señalado.

Por otro lado tampoco se pudieron diagnosticar lesiones macroscópicas (tipo 3) o microscópicas (tipo 3) compatibles con *B. hyodysenteriae* de acuerdo al presupuesto de hallazgos patológicos asumidos en esta tesis,. Un mayor número de cerdos con edema de colon, lesión inespecífica de colitis (Lapuente 2004), se observó con mayor proporción en la granja D, donde la diarrea fue observada en aproximadamente un 4% de los cerdos. Otras lesiones no fueron registradas en intestino delgado que podrían ayudar a comprender mejor la diarrea en los animales que la presentaron. Pero los hallazgos patológicos en IG son compatibles con alteraciones del IG responsables de diarrea inespecíficas como ya fue referenciado por Thomposon and Frienship 2012 y Sacristán GA 1995.

Todo ello puede estar en consonancia con que se espera que el agente y la enfermedad se presente en la etapa posterior. (Hampson, Fellstrom and Thomson 2006), sin embargo una infección temprana puede ocurrir (Joshua, W et al JSHP vol 22) y aquí esto no pudo demostrarse, el hecho no ocurrió o los antibióticos usados no permitieron que ello ocurra. Este trabajo por su diseño no permite resolver esta incógnita. Una sola muestra positiva al género *brachyspira* tanto en la granja D y L podría tanto indicar que mas *brachyspiras* no fueron observadas por el uso de los antibióticos, así como que una diseminación reciente este comenzando en las granjas.

Realizando un análisis similar a recría, en la etapa de desarrollado ninguno de los cerdos pertenecientes a los diferentes grupos en las tres granjas, alcanzó la GDP esperada de 920gr/día según la referencia tomada en esta tesis (PIC 2015). Pero a diferencia de lo que ocurrió en recría, aquí en las 3 granjas los cerdos presentaron diarrea y en proporción mayor a los de recría de las granjas D y L, lo cual podría ser responsable de la menor GDP en las 3 granjas, con un análisis similar al realizado en la etapa anterior en las 2 granjas que presentaron diarrea, sin embargo en desarrollo-terminación la presencia de *Brachyspira* spp y de *B. hyodysenteriae* en particular, fue demostrada en las 3 granjas lo que no ocurrió en recría.

No hubo animales sacrificados controles en esta etapa en ninguna de las tres granjas, como se reiteró por cuestiones de costo, pero los animales fueron seguidos a frigorífico para poder comparar hallazgos bacteriológicos y patológicos. De estos resultados se desprende que de los 90 animales en desarrollo sacrificados en las tres

granjas pertenecientes a los GA (45 cerdos) y GB (45 cerdos) en cada una de ellas, por bacterioscopía, todos los grupos presentaron más de un frotis positivo a espiroquetas Gram negativas. De las 27 muestras positivas a espiroquetas (29%) se identificó como género *Brachyspira* al 56% de las mismas, las que pertenecían también a los 6 grupos estudiados. Indicando que este género estaba presente en las granjas indistintamente fueran tratados con uno u otro antibiótico, lo cual puede corresponderse con las características epidemiológicas endémicas descripta para este agente por Alvarez-Ordoñez y col 2013 y Jensen et al 2004, Thompson 2002. De las 15 muestras género positivas (56%) solo 6 fueron identificadas como *B. hyodisenteriae*, todas pertenecientes a la Granja L, donde 5 fueron del GB y 1 del GA. Este hallazgo podría tener relación directa con los valores de GDP de la granja L donde el promedio de GDP fue de 764 gr/día. Pero aquí los animales tratados con el antibiótico GA ganaron 82 gr/día más que el GC y 52 gr/día que el B. Las pérdidas productivas fueron mayores en el GC donde además de la diferencia en las GDP, el IC y la edad a faena de GC fue superior en 10gr y 10 días respectivamente que el GA. Además de la diferencia en GDP entre el GA y el GB, en este último la diarrea fue superior en un 3,3% y en 5 días en la edad de faena. Por lo tanto se pudo demostrar que los índices productivos como GDP, IC y días a faena fueron mejores en el GA, pertenecientes al grupo tratados con AIV que los no tratados (GC) o tratados con tiamulina (GB).

Por otro lado, como señala Burrough 2012, Rubin 2005 y Segales no solo el agente debe encontrarse para asumir que la enfermedad está presente, sino también se debe demostrar las lesiones que este produce. En ese sentido 3 cerdos del GA y 9 del GB de los 30 sacrificados en desarrollo mostraron lesiones macroscópicas tipo 3 compatibles con Disenteria Porcina producida por *B. hyodisenteriae* como fueran descritas en materiales y métodos, mientras que por histopatología 5 cerdos del GA y 10 del GB tuvieron lesiones tipo 2 ó 3, lo cual podría contribuir a suponer de manera segura que en la granja L el agente estuvo y la enfermedad también.

Si tenemos en cuenta las características epidemiológicas endémicas descriptas por Alvarez-Ordoñez y col 2013 y Jensen et al 2004, Thompson 2002., podríamos asumir que los 3 grupos de esta granja tuvieron la misma probabilidad de infectarse y que las marcadas diferencias en los índices productivos a favor del GA en relación al

GB y GC podrían atribuirse a que AIV fue capaz de controlar al agente, evitar las lesiones y así disminuir el impacto productivo.

Por otro lado el GB de esta granja L, que tuvo índices productivos menores al del GA, estos fueron mayores que los del GC, lo cual podría atribuirse como señalan Van Duijkeren et al 2014, Zhang et al. 2016, Fellstrom et. al 1996; al incremento de cepas de *Brachyspiras* resistentes a la tiamulina en distintas partes del mundo, donde esta droga es usada rutinariamente como es el caso de Argentina (Cita del autor), lo que podría justificar los resultados obtenidos comparando al GB con el GA y GC.

Mientras que en las otras granjas, *B. hyodisenteriae* no se pudo aislar de ninguno de los 60 animales sacrificados después de finalizado el segundo tratamiento. Pero el género *Brachyspira* estuvo presente en 6 animales de la granja D y en 2 animales de la granja C, pudiendo ser responsable de las diarreas menos severas y ocasionar la baja en la GDP en ambas granjas.

En la granja D la GDP promedio fue de 790 gr/día no habiendo diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados, tampoco en los días y peso a faena, sin embargo la diarrea afectó a más del 10% de los cerdos tratados, donde se demostró que 5 animales del GA y 1 del GB fueron positivos al género *Brachyspira*.

La Granja C tuvo la menor GDP con 742gr/día en comparación con las otras 2 granjas, pero con una gran dispersión, donde el GC superó por 102gr/día al GB y por 32 gr/día al GA. Por ello el peso a faena promedio de los 3 grupos fue de 98 Kg a los 170 días de edad, donde el GB tuvo 7 Kg y 6 Kg menos que el GC y el GA respectivamente. Otra diferencia fue que hubo un 5% más de animales con diarrea en el GB que el GA.

Volviendo al enunciado de que la enfermedad es producto de demostrar que tanto el agente y las lesiones están presentes como señalamos en la Granja L, aquí en la Granja C podemos analizar que de los 30 cerdos sacrificados en desarrollo en esta granja solo en 1 animal tanto del GA y GB se pudo demostrar la presencia del género *Brachyspira*, no ha sí de *B. hyodisenteriae* y que ninguno de ellos presentó lesiones tipo 3 macro y microscópicas compatibles con la enfermedad cuestión de esta tesis. Si pudo demostrarse edema de colon en varios animales (lesión tipo 2) y diarrea en un promedio

del 10% de los animales lo cual podría asociarse a la peor performance productiva de esta granja en relación a las otras 2. Sin embargo otras patologías pueden haber ocurrido en estos animales, que no fueron motivo de estudio de esta tesis. Así como reiteramos las consideraciones de Lapunte . y Rosell,2004, cuando señalan que cada granja es un universo aparte y que el diseño de estudios a campo presentan esta dificultad de no poder abordar todas las variables que impactan sobre los animales.

También podría tenerse en cuenta el trabajo de Pedersen 2014, cuando propone no tratar los cerdos si la diarrea no compromete a más del 15% de la población, puesto que no solo es posible que ningún agente esté presente, sino que además el antibiótico pueda barrer la flora saprofítica y así contribuir a agravar el cuadro, lo que podría haber ocurrido en esta granja, donde si bien fue la de menor performance, los cerdos no tratados tuvieron mejores índices productivos que los tratados del GB y GA respectivamente.

Como puede observarse en las tablas D3, L3 y C3, de los 364 animales que fueron enviados a faena (resumidos en la Tablas H), donde la granja D envió 124, L 131 y la granja C 109, del total de 364 frotis el 31% (113) fueron positivos a espiroquetas Gram - pertenecientes a los 9 grupos. El género *Brachyspira* fue identificado por PCR en el 29% (105) de las muestras, indicando un resultado similar a los hallazgos por frotis de 113, es decir un 93% de concordancia, como lo señalado por Illanes cuando comparó distintas técnicas de diagnóstico y reforzando el enunciado de la característica enzootica del agente cuando está presente en una granja.

De las 105 muestras positivas a género (tabla hh), 35 lo fueron para *B. hyodisenteriae*, de las cuales el 86% (30) pertenecían a la granja L y el resto (5 muestras) a la granja C, ninguna lo fue para la granja D. Del total de las 30 muestras positivas por PCR a *B. hyodisenteriae* en la granja L, el 13% pertenecían al GA, el 50% (15 muestras) al GB y las 11 restantes (37%) al GC. Mientras que de las 5 muestras positivas a *B. hyodisenteriae* en la granja C, 1 cepa lo fue para el GA, 2 para el GB y 2 para el GC.

Del total de 364 animales enviados por cada granja a frigorífico (tabla GB1), pertenecían al GA, tratados con AIV, 134, al GB tratados con tiamulina 142 y GC no

tratados 88. De tal forma que el género *Brachyspira* fue identificado en 27 animales (20,14%), en 45 (31,7%) y en 33 (37,5%) para el GA, GB y GC respectivamente.

Así podría decirse que teniendo en cuenta el total de animales enviados a faena por las 3 granjas en los animales pertenecientes al GA fueron identificadas una menor proporción de *B. hyodisenteriae* (3,7%) y género *Brachyspira* (20,1%) que en el GB (12%, 31,7%) y mucho menos que en el GC (14,8%; 37,5%) respectivamente.

En el análisis de los resultados mostrados en los 2 párrafos anteriores en función de los objetivos de esta tesis, que es la respuesta de los antibióticos a *B. hyodisenteriae* en particular y al género en general, que parecería mostrar mejores resultados en el control de *Brachyspira* por parte del AIV, se debe tener en cuenta que las dosis usadas en esta prueba son las recomendaciones por los laboratorios cuando venden el producto (Merck, et al 2000) y que para la etapa de desarrollo la tiamulina se sugiere a 100ppm y el AIV 50 ppm. Ahora bien, cuando se revisan los trabajos que avalan el uso de los mismos se usan otros criterios como el de mg/kg de peso vivo (p/v) del animal, en ese sentido para tiamulina Van Duijkeren 2014, Rugna et al 2015, Lim et al. 2009, usan como criterio 10mg/kg p/v, mientras que para el AIV se recomienda 5mg/kg/p/v. Tomando como referencia la etapa de desarrollo que es donde más *Brachyspiras* fueron detectadas, el tratamiento en esos animales, se realizó de acuerdo a las recomendaciones de los laboratorios en la venta al público, por ello el AIV fue usado en 50ppm y la tiamulina en 100ppm. De tal forma que al momento de ser tratados los animales de la granja D tenían 72 a 82 días de edad, los de la granja L 81 a 91 edad y los de la granja C 85 a 95. Tomando como referencia el peso al destete (datos no mostrados) que fue usado para el cálculo de GDP tanto en recría como en D-T para las 3 granjas, sumando una semana mas de crecimiento para estimar el peso vivo de los animales cuando se iniciaron los tratamientos, arrojó una media de 40 kg/p/v por animal. De acuerdo a las tablas de la empresa proveedora de alimento (Biofarma SA) que lo fue para las 3 granjas, se estima que el consumo de alimento sólido por día para esa categoría es de 1kg. Por lo cual los cerdos del GA consumieron 50mg/día de AIV y los del GB 100mg/día de tiamulina.

Volviendo a las referencias citadas al comienzo del párrafo sobre la demanda por animal, 5mg/kg/p/v de AIV, podemos decir que los cerdos del GA en las 3 granjas

que pesaban 40 kg necesitaban 200 mg/día y recibieron 50mg que es lo que contenía un kg de alimento sólido. De manera similar con la tiamulina los animales recibieron 100 mg/día, cuando en realidad el requerimiento era de 400mg/día.

Puede quedar la duda cual sería el resultado productivo si se hubieran usados las dosis recomendadas, es decir 200mg/día de AIV y 400 mg/día de tiamulina, ¿el AIV habría mostrado las mismas diferencias que las aquí encontradas? Sin duda ello debería ser objeto de otro trabajo de investigación.

Una vez hecho este análisis, que consideramos muy importante en la práctica diaria, deberíamos agregar que tanto los cerdos del GA, como los del GB, recibieron menos antibióticos que los citados de referencia anteriormente y que ello debe tenerse en cuenta para cada una de las granjas cuando se relacione con la presencia o ausencia de *B. hyodisenteriae* así como las de género. Van Duijkeren Trott *et al* 2014, analiza el uso de antibióticos en el alimento y los relaciona no solo con la poca eficacia para controlar *B. hyodisenteriae* cuando es sub utilizado como en nuestro trabajo, si no también con el impacto en la salud humana. En el trabajo de los Italianos se hace referencia a que la susceptibilidad de diferentes *B. hyodisenteriae* a las tiamulinas variaba por región de Italia, origen genético de los animales, y el año del aislamiento. Estos datos deben ser tenidos en cuenta para un análisis pormenorizado de nuestros resultados pero dichos criterios no fueron motivo de este estudio y no conocemos datos de Argentina sobre los mismos. Solo conocemos un trabajo realizado en Argentina (Perfumo) donde se publican resultados sobre susceptibilidad de *B. hyodisenteriae* a los antibióticos, por ello el camino queda abierto para un estudio de este tipo.

Indicando que el AIV pudo disminuir significativamente el número de animales portadores a *B. hyodisenteriae* y del género *Brachyspira*, lo que podría ser responsable de las diferencias de los valores productivos entre los grupos a favor del GA como ocurrió en la granja L. Este resultado también podría indicar que el uso de AIV en las concentraciones y en los tiempos usados en este trabajo reducen los animales portadores, pero no por ello erradican el agente para lo cual debería usarse un modelo similar al descrito por Figi, et.al (2014) . Indicando de manera similar a la granja L, que el AIV redujo significativamente el número de portadores sea del género o especie *B. hyodisenteriae* en comparación con el GC. Si bien estos hallazgos pueden indicar la

ventaja del uso del AIV en el control del género *Brachyspira*, en la granja C los índices productivos fueron mejor para el GC, que el GA y GB. Pudiendo indicar que otros factores asociados no a *Brachyspira*, como instalaciones, ventilación, densidad animal, afectaron al GA y GB y no al GC, lo cual no fue motivo de este estudio.

Los hallazgos patológicos en matadero no fueron registrados para los animales pertenecientes a la granja D como fue explicado en resultados.

Analizando los resultados de hallazgos macroscópicos en frigorífico ( GP1, GP2) se puede observar que solo en la granja L se encontraron lesiones compatibles con el tipo 3, en 4 cerdos pertenecientes al GB y 4 del GC, mientras que en el GA ningún animal presentó hallazgos compatibles con este tipo de lesión. Estos animales fueron enviados a faena aproximadamente 3 meses después de finalizado su segundo tratamiento, pudiendo significar que la dinámica epidemiológica de la enfermedad como ya fue referenciado, puede haber comprometido a cerdos hacia un tiempo posterior y próximos a la edad de faena y donde los cerdos del GB y GC fueran por ello los más afectados.

De los animales de la granja C enviados a faena (GP1), que fue posible de inspeccionar el 87,3% fueron considerados normales desde el punto de vista macro y solo 14 el 12,7% con lesiones tipo 2. y en ninguno del resto se detectó lesiones patológicas grado 3, como ya fue señalado. Lo cual podría indicar que tanto por los resultados en recría, D-T y a faena en esta granja otro fenómeno patológico pueda haber ocurrido no relacionado a Disentería porcina y que en este estudio no se pudo determinar.

De cualquier forma para considerar los hallazgos patológicos en matadero y relacionarlos con *B. hyodisenteriae*, se debe tener en cuenta lo que señalan los libros clásicos de patología Jubb y Kenedy, Disease of swine, donde se advierte que el devenir de los cambios patológicos ocasionados sobre todo por las cepas patógenas de *Brachyspira*, como *B. hyodisenteriae*, son agudos y que ello conlleva o a la muerte del animal por lo cual no llega a matadero o que la recuperación del cerdo debido al tratamiento o a las propias defensas del mismo permiten una regeneración del epitelio intestinal que hace que a la edad de faena no se observen lesiones patológicas, salvo que los animales sean infectados en edad próxima a la faena. Para la disentería porcina,

enfermedad motivo principal de esta tesis, los animales enviados a matadero no presentan hallazgos característicos como puede ocurrir en la enteropatía proliferativa, la neumonía enzoótica porcina o tuberculosis.

Sin embargo analizando los resultados clínicos, índices productivos, bacteriológicos y patológicos en las 3 granjas, no se puede descartar que las formas crónicas o subclínicas de las colitis brachyspirales puedan haber ocurrido y que nosotros no hayamos podido demostrar en esta tesis. Se ha indicado que la patogenicidad del género *Brachyspira* puede ser variable, esto ha sido suficientemente demostrado con *B. hyodysenteriae*, donde cepas de este agente fueron identificadas como poco patógenas y con débil hemolisinas (Graham *et al* 2016 ), lo cual señalan los autores pueden confundir al colega de campo como al bacteriólogo, lo cual puede habernos ocurrido durante el desarrollo de esta tesis, por los métodos usados en el diagnóstico.

## Conclusiones:

- 1.- Los trabajos de investigación a campo como el aquí realizado, presentan diferencias en relación a los que se realizan en laboratorio, por la diversidad de variables muy difíciles y costosas de controlar que pueden afectar los resultados. En este caso las granjas que se ofrecieron voluntariamente para realizar este proyecto tenían diferencias en relación a: genética, manejo de los animales y el personal, sistema de alimentación, entre otras.
- 2.- El género *Brachyspira* fue demostrado por estar presente en las 3 granjas y la especie *hyodisenteriae* en la granja L y C confirmando su característica enzootica en las granjas en contacto con el agente.
- 3.- Independiente del impacto productivo la nueva droga AIV mostró capacidad de disminuir la presencia de *B. hyodisenteriae* tanto en los animales sacrificados pos tratamiento, como en los enviados a faena. Indicando que su uso tal como lo fue realizado en este trabajo puede controlar al agente y con ello las patologías, pero no erradicarlo.
- 4.- En la granja L, se pudo demostrar que *B. hyodisenteriae* fue capaz de producir colitis macro y microscópicamente compatibles con la enfermedad que esta especie produce y que los animales tratados con AIV presentaron los mejores índices productivos relacionados a GDP, IC, edad y peso a faena.
- 5.- Un trabajo experimental que permita disminuir o anular las variables mencionadas en el punto 1, debería realizarse a los fines de demostrar si los resultados obtenidos en la granja L es repetible y consistente.

## Bibliografía

Alvarez-Ordóñez , Francisco Javier Martínez-Lobo, Héctor Arguello, Ana Carvajal and Pedro Rubio.-Swine Dysentery: Aetiology, Pathogenicity, Determinants of Transmission and the Fight against the Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 1927-1947.

Burrough ER, Strait EL, Kinyon JM, Bower LP, Madson DM, Wilberts BL, Schwartz KJ, Frana TS, Songer JG.-Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2012 Nov;24(6):1025-34.

Canibe N, Højberg O, Højsgaard S, Jensen BB.- Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J Anim Sci.* 2005 Jun;83(6):1287-302.

Carvajal, A.; Arriba, M.L.; Pozo, J.; Vidal, A.; Rubio, P. 2000. Diagnóstico diferencial de las enfermedades digestivas del cerdo. *Información Veterinaria*, Unidad de enfermedades infecciosas, epidemiología, medicina preventiva y policía sanitaria. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

Carranza, A.; Parada, J.; Tamiozzo, P.; Milanesio, L.; Di Cola. G.; Pelliza. B.; Busso. J.; Bautista, S.; Ambrogi, R.; Illanes, N. Especies de *Brachyspira* aisladas de cerdos en frigorífico. XVIII Reunión Científica Técnica de la AAVLD. Mercedes, Corrientes 3-5 de Noviembre de 2010. B11. 51.

Costa, M O, Bonnie Chaban, John C S. Harding, and Janet E. Hill, Gourapura J. Renukaradhya, Editor Characterization of the Fecal Microbiota of Pigs before and after Inoculation with "*Brachyspira hampsonii*" PLoS One 2014; 9(8): e106399.

Costa MO, Chaban B, Harding JC, Hill JE. Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with "Brachyspira hampsonii". PLoS One 2014 Aug 28;9(8):e106399.

Cruz Eduardo C. Junior , Felipe M. Salvarani , Rodrigo O.S. Silva , Marcos X. Silva , Francisco C.F. Lobato and Roberto M.C. Guedes .Pesq. Vet. Bras. 33(8):963-969, Agosto 2013 A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil

De la Llata M, Dritz SS, Tokach MD, Goodband RD, Nelssen JL, Loughin TM Effects of dietary fat on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs reared in a commercial environment. 2001 J. Anim. Sci. Oct;79(10):2643-50.

Diarra A. T., M. Achacha and K. R. Mittal. 1995. Evaluation of different serological tests for detection of antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* in pig sera \*comp. immun. microbiol. infect. dis. vol. 18, no. 3, pp. 215-221, 1995

Duff J. W., BS; Jeremy S. Pittman, DVM, Diplomate ABVP; J. Mark Hammer, DVM, MS; Joann M. Kinyon, MS. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* in sows and suckling piglets. *J Swine Health Prod.* 2014;22(2):71-77.

Fellström, C.; Pettersson, B.; Johansson, K.E.; Lundeheim, N.; Gunnarsson, A. 1996. Prevalence of *Serpulina* species in relation to diarrhea and feed medication in pig rearing herds in Sweden. *Am. J. Vet. Res.* 57 (6): 807-8011.

Figi, Goldinger, Fuschini, Hartnack, Sidler.-Eradication of swine dysentery as modified partial depopulation in a nucleus sow breeding farm. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2014 Aug;156(8):373-80.

Giacoboni, Gabriela Tesis de doctorado. Doctor en Ciencias Veterinarias; Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. 1998. Susceptibilidad de diferentes cepas de ratones libre

de patógenos específicos a la infección experimental por *Serpulina hyodysenteriae* agente productor de disentería porcina.

Grahofer A, Overesch G, Nathues H, Zeeh F. Effect of soy on faecal dry matter content and excretion of *Brachyspira hyodysenteriae* in pigs.

VetRec Open 2016;3:e000159. doi:10.1136/vetreco-2015-000159.

Hampson, D.J.; Fellstrom, C.; Thomson J.R. Swinedysentery. In Diseases of Swine; Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Eds.; Blackwell Publishing Professional: Ames, IA, USA, 2006; 785–805.

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

Harris D. L., J. M. Kinyon, M.T. Mullin, and R. D. Glock. 1972b. Isolation and propagation of spirochetes from the colon of swine dysentery affected pigs. *Can. J. Comp. Med.* 36:74-76.

Hidalgo A, Carvajal A, Birte Vester, Ma`rit Pringle, Germa`n Naharro, and Pedro Rubio.-Trends to wards Lower Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Acquired Resistanceamong Clinical Isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. 2011, American Society for Microbiology,, p. 3330–3337.

Hontecillas R, Bassaganya-Riera J, Wilson J, Hutto DH, Wannemuehler MJ. CD4+ T-cell responses and distribution at the colonic mucosa during *Brachyspira hyodysenteriae*-induced colitis in pigs.2005 Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*, 115, 127-135.

Hutto DL, Wannemuehler MJ. A comparison of the morphologic effects of *Serpulina* hyodysenteriae or its beta-hemolysin on the murine cecal mucosa. *Vet Pathol* 1999; 36:412-22.

Illanes, N.; Pereyra, N.; Carranza, A.; Pelliza, B.; Ambrogi, R.; Tamiozzo, P.; Ambrogi, A. 2008. Presencia de *Brachyspirahyodysenteriae* y *pilosicoli* en Argentina. Memorias del IX Congreso Nacional de Producción Porcina, San Luis, Argentina.

Jacobson M, Lindberg R, Jonasson R, Fellström C, Waern MJ. Consecutive pathological and immunological alterations during experimentally induced swine dysentery - a study performed by repeated endoscopy and biopsy samplings through an intestinal cannula. *Res Vet Sci.* 2007 Jun;82(3):287-98.

Jensen, T.K.; Boye, M.; Moller, K. 2004. Extensive intestinal spirochaetosis in pig schallenged with *Brachyspira pilosicoli*. *J. Med. Microbiol.* 53: 309-312.

Joseph E. Rubin, Matheus O. Costa, Janet E. Hill, Heather E. Kittrell, Champika Fernando, Yanyu Huang, Brendad O'Connor, John C. S. Harding. Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with "*Brachyspira hamptonii*" strain 300446. February 2013. vol 8. Issue 2. e57146.

Joshua W. Duff, BS, Jeremy S. Pittmate ABVP, J. Mark Hammer, DVS, MS, Joann M Kinyon, MS. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* in sows and suckling piglets. *Journal of swine health and production*-Vol 22-N 2.

Judith Rohde, Anja Rothkamp, and Gerald F. Gerlach. Differentiation of Porcine *Brachyspira* Species by a Novel *nox* PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, July 2002, p. 2598–2600.

Lapuente, S.; Rosell, C. 2004. Patologías digestivas en el cerdo en crecimiento-cebo. *Mun. Ganad.* 169: 56-58.

Lim SK, Lee HS, Nam HM, Jung SC, Koh HB, Roh IS.-Antimicrobial resistance and phagetypes of *Salmonella* isolates from healthy and diarrheic pigs in Korea. *Food borne Pathog Dis.* 2009 Oct;6(8):981-7.

Mahu M, De Pauw N, Vande Maele L, Verlinden M, Boyen F, Ducatelle R, Haesebrouck F, Martel A, Pasmans F. Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Vet Res.* 2016 Jun 23;47(1):66. doi: 10.1186/s13567-016-0353-x.

Mirajkar NS, Davies PR, Gebhart CJ. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Brachyspira* Species Isolated from Swine Herds in the United States. *J Clin J Microbiol.* 2016 Aug; 54(8):2109-19. 10.1128.

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

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

Overland M, Tokach MD, Cornelius SG, Pettigrew JE, Wilson ME. Lecithin in swine diets: II. Growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 1993 May;71(5):1194-7.

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

Pedersen KS, Johansen M, Angen O, Jorsal SE, Nielsen JP, Jensen TK, Guedes R, Ståhl M, Bækbo P. Herd diagnosis of low pathogen diarrhoea in growing pigs - a pilot study. *Vet J.* 2014 Nov 1;67(1):24. 10.1186/2046-0481-67-24.

PIC 2015 TSNA201503 Sow gilt Manual Ver1SPN PIC NORTH America, Hendersonville, TN 37075.

Quintana-Hayashi MP, Mahu M, De Pauw N, Boyen F, Pasmans F, Martel A, Premaratne P, Fernandez HR, Teymournejad O, Vande Maele L, Haesebrouck F, Lindén SK. The levels of *Brachyspira hyodysenteriae* binding to porcine colonic mucins differ between individuals, and binding is increased to mucins from infected pigs with de novo MUC5AC synthesis. *Infect Immun.* 2015 Apr;83(4):1610-9.

Rodríguez, F. 2008. La disentería hemorrágica porcina: Elementos para su diagnóstico y control. < <http://www.bibliomaster.com/pdf/439.pdf>.> .

Rubin J. E., N. Jane Harms, Champika Fernando, Catherine Soos, Susan E. Detmer, John C. S. Harding, Janet E. Hill. Isolation and Characterization of *Brachyspira* spp. Including “*Brachyspira hampsonii*” from Lesser Snow Geese (*Chen caerulescens caerulescens*) in the Canadian Arctic. *Microbial ecology* 2013, Vol 66, 813–822.

Rugna G, Bonilauri P , Carra E , Bergamini F, Luppi A, Gherpelli Y , Magistrali C, Nigrelli A, Alborali G, Martelli P, La T, Hampson D, Merialdi G .-Sequencetypes and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003–2012. *The Veterinary Journal* 203 (2015) 115–119.

Sacristán G.A. 1995. *Fisiología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill. Interamericana de España. 7;507-633.

Schultz, R. A.; Mc Orist, S.; Shearm, M. 1999. Titration of BMD/CTC combination for control of porcine proliferative enteropathy. *Proceedings Am Assoc of Swine Pract.* Quebec. Canada. 109-111.

Segalés J, Kekarainen T, Cortey M.2013. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? Vet Microbiol. 26;165(1-2):13-20.

Thompson, J. 2002. Colitis: disentería y espiroquetosis colónica. SAC Vt. Sesvices. Escocia. Reino Unido. 1-8.

Thomson JR, Higgins RJ, Smith WJ, Done SH. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2002 Oct;49(8):430-7.

Van Duijkeren E, Greko C, Pringle M, Baptiste KE, Catry B, Jukes H, Moreno MA, Pomba MC, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K.-Pleuromutilins: use in food-producing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. J Antimicrob Chemother. 2014 Aug;69(8):2022-31.

Viott, A.M. Lage, A.P. Cruz Junior, E.C.C. Guedes R.M.C. . The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. Brazilian Journal of Microbiology 44, 1, 145-151 (2013).

Weissenbok H., Maderner A., Herzog A., Lussy H., Nowotny N. 2005 Amplification and sequencing of *Brachypira* spp. Specific portions of nox using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Australian pigs shows frequent solitary presence of *Brachypira murdochii*. Vet Mic. 111:67-75.

Wilberts BL, Arruda PH, Warneke HL, Erlandson KR, Hammer JM, Burrough ER.

Cessation of clinical disease and spirochete shedding after tiamulin treatment in pigs experimentally infected with "*Brachyspira hampsonii*". Res Vet Sci. 2014 Oct;97(2):341-7. doi: 10.1016.

Wilcock BP, Olander HJ. Studies on the pathogenesis of swine dysentery. II. Search for a cytotoxin in spirochetal broth cultures and colon content. Vet Pathol. 1979 Sep;16(5):567-73.

Zhang P, Hao H, Li J, Ahmad I, Cheng G, Chen D, Tao Y, Huang L, Wang Y, Dai M, Liu Z, Yuan Z. The Epidemiologic and Pharmacodynamic Cutoff Values of Tilmicosin against *Haemophilus parasuis*. Front Microbiol. 2016 Mar 22;7:385.