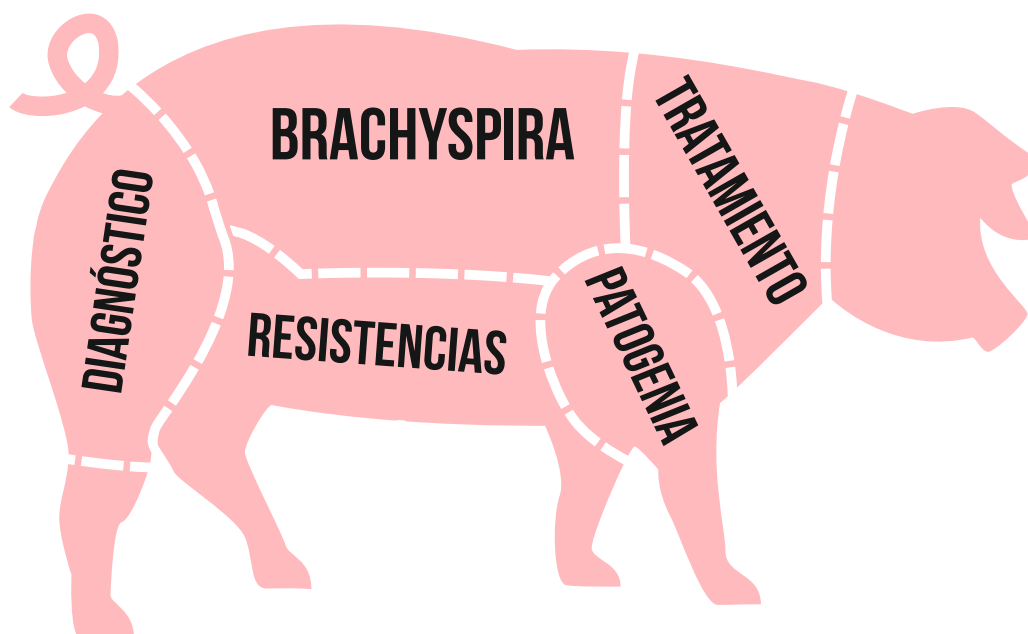


APORTACIONES AL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA DISENTERÍA PORCINA



LUIS MIGUEL ALLER MORÁN

TESIS DOCTORAL



Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad de León



APORTACIONES AL DIÁGNÓSTICO Y CONTROL DE LA DISENTERÍA PORCINA

Luis Miguel Aller Morán

Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria

Universidad de León, España



TESIS DOCTORAL

AGRADECIMIENTOS

Se acaba un ciclo y debe de comenzar otro. Esto es así toda la vida, algunas veces de manera voluntaria y otras sin poder hacer nada. En cualquier caso, los cambios implican emociones y, en la gran mayoría de los casos, la participación de personas en cada nuevo ciclo. Y han sido muchas emociones y muchas personas las que han ayudado en la elaboración de esta tesis de una u otra manera.

En primer lugar tengo que agradecer a Eduardo Arandilla Torrego, veterinario y amigo, por animarme en la idea de comenzar la Tesis doctoral, creo que su participación fue clave.

Por supuesto, agradecer al Prof. Pedro Miguel Rubio Nistal y a la Prof. Ana María Carvajal Urueña, directores de esta Tesis, por acogerme en su grupo de investigación y darme la oportunidad de formarme y el soporte académico y económico necesario para poder hacer realidad este trabajo.

A Francisco Javier Martínez Lobo, un cambio de ciclo en su vida supuso un cambio muy importante en la mía. Compañero de Departamento que se convirtió en amigo y co-Director de esta Tesis Doctoral a la fuerza. Compañero “a pie de campo” en todos los estudios que componen esta tesis. Otra persona fundamental para la consecución de este proyecto. Gracias por la paciencia que has tenido conmigo y por hacer mucho más fácil el trabajo diario durante estos años.

A todos los compañeros del laboratorio que me han facilitado el trabajo, colaborado conmigo y enseñado muchas cosas. Igualmente a todos los amigos del ámbito de la Facultad que lo mismo amenizaban los cafés, que me daban consejos o simplemente me escuchaban.

A los amigos veterinarios de Micros Veterinaria y todas las personas que han facilitado soporte técnico en la realización de los estudios que componen esta Tesis. A David Fernández García por el excelente trabajo de diseño de la portada y encuadernación de los ejemplares impresos.

Agradecer a mi familia y en especial a mis padres por el apoyo y el respaldo brindado durante toda mi vida para que estudiara lo que quisiera, basados en los comentarios de algún profesor de la E.G.B. del tipo: “Luis Miguel es muy inteligente, le gusta mucho estudiar” y que desencadenaron una fe ciega en esta idea que nunca se cuestionaron.

Por último, le debo el agradecimiento mayor a Cecilia, la madre de mi hijo y la persona que me ha acompañado en todo momento, soportando mis cambios de humor, mi carácter y todos los defectos que tengo, agravados por situaciones de incertidumbre y mucho estrés. Me has entendido, aconsejado y acompañado en lo bueno y en lo malo, durante muchos años y espero que siga siendo así toda mi vida. Te quiero.

Esta Tesis Doctoral aporta un granito de arena al avance de la Ciencia, como cualquier otra Tesis de esta área del conocimiento, pero a mi vida le ha aportado mucho más. Le ha aportado una formación profesional especializada, una salida laboral, mucho aprendizaje y la posibilidad de conocer a muchos profesionales y muchas personas interesantes por el camino. Es un ciclo de mi vida que acaba pero que influye decisivamente en cómo va a ser el siguiente.

Muchas gracias a todos por haberlo hecho posible.

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ATP	Adenosin trifosfato
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
CIMA Vet	Centro de Información online de Medicamentos Veterinarios
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DP	Disentería porcina
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EMEA	Agencia Europea del Medicamento
FAA	Fastidious anaerobic agar
FISH	Técnica de hibridación in situ fluorescente
LOS	Lipooligosacáridos
LPS	Lipopolisacáridos
CMB	Concentración mínima bactericida
CMB ₅₀	Concentración mínima bactericida para el 50 % de los aislados
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI ₅₀	Concentración mínima inhibitoria para 50 % de los aislados
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus
MLST	Tipificación mediante secuenciación multilocus
MLVA	Análisis del número de repeticiones en tándem
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsado
RAPD	Amplificación del ADN con cebadores aleatorios
REA	Análisis del ADN mediante endonucleasas de restricción

RFLP	Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.
SPF	Libre de patógenos específicos
UFC	Unidad formadora de colonias

Resumen

La disentería porcina (DP) es una importante enfermedad infecciosa del cerdo que cursa, en esta especie, con una colitis mucohemorrágica. Aunque puede afectar a animales de cualquier edad, la mayoría de los casos ocurren en animales en la fase de cebo y en las granjas afectadas se producen importantes pérdidas económicas derivadas del incremento del índice de conversión, retrasos en el crecimiento y desigualdad, aumento en los costes de medicación e incremento en las tasas de mortalidad. Se trata de una de las enfermedades digestivas más importantes en la industria porcina y que está presente en todos los países del mundo con producciones importantes de carne de cerdo.

Hasta principios de este siglo se consideraba que la DP estaba causada por un único agente etiológico denominado *Brachyspira hyodysenteriae*, una espiroqueta del género *Brachyspira* caracterizada por causar una beta hemólisis fuerte en medios de cultivo suplementados con sangre. Hoy en día han sido aceptadas dos nuevas especies fuertemente beta-hemolíticas dentro del género *Brachyspira* que son capaces de producir en el cerdo una enfermedad indistinguible de la DP clásica. Estas dos especies, *Brachyspira suanatina* y *Brachyspira hamptonii* se han aislado de cerdos afectados por disentería y de aves silvestres, habiéndose propuesto estas como su principal reservorio. *B. suanatina* únicamente se ha aislado en países del Norte de Europa; sin embargo, *B. hamptonii* ha demostrado tener una distribución global, habiendo sido identificada tanto en América del Norte como en diferentes países de Europa.

Esta tesis doctoral está basada en tres estudios que abordan diferentes aspectos relacionados con el control y el diagnóstico de la DP. En un primer capítulo se evalúa una fluoroquinolona, la flumequina, como alternativa terapéutica en el tratamiento de la DP. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) frente a una colección de aislados de campo de *B. hyodysenteriae*. Los valores de CMI y CMB obtenidos fueron más elevados que los descritos para otros patógenos intestinales frente a este mismo antibiótico y nos permiten concluir que, aunque no existen datos de biodisponibilidad de la flumequina en el intestino grueso del cerdo tras su administración oral, parece difícil que pueda tener un efecto directo sobre *B. hyodysenteriae*. La mejoría observada a nivel de campo en los cerdos con DP tratados con flumequina en agua de bebida podría deberse al efecto indirecto de este antibiótico sobre la microbiota.

En un segundo estudio se investigó la capacidad de un aislado de *B. hamptonii* de origen aviar para colonizar el intestino del cerdo, inducir signos clínicos o lesiones compatibles con la DP y transmitirse a cerdos sanos. Empleando un modelo de infección experimental, utilizado tradicionalmente en infecciones con aislados de *B. hyodysenteriae* y que emplea una dieta suplementada con una elevada concentración de soja para favorecer la infección, se demostró la colonización del intestino en todos los cerdos infectados así como signos clínicos característicos de DP en uno de los ellos. Más aún, pudimos demostrar la transmisibilidad de este aislado entre cerdos infectados y cerdos sanos.

Por último, en el tercer trabajo se evaluó la especificidad de diferentes técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) diseñadas para la detección de las principales especies de espiroquetas que colonizan el intestino del cerdo empleando una colección de 10 aislados de *B. hamptonii*. La detección de resultados falsos positivos en la mayoría de ellas hace necesaria una revisión cuidadosa de los protocolos diagnósticos de las infecciones por espiroquetosis intestinales en muestras de origen porcino.

Summary

Swine dysentery (SD) is a major infectious disease of pigs which causes, in this species, a mucohaemorrhagic colitis. It affects animals of all ages although the majority of the cases occurs in the growing period and it produces significant economic losses resulting from the increase in the conversion rate, growth delay and inequality, increase in medication costs as well as increase in mortality rates. SD is one of the most important enteric diseases in the swine production and is present in all countries with a relevant pork production.

Until recently, SD was considered to be caused by a single etiologic agent, *Brachyspira hyodysenteriae*, a spirochaete of the genus *Brachyspira* which produces a strong beta haemolysis in media containing blood. Nowadays it has been demonstrated that two new strongly beta-haemolytic species within the genus *Brachyspira* are also capable of producing a disease indistinguishable from the classical SD in pigs. These two species, *Brachyspira suanatina* and *Brachyspira hampsonii* have been isolated from affected pigs and wild birds and these wild birds have been proposed as the main reservoirs. While *B. suanatina* has only been isolated in countries of Northern Europe, *B. hampsonii* has a global distribution and has been identified in different countries in both, Europe and North America.

This PhD thesis is based on three studies focus on different aspects of the diagnosis and control of SD. In the first chapter we evaluated a fluoroquinolone, flumequine, as an alternative in the antibiotic treatment of SD. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were higher than described for other intestinal pathogens against the same antibiotic and allow us to suggest that flumequine does not have a direct effect on *B. hyodysenteriae*. Although data on bioavailability of flumequine on pig large intestine after its oral administration is lacked, we suggest that the clinical improvement observed in field cases of SD after oral administration of this antibiotic could be due to its effect on the microbiota.

In a second study we investigated the capacity of an avian isolate of *B. hampsonii* to colonize the pig intestine, induce clinical signs or lesions of SD and be transmitted to healthy pigs. Using an experimental infection model with includes the administration of a high level protein diet by the addition of soybean to encourage the infection, we were able to demonstrate colonization of the intestine in all challenged pigs as well as clinical signs of acute SD in one of them. Moreover, the transmission between infected and healthy pigs was demonstrated.

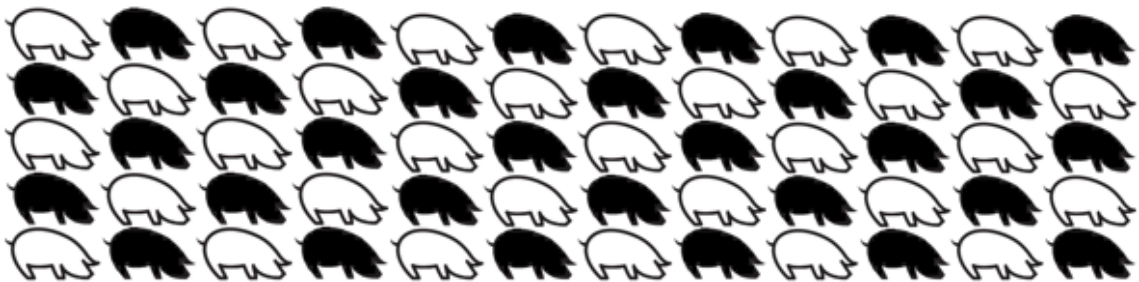
Finally, the third study assessed the specificity of different species-specific polymerase chain reactions (PCRs) designed for the detection of the main species of spirochetes that colonize the pig intestine using a collection of *B. hampsonii* isolates. The detection of false positive results in most of these PCRs allow us to propose the need of a careful review of the diagnosis protocols that are commonly used for intestinal espiroquetosis in porcine samples.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Phylum <i>Spirochaetes</i>	3
1.1.1 Características generales.....	3
1.1.2 Morfología y ultraestructura.....	3
1.1.3 Hábitat.....	5
1.2- Género <i>Brachyspira</i>	5
1.2.1 Características generales.....	5
1.2.2 Especies incluidas en el género <i>Brachyspira</i> y sus hospedadores	6
1.2.3 Transmisión interespecies.....	10
1.3- Detección, aislamiento e identificación de especies del género <i>Brachyspira</i>	10
1.3.1 Identificación fenotípica.....	12
1.3.2 Técnicas moleculares	14
1.3.3 Métodos inmunológicos.....	15
1.3.4 Tipificación	15
1.4-Disentería porcina	17
1.4.1 Historia e importancia de la enfermedad	17
1.4.2 Agente etiológico	18
1.4.3 Epidemiología.....	19
1.4.4 Patogenia.....	25
1.4.5 Cuadro clínico	27
1.4.6 Lesiones.....	29
1.4.7 Diagnóstico.....	32
1.4.8 Tratamiento y control	34
1.4.9 Resistencias antibióticas en <i>Brachyspira</i> spp.....	38
2. OBJETIVOS	43
3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	47
Estudio I.....	49
Estudio II.....	55
Estudio III.....	61
4.-RESUMEN GLOBAL Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	69
4.1. Búsqueda de nuevas opciones antimicrobianas en el control de la disentería porcina.....	71
4.2. Patogenicidad y transmisibilidad en cerdos de un aislado de <i>B. hamptonii</i> de origen aviar: infección experimental.....	75

4.3..... Nuevos retos en el diagnóstico de las infecciones por espiroquetas intestinales en cerdos	80
5.-CONCLUSIONES	85
6.-BIBLIOGRAFÍA.....	89

1. INTRODUCCIÓN



1.1 Phylum *Spirochaetes*

1.1.1 Características generales

Las espiroquetas son un grupo de bacterias que forman el filo *Spirochaetes*, uno de los 25 filos en que se divide actualmente el superreino *Bacteria*.

Forman un amplio grupo bacteriano filogenéticamente relacionado, con evidencias fenotípicas comunes como es la presencia de flagelos periplasmáticos y otras características como la resistencia de la mayoría de sus miembros a la rifampicina (Kunkle & Kinyon 1988; Wyss *et al.* 1996; Stamm *et al.* 2001).

El filo *Spirochaetes* contiene una única clase, *Spirochaetia*, y seis ordenes, entre ellos el orden *Brachyspirales*, formado por una única familia, *Brachyspiraceae*, con un único género denominado *Brachyspira*, en el que están incluidas las espiroquetas intestinales con mayor relevancia clínica para especies como el cerdo, como veremos más adelante.

Clásicamente, los actuales ordenes se clasificaban como familias dentro del orden *Spirochaetales*, distinguiéndose entre ellas en base a sus características bioquímicas y a las secuencias del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S o del gen que lo codifica (Paster *et al.* 1991; Paster & Dewhirst 2000). Estudios recientes, basados en evidencias filogenéticas y moleculares, propusieron que dichas familias podían ser, en realidad, divisiones taxonómicas mayores como órdenes o incluso clases dentro del propio filo *Spirochaetes*, como actualmente están clasificadas (Gupta *et al.* 2013).

Dentro del filo *Spirochaetes* se incluyen cuatro géneros con gran importancia clínica que engloban especies causantes de importantes enfermedades. Así, *Treponema pallidum* es el agente etiológico de la sífilis, *Borrelia burgdorferi* causa la enfermedad de Lyme y especies de los géneros *Leptospira* y *Brachyspira* causan leptopirosis y espiroquetosis intestinales, respectivamente, en diversas especies animales incluido el hombre (Gupta *et al.* 2013).

1.1.2 Morfología y ultraestructura

Las espiroquetas son bacterias con forma helicoidal, delgadas, flexibles y alargadas. Presentan diámetros entre 0,1 y 3 μm , que son constantes dentro de cada especie, y una longitud que puede aumentar cuando se encuentran ante condiciones que inhiben el crecimiento bacteriano, variando entre 3 y 500 μm (Margulis *et al.* 1993). Por otro lado, se han descrito formas cocoides (Dröge *et al.* 2006) y pleomorfismos reversibles cuando estas bacterias se encuentran en condiciones adversas para su crecimiento que favorecen la formación de los denominados cuerpos esféricos (Brorson *et al.* 2009).

La estructura de las espiroquetas incluye una membrana celular externa o vaina flexible, similar a la pared de las bacterias Gram negativas, que delimita el espacio periplasmático por el que discurren los flagelos característicos de este filo, en número variable según la especie. Cada uno de estos endoflagelos, también denominados filamentos axiales, está anclado en su extremo proximal a uno de los polos del cilindro protoplasmático, el cual hace las veces de membrana celular delimitando el citoplasma y el nucleoide de la bacteria (ver fig. 2). El otro extremo del flagelo queda libre. Este complejo axial que forman los flagelos en el espacio periplasmático contribuye a forjar la morfología bacteriana y a favorecer el desarrollo de la motilidad características de las espiroquetas, particularmente en medios muy viscosos, que impedirían el

desplazamiento de bacterias con flagelos externos, o sobre superficies sólidas (Holt 1978; Charon *et al.* 1992).

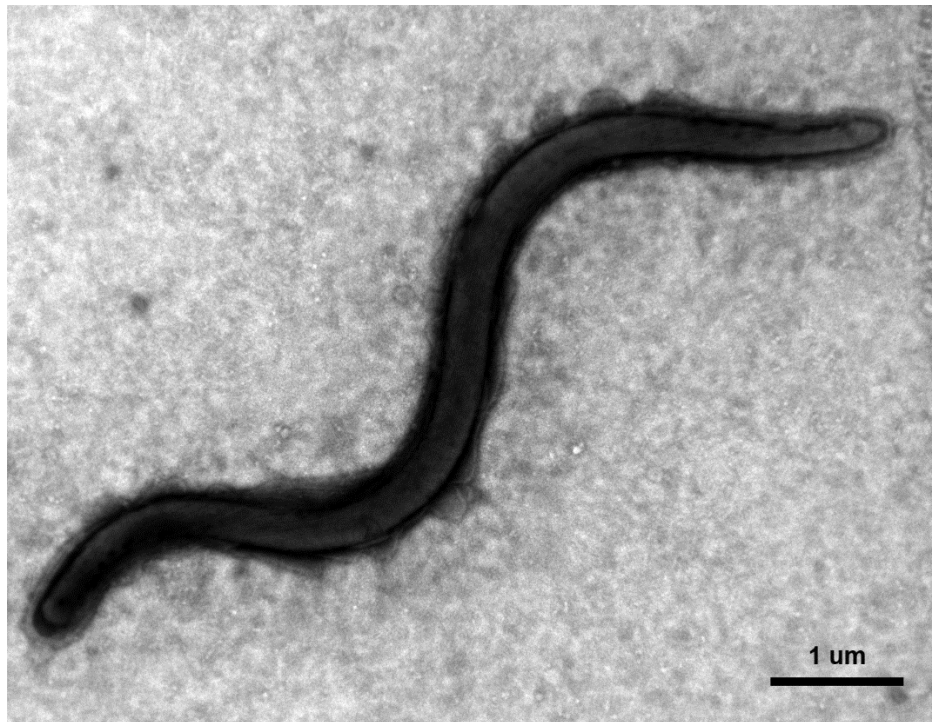


Figura 1: Microscopía electrónica de barrido de *B. hyodysenteriae* (x20000).

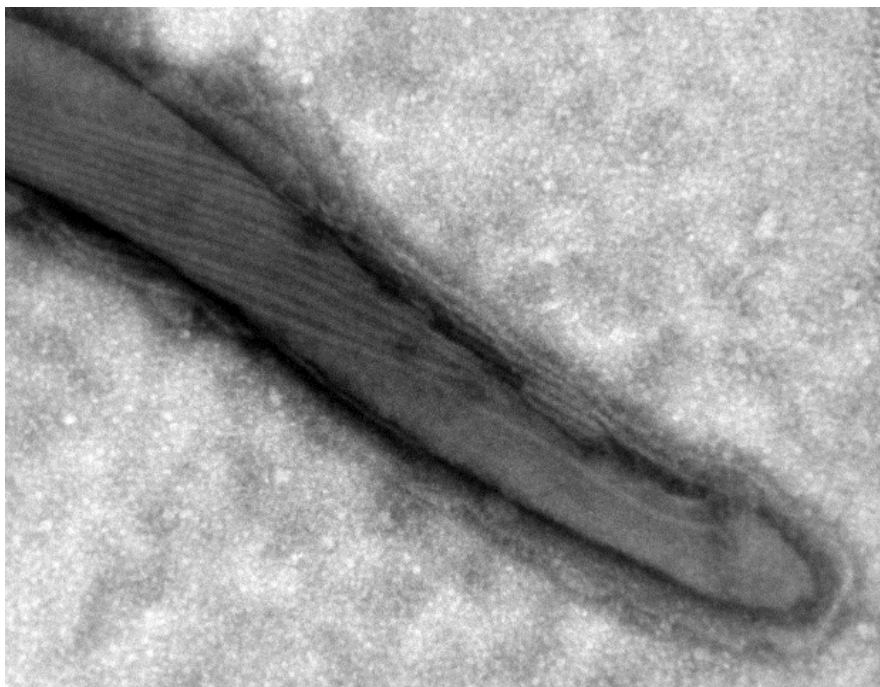


Figura 2: Detalle del anclaje de los flagelos periplásmicos en el extremo proximal de *B. hyodysenteriae* obtenido por microscopía electrónica de barrido (x80000).

1.1.3 Hábitat

El filo *Spirochaetes* presenta una gran biodiversidad, incluyendo desde espiroquetas capaces de colonizar el tracto digestivo de mamíferos, aves, insectos y moluscos bivalvos, hasta formas de vida libre que habitan en medios acuáticos tanto dulces como de aguas saladas (Paster & Dewhirst 2000; Madigan *et al.* 2014; Lasa *et al.* 2016). Igualmente, incluye tanto bacterias anaerobias estrictas como anaerobias facultativas.

1.2- Género *Brachyspira*

1.2.1 Características generales

El término “brachyspira” significa espirales cortas y dentro de este género se incluyen un grupo de especies de bacterias Gram negativas, anaerobias estrictas, pero con cierto grado de tolerancia al oxígeno, y que colonizan el tracto digestivo de mamíferos y aves. La especie tipo del género es *Brachyspira aalborgi* (*B. aalborgi*). Actualmente este género incluye 9 especies aceptadas y existe un cierto número de especies aún no validadas que han sido propuestas para su integración en el mismo.

A principios de 1970 y simultáneamente en Europa y América, se aisló de las heces de cerdos afectados de disentería la primera espiroqueta intestinal y se reprodujo satisfactoriamente la enfermedad mediante la inoculación, por vía oral, de cerdos con este aislado (Vallejo 1969; Taylor & Alexander 1971; Harris *et al.* 1972). Esta bacteria, pionera del actual género *Brachyspira*, se denominó inicialmente *Treponema hyodysenteriae*. Actualmente se identifica como *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyodysenteriae*) y es reconocida como el agente etiológico de la DP (Harris *et al.* 1972).

Pocos años después se aisló otra espiroqueta, morfológica y bioquímicamente similar a la anteriormente descrita pero aparentemente apatógena y débilmente hemolítica, a la que se denominó *Treponema innocens* (Kinyon & Harris 1979). Posteriormente se comprobó que el grado de homología en las secuencias genéticas de ambas especies era muy elevado, mientras que la homología con la especie referencia del género, *Treponema pallidum*, tan solo era del 5 %. Además, el contenido de citosina y guanina en el genoma de estas nuevas especies era muy diferente del de *Treponema pallidum* (Miao & Fieldsteel 1980). Por ello, se propuso su inclusión en un nuevo género denominado *Serpula*. Sin embargo, esta denominación ya estaba en uso y fue sustituida, en un corto plazo de tiempo, por la de género *Serpulina* (Stanton 1992).

A mediados de 1990 se reconoció como nueva especie del género *Serpulina*, una bacteria patógena para el cerdo y para el hombre que se denominó *Serpulina pilosicoli* (Trott *et al.* 1996a) y que había sido identificada años antes como *Anguillina coli* (Lee & Hampson 1994).

Los estudios filogenéticos basados en la secuencia del gen ARNr 16S revelaron que estas tres especies estaban relacionadas entre sí, así como con otra especie, previamente separada del género *Treponema* en base a los resultados proporcionados por la técnica de electroforesis de enzimas multilocus o MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis), identificada como *B. aalborgi* (Hovind-Hougen *et al.* 1982). Con una homología superior al 96 % entre sus secuencias, se decidió reclasificar estas bacterias e incluirlas en un nuevo género denominado *Brachyspira* (Ochiai *et al.* 1997). En último lugar, se incluyeron en este nuevo género especies como *Serpulina intermedia* y *Serpulina murdochii*, espiroquetas intestinales identificadas en cerdos (Hampson & La 2006b), renombradas como *Brachyspira intermedia* y *Brachyspira murdochii* (*B. murdochii*); y

Brachyspira alvinipulli (*B. alvinipulli*) aislada del intestino de aves de corral (Stanton *et al.* 1998; Hampson & La 2006b).

1.2.2 Especies incluidas en el género *Brachyspira* y sus hospedadores

- *Brachyspira hyodysenteriae*:

Es el agente etiológico de la DP y la especie más estudiada del género. Se caracteriza por producir una fuerte hemólisis beta cuando se cultiva en medios suplementados con sangre debido a que posee una copia del gen *hlyA* que codifica una hemolisina (Hsu *et al.* 2001). Tradicionalmente se usó esta característica para diferenciar esta especie de otras del género, pero actualmente se han aceptado *Brachyspira suanatina* (*B. suanatina*) y *Brachyspira hampsonii* (*B. hampsonii*) como nuevas especies fuertemente hemolíticas. Todas estas especies que presentan beta hemólisis fuerte han sido aisladas del tracto intestinal de cerdos y aves (Råsbäck *et al.* 2007a; Chander *et al.* 2012; Mushtaq *et al.* 2015; Mirajkar *et al.* 2016a). Incluso se han descrito aislados de *B. hyodysenteriae* aislados de granjas sanas que presentan una hemólisis débil (Card *et al.* 2016; Mahu *et al.* 2016).

La mayoría de los aislados de *B. hyodysenteriae* son capaces de producir indol (aislados indol positivos), una característica que permite diferenciarlos de los aislados de *B. hampsonii*, indol negativos. Sin embargo, *B. suanatina* también es indol positivo y, además, se han descrito aislados de *B. hyodysenteriae* indol negativos en diversos países (Hommeiz *et al.* 1998; Fellström *et al.* 1999; Hidalgo *et al.* 2009). Todo esto muestra la complejidad en la diferenciación de especies del género *Brachyspira*, formulada originalmente en base a las espiroquetas intestinales porcinas, pero que incluye un grupo muy amplio de bacterias que colonizan otros hospedadores, particularmente el tracto digestivo de las aves (Backhans *et al.* 2011; Mappleby *et al.* 2014).

El rango de hospedadores de *B. hyodysenteriae* lo integran, principalmente, cerdos, diversos tipos de aves y roedores. Diversos tipos de insectos y otros animales, siempre en contacto directo con granjas de cerdos, pueden actuar como vectores biológicos en la transmisión de esta infección (Jensen *et al.* 1996; Jansson *et al.* 2004; Nemes *et al.* 2006; Feberwee *et al.* 2008; Reiner *et al.* 2011; Alvarez-Ordóñez *et al.* 2013).

- *Brachyspira pilosicoli*:

Es el agente etiológico de la espiroquetosis intestinal porcina (Trott *et al.* 1996a) así como uno de los agentes causantes de la espiroquetosis intestinal humana y de la espiroquetosis intestinal aviar. También se ha propuesto que esta especie está asociada a cuadros clínicos de diarrea en perros, fundamentalmente en cachorros (Fellstrom *et al.* 2001; Hidalgo *et al.* 2010).

Se caracteriza por producir una hemólisis débil cuando se cultiva en agar sangre. Bioquímicamente, posee actividad α -galactosidasa, no produce indol y es capaz de hidrolizar el hipurato (Fellström & Gunnarsson 1995), aunque se han identificado cepas indol positivas (Lee *et al.* 1993) y cepas hipurato negativas (Fossi *et al.* 2004).

Es la especie del género *Brachyspira* que presenta un rango de hospedadores más amplio, incluyendo cerdos, perros, caballos, primates, aves de corral y silvestres, así como el hombre (Lee & Hampson 1994; Duhamel *et al.* 1995; D. J. Trott *et al.* 1996a; Oxberry *et al.* 1998; Stephens & Hampson 2001; Shivaprasad & Duhamel 2005; Westerman *et al.* 2012; Martinez-Lobo *et al.* 2013).

- *Brachyspira intermedia*:

Es una especie del género *Brachyspira* denominada así por sus características bioquímicas, intermedias entre *B. hyodysenteriae* y *B. innocens*, ya que produce una hemólisis débil en medios con sangre y es indol positiva (Stanton *et al.* 1997). Existe una gran variabilidad genética dentro de esta especie, tanto es así que se han descrito aislados identificados como *Brachyspira intermedia* (*B. intermedia*) mediante PCR, que presentan beta hemólisis fuerte y genéticamente están estrechamente relacionados con *B. suanatina* y *B. hyodysenteriae*. Algunos autores ha sugerido que entre los aislados identificados como *B. intermedia* incluyan aislados que formen parte de otras especies del género *Brachyspira* (Phillips *et al.* 2010; Mirajkar *et al.* 2015).

Sus hospedadores más comunes son aves de corral y cerdos. Su patogenicidad en cerdos es controvertida, habiendo sido relacionada ocasionalmente con cuadros de diarrea en esta especie (Fellström & Gunnarsson 1995). Es patógena para aves, causando espiroquetosis intestinal aviar, particularmente en gallinas y en pollos de engorde (Hampson *et al.* 2002).

- *Brachyspira innocens*:

Es una especie inicialmente aislada de cerdos sin signos clínicos de disentería y poco después aislada también en heces de perros sanos (Kinyon & Harris 1979). Se considera apatógena aunque cabe mencionar que un estudio asoció la infección de cerdos gnotobióticos con *Brachyspira innocens* (*B. innocens*) a cuadros de colitis (Neef *et al.* 1994).

Se trata de una espiroqueta débilmente hemolítica, que no produce indol y que puede fermentar la fructosa, galactosa, lactosa, glucosa y maltosa, así como hidrolizar el hipurato (Kinyon & Harris 1979; Ochiai *et al.* 1997).

- *Brachyspira murdochii*:

Es una espiroqueta débilmente hemolítica que no produce indol ni hidroliza el hipurato y que carece de actividad α -galactosidasa y α -glucosidasa, aunque sí tiene actividad β -glucosidasa (Stanton *et al.* 1997). Los hospedadores principales de esta especie son cerdos y ratas (Stephens & Hampson 2001).

Tradicionalmente se ha considerado una especie apatógena para el cerdo. Sin embargo, mediante PCR y técnicas inmunohistoquímicas se ha identificado en biopsias de cerdos con colitis y también se ha aislado a partir de muestras de líquido sinovial procedentes de cerdos con cojera, demostrando su capacidad de propagación a nivel sistémico (Hampson *et al.* 1999; Jensen *et al.* 2010). También se ha aislado en granjas de ponedoras y de pollos de engorde así como de aves silvestres (Jansson *et al.* 2015). Se ha asociado con problemas de cama húmeda en avicultura intensiva aunque existen dudas sobre su papel en la etiología de esta enfermedad debido que en todos los casos se ha tratado de infecciones múltiples con varias especies de *Brachyspira* implicadas (Stephens & Hampson 1999; Mappley *et al.* 2014).

- *Brachyspira alvinipulli*:

Bioquímicamente esta especie se caracteriza por hidrolizar el hipurato, producir β -galactosidasa y ser indol y α -glucosidasa negativa (Swayne *et al.* 1995; Stanton *et al.* 1998). Es débilmente hemolítica.

Se trata de una especie patógena para pollos, en los que se asocia a una tiflitis moderada y diarrea (Stanton *et al.* 1998). También ha sido aislada de gallinas, gansos, serretas y perros (Swayne *et al.* 1995; Stanton *et al.* 1998; Nemes *et al.* 2006) y, aunque se ha demostrado la

colonización del intestino, esta infección solo se asocia a una ligera inflamación de la mucosa intestinal en infecciones experimentales llevadas a cabo en gansos y patos (Ivanics *et al.* 2007; Thuma *et al.* 2011).

-*Brachyspira aalborgi*:

Es la especie tipo del género *Brachyspira* (Hovind-Hougen *et al.* 1982). Se trata de una especie de difícil cultivo y que ha sido muy poco estudiada. Es débilmente hemolítica y ha sido aislada del hombre y de primates no humanos (Duhamel *et al.* 1995; Tsinganou & Gebbers 2010). Se considera, junto a *Brachyspira pilosicoli* (*B. pilosicoli*), el agente etiológico de la espiroquetosis intestinal humana.

Bioquímicamente esta especie se caracteriza por presentar actividad β -galactosidasa, no produce indol ni hidroliza el hipurato y no presenta actividad β -glucosidasa ni α -galactosidasa. Existe controversia en lo que respecta a su actividad α -glucosidasa (Hovind-Hougen *et al.* 1982; Fellström & Gunnarsson 1995).

- *Brachyspira suanatina*:

Es una espiroqueta aislada originalmente de cerdos afectados de diarrea en Suecia y Dinamarca y que más tarde se relacionó genéticamente con aislados recuperados de patos silvestres. Presenta características fenotípicas similares a *B. hyodysenteriae*; hemólisis beta fuerte, no hidroliza el hipurato y produce indol, no presenta actividad α -galactosidasa pero sí actividad β -glucosidasa. Fue propuesta como especie debido a su genotipo atípico, muy semejante a espiroquetas procedentes de ánades reales (Råsbäck *et al.* 2007b), poniéndose de manifiesto la posible transmisión interespecífica de esta espiroqueta entre dichas aves y cerdos. Provoca en los cerdos una enfermedad similar a la DP (Jansson *et al.* 2004). Se ha demostrado experimentalmente que aislados procedentes de granjas de cerdos, colonizan y producen signos de disentería, la inoculación de cerdos con aislados de origen aviar ha demostrado su capacidad para colonizar el intestino de cerdos inoculados y producir diarrea (Råsbäck *et al.* 2007b).

- *Brachyspira hampsonii*:

Es una espiroqueta fenotípicamente similar a *B. hyodysenteriae*, que produce hemólisis beta fuerte pero que es indol negativa, al contrario que la mayoría de los aislados de *B. hyodysenteriae*. No hidroliza el hipurato ni presenta actividad α -galactosidasa ni α -glucosidasa. Está conformada por 4 grupos genéticos de aislados, que muestran relación estrecha con *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia* y *B. suanatina*, como se ha demostrado mediante comparación de genomas completos de las diferentes especies del género. Ha sido la última especie aceptada dentro del género *Brachyspira* (Mirajkar *et al.* 2016a).

Como veremos más adelante, en Norteamérica se ha convertido en un importante agente etiológico de DP (Rubin *et al.* 2013a). Por el contrario, en Europa solo existen dos descripciones clínicas de DP asociadas a *B. hampsonii* (Mahu *et al.* 2014; Rohde *et al.* 2014). También se ha aislado de aves silvestres tanto en Norteamérica como en Europa (Martínez-Lobo *et al.* 2013; Rubin *et al.* 2013a)

- **Especies propuestas**

- **“*Brachyspira pulli*”:**

Es una espiroqueta aislada de explotaciones avícolas y, ocasionalmente, también de perros (Jansson *et al.* 2008a). Es débilmente hemolítica e indol negativa aunque se ha descrito que sus características fenotípicas son muy variables. Se ha mostrado levemente patógena en infecciones experimentales en pollos (McLaren *et al.* 1997; Stephens & Hampson 1999).

- **“*Brachyspira canis*”:**

Se trata de una de las especies del género más específicas de hospedador que únicamente ha sido aislada de heces de perros sanos (Duhamel *et al.* 1998a; Hidalgo *et al.* 2010). Es débilmente hemolítica e indol negativa.

- **“*Brachyspira corvi*”:**

Es una espiroqueta débilmente hemolítica, indol e hipurato negativa. Originalmente fue aislada de aves del género *Corvus* en diferentes regiones de Suecia (Jansson *et al.* 2008b) y posteriormente de patos salvajes (Jansson *et al.* 2011). Se trata una especie que genéticamente forma un cluster separado del resto de especies del género, en base a la secuenciación del gen 16S del ARNr y cuya patogenicidad es desconocida (Jansson *et al.* 2008b).

- **“*Brachyspira ibaraki*”:**

Es una especie propuesta pero muy poco estudiada y aislada de heces de humanos. Estrechamente relacionada con *B. aalborgi* (Tachibana *et al.*, 2002).

- **“*Brachyspira christiani*”:**

Es una espiroqueta genéticamente muy parecida a *B. aalborgii* y únicamente aislada de biopsias de humanos diagnosticados de espiroquetosis intestinal (Jensen *et al.* 2001).

- **“*Brachyspira hominis*”:**

Especie que presenta una gran similitud genética con *B. aalborgii*, aislada de muestras intestinales de humanos, generalmente en infecciones mixtas junto a otras especies de espiroquetas (Westerman *et al.* 2012).

- **“*Brachyspira rattus*”:**

Se trata de una nueva especie propuesta, aislada de ratas silvestres y muy próxima, genéticamente, a *B. pilosicoli* en base a la secuencia del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr.

Produce hemólisis débil y tiene actividad β -glucosidasa. No hidroliza el hipurato, ni produce indol, ni presenta actividad α -glucosidasa o α -galactosidasa (Backhans *et al.* 2010).

- **“*Brachyspira muris*” y “*Brachyspira muridarum*”:**

Espiroquetas ampliamente extendidas en roedores silvestres, propuestas como nuevas especies dentro del género *Brachyspira* en base a diferencias en la secuencia de los genes de la subunidad 16S del ARNr (Backhans *et al.* 2010).

Casi no presentan hemólisis cuando se cultivan en medios con sangre y bioquímicamente no presentan actividad α -glucosidasa ni α -galactosidasa. No hidrolizan el hipurato ni producen indol

y únicamente se diferencian entre sí porque los aislados de “*B. muris*” presentan actividad β -glucosidasa (Oxberry *et al.* 1998; Jansson *et al.* 2004; Råsbäck *et al.* 2007a; Martínez-Lobo *et al.* 2013).

1.2.3 Transmisión interespecies

Las especies del género *Brachyspira* presentan multitud de hospedadores silvestres que juegan, en muchas ocasiones, un papel fundamental en la introducción, reintroducción y mantenimiento de las mismas en granjas de animales domésticos. Así, en Australia, se demostró que las ratas son los animales silvestres que presentan mayor riesgo de transmisión de patógenos para las granjas de cerdos, siendo *B. hyodysenteriae* el microorganismo patógeno con más probabilidades de ser transmitido por estos roedores (Pearson *et al.* 2016).

Muy particularmente, las ratas se han revelado como el principal reservorio ambiental para algunas especies del género *Brachyspira*, pudiendo ser colonizadas por diversas especies, al igual que ocurre con los ratones. Esto permite el mantenimiento de las infecciones en las granjas durante largos períodos de tiempo y, como se ha demostrado en diversos estudios, constituye una pieza fundamental en la transmisión interespecífica en el caso de las infecciones por espiroquetas intestinales en granjas porcinas y avícolas (Backhans *et al.* 2011).

Diversas especies de espiroquetas se han aislado de muestras del intestino de aves silvestres, muy particularmente de aves migratorias (Jansson *et al.* 2001; Jansson *et al.* 2004; Rubin *et al.* 2013a). Se considera que las aves son un reservorio muy importante en el caso de las especies de espiroquetas patógenas para el cerdo como *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. suanatina* o *B. hamptonii* (Oxberry *et al.* 1998; Råsbäck *et al.* 2007b; Thuma *et al.* 2011; Martínez-Lobo *et al.* 2013). Estas bacterias ven facilitada su difusión a nivel mundial con la migración de estas aves y el contacto con granjas que puedan tener durante sus trayectos (La *et al.* 2016). En este sentido, un reciente estudio ha demostrado estrechas relaciones genéticas entre aislados de *B. hamptonii* procedentes de diversos países y de diferentes especies hospedadoras, proponiéndose que es necesario un control exhaustivo de esta fuente de transmisión en las granjas de animales (Mirajkar *et al.* 2015). Una situación similar se ha demostrado al comparar los genomas de aislados de *B. pilosicoli* procedentes de diferentes hospedadores (Mappley *et al.* 2012).

Esta transmisión entre especies es especialmente importante en el caso de *B. suanatina* y *B. hamptonii* porque ambas se asocian a una enfermedad grave, clínicamente idéntica a la DP causada por *B. hyodysenteriae*. La diferenciación es importante ya que estas tres especies producen en medios con sangre una hemólisis beta fuerte. Además, algunas de las técnicas moleculares empleadas tradicionalmente en el diagnóstico de la DP pueden dar resultados falsos positivos con estas nuevas especies (Mahu *et al.* 2014), haciendo necesario el uso de una caracterización fenotípica más exhaustiva o de nuevas técnicas moleculares u otros sistemas de detección novedosos para alcanzar un diagnóstico etiológico correcto (Scherrer *et al.* 2016).

1.3- Detección, aislamiento e identificación de especies del género *Brachyspira*

Generalmente en el primer paso del aislamiento e identificación de espiroquetas intestinales a partir de muestras clínicas se emplea un medio selectivo específico que inhiba el crecimiento de la mayoría de la microbiota bacteriana presente, permitiendo exclusivamente el crecimiento de las espiroquetas que suele ser mucho más lento que el de sus competidores. Existen numerosas

descripciones de medios selectivos específicos para espiroquetas. Si bien es cierto que no existe un medio de cultivo ideal para todas las especies de espiroquetas intestinales, la mayoría de los trabajos recomiendan utilizar un medio sólido, como el agar triptona soja, suplementado con un 5 % de sangre y con antibióticos como la vancomicina, colistina, rifampicina, espiramicina o espectinomina en distintas concentraciones y combinaciones. (Songer *et al.* 1976; Jenkinson & Wingar 1983; ; Kunkle *et al.* 1986; Szykiewicz & Binek 1986; Kunkle & Kinyon 1988; Achacha & Messier 1992).

El cultivo de estos medios se debe realizar a temperatura entre 39 y 42 °C y en una atmósfera anaeróbica con una composición de gases que incluya un 5-10 % de CO₂ y un 5-10 % de N₂ o H₂ (Margawani *et al.* 2004). Al igual que ocurre con la composición del medio, las condiciones de incubación óptimas también pueden variar ligeramente de unas especies a otras.

Las especies del género *Brachyspira* necesitarán entre 3 y 14 días (hasta 28 días en el caso de *B. aalborgi*) para lograr un crecimiento evidente al ser cultivadas en medios sólidos. Generalmente se observa una hemólisis que varía en intensidad, según la especie, y, en algunos casos, se pueden observar colonias, especialmente cuando se emplean medios para anaerobios exigentes como el Fastidious Anaerobic Agar (FAA) en cultivos más o menos puros.



Figura 3: Cultivo puro de *B. hyodysenteriae* en agar sangre mostrando zonas con hemólisis beta fuerte.



Figura 4: Cultivo puro de *B. hyodysenteriae* en Fastidious Anaerobic Agar (FAA). Se observa la formación de colonias en la superficie del medio de cultivo.

A partir de las primeras zonas donde se observe hemólisis se puede realizar una observación directa mediante microscopía. Se observará a 400 o a 1000 aumentos en microscopio con contraste de fases o de campo oscuro, la presencia de bacterias con la morfología particular de las espiroquetas y muy móviles.

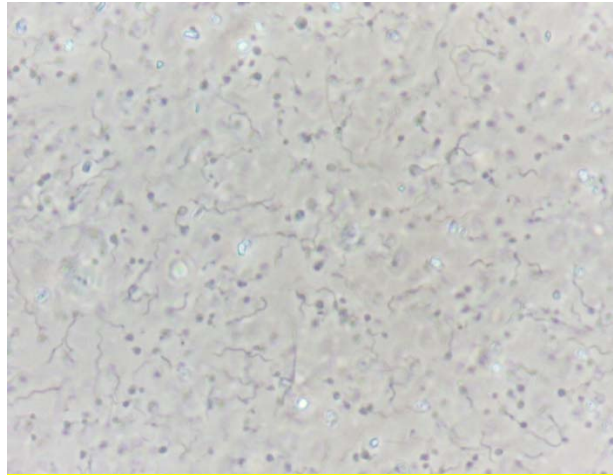


Figura 5: Cultivo de *B. hyodysenteriae* en medio líquido. Observación mediante microscopio óptico de contraste de fases (x1000).

Habitualmente, suele ser necesario realizar varios subcultivos utilizando siembra por agotamiento para obtener un cultivo puro.

1.3.1 Identificación fenotípica

Algunas características fenotípicas permiten la diferenciación preliminar de algunas especies del género. En primer lugar, la hemólisis que producen cuando se cultivan en medios con sangre permite diferenciar espiroquetas fuertemente beta-hemolíticas de aquellas que producen una hemólisis débil. La combinación de esta característica con resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas permite una identificación preliminar de las diferentes especies del género *Brachyspira*.



Figura 6: Hemólisis beta fuerte asociada a *B. hyodysenteriae* en una placa de agar sangre suplementada con antibióticos.

Las pruebas bioquímicas más utilizadas para la identificación son la hidrólisis del hipurato, el test de producción de indol y la actividad alfa-galactosidasa y beta-glucosidasa. La tabla 1 muestra los resultados de cada una de estas pruebas bioquímicas para las principales especies del género *Brachyspira*. Los resultados proporcionados por estas pruebas bioquímicas permiten dividir a las especies del género en diferentes grupos bioquímicos (Fellström & Gunnarsson 1995).

Especie	β -hemólisis	Indol	Hidrólisis Hipurato	α -gal. ²	β -gluc. ³	α -gluc. ⁴	Grupo ⁵	Referencia
<i>B. hyodysenteriae</i>	Fuerte (débil) ¹	+ (-)	-	-	+	+	I	Taylor <i>et al.</i> , 1971
<i>B. pilosicoli</i>	Débil	- (+)	+ (-)	+ (-)	- (+)	-	IV	Trott <i>et al.</i> , 1996a
<i>B. intermedia</i>	Débil (fuerte)	+	-	-	+	+	II	Stanton <i>et al.</i> , 1997
<i>B. innocens</i>	Débil	-	+	+	+	+	IIIbc	Kinyon <i>et al.</i> , 1979
<i>B. murdochii</i>	Débil	-	-	-	+	-	IIIa	Stanton <i>et al.</i> , 1997
<i>B. alvinipulli</i>	Débil	-	+	-	+ (-)	-	N/A	Stanton <i>et al.</i> , 1998
<i>B. aalborgi</i>	Débil	-	-	-	-	-	N/A	Hovin-Hougen <i>et al.</i> , 1982
<i>B. suanatina</i>	Fuerte	+	-	-	+	ND	I	Råsbäck <i>et al.</i> , 2007b
<i>B. hampsonii</i>	Fuerte	-	-	-	+ (-)	-	I	(Mirajkar <i>et al.</i> 2016a)
" <i>B. canis</i> "	Débil	-	-	-	+	ND	IIIa	Duhamel <i>et al.</i> , 1998
" <i>B. corvi</i> "	Débil	-	-	+ (-)	- (+)	+(-)	N/A	Jansson <i>et al.</i> , 2008
" <i>B. pulli</i> "	Débil	-	-	+	+	ND	IIIbc	Stephens & Hampson 1999
" <i>B. ibaraki</i> "	Débil	ND	ND	ND	ND	ND	N/A	Tachibana <i>et al.</i> , 2002
" <i>B. rattus</i> "	Débil	ND	ND	ND	ND	ND	N/A	Backhans <i>et al.</i> , 2010
" <i>B. muris</i> "	Débil	ND	ND	ND	ND	ND	N/A	Backhans <i>et al.</i> , 2010
" <i>B. muridarum</i> "	Débil	ND	ND	ND	ND	ND	N/A	Backhans <i>et al.</i> , 2010
" <i>B. christiani</i> "	Débil	ND	ND	ND	ND	ND	N/A	Jensen <i>et al.</i> , 2001

Tabla 1: Principales características bioquímicas y fenotípicas de las diferentes especies del género *Brachyspira* y grupos bioquímicos al que pertenecen según Fellstrom & Gunnarson (1995).

¹ Entre paréntesis, reacciones menos frecuentes.

² α -galactosidasa.

³ β -glucosidasa.

⁴ α -glucosidasa.

⁵ Grupos bioquímicos según Fellström *et al.* (1995).

N/A, grupo bioquímico no asignado.

ND, no determinado.

Sin embargo, el sistema de identificación basado en las características fenotípicas presenta importantes limitaciones debido a la existencia de aislados con características bioquímicas atípicas dentro de una misma especie (Hommezz *et al.* 1998; Fossi *et al.* 2004; Card *et al.* 2016; Mahu *et al.* 2016). También la imposibilidad de obtener cultivos puros de estas bacterias en algunas ocasiones complica la identificación fenotípica y hace recomendable que estas pruebas

sean siempre complementadas con otras técnicas de identificación (Rohde *et al.* 2002; La *et al.* 2003; Råsbäck *et al.* 2006; Jansson *et al.* 2008a).

1.3.2 Técnicas moleculares

Debido a las limitaciones mencionadas de las técnicas fenotípicas, se han desarrollado diversos métodos basados en la secuencia del ácido nucleico de las bacterias como son la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante endonucleasas de restricción o REA (Combs *et al.* 1989), el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Rohde *et al.* 2002), la electroforesis en campo pulsado o PFGE (Atyeo *et al.* 1996), técnicas de hibridación con sondas de ADN, la tipificación mediante secuenciación multilocus o MLST (Maiden *et al.* 1998), el análisis del número de repeticiones en tandem o MLVA (Lindstedt 2005; Hidalgo *et al.* 2010a; Neo *et al.* 2013) o el ribotipado, entre otras. Estas técnicas pueden permitir la diferenciación a nivel de especies dentro del género o la caracterización de los aislados dentro de una especie del género.

Entre estas técnicas moleculares, la más utilizada en la diferenciación de especies del género y en el diagnóstico de estas infecciones es, sin lugar a dudas, la PCR. Se basa en la amplificación de fragmentos específicos de especie y sus principales dianas en bacterias del género *Brachyspira* son los genes *nox*, ARNr 23S, ARNr 16S o *tlyA*, aunque han sido amplificados muchos más (Elder *et al.* 1994; Harel & Forget 1995; Park *et al.* 1995; Leser *et al.* 1997; Atyeo *et al.* 1999; Mikosza *et al.* 2001). Cabe mencionar que aunque la secuenciación del gen ARNr 16S es la base de la filogenia bacteriana, por lo general esta diana se ha mostrado insuficiente en la identificación de especies del género *Brachyspira* (Pettersson *et al.* 1996; Stanton *et al.* 1997). Además, esta técnica puede combinarse para identificar varias especies a la vez, realizando PCRs múltiples, disminuyendo costes y tiempo (Phillips *et al.* 2006; Råsbäck *et al.* 2006). También puede emplearse la técnica de PCR a tiempo real para reducir el tiempo necesario para el diagnóstico, permitiendo una mayor sensibilidad que las técnicas de PCR tradicionales así como la cuantificación de las bacterias presentes en una muestra (Song & Hampson 2009a; Willems & Reiner 2010).

Han sido muchas las técnicas desarrolladas utilizando como base la PCR; una de ellas se basa en la amplificación de fragmentos de ADN específicos de género que son, a continuación, digeridos con enzimas de restricción (PCR-RFLP), lo cual provoca la separación de fragmentos de diferentes tamaños y permite obtener un patrón de bandas de ADN específico de especie al realizar la electroforesis de los mismos (Barcellos *et al.* 2000a; Rohde *et al.* 2002; Tae & Jae 2006; Ohya *et al.* 2008). Utilizando el gen *nox*, mediante esta técnica se pueden diferenciar las cinco especies principales del género *Brachyspira* que colonizan el intestino del cerdo (Rohde *et al.* 2002).

Habitualmente estas técnicas basadas en la PCR se combinan, para el diagnóstico de especies del género, con el cultivo en medios selectivos y con la identificación fenotípica de los aislados, aunque también se pueden realizar directamente, a partir de heces, para acortar los tiempos. Sin embargo, la identificación directa de especies del género *Brachyspira* en muestras de heces presenta limitaciones asociadas a la presencia de inhibidores de la PCR en estas muestras (Phillips *et al.* 2006; Råsbäck *et al.* 2006).

Las sondas de ADN permiten la detección de especies del género *Brachyspira* directamente en cortes de tejidos, utilizando técnicas de hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoresceína (FISH). Generalmente, estas sondas hibridan con regiones del gen ARNr 16S o

ARNr 23S. La observación de fluorescencia permite evaluar la morfología y distribución de las bacterias (Jensen *et al.* 2000).

La caracterización por electroforesis de enzimas multilocus o MLEE es un método fenotípico que analiza la variabilidad genética de una población en base a diferencias en la movilidad electroforética de una serie de enzimas bacterianas que son interpretadas como el producto de diferentes alelos de un mismo locus y, por lo tanto, reflejan diferencias genéticas (Lee *et al.* 1993). Esta técnica fue muy usada en los años 90 para la identificación y caracterización de espiroquetas intestinales, particularmente de las nuevas especies actualmente reconocidas dentro del género *Brachyspira* (Stanton *et al.* 1997) así como para el estudio de la estructura poblacional con aislados de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* (Trott *et al.* 1996a; Trott *et al.* 1998). También se ha empleado para la diferenciación de grupos genéticos en espiroquetas débilmente beta-hemolíticas (Stephens *et al.* 2005). Esta técnica ha sido substituida, más recientemente, por el análisis de secuencias multilocus o MLST, una técnica molecular que busca diferencias en la secuencia de los genes que codifican una selección de enzimas bacterianas y que ha sido ampliamente empleada para la identificación y caracterización de aislados del género *Brachyspira* (Råsbäck *et al.* 2007a; La *et al.* 2009a; Phillips *et al.* 2010; Osorio *et al.* 2012; Osorio *et al.* 2013; Mirajkar & Gebhart 2014).

1.3.3 Métodos inmunológicos

Se basan en la utilización de anticuerpos, poli o monoclonales, frente a antígenos de la propia bacteria e incluyen técnicas de microaglutinación, inmunofluorescencia directa o ELISA, entre otras. Aunque algunas de estas técnicas se han empleado en el pasado, la descripción de nuevas especies del género y la presencia de reacciones cruzadas entre ellas da lugar a una especificidad muy baja y complica la interpretación de las técnicas basadas en la identificación inmunológica por lo que no se emplean en la actualidad.

1.3.4 Tipificación

Para la diferenciación de aislados pertenecientes a una misma especie del género *Brachyspira* pueden emplearse técnicas basadas en sus características fenotípicas, principalmente técnicas serológicas que permiten, teóricamente, la clasificación de los aislados en serogrupos y serovariedades utilizando antisueros (Lau & Hampson 1992) o técnicas moleculares.

El serotipado ha sido un método tradicionalmente empleado para la clasificación subespecífica de aislados bacterianos. Antes de ser desplazada por métodos moleculares, se utilizó principalmente para la caracterización de aislados de *B. hyodysenteriae*. Mediante análisis del lipooligosacárido (LOS) extraído de la membrana bacteriana y usando antisueros de conejo frente a células completas de aislados de diferentes áreas geográficas, se describió la existencia de 9 serotipos de *B. hyodysenteriae*, englobando aislados procedentes de Norteamérica y Japón (Adachi *et al.* 1979; Baum & Joens 1979; Li *et al.* 1991). Sin embargo, debido a las numerosas reacciones cruzadas entre aislados se propuso un sistema de tipificación en el que se incluían 5 serogrupos (A-E), que poseían 3 o 4 antígenos comunes de LOS, y varios serovares, los cuales tenían un antígeno específico adicional (Hampson *et al.*, 1989). Finalmente, tras la inclusión de más aislados procedentes de Australia y debido a la complejidad de los LOS, que hace impredecible las reacciones cruzadas entre aislados de *B. hyodysenteriae*, se han descrito un total de 11 serogrupos (A-K) y 9 serotipos (Hampson 1997a).

Recientemente, se han estudiado las relaciones entre aislados europeos mediante inmunoblot del LOS previamente tratado con proteinasa K, procesado que disminuye en gran medida las

reacciones cruzadas inespecíficas. De este modo, se ha podido comprobar que la relación serológica de *B. hyodysenteriae* es muy compleja y que el número de serotipos puede ser muy elevado. Así, los aislados alemanes y españoles parecen responder de manera similar a un panel de antisueros, pero de manera diferente a los aislados daneses. Finalmente, es importante destacar que existen aislados con un mismo perfil de MLST pero que se incluyen en distintos serotipos y viceversa, por lo que el análisis MLST puede no representar adecuadamente el comportamiento serológico de los aislados (Herbst *et al.* 2017).

Cuando se intentó un abordaje similar para la caracterización de aislados de *B. pilosicoli* procedentes de humanos y de cerdos, se comprobó una mayor variabilidad antigénica de esta especie (Lee & Hampson 1999).

Entre las técnicas moleculares empleadas en la tipificación de aislados se encuentran muchas de las mencionadas anteriormente y que se emplean para la identificación de especies del género.

- La técnica de MLEE se ha empleado para diferenciar aislados y para estudiar la estructura de poblaciones de *B. hyodysenteriae* (Tae & Jae 2006) o *B. pilosicoli* (Oxberry & Hampson 2003) así como las relaciones entre aislados de espiroquetas de aves (Stephens *et al.* 2005).
- El análisis de endonucleasas de restricción o REA se basa en la digestión del ADN bacteriano con enzimas de restricción de elevada frecuencia de corte. Es una técnica compleja y difícil de estandarizar e interpretar. Puede combinarse con otras técnicas moleculares como la hibridación de sondas de ADN (Koopman *et al.* 1993; Sotiropoulos *et al.* 1994) y se ha empleado para demostrar diferencias en el genotipo de *B. hyodysenteriae* y *B. innocens* (Combs *et al.* 1989) o para establecer asociaciones entre diferentes aislados de una misma especie. Así, empleando esta técnica se demostró que una cepa de *B. hyodysenteriae* aislada de una rata en una explotación de cerdos era semejante a la que había causado un brote de DP en la misma granja (Hampson *et al.* 1991).
- El estudio del polimorfismo generado al amplificar secuencias aleatorias del ADN o RAPD se basa en la amplificación de regiones del ADN al azar mediante el uso de cebadores inespecíficos en la PCR combinados con bajas temperaturas de anillamiento. La visualización de los múltiples fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa, genera perfiles electroforéticos variables según el polimorfismo de cada aislado (Welsh *et al.* 1995; Fellström *et al.* 2008). Se ha empleado para caracterizar aislados fuertemente hemolíticos procedentes de ánales con un genotipo atípico, diferente al de *B. hyodysenteriae*, y que fueron finalmente propuestos como una nueva especie del género, *B. suanatina* (Råsbäck *et al.* 2007b). También se ha empleado para estudiar las relaciones entre aislados de *B. hyodysenteriae* de diferentes granjas y regiones de España (Hidalgo *et al.* 2010b).
- La electroforesis de campo pulsado o PFGE se basa en el empleo de cambios periódicos en la orientación del campo eléctrico durante la electroforesis permitiendo la separación, en base a su tamaño, de grandes fragmentos de ADN obtenidos mediante la digestión del ADN bacteriano con enzimas de restricción de baja frecuencia. Se ha empleado con éxito para la caracterización de aislados de *B. intermedia* de gallinas ponedoras (Phillips *et al.* 2005) o de aislados de otras espiroquetas intestinales de origen humano y animal (Atyeo *et al.* 1996; Fellstrom *et al.* 2001; Hidalgo *et al.* 2010c) aunque presentó problemas cuando se empleó para la caracterización de aislados de

Brachyspira spp. con hemólisis fuerte (Råsbäck *et al.* 2007a). También ha demostrado utilidad en el estudio del potencial zoonótico de las especies del género, en la investigación de brotes y reinfecciones en animales de la misma o de diferentes granjas, de la persistencia de espiroquetas en el ambiente o de la transmisión entre especies silvestres y domésticas (Phillips *et al.* 2006).

- El análisis de secuencias multilocus o MLST examina las secuencias de genes que codifican determinadas enzimas. Como indicamos anteriormente, es una evolución de la técnica de MLEE que detecta los alelos de los genes que codifican las enzimas, por lo que es más sensible y estandarizable, permitiendo el almacenamiento de la información y la comparación de resultados entre diferentes laboratorios mediante bases de datos públicas como PubMLST. Esta técnica fue adaptada al género *Brachyspira* usando 8 locus correspondientes a los genes de un mismo número de enzimas (Råsbäck *et al.* 2007a). Debido al escaso polimorfismo de uno de estos genes, la técnica que se emplea en la actualidad se basa en 7 genes. Se ha utilizado para analizar las relaciones entre aislados y la estructura poblacional de *B. hyodysenteriae* y de otras espiroquetas del género *Brachyspira* (Osorio *et al.* 2012; Neo *et al.* 2013; Osorio *et al.* 2013; Mirajkar & Gebhart 2014; Mirajkar *et al.* 2015).
- El análisis del número de repeticiones en tandem o MLVA también se perfila como una técnica de utilidad para identificación rápida de relaciones entre cepas de la misma o diferentes especies (Hidalgo *et al.* 2010a; Mapple *et al.* 2014).
- El ribotipado, finalmente, se basa en la caracterización de las regiones del genoma que codifican el ARNr. Permite emplear sondas universales, debido a que se trata de regiones muy conservadas en las distintas especies bacterianas, y genera polimorfismos que pueden permitir discriminar especies o a nivel infraespecífico. Ha sido empleado ocasionalmente para la caracterización de especies del género *Brachyspira* aisladas de perros o cerdos (Harel & Forget 1995; Duhamel *et al.* 1998a).

1.4-Disentería porcina

1.4.1 Historia e importancia de la enfermedad

La DP fue descrita por primera vez en 1921 (Whiting *et al.* 1921). Desde entonces, se han barajado diferentes posibles agentes etiológicos de esta enfermedad, incluyendo a las espiroquetas que se observaban en grandes concentraciones en las heces de animales afectados (Terpstra *et al.* 1968; Vallejo 1969). Sin embargo, la reproducción experimental de la enfermedad tras la administración, por vía oral, de cultivos de estas espiroquetas no fue posible hasta varios años después (Taylor & Alexander 1971).

En la actualidad, la DP es una importante enfermedad infecciosa del cerdo que cursa con una colitis mucohemorrágica en animales de cualquier edad, aunque afecta principalmente a animales en la fase de cebo, entre los 15 y los 70 kg peso. Debido a las enormes pérdidas económicas que provoca en las granjas afectadas, derivadas del aumento de índice de conversión, del retraso del crecimiento, de los costes de medicación y del incremento de la mortalidad, es una de las enfermedades digestivas más relevantes del cerdo (Hampson & McLaren 1997b) y está presente en los principales países productores de carne de cerdo (Hampson *et al.* 2006a).

1.4.2 Agente etiológico

Como hemos mencionado, aunque fueron varios los investigadores que observaron la presencia de espiroquetas en las heces de los cerdos afectados de DP, los primeros desafíos con los cultivos mixtos de estas espiroquetas no permitieron reproducir el cuadro clínico. En los años 40, la DP se asoció con una bacteria denominada *Vibrio coli*, hablándose de disentería vibriónica (Doyle 1944), etiología que se mantuvo durante años, hasta que en 1971 se identificó una espiroqueta como agente etiológico (Taylor & Alexander 1971). Esta espiroqueta recibió, inicialmente, la denominación de *Treponema hyodysenteriae* (Glock & Harris 1972; Harris *et al.* 1972). En 1992, esta bacteria se agrupó en un nuevo género denominado *Serpulina* (Stanton 1992) y, en 1997, tras analizar la secuencia del gen ARNr 16S se clasificó, finalmente, en el género que actualmente la alberga, con el nombre de *Brachyspira hyodysenteriae* (Ochiai *et al.* 1997).

Tradicionalmente la DP se había considerado causada por esta bacteria como único agente etiológico y el diagnóstico rutinario englobaba el cultivo y observación de características fenotípicas de la misma y la confirmación mediante técnicas moleculares, principalmente PCR. Sin embargo, a principios de los años 2000, se aislaron espiroquetas fuertemente hemolíticas de heces de patos en Escandinavia que mostraban características fenotípicas similares a *B. hyodysenteriae* pero que no eran identificadas como tales mediante técnicas moleculares (Jansson *et al.* 2004). Estos aislados, junto con otro aislado “atípico” obtenido de cerdos con diarrea indistinguible de DP en Suecia (Råsbäck *et al.* 2006) y con otros aislados obtenidos de cerdos diarreicos de granjas de Suecia y Dinamarca con posterioridad fueron agrupados como una nueva variante genética del género *Brachyspira* y propuestos como una nueva especie, denominada *Brachyspira suanatina* (Råsbäck *et al.* 2007b; Mushtaq *et al.* 2015). Las características fenotípicas de esta nueva especie son similares a las de *B. hyodysenteriae*, como podemos observar en la tabla 1; sin embargo, la secuenciación de los genes ARNr 16S y *nox* mostró secuencias idénticas para todos los aislados, que eran diferentes de las secuencias de las cepas de referencia de *B. hyodysenteriae*. Mediante RAPD se comprobó que un clon de esta nueva especie se había extendido entre las granjas de cerdos de Suecia. Además, en este mismo estudio se determinó que los aislados de esta nueva variante genética recuperados de aves silvestres eran capaces de colonizar el intestino de cerdos y producir diarrea cuando son inoculados siguiendo un modelo de infección experimental similar al descrito para *B. hyodysenteriae* (Råsbäck *et al.* 2007b). El análisis completo del genoma de *B. suanatina* demostró suficiente variabilidad para proponer esta variante como una nueva especie dentro del género *Brachyspira* (Mushtaq *et al.* 2015). Hasta el momento sólo se han detectado casos de disentería atribuibles a esta nueva especie en el Norte de Europa (Hampson *et al.* 2015).

En 2007 se produjo un incremento del número de casos de DP en los Estados Unidos y en Canadá, en los que no se podía demostrar la participación de *B. hyodysenteriae* mediante técnicas moleculares como la PCR. Los aislados de espiroquetas recuperados de estos casos se caracterizaban por ser fuertemente hemolíticos; fenotípicamente eran muy similares a *B. hyodysenteriae* (ver Tabla1) y fueron propuestos como una nueva especie del género, provisionalmente denominada *Brachyspira hampsonii* (Chander *et al.* 2012). Más adelante se demostró que estos aislados se podían dividir en dos clados y que eran capaces de producir en cerdos una diarrea mucohemorrágica indistinguible de la causada por *B. hyodysenteriae* (Burrough *et al.* 2012; Rubin *et al.* 2013b; Costa *et al.* 2014a). Finalmente, en 2016, estudios más exhaustivos del genoma completo de esta especie permitieron dividir los aislados que existen de esta especie en tres grupos genéticos diferentes. La comparación con el genoma de otras

especies del género permitió concluir que se trata de una especie con entidad propia dentro del género *Brachyspira* (Mirajkar *et al.* 2016a).

La distribución de esta nueva especie es mucho más global que en el caso de *B. suanatina*, habiéndose aislado de aves silvestres en Canadá y España (Martinez-Lobo *et al.* 2013; Rubin *et al.* 2013a) y de cerdos con diarrea en América del Norte (Burrough 2017) y en algunos países europeos como Bélgica y Alemania (Chander *et al.* 2012; Rohde *et al.* 2014). Incluso, se ha identificado como *B. hampsonii* un aislado atípico recuperado de un cerdo en el Reino Unido en los años 80 (Chander *et al.* 2012).

Por el contrario, no se ha detectado la presencia de esta nueva especie en un total de 897 aislados de *Brachyspira* spp. de origen porcino en Suiza (Scherrer *et al.* 2016), ni en explotaciones porcinas australianas (La *et al.* 2016). La transmisión de *B. hampsonii* entre aves acuáticas y cerdos, actuando estas como reservorio de la espiroqueta, y entre cerdos, ha sido propuesta y entra dentro de los objetivos de esta tesis doctoral, como veremos más adelante. Finalmente, en Australia, un aislado atípico, fuertemente hemolítico y distinto de las tres especies descritas actualmente, fue identificado en cerdos con sospecha clínica de DP (Phillips *et al.* 2007). En base a todos estos hallazgos, la etiología de la DP se ha ampliado para incluir no solo a *B. hyodysenteriae* sino también a otras especies de espiroquetas recientemente aceptadas como miembros de este género como son *B. suanatina* o *B. hampsonii*, siendo más correcto indicar que esta enfermedad está causada por espiroquetas fuertemente beta hemolíticas del género *Brachyspira*.

1.4.3 Epidemiología

1.4.3.1. Distribución geográfica

La DP se ha descrito en todos los países con una producción porcina importante (Hampson *et al.* 2006a).

1.4.3.1.1- Europa

- España

En España, entre los años 2000 y 2003, se demostró la presencia de *B. hyodysenteriae* en más del 30 % de las explotaciones que presentaban problemas de diarrea en animales adultos o en fase de cebo y en el 12 % de las muestras de heces analizadas (Carvajal *et al.* 2006). Los resultados más recientes, obtenidos en el diagnóstico rutinario de brotes de diarrea en los que se sospechaba DP, demuestran una situación de endemia, identificándose *B. hyodysenteriae* en el 46,8 % de los brotes investigados en 2011, el 39 % en 2012 (Álvarez *et al.* 2013), el 44,8 % en 2013, el 44,4 % en 2014 y el 35,2 % en 2015 (Álvarez-González *et al.* 2016). Por las peculiaridades del sistema de producción, la enfermedad tiene una incidencia más alta en explotaciones de cerdo ibérico en extensivo, así como en áreas de alta concentración de explotaciones de porcino (Rubio 2016). La incidencia de la DP, por tanto, se mantiene relativamente estable a lo largo del tiempo si bien, existió una tendencia al aumento del número de casos entre 2010 y 2014.

Además, el agente etiológico de la DP en España es *B. hyodysenteriae*. No se han identificado casos de DP en explotaciones porcinas españolas vinculados al aislamiento de *B. hampsonii* o de *B. suanatina* aunque sí se han obtenido aislados de *B. hampsonii* de aves silvestres (Martinez-Lobo *et al.* 2013).

- Reino Unido

Un estudio llevado a cabo en 105 granjas de cerdos de cebo en 1996 describió que el 50,5 % de las granjas reportaba alertas por alguna enfermedad durante ese año y de estas, el 10,5 % fueron diagnosticadas como DP (Pearce 1999). Otra investigación sobre las causas de la colitis en

cerdos, llevada a cabo entre 1992 y 1998, determinó que *B. hyodysenteriae* era el principal agente etiológico, apareciendo como único agente etiológico en el 7 % de las explotaciones investigadas así como en el 3,5 % de los casos en los que se detectaba más de un agente etiológico simultáneamente (Thomson *et al.* 1998)

- Dinamarca

Un estudio llevado a cabo en 79 granjas sin signos de enfermedad entérica, investigadas en 1998, determinó una prevalencia de la infección por *B. hyodysenteriae* del 2,5 % (Stege *et al.* 2001). Este bajo valor se confirmó en un estudio realizado en granjas con cerdos libres de patógenos específicos (Specific Pathogens Free o SPF) de este mismo país (Møller *et al.* 1998) o en estudios similares en otros países nórdicos como Suecia o Finlandia (Fellstrom *et al.* 1996; Heinonen *et al.* 2000). Por el contrario, la prevalencia de la infección en granjas con diarrea fue más elevada, 14 %, similar a la descrita en otros países (Møller *et al.* 1998).

- Alemania

Los datos obtenidos en un estudio realizado entre 2002 y 2003 en este país señalaban a *B. hyodysenteriae*, junto con *Lawsonia intracelullaris*, como los principales agentes etiológicos en brotes de diarrea en explotaciones porcinas, con prevalencias de aislamiento de *B. hyodysenteriae* del 35,8 % en cerdos de cebo. En el caso de animales sanos, no afectados de diarrea, el porcentaje de animales positivos a *B. hyodysenteriae* desciende hasta el 6,7 % (Herbst *et al.* 2004).

Un estudio más reciente, realizado en 2011 en el sur de Alemania y que incluyó 1176 muestras de heces recogidas en 95 granjas afectadas o con antecedentes de diarrea, permitió demostrar la presencia de *B. hyodysenteriae* en un 24,2 % de las explotaciones y en el 8 % de las muestras analizadas. Además, se trató de una infección mixta, incluyendo otros patógenos intestinales, en el 82,6 % de los casos (Reiner *et al.* 2011).

Respecto a las infecciones por otras especies fuertemente hemolíticas del género *Brachyspira*, los datos existentes indican que sus prevalencias son muy bajas. En el caso de *B. suanatina*, se identificaron mediante *nox*-RFLP un total de 3 aislados de esta especie en un total de 7186 muestras positivas a *Brachyspira* spp. y procedentes de cerdas sanas en el año 2014 y un único aislado en 2015. Para *B. hamptonii* se obtuvo una prevalencia del 1,3 % a partir de 585 aislados con características fenotípicas y bioquímicas compatibles con esta especie. Todos estos datos permiten concluir que estas especies tienen un papel menor en la etiología de los casos de DP en Alemania (Rohde *et al.* 2016).

- Hungría

Un trabajo publicado en 2007 demostró una prevalencia de la infección por *B. hyodysenteriae* en granjas de más de 500 madres de este país del 45,2 % (Biksi *et al.* 2007).

- Suecia

En Suecia, a partir del año 2000 se implementó un programa para reducir la incidencia de la DP. En 2004, se estimó que el número de granjas infectadas por *B. hyodysenteriae* era del 4 %, disminuyendo este valor hasta el 1,2 % en 2009 y manteniéndose esta baja prevalencia de la infección en los últimos años, lo que permite pensar en una erradicación de la enfermedad en un futuro cercano (Carlertz *et al.* 2016). Un estudio realizado sobre 1052 muestras de heces de animales entre 8 y 12 semanas de vida, procedentes de 150 explotaciones de porcino y sobre

71 muestras de jabalíes silvestres, para determinar la prevalencia de *Brachyspira* spp., no identificó ningún aislado de *B. hyodysenteriae* entre todos los aislados de *Brachyspira* spp. obtenidos (Jacobson *et al.* 2005).

En el caso de *B. suanatina*, solo se tiene constancia de su presencia en dos granjas de madres y dos granjas de cebo afectadas por procesos diarreicos similares a la DP (Råsbäck *et al.*, 2007b). Todos los estudios posteriores en Suecia o en el resto del mundo no han logrado aislar esta especie en ninguna muestra.

- Noruega

El estudio más reciente, publicado en el año 2000 y basado en el análisis de 1811 muestras de cerdos de cebo procedentes de 93 granjas sin signos de diarrea, determinó una prevalencia de granjas infectadas por *B. hyodysenteriae* del 12,9 %, aunque sólo se aisló esta bacteria del 1,7 % de las muestras analizadas (Flø & Bergsjø 2000).

- Suiza

En un estudio publicado en 2008 se investigaron 105 granjas, 50 con signos clínicos compatibles con la DP y el resto sin diarrea. Se alcanzó un diagnóstico positivo a *B. hyodysenteriae* en el 2,8 % del total de granjas, y la prevalencia por individuo en las granjas diagnosticadas fue del 93,3 % (Speiser *et al.* 2008). Los datos más recientes de este país proporcionan valores de prevalencia de la infección del 2,5 % en 40 granjas de reproductoras analizadas con valores de prevalencia de individuos positivos en granjas positivas del 25 % (Lobert *et al.* 2016).

- Polonia

La prevalencia de *B. hyodysenteriae* obtenida a partir de muestras analizadas entre marzo de 2011 y abril de 2013, procedentes de 70 granjas del país (7 % de ellas afectadas por diarrea en la fase de cebo) fue del 1,4 % (Dors *et al.* 2015). Cabe destacar que esta baja prevalencia de la infección contrasta con los datos obtenidos en un estudio anterior en este mismo país (Pejsak *et al.*, 2007), aunque concuerda con los datos descritos en países del norte de Europa como Suecia, Dinamarca, Finlandia o Noruega.

- República Checa

En la República Checa, se describió una prevalencia de la infección del 27,3 % en un estudio que incluyó 22 granjas con y sin antecedentes de disentería, y 880 muestras de heces de animales con o sin historial o sospecha de DP, entre 1997 y 2006 (Lobova *et al.* 2011).

1.4.3.1.2- América

- Norteamérica

En Norteamérica, desde el inicio de los años 90 y en contra de lo ocurrido en otras partes del mundo, la DP fue disminuyendo su importancia manteniéndose en esta situación hasta finales de la primera década del siglo XXI. Esta situación se atribuyó a varios factores, particularmente a los sistemas de producción en múltiples puntos, mejoras en el manejo y el uso de determinados antibacterianos como promotores del crecimiento.

Sin embargo, a partir de 2008, esta situación se empieza a revertir con el incremento de brotes de DP asociados a la aparición y diseminación de *B. hamptonii* (Chander *et al.* 2012). En el caso de Canadá, se ha descrito que esta nueva especie se aísla con una frecuencia tres veces mayor a la de *B. hyodysenteriae*, habiendo desplazado a esta especie como principal agente etiológico

de DP al menos en la zona oeste del país (Burrough 2013; Harding 2013). Aparte de la aparición de esta nueva especie, entre las causas propuestas como posible explicación a la reemergencia de la DP cabe destacar la prohibición del uso de carbadox en 2001, la presentación cíclica de la enfermedad o la circulación de animales portadores asintomáticos entre granjas (Mirajkar & Gebhart 2014; Hampson *et al.* 2015).

Hasta el momento ningún aislado de *Brachyspira* spp. ha sido identificado como *B. suanatina* en el continente americano.

- América Central y Sudamérica

El número de brotes de DP descritos en el centro y sur del continente americano en los años 80 y 90 se mantuvo muy bajo. Esta misma situación se mantiene en países como Venezuela, Chile o Colombia, en los que existe muy limitada información respecto a las infecciones por espiroquetas intestinales. En Brasil, un estudio realizado sobre 203 muestras de heces recogidas de 17 granjas con historia de DP, entre julio y octubre de 1998, demostró una prevalencia de la infección por *B. hyodysenteriae* del 12,2 % de las explotaciones y 3,8 % del total de muestras analizadas (Barcellos *et al.* 2000b). A partir de 2010, en este mismo país, se describe una reemergencia de la DP mostrando los aislados obtenidos una gran diversidad genética (Guedes *et al.* 2016). Por su parte, en Argentina, un estudio realizado en granjas de la principal zona productora de carne de cerdo del país demostró una prevalencia de la infección por *B. hyodysenteriae* del 8,3 % (Carranza *et al.* 2009).

1.4.3.1.3- Australia

El estudio más reciente realizado en Australia analizó un total de 606 muestras de heces y 497 muestras de mucosa del colon de un total de 97 granjas de cerdos distribuidas por todo el país, entre 2014 y 2016 (La *et al.* 2016). De estas 97 granjas, 24 se consideraban libres de DP, 25 tenían antecedentes de haber sufrido esta enfermedad y el resto de granjas presentaban problemas de diarrea o colitis moderada aunque no se había diagnosticado DP. Se detectaron espiroquetas fuertemente hemolíticas en el 35,1 % de las granjas. *B. hyodysenteriae* fue la única especie identificada, detectándose en el 14,4 % del total de las muestras analizadas. Por el contrario, en ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de alguna de las nuevas especies aceptadas como agentes etiológicos de DP, *B. suanatina* o *B. hampsonii*, ni un aislado fuertemente hemolítico diferente de las anteriores y similar al descrito previamente en el país (Phillips *et al.* 2007). Cabe destacar que se detectó la presencia de *B. hyodysenteriae* en más de la mitad (58,3 %) de las granjas supuestamente libres de DP y en un 33,3 % de las granjas con diarrea o colitis moderada, demostrando la presencia de infección en granjas sin problemas aparentes de disentería o con signos leves o moderados que no son asociados tradicionalmente con esta enfermedad (La *et al.* 2016). Además, los estudios de caracterización molecular empleando la técnica de MLST permitieron demostrar la evolución temporal de los aislados de *B. hyodysenteriae* en este país.

Estos resultados concuerdan con descripciones anteriores que indicaban que a la incidencia de la DP en el país había disminuido mucho en la última década del siglo XX pero que la bacteria estaba presente en explotaciones de tamaño grande y en ausencia de signos clínicos o viéndose estos enmascarados por el uso de antibióticos como promotores del crecimiento, pero sin erradicarla completamente. La evolución de estos aislados, unida a las restricciones de uso de antibióticos, las normas de bienestar animal, la actuación de vectores y reservorios salvajes y otros factores, han podido favorecer la evolución genética de estos aislados y la transmisión de los mismos entre granjas aparentemente sanas (Phillips *et al.* 2009; La *et al.* 2016)

1.4.3.1.4- Asia

- Corea

La primera descripción de DP en Corea se remonta a 1975. La incidencia de esta infección se estimó entre el 17 y el 30 % de las explotaciones en 1986, valores que se mantuvieron, hasta 1994. Determinando una prevalencia de cerdos infectados del 10,6 % Entre marzo de 1999 y diciembre de año 2000 fueron analizadas 462 muestras de 43 granjas del país con antecedentes de diarrea obteniéndose una prevalencia de granjas infectadas del 37,2 % y una prevalencia de muestras positivas del 10,8 % (Suh & Song 2005).

- Rusia

Existen pocos estudios que reflejen la situación del país en relación a la DP. Los datos más recientes indican que es una importante y emergente enfermedad entérica en los nuevos sistemas de producción en este país, con una prevalencia de granjas positivas a *B. hyodysenteriae* (14 granjas analizadas) del 64 % y una prevalencia de muestras positivas (81 muestras de granjas afectadas con diarrea sanguinolenta fueron analizadas) del 31 % (Sperling *et al.* 2013).

1.4.3.2- Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

La transmisión de la enfermedad es horizontal, por la vía fecal-oral, directa o indirecta, mediante ingestión de heces o productos contaminados con heces procedentes de cerdos enfermos o portadores que eliminan la bacteria sin manifestar signos de enfermedad (Alvarez-Ordóñez *et al.* 2013).

Estos cerdos portadores son la principal vía de entrada de la infección en explotaciones libres de la enfermedad, si bien es cierto que otros animales pueden actuar como vectores o incluso reservorios, facilitando la transmisión tanto dentro de una granja como entre diferentes explotaciones. De forma similar también actúan diferentes tipos de vehículos incluyendo alimento, agua o diversos fómites (Alvarez-Ordóñez *et al.* 2013; Burrough 2017).

Las espiroquetas incluidas en el género *Brachyspira*, como hemos visto anteriormente, pueden colonizar un amplio rango de hospedadores. Esto hace que animales salvajes y otras especies domésticas o peridomésticas que entran en contacto con granjas de cerdos puedan desarrollar un papel importante en la epidemiología de la DP. Destacan como reservorios de estas infecciones las aves, en especial las aves acuáticas migratorias como patos, gansos, ocas, etc. (Jansson *et al.* 2009; Jansson *et al.* 2011). Estas aves migratorias son colonizadas por muchas especies del género *Brachyspira*, incluidas las especies de espiroquetas fuertemente hemolíticas que causan la DP. Al contrario de lo descrito en diversos desafíos experimentales realizados en pollos, los patos son colonizados por *B. hyodysenteriae* y por *B. suanatina* pero no muestran signos clínicos de enfermedad (Adachi *et al.* 1985; Sueyoshi & Adachi 1990; Trott *et al.* 1996b; Jansson *et al.* 2009). Algunos estudios han detectado espiroquetas fuertemente hemolíticas en granjas de ñandúes, patos y gansos con problemas de tiflocolitis y con aumento de mortalidad; sin embargo, estos aislados no suelen causar enfermedad cuando se inoculan experimentalmente en estos mismos animales (Sagartz *et al.* 1992; Nemes *et al.* 2006; Glávits *et al.* 2011). De forma general, la colonización intestinal de otras especies animales diferentes al cerdo por espiroquetas fuertemente hemolíticas ha sido descrita en numerosos estudios, si bien es cierto que la patogenicidad de esos aislados suele ser limitada o nula cuando se emplean en desafíos experimentales en esta nueva especie (Jansson *et al.* 2009; Rubin *et al.* 2013a).

La importancia de las aves migratorias como reservorio de espiroquetas radica especialmente en la dispersión que se produce cuando estas aves se mueven entre las áreas de cría y de

invernada, separadas en muchos casos por miles de kilómetros. Durante estas travesías las aves cruzan por importantes áreas de producción de cerdos en diferentes países y, de esta manera, pueden colaborar en la dispersión de espiroquetas intestinales. Esta situación tiene capital importancia en el caso de explotaciones con medidas de bioseguridad escasas o en explotaciones abiertas al exterior como ocurre en el caso de la cría tradicional del cerdo ibérico en las dehesas españolas (Martinez-Lobo *et al.* 2013; Rubin *et al.* 2013a).

Los roedores, ratas y ratones también tienen un papel destacado como vectores biológicos o incluso reservorios de espiroquetas que pueden colonizar el tracto intestinal del cerdo, incluyendo tanto espiroquetas débilmente como fuertemente hemolíticas (Backhans *et al.* 2010). Se ha demostrado mediante RAPD y PFGE que los mismos aislados que provocan brotes de disentería en granjas porcinas, una vez controlada la enfermedad pueden mantenerse en ratas presentes en la explotación, facilitando la reaparición de la enfermedad y traspasando la barrera de especie (Backhans *et al.* 2011). Además, el desarrollo de modelos experimentales para el estudio de la DP en ratones ha demostrado que *B. hyodysenteriae* se elimina durante al menos 21 días tras su inoculación por vía oral en estos animales (Suenaga & Yamazaki 1983) y que, en algunos casos la infección se hace crónica en estos ratones, manteniéndose la eliminación de *B. hyodysenteriae* hasta 70 días tras el desafío experimental (Nibbelink & Wannemuehler 1991).

También entre los vectores biológicos de estas infecciones cabe destacar el papel de los jabalíes y de cerdos salvajes. Algunos trabajos han detectado altas prevalencias de la infección por *B. hyodysenteriae* y por otras espiroquetas intestinales en estos animales así como la posibilidad de transmisión a cerdos de explotaciones con escasas medidas de bioseguridad (Phillips *et al.* 2009).

Varias especies de moscas, escarabajos, cucarachas e incluso mosquitos se han revelado como vectores mecánicos de *B. hyodysenteriae* en granjas afectadas por disentería (Blunt & McOrist 2008). Su posible papel como vectores biológicos es más controvertido puesto que los estudios realizados son escasos y únicamente se han infectado experimentalmente cucarachas que han eliminado la bacteria hasta tres días después de la inoculación (Blunt & McOrist 2009).

Finalmente, se ha sugerido que algunos animales domésticos como los perros también pueden actuar como vectores biológicos (Songer *et al.* 1978). Sin embargo, son muy escasos los estudios que muestran la presencia de espiroquetas fuertemente hemolíticas en las heces o el contenido del colon de perros, siendo más frecuente su colonización por otras especies de espiroquetas (Hidalgo *et al.* 2010).

Además, *B. hyodysenteriae* sobrevive durante largos periodos de tiempo, hasta 2 meses, en ambientes húmedos, como balsas de purines o charcas, favoreciendo la transmisión de la infección (Hampson 1997a).

Tras infectar una granja, el periodo de incubación oscila entre 10 y 14 días, aunque este periodo puede ser muy variable y alargarse hasta las 5 semanas (Jacobson *et al.* 2004). En las granjas que sufren la enfermedad por primera vez se pueden alcanzar morbilidades de hasta el 90 % y la mortalidad puede ascender hasta el 50 % si no se instaura un tratamiento adecuado. Además, en muchas granjas la infección se mantiene en el tiempo, disminuyendo o incluso desapareciendo los signos clínicos pero manteniéndose animales portadores y viéndose afectados los índices productivos (Hampson *et al.* 2006a).

1.4.4 Patogenia

Tras su entrada por vía oral, *B. hyodysenteriae* sobrevive al pH ácido del estómago, atraviesa el intestino delgado y alcanza su órgano diana, el colon. Los signos clínicos y lesiones asociados a la DP son consecuencia de la proliferación de estas espiroquetas en la luz del colon y el ciego en el intestino grueso y de la invasión de las criptas intestinales en este tramo del intestino.

Son varios los factores que afectan a esta proliferación de espiroquetas en el colon, principalmente la dieta y la microbiota intestinal (Meyer *et al.* 1975; Harris *et al.* 1978; Whipp *et al.* 1979; Pluske *et al.* 1996; Pluske *et al.* 1998; Jacobson *et al.* 2004; Hampson *et al.* 2006a). También favorecen la colonización a nivel intestinal, factores de virulencia bacterianos como la actividad quimiotáctica por la mucina (Naresh & Hampson 2010) y la motilidad en medios densos como el moco, asociada a la presencia de flagelos periplasmáticos, con gran relevancia en la virulencia de estas bacterias al favorecer la colonización de este hábitat (Milner & Sellwood 1994; Kennedy *et al.* 1997).

De forma general, los genes pueden agruparse en tres grupos en lo que respecta a su función en la patogénesis y la virulencia de las bacterias (Wassenaar & Gaastra 2001):

- **Verdaderos genes de virulencia:** codifican factores de virulencia o enzimas que actúan sobre esos factores y que ejercen su acción directamente sobre el hospedador durante la infección provocando daños en el mismo y que no aparecen en cepas apatógenas
- **Genes asociados a la virulencia:** codifican factores o enzimas que actúan sobre otros factores que regulan la expresión, activan o son necesarios para la acción de los verdaderos genes de virulencia.
- **Genes relacionados con la virulencia:** codifican factores o enzimas que actúan sobre otros factores que favorecen la colonización del hospedador; así, facilitan la evasión de la respuesta inmune, permiten la supervivencia intracelular o la utilización de factores del hospedador para sobrevivir.

El estudio del genoma completo de la cepa WA1 de *B. hyodysenteriae* ha permitido identificar 314 secuencias que codifican proteínas implicadas en la patogénesis y en la virulencia de esta especie bacteriana (Bellgard *et al.* 2009). Estos genes codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS), factores de adhesión, quimiotaxis y motilidad, degradación de la membrana de las células del hospedador, nutrición, inmunoevasión o inmunosupresión (Casas *et al.* 2016).

Se han descrito 29 genes relacionados con proteínas flagelares en *B. hyodysenteriae*. Estos genes se agrupan en 5 familias (*fla*, *flh*, *flg*, *fli* y *mot*) (Casas *et al.* 2016) y se ha demostrado que las cepas que carecen de los genes implicados en la quimiotaxis y motilidad son avirulentas (Milner & Sellwood 1994).

En lo que respecta a la quimiotaxis, *B. hyodysenteriae* presenta varias proteínas relacionadas con esta actividad, siendo las más importantes en cuanto al grado de expresión en la bacteria las proteínas de aceptación de grupos metilo (McpA, McpB y McpC), la proteína relacionada con la quimiotaxis (CheY), la histidinquinasa (CheA) y la metilesterasa reguladora de la quimiotaxis que actúa sobre grupos glutamato residuales (CheB) (Casas *et al.* 2016).

La colonización profunda de las criptas provoca la producción de más moco en las mismas, favoreciendo la proliferación de espiroquetas hasta alcanzar concentraciones de hasta 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por cm^2 de mucosa intestinal. Además, se produce un cambio marcado en la composición de la microbiota intestinal, que pasa de ser predominantemente Gram positiva en los animales sanos a este nivel, a ser mayoritariamente Gram negativa en los afectados (Whipp *et al.* 1979; Robinson *et al.* 1984; Leser *et al.* 2000).

Las espiroquetas, presentes en gran número en el lumen intestinal, a nivel de las criptas, penetran en las células caliciformes y provocan pérdida de cohesión de los enterocitos, causando necrosis y el desprendimiento de parte del epitelio.

Implicadas en el proceso de adhesión a las células del hospedador encontramos diferentes proteínas de membrana de *B. hyodysenteriae*, incluyéndose en este grupo las denominadas Vsp o proteínas variables de membrana (variable surface proteins), lipoproteínas como BmpB, SmpA y SmpB, y otras proteínas integrales de membrana. Un trabajo reciente indica que estas proteínas de membrana tienen menor importancia en la virulencia pero que pueden actuar como moduladoras de la misma (Casas *et al.* 2016). Algunas de estas proteínas de membrana también han sido propuestas como candidatos para formar parte de vacunas frente a la DP a consecuencia de su capacidad inmunógena (Holden *et al.* 2006). Las Vsp son las más abundantes en la membrana de *B. hyodysenteriae* y han demostrado ser inmunógenas en los cerdos. Están codificadas en 4 genes, *vspD*, *vspE*, *vspF* y *vspH*. Otras proteínas externas de membrana son *smpA* y *SmpB*. Estas dos proteínas se expresan a partir de dos genes, *smpA* y *smpB*, con la particularidad de que cada aislado solo presenta uno de estos dos genes (Casas *et al.* 2016).

Cuando las espiroquetas logran alcanzar la lámina propia y dañan vasos sanguíneos se producen hemorragias. La sangre junto con la gran cantidad de moco producida se elimina en las heces que serán de consistencia más o menos líquida. Si bien esta invasión de la lámina propia favorece el desarrollo de las lesiones, no se considera esencial para la aparición del cuadro clínico o las lesiones de la DP (Glock & Harris 1972; Hampson *et al.* 1997c).

Adicionalmente, la pérdida de cohesión y la necrosis de los enterocitos se ve favorecida por toxinas producidas por *B. hyodysenteriae*, como las hemolisinas que causan citotoxicidad y favorecen la salida de nutrientes de las células dañadas (Mappley *et al.* 2014), los LPS y ciertas proteínas de membrana que favorecen la inflamación por efecto endotóxico (Kinyon & Harris 1979; Kent *et al.* 1989; Ter Huurner *et al.* 1993). Se han identificado 8 genes que codifican hemolisinas en *B. hyodysenteriae* así como 7 hemolisinas diferentes codificadas en los genes *hly* y *tly* de esta bacteria. La presencia de hemólisis beta fuerte en cultivos de *Brachyspira* spp. se relaciona con alta virulencia (Burrough *et al.* 2012).

Otro factor de virulencia de *B. hyodysenteriae*, importante para la colonización del intestino grueso, es la presencia de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) oxidasa, una enzima que protege a la bacteria de la toxicidad del oxígeno, habiéndose demostrado que las mutaciones en el gen que codifica esta enzima dan lugar a mutantes de menor virulencia (Mappley *et al.* 2014). Esta enzima es una de las 10 proteínas presentes en mayor cantidad en el denominado "surfaceoma" y "exoproteoma" de la bacteria, es decir en la superficie o expresadas fuera de la bacteria. Existen otras enzimas que favorecen esta tolerancia al oxígeno como las codificadas en los genes *BatA*, *BatB*, *BatC* o *BatE*, pero se encuentran en concentraciones muy inferiores (Casas *et al.* 2016).

Por último y no menos importante, debido al ambiente en el que desarrolla su acción patógena *B. hyodysenteriae*, las proteínas relacionadas con la captación y el metabolismo del hierro son fundamentales para la supervivencia en el intestino. Se han descrito en *B. hyodysenteriae* hasta 9 lipoproteínas de captación de hierro (iron-binding lipoproteins) así como permeasas y proteínas de captación de adenosin trifosfato (ATP) denominadas Bit (Casas *et al.* 2016).

Adicionalmente, la mayoría de las cepas de *B. hyodysenteriae* poseen un plásmido de 36 Kb que contribuye a aumentar su virulencia (La *et al.* 2011). En este plásmido se encuentra un bloque de genes adyacentes, normalmente compuesto por 4 genes, que codifican diferentes factores de virulencia demostrados en diversas especies bacterianas como son:

-Radical SAM (S-adenosylmetionina): necesario para ciertas enzimas que actúan en rutas metabólicas de biosíntesis de cofactores enzimáticos, metabolitos secundarios, biosíntesis y reparación de ADN y metabolismo general de las bacterias. Su eliminación en diversas bacterias ha atenuado su virulencia (La *et al.* 2014).

-Glicosiltransferasas: catalizan la transferencia de fracciones de azúcares a diferentes sustratos como oligosacáridos, monosacáridos, proteínas y lípidos.

-Epimerasa NAD-dependiente y dTDP-4-dihidrorhamnosa-3,5-epimerasa: participan en la elaboración de LOS.

Este bloque de genes favorece la colonización y desarrollo de la enfermedad, no siendo indispensables para ninguna de las dos acciones pero permitiendo predecir que, los aislados que no presentan alguno o todos estos genes, tendrán un potencial patogénico más limitado en comparación con los que los presenten (La *et al.* 2011; La *et al.* 2014).

Todo este conjunto de interacciones entre el agente etiológico y el hospedador conducen hacia el desarrollo de una colitis mucohemorrágica, malabsorción y pérdida de fluidos por fallo en el transporte intestinal activo de cloro y sodio desde la luz intestinal a la sangre. Esto provoca en los animales un deterioro grave por deshidratación progresiva e incluso la muerte (Schmall *et al.* 1983).

Recientemente, se ha propuesto un posible mecanismo patogénico adicional asociado a la alteración de la transmisión nerviosa en el intestino que provocaría alteraciones en la motilidad intestinal asociadas a las infecciones por espiroquetas (Sato *et al.* 2010).

Los limitados estudios realizados en infecciones experimentales con *B. hamptonii* (Rubin *et al.* 2013b; Costa *et al.* 2014a) o *B. suanatina* (Råsbäck *et al.* 2007b) no muestran diferencias relevantes en la patogenia de la infección en relación a la de *B. hyodysenteriae*.

1.4.5 Cuadro clínico

Los cerdos afectados de DP presentan una diarrea mucohemorrágica característica, con heces de consistencia disminuida y de color amarillento-grisáceo en los primeros momentos de la enfermedad. A medida que progresa, las heces pasan a presentar moco, fibrina y estrías de sangre sin digerir y son cada vez más acuosas y de color más oscuro, manteniendo sucio el perineo de los animales constantemente.



Figura 7: Perineo sucio por una diarrea mucohemorrágica en un cerdo muerto por DP.

Los animales tienen anorexia parcial, adelgazan y presentan los flancos hundidos y la espalda arqueada (Fig. 8). La temperatura rectal puede aumentar hasta 40-40,5° C. A medida que el proceso evoluciona y empeora el estado de los animales, estos se muestran sedientos, aparece incoordinación, emaciación y debilidad muy marcada que puede desembocar en la muerte por diversas causas como deshidratación, acidosis o hiperpotasemia (Hampson *et al.* 1997c; Hampson *et al.* 2006a).

Además, los animales que se recuperan presentan ganancias medias diarias de peso e índices de conversión inferiores a los de los animales sanos.

El periodo de incubación de la enfermedad puede variar entre 2 días y 3 meses, apareciendo los primeros signos clínicos normalmente a los 10-14 días postinfección.

En cuadros hiperagudos de la enfermedad los animales afectados pueden morir en escasas horas desde el inicio de los primeros signos clínicos.

En brotes de disentería tradicionales, cuando la bacteria coloniza una explotación anteriormente negativa, la mortalidad puede alcanzar el 30 % y la morbilidad el 90 % entre los cerdos destetados si no se instaura con rapidez un tratamiento adecuado. Incluso, en algunas infecciones experimentales y en ausencia de tratamiento se ha observado hasta un 50 % de mortalidad (Hampson *et al.* 1997c).

Por su parte, en las granjas con una situación endémica de la infección, los signos clínicos pueden aparecer de manera cíclica, cada 3-4 semanas y coincidiendo con la retirada de la medicación en agua o pienso. En algún caso, en estas infecciones crónicas puede que no se observen signos clínicos aunque sí se puede aislar la bacteria en muestras de animales aparentemente sanos (Duff *et al.* 2014; Burrough 2017).



Figura 8: Desigualdad en cebo dentro de un lote de animales afectados de DP. Los animales muestran los flancos hundidos y lomo arqueado.

Experimentalmente, se ha comprobado que la aparición de la enfermedad y la gravedad de los signos clínicos dependen de factores como el estrés al que se someten los animales, la cantidad de bacterias del inóculo utilizado y la fase de crecimiento del mismo en el momento de la inoculación, la dieta, la edad de los animales y su peso (Jacobson *et al.* 2004).

En el caso de las infecciones experimentales con otras especies del género *Brachyspira* fuertemente hemolíticas, los signos clínicos son indistinguibles de los de las formas clásicas de la enfermedad asociadas a *B. hyodysenteriae* (Råsbäck *et al.* 2007b; Rubin *et al.* 2013b; Costa *et al.* 2014a). Algunos autores indican que la enfermedad es más leve en estos casos, especialmente si se compara con infecciones por cepas particularmente virulentas de *B. hyodysenteriae* (Burrough 2017). Particularmente, cuando se emplean como inóculos aislados procedentes de otras especies diferentes al cerdo, fundamentalmente aislados de origen aviar, se ha descrito la necesidad de favorecer la infección mediante actuaciones que causen estrés, variaciones en la dieta, en las condiciones ambientales o en la dosis inoculada, para lograr la reproducción experimental de la infección (Jacobson *et al.* 2004; Jansson *et al.* 2009; Rubin, *et al.* 2013a)

1.4.6 Lesiones

Las lesiones de DP se circunscriben al intestino grueso. En la necropsia de animales muertos en presentaciones agudas de esta enfermedad se observa, macroscópicamente, la presencia de colitis y tiflitis, siendo características la inflamación catarral y la necrosis de la superficie del epitelio del ciego y el colon (Hampson *et al.* 1997c)(Fig. 9, 10 y 11). También son frecuentes en los casos agudos de DP, la hiperemia y el edema en las paredes del intestino grueso, en el

mesenterio y en los ganglios linfáticos regionales más próximos a la zona afectada. El contenido del intestino grueso tiene una consistencia blanda o incluso acuosa, con una coloración variable, desde amarillenta a color cemento o incluso negruzco, y con trazas tanto de fibrina como de sangre fresca y moco, en mayor o menor cantidad. La evolución del proceso hacia formas crónicas hace que la superficie del epitelio adquiera un aspecto granular, con membranas diftéricas fibrinonecróticas, formando estrías, a consecuencia de la necrosis de la mucosa intestinal (Hughes *et al.* 1977; Harris *et al.* 1999).

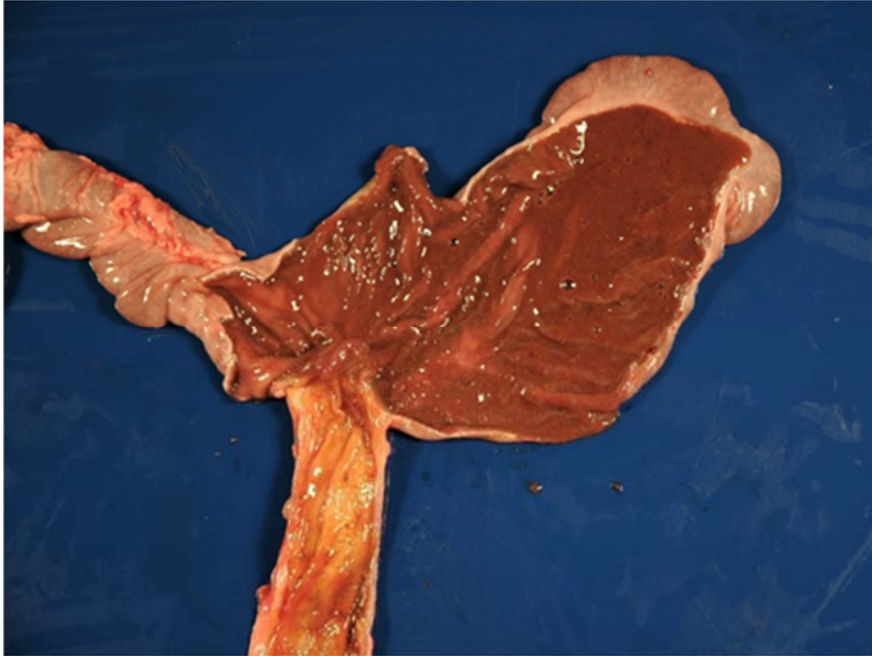


Figura 9: Presencia de contenido líquido, muy fluido y con sangre en el ciego y ausencia de alteraciones macroscópicas en el tramo final de íleon en un cerdo infectado experimentalmente con *B. hyodysenteriae*.



Figura 10: Colitis catarral con engrosamiento, coloración oscura y edema de la mucosa intestinal evidente en un tramo del colon (derecha en la imagen) en un cerdo infectado experimentalmente con *B. hyodysenteriae*.



Figura 11: Colitis fibrinohemorrágica y contenido sanguinolento con flóculos de fibrina en un cerdo infectado experimentalmente con *B. hyodysenteriae*.

Microscópicamente, los hallazgos más relevantes en las presentaciones agudas se localizan en el ciego, colon y recto e incluyen congestión vascular que produce engrosamiento de la mucosa y la submucosa (Fig. 12). Se produce una hiperplasia asociada al aumento en el número de células caliciformes, originando columnas de moco bastante gruesas, y un incremento del número de leucocitos en la lámina propia y de neutrófilos alrededor de los capilares sanguíneos más próximos a la luz intestinal y alrededor de estos. Las lesiones en los vasos sanguíneos subyacentes a la lámina propia provocan la aparición de hemorragias en esta zona y en la luz del colon.

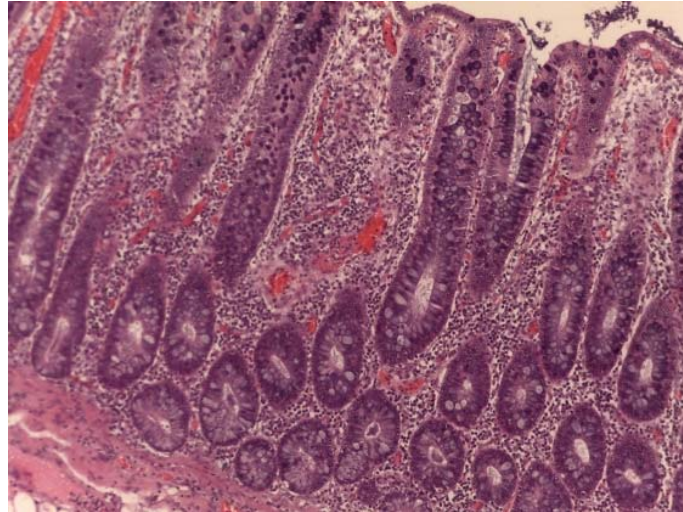


Figura 12: Engrosamiento de la mucosa del colon con un infiltrado inflamatorio que ocasiona una disminución aparente en la densidad de criptas intestinales. Ligeramente congestión y algunas hemorragias en la lámina propia de la mucosa. Cerdo infectado experimentalmente con un aislado de *B. hamptonii*. (tinción hematoxilina-eosina x100).

Las lesiones en la ultraestructura de las células intestinales del colon incluyen el acortamiento de las microvellosidades y lesiones en algunos orgánulos celulares; así, en algunas células se ve reducido su número o las mitocondrias adquieren un aspecto hinchado (Burrough 2017).

A medida que la enfermedad evoluciona hacia una presentación crónica se pueden observar acúmulos de fibrina, mucus y restos celulares en las criptas y en la luz del intestino grueso (Albassam *et al.* 1985; Hampson *et al.* 1997c).

Tanto en los casos agudos como en las presentaciones crónicas se pueden observar espiroquetas en la superficie intestinal y en las criptas (Fig. 13), siendo particularmente abundantes en las formas más agudas o hiperagudas de la DP (Hughes *et al.* 1977; Kinyon & Harris 1979).

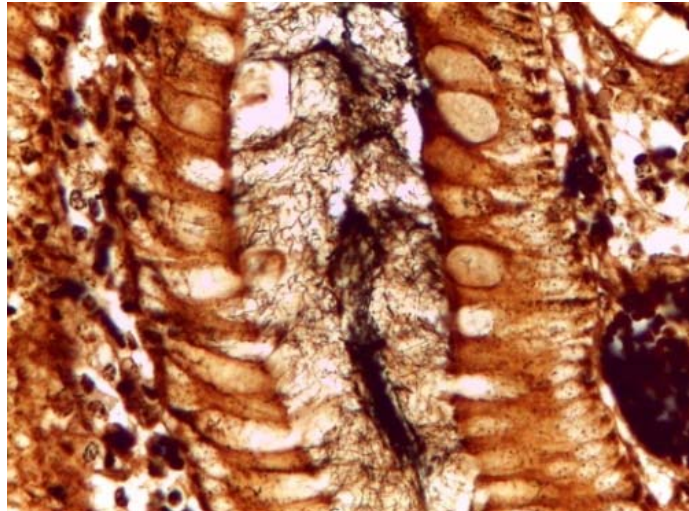


Figura 13: Abundantes espiroquetas en la luz de las criptas intestinales en un corte histológico de colon de un cerdo infectado experimentalmente con *B. hamptonii*. (tinción de Warthin-Starry x630)

Las lesiones observadas en infecciones naturales o experimentales causadas por aislados de otras espiroquetas fuertemente hemolíticas diferentes a *B. hyodysenteriae* son similares a las observadas en cerdos afectados por DP clásica (Råsbäck *et al.* 2007b; Rubin *et al.* 2013b).

1.4.7 Diagnóstico

Los diagnósticos epidemiológico, clínico y lesional de la DP son presuntivos. La edad de los cerdos afectados, la presencia de sangre y/o mucus en las heces y la existencia de lesiones restringidas al intestino grueso permiten establecer una sospecha diagnóstica, pero es necesario llevar a cabo un diagnóstico diferencial con otras enfermedades entéricas porcinas como las formas aguda de la enteritis proliferativa, causada por *Lawsonia intracellularis*, la espiroquetosis intestinal porcina, causada por *B. pilosicoli*, infecciones por bacterias del género *Salmonella* o parasitosis, como la causada por *Trichuris suis* (Hampson *et al.* 1997c).

Además, el diagnóstico se complica por la existencia frecuente de infecciones mixtas en las que el agente etiológico de la DP se asocia a otros patógenos entéricos, dando lugar a cuadros clínicos y lesionales más difíciles de distinguir.

El diagnóstico etiológico requiere de la identificación de las espiroquetas causales en muestras de heces, de contenido intestinal o de raspados de mucosa del intestino grueso. Teniendo en cuenta que existen diferentes especies de espiroquetas que infectan el intestino grueso del cerdo, incluyendo tanto especies patógenas causantes de DP, como patógenas causantes de otras enfermedades o comensales, es necesario llevar a cabo pruebas de identificación. El cultivo en medios selectivos, seguido de pruebas fenotípicas y, particularmente, de pruebas moleculares, permite determinar la especie implicada en la infección. Como mencionamos anteriormente, también se pueden emplear técnicas moleculares de detección directa sobre

muestras de heces o contenido intestinal, aunque por lo general se asocian a una menor sensibilidad. Habitualmente las espiroquetas comensales se encuentran en el intestino grueso en concentraciones que oscilan entre 10^2 y 10^4 UFC/gr de heces mientras que en casos de DP, las concentraciones son significativamente más elevadas, del orden de 10^7 - 10^9 UFC/gr de heces. Estudios experimentales han demostrado que los animales que presentan signos clínicos de disentería, tanto causada por *B. hyodysenteriae* como por *B. hampsonii*, tienen concentraciones de estas bacterias de, al menos, 10^5 UFC/gr de heces (Kinyon & Harris 1979; Wilcock & Olander 1983; Neef *et al.* 1994; Råsbäck *et al.* 2006; Rubin *et al.* 2013b).

La aparición de *B. hampsonii* y *B. suanatina*, nuevas especies del género *Brachyspira* con características fenotípicas muy similares a las de *B. hyodysenteriae* y que también causan DP, ha complicado el diagnóstico de esta enfermedad incluso cuando se emplean técnicas moleculares, a consecuencia de resultados falsos positivos y falsos negativos (Calderaro *et al.* 2006; Mahu *et al.* 2014). Además, existen aislados de *B. hyodysenteriae* con características fenotípicas atípicas cuya identificación plantea retos adicionales a este complejo diagnóstico etiológico. Así, se han descrito aislados indol negativos (Fellström *et al.* 1999; Hidalgo *et al.* 2009) o aislados débilmente hemolíticos, incluso en presencia de los genes que codifican las hemolisinas (Mahu *et al.* 2016). Todo ello hace que, en ocasiones, sea necesario realizar un diagnóstico que combine diferentes técnicas: caracterización fenotípica, técnicas moleculares e incluso la secuenciación de uno o más fragmentos de ADN amplificados para alcanzar el diagnóstico etiológico exacto.

Por otra parte, el diagnóstico indirecto de esta enfermedad se enfrenta a diferentes retos que han limitado su desarrollo. La detección de anticuerpos específicos mediante un ELISA indirecto basado en un antígeno completo de *B. hyodysenteriae* da lugar a una elevada proporción de falsos positivos debido a que esta bacteria comparte antígenos con otras bacterias intestinales que interfieren en la prueba, incluidas otras especies del género *Brachyspira*. Por el contrario, el uso de LPS de la pared bacteriana para el tapizado de las placas permite reducir este problema pero se asocia a un elevado número de falsos negativos a consecuencia de la especificidad de serogrupo de la respuesta de anticuerpos inducida por la bacteria. Todo ello ha dificultado la puesta a punto de una herramienta de diagnóstico serológico universal (La & Hampson 2001).

El empleo de una proteína recombinante de la membrana externa de *B. hyodysenteriae* (Bhlp29.7) como antígeno, permitió reducir el número de falsos negativos pero, aunque disminuyeron los falsos positivos en comparación con las técnicas que empleaban antígeno completo, el número de falsos positivos se mantuvo elevado a consecuencia de reacciones cruzadas con proteínas de otras bacterias Gram negativas con las que comparte epítomos. También existían reacciones cruzadas con anticuerpos dirigidos frente a *B. innocens*, un comensal relativamente frecuente en el intestino de cerdos sanos (La *et al.* 2009b). El uso de la proteína Bhlp29.7 recombinante permite la producción de un antígeno para el ELISA mucho más estandarizado que el antígeno completo de *B. hyodysenteriae* y, presumiblemente, esto se supone que reduce las posibles reacciones cruzadas, pero aparecieron otros problemas con el uso de esta proteína. El primero fue la identificación del gen que codifica Bhlp29.7 en cepas de *B. innocens* hecho que explica las reacciones cruzadas antes mencionadas y previamente descritas con esta especie del género *Brachyspira* (La *et al.* 2005). Más tarde se demostró la presencia de aislados de *B. hyodysenteriae* en Alemania que no expresaban este gen (Barth *et al.* 2009). Estos problemas no impiden que, tanto el uso de antígeno completo como de la proteína de membrana evaluada como antígenos en ELISAs, puedan ser útiles a nivel de granja para detectar anticuerpos frente a *B. hyodysenteriae*.

En lo que respecta al tipo de muestra, se ha comprobado que tanto el suero como el jugo de carne obtenido en el matadero son de utilidad para la detección de anticuerpos específicos en estos ELISAs (Song *et al.* 2012).

La obtención del genoma de la cepa WA1 de *B. hyodysenteriae* permitió avanzar en el diseño de técnicas serológicas basadas en el empleo de proteínas recombinantes. La comparación de los resultados proporcionados por diferentes técnicas ELISA basadas en estas proteínas permitió identificar una proteína que proporcionaba valores de sensibilidad superiores al 90 % con una especificidad del 100 %. Esto proporcionaba resultados muy satisfactorios para la detección de la enfermedad, con un 95 % de confianza, analizando 50 sueros de animales elegidos al azar de una explotación (Song *et al.* 2015).

Sin embargo y, a pesar de todos estos avances, en la actualidad no existe ninguna herramienta comercial en el mercado para el diagnóstico indirecto de la DP.

1.4.8 Tratamiento y control

Ante la aparición de un brote de disentería en una granja, las medidas a llevar a cabo para el control de la enfermedad pasan por la utilización de agentes antimicrobianos, la limpieza y desinfección a fondo de las instalaciones y el control de vectores como roedores o aves.

La aparición de resistencias, las limitaciones legales en su uso, la escasa disponibilidad a nivel del intestino grueso de algunas moléculas o, simplemente, las altas concentraciones necesarias para inhibir a *B. hyodysenteriae* hacen que el número de antimicrobianos disponibles para el control de la DP sea muy reducido en la actualidad. Durante los últimos años, con este fin se están empleando:

- Pleuromutilinas: tiamulina y valnemulina.
- Lincosamidas: lincomicina y clindamicina.
- Macrólidos: tilosina y tilvalosina.
- Tetraciclinas: oxitetraciclina y doxiciclina.

En los brotes agudos se recomienda la aplicación parenteral, durante al menos 3 días, de estos antibióticos a los animales más afectados. En caso de administrarlos en agua de bebida, se recomiendan tratamientos con una duración mínima de 10 días. Por su parte, la administración en pienso no se recomienda ya que, a consecuencia de la anorexia, los animales más afectados difícilmente van a ingerir dosis adecuadas, asociándose esta vía de administración con una elevada proporción de fracasos terapéuticos. En cualquier caso, al completar el tratamiento inicial del brote, y cuando la enfermedad ha empezado a remitir, es recomendable mantener una adecuada medicación en el pienso, durante 2-4 semanas a dosis menores, para controlar posibles reinfecciones.

Se debe garantizar el acceso al agua de los animales en todo momento y, adicionalmente, se pueden incorporar electrolitos a este agua de bebida para minimizar el efecto de deshidratación en los más afectados.

Para la elección adecuada del antimicrobiano es necesario llevar a cabo un diagnóstico etiológico completo, aislar el agente etiológico implicado y realizar un antibiograma para conocer las concentraciones mínimas que inhiben su crecimiento.

Las pleuromutilinas son los antibióticos más utilizados con este fin aunque la aparición de aislados con resistencias frente a la tiamulina y valnemulina hace que, si existe la posibilidad de usar otro grupo de antibióticos, este último debe ser elegido en primer lugar (Karlsson *et al.* 2004; Rugna *et al.* 2015). La resistencia a lincomicina también ha aumentado y es generalizada, entre aislados de *B. hyodysenteriae*, la resistencia a la tilosina. (Clothier *et al.* 2011; Álvarez-Gonzalez *et al.* 2016) o incluso, la presencia de aislados multirresistentes (Hampson *et al.* 2006a; Duinhof *et al.* 2008). Basándose en todos estos datos, el 31 de junio de 2014, la Comisión Europea modificó las indicaciones de la tilosina, excluyendo de las mismas el

tratamiento de la DP. Además, algunos de los antimicrobianos con actividad frente a *B. hyodysenteriae* han sido retirados del mercado por diversas causas. En algún caso se ha demostrado que tenían potencial mutagénico y carcinogénico como en el caso de los nitroimidazoles (CEE Nº 2377/90) mientras que otros productos como el carbadox y el olaquinox (CE Nº2788/98) han sido retirados por sus potenciales efectos adversos para la salud. Este hecho se ha relacionado con la reemergencia de la DP en Europa hace años o más recientemente en los Estados Unidos.

Como hemos mencionado, son necesarias unas buenas prácticas de manejo que permitan disminuir la contaminación en el ambiente de las explotaciones afectadas y, con ello, la reinfección de animales. El manejo todo dentro-todo fuera estricto, en aquellas fases en que sea posible y siempre tras finalizar la medicación de lotes de animales afectados y la aplicación de protocolos de limpieza y desinfección exhaustivos en las instalaciones, son fundamentales. Igualmente la adecuada limpieza y desinfección de útiles y ropa usados en granjas afectadas, el uso de pediluvios para vehículos y baños desinfectantes para el calzado son también medidas fundamentales en el control de la enfermedad.

Evitar o reducir las situaciones de stress para los animales asociadas al transporte, a manejos sanitarios, cambios de dieta, etc., puede contribuir a disminuir los daños asociados a la DP en granjas afectadas.

Finalmente, se debe prestar especial atención al control de vectores, especialmente roedores y aves, que pueden favorecer la entrada o el mantenimiento de esta infección en una explotación. Así, es necesario prestar atención y potenciar los programas de control de roedores y plagas y aplicar medidas básicas de bioseguridad que minimicen el riesgo de contacto con otras especies animales.

En el momento actual no existen vacunas comerciales frente a la DP. Hace años se comercializó durante un breve periodo de tiempo una bacterina que incluía dos aislados diferentes de *B. hyodysenteriae*. Aunque los estudios realizados indicaban que confería un cierto grado de protección y minimizaba el cuadro clínico (Diego *et al.* 1995), esta vacuna fue retirada del mercado por la casa comercial que la fabricaba, sin que desde entonces, haya existido ninguna otra propuesta comercial para este fin. Teniendo en cuenta que la especificidad de serogrupo de la respuesta inmunitaria que desarrollan los cerdos infectados es una de las principales limitaciones en el desarrollo de estas vacunas (Hampson *et al.* 2006a), recientemente se ha introducido el uso de autovacunas para el control de la DP. Algunos estudios han demostrado que el uso de autovacunas aplicadas tres veces, en intervalos de 3-5 semanas, en granjas porcinas con DP reduce la cantidad de antibióticos necesaria para tratar la enfermedad, disminuye el número de heces positivas y reduce también los signos clínicos de la enfermedad y las tasas de mortalidad en la explotación. Todo esto hace que las autovacunas inactivadas sean un complemento muy interesante en la terapia y control de granjas afectadas por DP (Hidalgo *et al.* 2008).

La utilización de proteínas flagelares como antígenos vacunales no previene la colonización de los cerdos (Gabe *et al.* 1995) pero la utilización de la lipoproteína recombinante Bhlp29.7 demostró un 50 % de reducción en la incidencia de la enfermedad. Datos muy similares se han obtenido con otras proteínas recombinantes (La *et al.* 2004; Song *et al.* 2009a). De acuerdo a algunos autores, el futuro de la vacunación frente a la DP pasa por la utilización de varios factores de virulencia de la bacteria combinados y por la estimulación de la inmunidad local a nivel intestinal (Haesebrouck *et al.* 2004). Por el contrario, otros autores proponen el uso de bacterinas que combinen los aislados más relevantes de una región.

1.4.8.1- Influencia de la dieta en el control de la DP

La dieta de los animales se encuentra entre los factores más importantes que pueden influir en la colonización de las espiroquetas y en la aparición de los signos clínicos de DP. En particular, determinadas composiciones así como los cambios rápidos de dieta se han asociado con un aumento en la incidencia de la enfermedad. Se ha propuesto que este efecto podría estar relacionado, principalmente, con la digestibilidad de los componentes de los piensos que a su vez puede tener un efecto sobre la composición y el equilibrio de la microbiota del intestino grueso (Huisman *et al.* 1992), así como en la secreción de factores de quimiotaxis para *B. hyodysenteriae*.

La composición de la microbiota en el intestino grueso es relevante en el desarrollo de la enfermedad porque *B. hyodysenteriae* ejerce su acción patógena junto con otras bacterias anaeróbicas para inducir inflamación y necrosis en la superficie epitelial del ciego y del colon (Hampson *et al.* 2006a). Además, se ha demostrado que los cambios en la microbiota del colon pueden favorecer o inhibir la colonización por *B. hyodysenteriae*. Dicha inhibición puede ser directa, actuando frente a la propia *B. hyodysenteriae*, o indirecta, mediante la inhibición de cualquiera de las bacterias sinérgicas que facilitan la colonización por la espiroqueta (Whipp *et al.* 1979). Desde el punto de vista clínico, estos efectos sobre la colonización se pueden traducir en una disentería de carácter grave o bien en una prevención completa de la enfermedad o al menos, en una disminución de los signos clínicos asociados a la misma. Sin embargo, es importante mencionar que los mecanismos precisos por los cuales la composición de la dieta predispone o protege contra la DP son todavía desconocidos.

En primer lugar, la adición de harina de soja a la dieta del cerdo parece ser un factor muy importante en la aparición de la enfermedad, ya que, los cerdos alimentados tras el desafío experimental con grandes cantidades de soja mostraron signos clínicos de disentería (Jacobson *et al.* 2004). En coincidencia con esta observación, se ha demostrado que la adición de un alto porcentaje de harina de soja a la formulación se asocia con diarreas tanto de intestino delgado (Dreau *et al.* 1995) como de intestino grueso (Neef *et al.* 1994). Aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto de la soja en la aparición de DP, el aumento en la relación proteína:carbohidrato en el intestino grueso puede jugar un papel a través de alteraciones en la microbiota del colon.

Por el contrario, se ha sugerido que las dietas altamente digeribles que reducen la actividad fermentativa en el intestino grueso pueden contribuir a inhibir la colonización por *B. hyodysenteriae* y, consecuentemente, a prevenir la aparición del cuadro clínico de la DP. Así, se ha propuesto que la protección de cerdos alimentados con dietas altamente digeribles es consecuencia de una menor fermentación en el intestino grueso en comparación con los cerdos que reciben dietas convencionales (Siba *et al.* 1996). Sin embargo, este efecto protector mediante la alimentación de cerdos con dietas altamente digeribles no siempre se ha podido reproducir experimentalmente (Durmic *et al.* 2000; Lindecrona *et al.* 2004).

Por otra parte, el empleo de dietas suplementadas con carbohidratos altamente fermentables (Thomsen *et al.* 2007), que producen el efecto opuesto a las dietas altamente digeribles en el intestino grueso, también se asoció a una disminución significativa de los signos clínicos de DP. No obstante, la formulación antes mencionada se basó en raíces de achicoria deshidratadas y en altramuces dulces, hecho que ha permitido especular con la posibilidad de que el efecto protector se debiera a la presencia de inulina en las raíces de achicoria (Hansen *et al.* 2010). La fermentación de la inulina por la microbiota da como resultado la producción de ácidos grasos volátiles y gases (Roberfroid 1998) y causa una disminución de los valores de pH en el lumen del ciego y el colon que podría prevenir la colonización por *B. hyodysenteriae* (Hansen *et al.* 2011). Un mecanismo de acción alternativo sería la regulación de la actividad metabólica por la

suplementación con inulina, disminuyendo la relación proteína:carbohidrato en el intestino grueso y, en consecuencia, la fermentación proteica en dicha localización. Este hecho provoca un aumento de bacterias lácticas y de bacterias productoras de butirato (Cummings & Englyst 1991; Hansen *et al.* 2011) y una reducción en las bacterias proteolíticas, pudiendo ser estas últimas sinérgicas a *B. hyodysenteriae* en la patogénesis de la disentería.

Como se ha comentado anteriormente, existen componentes de la dieta como la fibra insoluble que aumentan la excreción de fucosa, galactosa y mucinas (Montagne *et al.* 2004). Estos compuestos ejercen quimiotaxis sobre *B. hyodysenteriae* (Kennedy *et al.*, 1997) por lo que un aumento en la producción de moco podría predisponer a la colonización por *Brachyspira* spp. En este sentido, la inclusión de un 30 % de destilados de grano deshidratados, subproductos de la producción de etanol, que aumentan la producción de mucinas en el intestino grueso aceleró tanto el comienzo de la excreción, como el comienzo de la enfermedad asociada a la infección por *B. hyodysenteriae* y por *B. hamptonii* (Wilberts *et al.* 2014).

En conjunto, todos estos resultados indican que la reproducibilidad del efecto de protección contra la DP asociado a diferentes dietas es baja, apuntando hacia un efecto complejo en el que la formulación de la dieta, incluyendo las materias primas utilizadas y su proporción, la composición microbiana y otros factores aún no revelados juegan un papel fundamental en el resultado final de la infección. Sin embargo, todos estos datos también sugieren que el control de la DP puede lograrse mediante la manipulación de ingredientes dietéticos o mediante el uso de aditivos dietéticos específicos. En este sentido, Siba *et al.* (1996) demostraron que los cerdos alimentados con una dieta altamente digerible basada en arroz blanco cocido y proteína animal estaban totalmente protegidos contra la enfermedad, mientras que los cerdos alimentados con dietas con altramuces y/o trigo presentaban signos clínicos de DP. Resultados similares se han obtenido con otras dietas con bajo contenido en polisacáridos no amiláceos solubles y almidón resistente (Pluske *et al.* 1998; Durmic *et al.* 2002), apoyando la idea de que la digestión microbiana de carbohidratos fermentables en el intestino grueso facilita la aparición de la DP. De forma paralela, se ha demostrado que la protección contra la enfermedad se logra mediante la suplementación con carbohidratos altamente fermentables (dietas prebióticas) (Thomsen *et al.* 2007). Los prebióticos son componentes alimenticios no digeribles que alcanzan el colon en estado intacto y que son metabolizados y/o fermentados por microorganismos beneficiosos de la microbiota residente (Gibson & Roberfroid 1995). La fermentación selectiva por estos microorganismos tiene como consecuencia una composición más saludable de la microbiota intestinal y una menor receptividad a las infecciones gastrointestinales. En este sentido, una alta concentración de inulina en la dieta, cuyos posibles mecanismos de acción se han mencionado anteriormente, reduce la incidencia de la enfermedad en cerdos experimentalmente desafiados con *B. hyodysenteriae* (Hansen *et al.* 2011). Sin embargo, la reducción del riesgo de desarrollar DP sólo se logró mediante una dieta suplementada con altos niveles de inulina (80 g/kg) pero no con niveles más bajos, por lo que no parece que esta sea una opción económicamente viable a nivel comercial. Por último, otro aditivo dietético que podría influir en la disminución de la gravedad de la DP, a través de la inmunomodulación y de la reducción de la inflamación colónica, es el ácido linoléico conjugado (Hontecillas *et al.* 2002).

En resumen, aunque la inclusión de materias primas teóricamente protectoras en la dieta podría ser demasiado costosa para ser implementada de forma rutinaria en las formulaciones de dieta de cerdos, la modificación de la dieta debe considerarse de forma adicional en cualquier estrategia eficaz de control de la enfermedad

1.4.9 Resistencias antibióticas en *Brachyspira* spp.

Como hemos mencionado, uno de los principales problemas que entraña el tratamiento de la DP en la actualidad es la emergencia de resistencias frente a algunos de los antimicrobianos empleados para el control de esta enfermedad.

Los mecanismos utilizados por las bacterias para eludir la acción de los antibióticos son muy variados aunque, en general, obedecen a una de estas acciones: modificación del antibiótico, alteración de su lugar de acción o dificultad para alcanzar su diana terapéutica, bien sea por una escasa permeabilidad del antibiótico o por una expulsión activa del mismo una vez incorporado en la bacteria.

En el caso de *B. hyodysenteriae*, el descenso en la sensibilidad antibiótica se ha relacionado con alteraciones en el lugar de acción de los antibióticos, generalmente un operon en el ARNr (Zuerner & Stanton 1994); mutaciones puntuales en el mismo pueden favorecer la resistencia a antibióticos con diana en su transcrito (Vester & Douthwaite 2001). Algunos grupos de antibióticos comparten incluso los nucleótidos de unión y así, se ha observado que mutaciones en la posición 2058 del dominio V del ARNr 23S (numerado en relación a *E. coli*) producen resistencias a macrólidos y lincosamidas en aislados de campo de *B. hyodysenteriae* (Karlsson *et al.* 1999). Por su parte, la resistencia frente a pleuromutilinas está relacionada con diversas mutaciones puntuales que actúan de forma indirecta en el sitio de unión de estos antibióticos (nucleótidos del dominio V del ARNr 23S bacteriano), alterando la flexibilidad del centro peptidil transferasa lo cual impide la unión del antibiótico y la consecuente inhibición de la fase de elongación en la síntesis proteica de la bacteria (Long *et al.* 2009).

Hasta enero de 2017, a nivel internacional no existía un consenso aceptado de límites estándar para considerar a los aislados de *Brachyspira* spp. como resistentes o no a los diferentes antibióticos (Mirajkar & Gebhart 2016). Para poder definir un aislado de *Brachyspira* spp. como resistente o sensible a un antibiótico se disponía de diversas propuestas o guías de referencia proporcionadas por parte de diversos grupos de investigación (Tabla 2). Estas guías están basadas en resultados de antibiogramas realizados mediante los dos métodos aceptados para la valoración de la sensibilidad a antibióticos en bacterias del género *Brachyspira*, la dilución en agar y la microdilución en caldo (Karlsson *et al.* 2002).

Antibiótico	Valores MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	Pringle <i>et al.</i> 2012 (MDC) ⁽¹⁾	Burch 2005 (MDC)	IVNS ⁽³⁾ (MDC)	Ronne & Szancer 1990 (DA) ⁽²⁾	Duhamel <i>et al.</i> 1998b (DA)
Tiamulina	>0,25 (SR ⁽⁴⁾)	>0,5 (R ⁽⁵⁾)	>2 (R)	>4 (R) >1 y \leq 4 (I ⁽⁶⁾)	>2 (R) \geq 1 y \leq 2 (I)
Valnemulina	>0,125 (SR)	>0,125 (R)	N/A	N/A	
Lincomicina	>1 (SR)	>50 (R)	N/A	>36 (R) >4 y \leq 36 (I)	>75 (R) \geq 25 y \leq 75 (I)
Tilosina	>16 (SR)	>16 (R)	16 (R)	>4 (R) >1 y \leq 4 (I)	N/A
Doxiciclina	>0,5 (SR)	N/A	N/A	N/A	N/A
Carbadox	N/A ⁽⁷⁾	N/A	N/A	N/A	>1 (R) \geq 0,125 y \leq 1 (I)

(1)MDC, Método de microdilución en caldo de cultivo. (2)DA, Método de dilución en agar. (3)Instituto Veterinario Nacional de Suecia (Swedish National Veterinary Institute 2014). (4) Sensibilidad reducida. (5)Resistentes. (6)Sensibilidad intermedia. (7)Valor no definido

Tabla 2: Valores propuestos para interpretar los resultados de los antibiogramas realizados a aislados de *Brachyspira* spp. según el método utilizado para su determinación (adaptado de Mirajkar *et al.* 2016c).

En enero de 2017 el Instituto de estandarización clínica y laboratorial (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) propuso los valores estándar internacionales para la interpretación de los resultados de antibiogramas de aislados de *B. hyodysenteriae* (Tabla 3).

Familia Antibiótico	Antibiótico	MICRODILUCIÓN EN CALDO CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			DILUCIÓN EN AGAR CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
		S	I	R	S	I	R
MACRÓLIDOS							
	Tilosina	≤ 32	64	≥ 128	-	-	-
	Tilvalosina	≤ 32	-	-	-	-	-
PLEUROMUTILINAS							
	Tiamulina	$\leq 0,5$	-	≥ 1	$\leq 0,5$	-	≥ 2
	Valnemulina	-	-	-	≤ 2	-	-
AMINOGLUCÓSIDOS							
	Gentamicina	-	-	-	≤ 8	-	-

S=Sensible; I=Intermedio; R=Resistente

Tabla 3: Valores estándar para la interpretación de CMI obtenidas con aislados de *B. hyodysenteriae*. Emitidos por el Instituto de estandarización clínica y laboratorial (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI).

Se han llevado a cabo estudios de sensibilidad a antibióticos con aislados de *B. hyodysenteriae* en diversos países y regiones del mundo. En España se han publicado diversos estudios relativos al desarrollo de resistencias o la tendencia de la resistencia en aislados de *B. hyodysenteriae* obtenidos de granjas porcinas a lo largo de los años. Los más recientes comparan los resultados de aislados obtenidos entre 2014 y 2016 con resultados de aislados obtenidos entre 2011 y 2013 y muestran una disminución de la sensibilidad a la valnemulina y a la tilvalosina con el paso del tiempo (Álvarez *et al.* 2016). Las primeras investigaciones relativas a la sensibilidad de aislados de *B. hyodysenteriae* de campo de nuestro país, se realizaron en 2009 y demostraron una situación similar a la de otros países europeos, con un elevado porcentaje de aislados resistentes a la tilosina, un 20 % de aislados resistentes a la lincomicina y casi un tercio con sensibilidad reducida a este antibiótico. La proporción de aislados resistentes o con sensibilidad reducida a la tiamulina y la valnemulina fue, en contraposición, más baja (7,4 %) (Hidalgo *et al.* 2009). La comparación de los resultados proporcionados por aislados recuperados entre 2000 y 2004 con los de 2006 y 2007 mostró diferencias significativas, con un incremento de las CMI para tilosina y eritromicina en los aislados más recientes. También existieron diferencias, aunque no alcanzaron la significación estadística para la tiamulina, la clindamicina y la valnemulina (Hidalgo *et al.* 2009). Un estudio posterior comparó los resultados anteriores con los proporcionados por aislados de *B. hyodysenteriae* obtenidos entre 2008 y 2009 mostrando una marcada disminución de la sensibilidad a las pleuromutilinas, tiamulina y valnemulina. El incremento del porcentaje de aislados con sensibilidad reducida a la tiamulina que alcanzó el 60 % fue particularmente significativo. En contraposición, la resistencia a la lincomicina se mantuvo en valores similares a los de años precedentes. Finalmente se confirmó la resistencia muy frecuente a la tilosina, desaconsejando su uso en el tratamiento de la DP (Hidalgo *et al.* 2011).

La situación en otros países europeos es muy similar a la descrita en España, con un porcentaje significativo de aislados resistentes a tiamulina y valnemulina, que en muchos casos supera el 50 % de los aislados analizados, con resistencia generalizada a tilosina y con la aparición frecuente de aislados multirresistentes o con sensibilidad reducida frente a los antimicrobianos más comunes para tratar la DP (Karlsson *et al.* 2004; Sperling *et al.* 2011; Rugna *et al.* 2015). Se

han descrito diversos mecanismos potenciales que influyen en la disminución de la sensibilidad a las pleuromutilinas en *B. hyodysenteriae* (Hillen *et al.* 2014) y se ha propuesto que su desarrollo se ve favorecido por la subdosificación y por el uso indiscriminado de estos antibióticos que facilita la dispersión de clones resistentes entre explotaciones y la aparición de aislados multirresistentes (Karlsson *et al.* 2004). Estos aislados multirresistentes son más frecuente en granjas de cebo con formas endémicas de la DP que en otros tipos de explotaciones porcinas (Sperling *et al.* 2011).

En el entorno europeo, merece especial mención la situación de Polonia donde no se ha observado una disminución de la sensibilidad de aislados de *B. hyodysenteriae* a las pleuromutilinas (Zmudzki *et al.* 2012) y la situación de Suecia, donde los valores de sensibilidad a los antibióticos de uso común frente a la DP se han mantenido constantes en la última década y donde no se han descrito aislados multirresistentes. En este último caso, esta situación tan favorable se ha debido, en gran parte, al programa de control implantado en el país en el año 2000 que monitoriza la situación de las granjas positivas así como a la situación a nivel nacional, con una muy baja prevalencia de la enfermedad, menos del 1 % de granjas infectadas por *B. hyodysenteriae*, y unas marcadas estrategias de control y tratamiento para alcanzar su completa erradicación (Pringle *et al.* 2012).

La situación en Australia también refleja una disminución de la sensibilidad antibiótica en aislados de *B. hyodysenteriae* en los últimos años. Los estudios realizados antes de 2002 mostraron que esta resistencia era menos frecuente que la descrita en la de la mayoría de los países europeos, manteniéndose valores adecuados de sensibilidad para las pleuromutilinas (Karlsson *et al.* 2002). Sin embargo, un estudio más reciente, publicado en 2016, que analizó la resistencia en aislados recuperados entre 2002 y 2016, demostró resistencia o sensibilidad reducida a pleuromutilinas en un 10 % y un 50 % de los aislados de *B. hyodysenteriae* respectivamente (La *et al.* 2016).

Existen pocos estudios sobre sensibilidad a antimicrobianos de aislados de *B. hyodysenteriae* en países asiáticos. En el caso de Japón se han descrito resistencias a macrólidos y sensibilidad intermedia a tiamulina, tetraciclina y valnemulina, con incrementos de las concentraciones mínimas inhibitorias para estos antibióticos en los últimos años (Kajiwara *et al.* 2015).

Los estudios más recientes realizados en Estados Unidos. muestran valores de sensibilidad a la tiamulina y la valnemulina mejores que los obtenidos en la mayoría de los países europeos y similares a los obtenidos en Australia. Este hecho puede ser consecuencia de la peculiar situación epidemiológica que se ha vivido en esta región, con un periodo de baja incidencia de la enfermedad durante la década de los años 90 seguido por un fenómeno de reemergencia a comienzos del siglo XXI. El limitado uso de otros antimicrobianos durante los años 90 podría explicar las diferencias en lo que respecta a la sensibilidad a pleuromutilinas con los países europeos. Además, una proporción significativa de los aislados recuperados en casos de DP en los Estados Unidos. recientemente corresponden a *B. hampsonii*. En este sentido, cabe destacar que los aislados de *B. hampsonii* obtenidos de aves silvestres en Europa también mostraron una elevada sensibilidad a la gran mayoría de los antibióticos usados para el control de la DP (Martínez-Lobo *et al.* 2013). Por su parte, los datos americanos para la tilosina y la lincomicina son similares a los descritos en Europa, con un elevado porcentaje de aislados resistentes o con baja sensibilidad (Mirajkar *et al.* 2016c), mientras que la resistencia a la doxiciclina parece ser menos común que en los aislados de origen europeo (Karlsson *et al.* 2004; Mirajkar *et al.* 2016c). Además, los resultados obtenidos en los Estados Unidos. muestran una clara relación entre los sistemas de producción o tipos de granjas y los datos de sensibilidad a antibióticos de los aislados que se obtienen en las mismas. Así, en granjas de reproducción se recuperan aislados sensibles a tilosina y lincomicina, algo muy poco frecuente en el caso de granjas de cebo. Del mismo modo,

los escasos aislados resistentes a pleuromutilinas se asocian a sistemas de producción muy concretos. Entre las causas propuestas para explicar estas diferencias se encuentran diferencias en la edad de los animales en uno y otro tipo de granjas, las medidas de bioseguridad o el uso de antimicrobianos (Laanen *et al.* 2013; Mirajkar *et al.* 2016c).

Teniendo en cuenta el problema que supone la emergencia de aislados resistentes o con sensibilidad reducida, desde hace unos años se ha destacado la necesidad de monitorizar este fenómeno a nivel mundial (Karlsson *et al.* 2003). Entre las acciones que se deben desarrollar en esta lucha frente a las resistencias antibióticas en *Brachyspira* spp., Jill Thomson (2013) destaca las siguientes:

1-Estandarizar los métodos de determinación de la sensibilidad antibiótica para bacterias del género *Brachyspira*, estableciendo un protocolo estandarizado y microorganismos controles de sensibilidad y resistencia que puedan ser empleados por diferentes laboratorios. Actualmente existen test comerciales para la determinación de sensibilidad antibiótica de *B. hyodysenteriae* frente a 6 antibióticos y mediante el método de microdilución en caldo y se ha propuesto una cepa de referencia, B78T, como posible control. Todo ello permitirá una mejor comparación de los resultados de diferentes laboratorios.

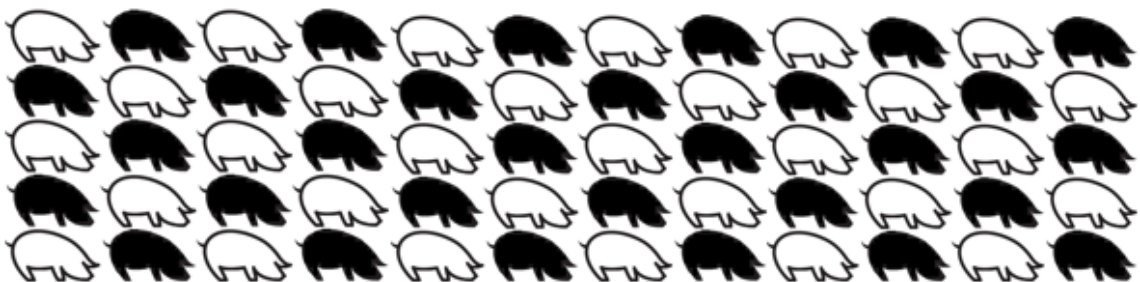
2-Vigilar la sensibilidad antibiótica a nivel de país o de región mediante controles aleatorios en un cierto número de aislados de origen porcino con el fin de conocer las tendencias y poder implementar estrategias de lucha a nivel estatal frente a la DP.

3-Redactar guías a nivel nacional o internacional donde se recojan aspectos de importancia en la lucha frente a la DP, incluyendo jerarquías de uso de antibióticos en función de la región y de los resultados de los test de sensibilidad, directrices en el uso de los propios antibióticos, combinaciones recomendadas, descripción de malas prácticas en su uso, etc. La identificación de nuevos productos con actividad antimicrobiana específica también ayudaría a preservar la eficacia de los limitados antibióticos disponibles actualmente.

4-Controlar de forma estricta los casos de DP causados por aislados multirresistentes, definiendo la estrategia a seguir ante la aparición de estos aislados para evitar su dispersión mediante medidas de bioseguridad estrictas, evitando el sufrimiento de los animales, ayudando a los profesionales implicados, veterinarios y ganaderos, en la resolución de estos casos.

Algunos países como Suecia, ya están implementando algunas de estas estrategias desde hace años siendo destacable la baja incidencia de la infección, la no disminución de la sensibilidad antibiótica en los aislados de *B. hyodysenteriae* en los años más recientes y la no aparición o el mínimo impacto de los aislados multirresistentes (Pringle *et al.* 2012).

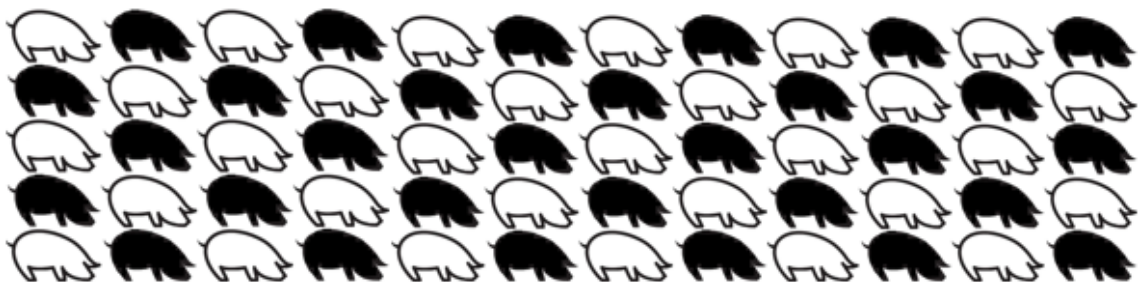
2. OBJETIVOS



El objetivo general de la presente tesis ha sido aportar nuevos conocimientos al diagnóstico y el control de la DP. La evolución creciente de las resistencias a algunos de los antimicrobianos empleados en el tratamiento de la DP hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para este tratamiento, incluyendo la valoración de la actividad de algunos antibióticos frente a *B. hyodysenteriae*. Por otra parte, el descubrimiento de nuevas especies del género *Brachyspira* capaces de reproducir el cuadro clínico de la DP en cerdos, así como el aislamiento de una de estas nuevas especies en anátidas silvestres de la Comunidad Autónoma de Castilla y León a finales del año 2010, hicieron surgir nuevas cuestiones con respecto a la posible implicación de estos aislados en los brotes de DP ocurridos en las explotaciones porcinas de la región. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos específicos abordados en la presente tesis fueron:

- Búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas para el tratamiento de la DP mediante la determinación de la sensibilidad *in vitro* de una colección de aislados de campo de *B. hyodysenteriae* frente a flumequina, una fluoroquinolona.
- Evaluación experimental de la capacidad de un aislado de *B. hamptonii* recuperado de aves silvestres en el noroeste de España para colonizar el intestino del cerdo, causar cuadro clínico o lesiones y transmitirse entre cerdos infectados y cerdos centinela.
- Determinación de las reacciones cruzadas generadas por aislados de *B. hamptonii* en las técnicas de PCR específicas para la identificación de diferentes especies del género *Brachyspira*.

3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS



Estudio I

Evaluation of the *in vitro* activity of flumequine
against field isolates of *Brachyspira*
hyodysenteriae.

Aller-Morán, L.M., Martínez-Lobo, F.J., Rubio, P., Carvajal, A.
Research in Veterinary Science 103, 51-33 (2015).



Evaluation of the in vitro activity of flumequine against field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*



Luis Miguel Aller-Morán *, Francisco Javier Martínez-Lobo, Pedro Rubio, Ana Carvajal

Infectious Diseases and Epidemiology Unit, Faculty of Veterinary, University of León, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2014

Received in revised form 24 June 2015

Accepted 24 August 2015

Keywords:

Brachyspira hyodysenteriae

Flumequine

Quinolone

Swine dysentery

ABSTRACT

Flumequine is a quinolone derivative used in veterinary medicine to treat enteric infections, mainly those caused by Gram negative bacteria and also some Gram positive. Some recent reports by field practitioners have suggested that its use in swine dysentery outbreaks can minimize the impact of this disease. This study aims to evaluate the in vitro anti-*Brachyspira hyodysenteriae* activity of flumequine. Forty eight field isolates of the bacterium were evaluated using a microdilution test. The lack of colon bioavailability studies of flumequine in pigs makes it difficult to establish the true efficacy of this antibiotic for swine dysentery control. Nonetheless, the relatively high values of MIC₅₀ (50 µg/mL) and MBC₅₀ (50 µg/mL) obtained suggest poor activity against *B. hyodysenteriae*. Flumequine activity in swine dysentery outbreaks could be related to its activity against other bacteria, different from *B. hyodysenteriae*, engaged in swine dysentery pathogenesis.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Swine dysentery (SD) is one of the main digestive diseases of grower/finisher pigs caused by the colonization of the large intestine with the anaerobic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae*, a strongly β-hemolytic spirochete (Hampson, 2012). Recently, a new strongly β-hemolytic spirochete, "*Brachyspira hampsonii*", has been identified and related to SD outbreaks in North America (Chander et al., 2012). This new specie has recently been identified in Europe in wild waterfowl (Martínez-Lobo et al., 2013) and pigs (Rohde et al., 2013). Whatever, the disease is characterized by muco-hemorrhagic colitis causing diarrhea; the feces are gray to chocolate-brown in color and may contain plugs of mucus or flecks of fresh blood with necrotic material in worst cases. Although severity is very variable, SD is considered to be one of the most significant production-limiting porcine infections and it causes considerable financial losses arising from mortality, decreased growth rates, poor feed conversion and treatment expenses (Hampson, 2012).

Despite the fact that SD was almost eradicated during the 90s, it has reemerged as a major disease in recent years (Hampson, 2012). At the moment, there is no commercial vaccine available and the main tool in the control of SD is the use of antimicrobials. However, a clear trend towards a higher incidence of clinical isolates of *B. hyodysenteriae* with reduced antimicrobial susceptibility has been reported in several European countries in the last decades making it more difficult to control this disease (Álvarez-Ordóñez et al., 2013; Hidalgo et al., 2009, 2011). Tiamulin, valnemulin, lincomycin, tylosin and tylvalosin are the antimicrobials most commonly used for the control of SD and the mechanism of action of all these antimicrobials is similar; they inhibit protein synthesis by binding to the large ribosomal subunit and certain degree

of cross-resistance has been reported between the two pleuromutilins, tiamulin and valnemulin (Hidalgo et al., 2011) and also it has been proposed for tylosin and lincomycin or pleuromutilins and lincomycin (Hidalgo et al., 2011; Pringle et al., 2004). In this context, the search for new drugs effective against *B. hyodysenteriae* is an important priority in porcine production. Some recent reports by field practitioners (Álvaro Aguarón, personal communication) have suggested that flumequine, a first generation quinolone antibiotic, administered in drinking water, can minimize the impact of SD in *B. hyodysenteriae* infected farms. The aim of this study was to determine the in vitro susceptibility of *B. hyodysenteriae* field isolates against flumequine.

A set of 48 Spanish field isolates of *B. hyodysenteriae* from the bacterial collection held at the Animal Health Department at the University of León was used. Isolates were recovered from stool samples of pigs suffering from diarrhea between January 2006 and June 2012 (each isolate from a single farm) and were selected in order to include samples representing the most important pig production regions of the country. Moreover, some of these isolates were previously typed by PFGE (Hidalgo et al., 2010a), multiple-locus variable-number-of-tandem-repeat analysis (Hidalgo et al., 2010b) or multilocus sequence typing (Osorio et al., 2012) that demonstrated that they were genetically different (data not shown). Susceptibility testing was performed by broth microdilution (Karlsson et al., 2002) using 48-well tissue culture trays (Iwaki). Flumequine was provided by Laboratorios Syva S.A. (Spain) in a stock solution of 6.41 g of flumequine diluted in 50 mL of NaOH 1 M (pH 13.6). Testing media was brain heart infusion broth (Merk) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Gibco). Two-fold serial dilutions of flumequine (0.2–1600 µg/mL) were tested. Each plate included one well without drug as positive growth control and another one without bacteria that served as negative growth control.

* Corresponding author.

E-mail address: lalm@unileon.es (L.M. Aller-Morán).

Table 1
Minimum inhibitory concentrations (MICs) and Minimum bactericidal concentrations (MBCs) of flumequine for 48 Spanish field isolates of *B. hyodysenteriae*.

MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Range (µg/mL)
50	100	6.25–200
MBC ₅₀ (µg/mL)	MBC ₉₀ (µg/mL)	Range (µg/mL)
50	200	12.5–400

Plates were prepared immediately before its use in a safety cabinet and were incubated in anaerobic jars (GENbox, BioMerieux) with AnaeroGen sachets (Oxoid) for 3–5 days on a rotary agitator at 39 °C. The growth of positive control wells was checked by phase-contrast microscopy to confirm purity. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of flumequine that prevented visible growth. Within each plate, aliquots of 15 µL were collected from the four wells with the highest flumequine concentrations that prevent bacterial growth and were subcultured in TSA-blood plates (Oxoid) for 7 days in anaerobic conditions to determine minimal bactericide concentration (MBC).

The MICs and MBCs of flumequine for the 48 *B. hyodysenteriae* isolates are shown in Table 1 and Fig. 1. Flumequine MICs ranged between 6.25 and 200 µg/mL with a MIC₅₀ and MIC₉₀ of 50 and 100 µg/mL respectively. According to previous reports with other quinolones (Andraud et al., 2010) a correlation between MIC and MBC values was observed. In almost 80% of the isolates, MBC values were equal or one dilution higher than the MIC. In any case, these values are higher than those reported for other pathogens isolated from pigs such as *Pasteurella multocida* (MIC₅₀ = 0.5 µg/mL), *Salmonella enterica* (MIC₅₀ = 2 µg/mL) or *Escherichia coli* (MIC₅₀ = 32 µg/mL) (Villa et al., 2005) and suggest that flumequine has poor activity against *B. hyodysenteriae*. In clinical evaluations, the ratio of the maximum serum antimicrobial concentration (C_{max}) to the MIC is often used as a measure of treatment efficiency. The administration of a recommended therapeutic dosage for IM flumequine in pigs (15 mg/kg) is associated with a C_{max} of 4.99 ± 0.92 µg/mL observed after 2.44 ± 0.81 h (Villa et al., 2005) and this value is lower than the MICs reported for *B. hyodysenteriae* in the present research. However, antimicrobial efficacy against SD depends on the bioavailability of the drug at the large intestine where the infection by *B. hyodysenteriae* takes place (Burch, 2005). To the authors knowledge, there is no specific report on flumequine distribution in the porcine large intestine and studies to determine the colonic content concentration of this drug after its oral or intramuscular administration in pigs are required in order to obtain suitable clinical breakpoints against *B. hyodysenteriae*.

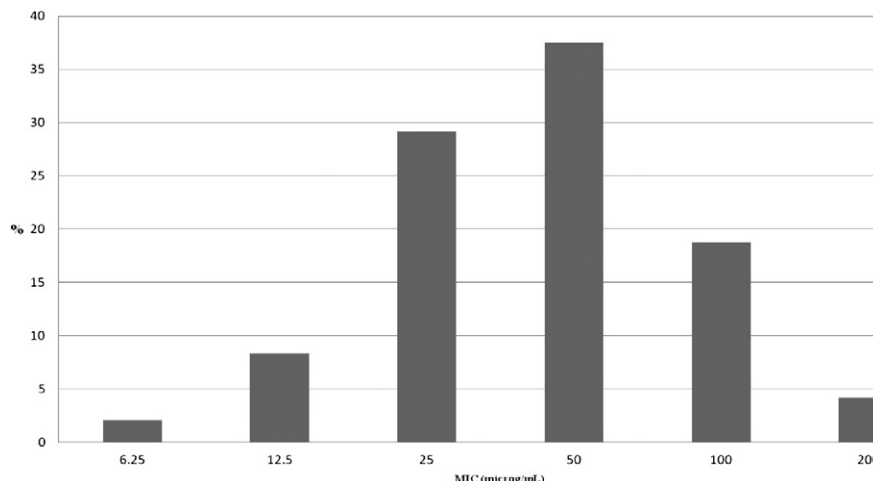


Fig. 1. Distribution of MICs of flumequine for 48 Spanish field isolates of *B. hyodysenteriae*.

Unfortunately, data on the use of flumequine or other quinolones in the farms where the *B. hyodysenteriae* isolates used in the present study were recovered were not available. However, a recent survey collecting data from more than 3000 practitioners from 25 European countries reported a low use of quinolones in pig production compared with other antibiotics (De Briyne et al., 2014). Accordingly, it appears that the MIC and MBC values described in the present research were probably not influenced by a prior exposure to these antimicrobials.

The high MIC and MBC values for flumequine described in the present research against *B. hyodysenteriae* are in contradiction with the evidences from field experiences that suggest that this quinolone can be useful in the treatment and control of SD in infected farms. We cannot rule out that flumequine may be acting on other microflora bacteria that can influence the colonization by *B. hyodysenteriae* and the occurrence of the disease. According to this, it has been reported that concurrent colonization with sulphatase-producing bacteria such as *Bacteroides* and *Prevotella* spp. that allows a decrease in the expression of sulphated mucins, is necessary for the development of SD (Wilberts et al., 2013). Other studies have suggested a pathogenic synergism between *B. hyodysenteriae* and a variety of anaerobic bacteria such as *Fusobacterium necrophorum* or *Clostridium* spp. (Whipp et al., 1979; Harris et al., 1978). A similar mechanism of action has also been proposed to explain the effect of different diets on the occurrence of SD after *B. hyodysenteriae* experimental infection (Hampson, 2012).

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

The authors express their thanks to Gloria Fernández Bayón for her excellent technical assistance. This work was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project AGL 2010-18804) and Laboratorios Syva S.A.

References

- Álvarez-Ordóñez, A., Martínez-lobo, F.J., Argüello, H., Carvajal, A., Rubio, P., 2013. Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 1927–1947.
- Andraud, M., Chauvin, C., Sanders, P., Laurentie, M., 2010. Pharmacodynamic modeling of in vitro activity of marbofloxacin against *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 756–761.

- Burch, D.G.S., 2005. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in pigs and breakpoint determinations. *Pig J.* 56, 8–24.
- Chander, Y., Primus, A., Oliveira, S., Gebhart, C.J., 2012. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated “*Brachyspira hamptonii*”. *J. Vet. Diagn. Investig.* 24, 903–910.
- De Briyne, N., Alkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S.P., 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet. Rec.* <http://dx.doi.org/10.1136/vr.102462>.
- Hampson, D.J., 2012. Swine Dysentery. *Diseases of Swine*, 10th edition Wiley-Blackwell, Iowa, USA, pp. 680–689.
- Harris, D.L., Alexander, T.J., Whipp, S.C., Robinson, I.M., Glock, R.D., Matthews, P.J., 1978. Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172 (4), 468–471.
- Hidalgo, A., Carvajal, A., García-feliz, C., Osorio, J., Rubio, P., 2009. Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 87, 7–12.
- Hidalgo, A., Carvajal, A., Pringle, M., Rubio, P., Fellström, C., 2010a. Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiol. Infect.* 138, 76–85.
- Hidalgo, A., Carvajal, A., La, T., Naharro, G., Rubio, P., Phillips, N.D., Hampson, D.J., 2010b. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of the swine dysentery pathogen, *Brachyspira hyodysenteriae*. *J. Clin. Microbiol.* 48 (8), 2859–2865.
- Hidalgo, A., Carvajal, A., Vester, B., Pringle, M., Naharro, G., Rubio, P., 2011. Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3330–3337.
- Karlsson, M., Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 2002. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Vet. Microbiol.* 84, 123–133.
- Martínez-Lobo, F.J., Hidalgo, A., García, M., Argüello, H., Naharro, G., Carvajal, A., Rubio, P., 2013. First identification of “*Brachyspira hamptonii*” in wild European waterfowl. *PLoS One* 8, e82626.
- Osorio, J., Carvajal, A., Naharro, G., La, T., Phillips, N.D., Rubio, P., Hampson, D.J., 2012. Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries. *PLoS One* 7 (6), e39082.
- Pringle, M., Poehlsgaard, J., Vester, B., Long, K.S., 2004. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol. Microbiol.* 54, 1295–1306.
- Rohde, J., Habighorst-Blome, K., Seehusen, F., 2013. “*Brachyspira hamptonii*” clade I isolated from Belgian pigs imported to German. *Vet. Microbiol.* 168, 432–435.
- Villa, R., Cagnardi, P., Acocella, F., Massi, P., Anfossi, P., Asta, F., Carli, S., 2005. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of flumequine in pigs after single intravenous and intramuscular administration. *Vet. J.* 170, 101–107.
- Whipp, S.C., Robinson, I.M., Harris, D.L., Glock, R.D., Matthews, P.J., Alexander, T.J., 1979. Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 26, 1042–1047.
- Wilberts, B.L., Arruda, P.H., Kinyon, J., Madson, D.M., Frana, T., Burrough, E.R., 2013. Differential Colonic Mucin Expression in Pigs with Acute Dysentery Following Oral Inoculation with “*Brachyspira hamptonii*” or *Brachyspira hyodysenteriae*. *Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animal and Humans*. Guildford, United Kingdom, p. 35.

Estudio II

Experimental infection of conventional pigs
with a “*Brachyspiara hampsonii*” isolate
recovered from migrating waterfowl in Spain.

Aller-Morán, L.M., Martínez-Lobo, F.J., Rubio, P., Carvajal, A.

The Veterinary Journal 214, 10-13 (2016).



Short Communication

Experimental infection of conventional pigs with a '*Brachyspira hamptonii*' isolate recovered from a migrating waterfowl in Spain

Luis Miguel Aller-Morán*, Francisco Javier Martínez-Lobo, Pedro Rubio, Ana Carvajal

Department of Animal Health, Veterinary Faculty, University of León, León 24071, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 3 February 2016

Keywords:

'*Brachyspira hamptonii*'
Migrating waterfowl
Pigs
Swine dysentery

ABSTRACT

'*Brachyspira hamptonii*' is a recently proposed new species within the *Brachyspira* genus, which produces a dysentery-like disease in pigs. This study aims at investigating whether a '*B. hamptonii*' isolate recovered from a migrating waterfowl was capable of colonizing pig intestines, inducing clinical signs of dysentery and being transmitted among pigs. Eleven 7-week-old pigs were randomly assigned into two separate groups which were orally administered an avian isolate of '*B. hamptonii*' (inoculated group, $n = 5$) or BHI broth (control group, $n = 6$). After inoculation, three pigs from the control group were placed in the inoculated pen and served as sentinel pigs. Our results show the capacity of this avian '*B. hamptonii*' isolate to colonize the large intestine of pigs and to be transmitted among pigs. According to this, migrating birds could play a role in the epidemiology of '*B. hamptonii*' as a possible source of infection in swine populations.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

'*Brachyspira hamptonii*' was identified for the first time in pig faeces collected on farms with swine dysentery (SD)-like disease in the USA and has emerged as an important swine pathogen in the USA and Canada, replacing *B. hyodysenteriae* as the predominant aetiological agent of SD (Rubin et al., 2013a). Recently, '*B. hamptonii*' was identified in European pigs for the first time (Mahu et al., 2014; Rohde et al., 2014). Apart from pigs, '*B. hamptonii*' isolates have also been recovered from wild waterfowl, from lesser snow geese in the Canadian Arctic (Rubin et al., 2013b) and wild mallards and Greylag geese in Spain (Martínez-Lobo et al., 2013).

Although two genetically distinct clades of '*B. hamptonii*' isolates were initially recognized (Chander et al., 2012), recent research using multilocus sequence typing has revealed a heterogeneous population with a total of 20 sequence types and three clonal complexes (Mirajkar et al., 2015). The pathogenicity of '*B. hamptonii*' isolates recovered from pigs has been demonstrated (Burrough et al., 2012; Rubin et al., 2013a; Costa et al., 2014; Wilberts et al., 2014). The ability of a Canadian avian '*B. hamptonii*' isolate to colonize pigs was also demonstrated in an experimental study, although no clinical signs were observed in the infected pigs. The aim of this pilot inoculation study was to evaluate a European '*B. hamptonii*' isolate, AIS50 (Genbank accession no: KF386054), recovered from faecal samples of a Greylag goose (Martínez-Lobo et al., 2013) to determine whether this isolate was capable of infecting pigs, inducing pathological outcomes and being transmitted between pigs.

This study was approved by the University of León Committee on Animal Care and Supply (No. 7–2010; 3th February 2010). No positive control group inoculated with *B. hyodysenteriae* was included due to limited space, but this model has been successfully used previously in our laboratory to reproduce SD.

Eleven 7-week-old commercially obtained cross-breed female pigs from a farm with no history of SD or porcine spirochaetosis were randomly assigned into two groups, inoculated ($n = 5$; no. 1–5) and control ($n = 6$; no. 6–11), which were kept in two separate rooms throughout the experiment. All pigs were fed ad libitum with a commercial pelleted starter diet with no added antibiotics and they all had free access to water. During a 10-day acclimation period, the pigs were confirmed negative for *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* and *Salmonella* spp. by culture of rectal swabs and free of *Lawsonia intracellularis* by PCR testing. On post-inoculation days (PID) 0, 1 and 2, pigs from the inoculated group were orally administered 100 mL of AIS50 culture in brain heart infusion broth (BHI) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) containing between 2.4 and 8.0×10^8 of spirochaetes per mL using a feeding syringe. Pigs in the control group received 100 mL of BHI-10% FBS. A diet containing a high proportion of soybean meal (50%) was used between PID 0 and PID 21 to encourage spirochaete colonization and the development of brachyspiral colitis (Hampson et al., 2000; Jacobson et al., 2004). On PID 4, three pigs from the control group (no. 6–8) were placed in the inoculated group and served as sentinel pigs.

All pigs were examined daily to assess faecal consistency (scored 0–4/4) as previously described (Rubin et al., 2013a) and systemic clinical signs. A masked analysis of *Brachyspira* spp. shedding in faecal samples by culture-PCR combination (Martínez-Lobo et al., 2013) and a masked assessment of gross and microscopic lesions in the

* Corresponding author. Tel.: +34987291306.

E-mail address: lallm@unileon.es (L.M. Aller-Morán).

Table 1Faecal consistency score^a and *Brachyspira* culture and identification results after experimental inoculation with an avian isolate of '*B. hamptonii*' (AIS 50).

PID	Inoculated pigs ^b					Sentinel pigs ^c			Control pigs ^d		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0 (Bm)	0
2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0 (UI)	0
3	1	1	1	2	0	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0	1	0
4	1	1	1	2	0	1	1	0	0	1 (Bm)	0
5	2	1	1	2	0	1	2	0	0	1	0 (Bm)
6	2 (Bh)	1	2	1	1 (Bh)	4	2	0	0	0	0 (UI)
7	0 (Bh)	0	0	2	0 (Bm)	4	0	0	1	1	1 (UI)
8	3 (Bh)	0 (Bh)	0	1	0		0	0	2	0	1
9	3 (Bh)	0	0	1	0 (Bh)		0	0	2 (UI)	1	0
10	3 (Bh)	0	0	1	0 (Bh)		0	0	1	0	0
11	4 (Bh)	0 (Bh)	0	1	0 (Bh)		0	0	1	1	0
12	1 (Bh)	0	0	1	0		0	0	1	0	1
13		1	0	1	1		0	0	1	1	1
14		0	0 (Bh)	0	0		0	0	0	1	1
15		1	0	0	0		0	0	0	0	0
16		1	0	0	0		0	0	0	0	0
17		0	0	0	0		0	0	0	0	0
18		0	0	0	0		0	0	0	0	0
19		0 (Bh)	0	0 (Bh)	0		0	0	0	0	0
20		0	0	0	0		0	0	0	0	0
21		0	0	0	0 (Bh)		0	0	0	0	0
22		0	0	0	0		0	0	0	0	0
23		0 (Bh)	0	0 (Bh)	0		0 (Bh)	0	0	0	0
24		1	0	1	0		2 (Bh)	1	0	0	0
25		1	0	1	0		2 (Bh)	1	0	0	0
26		1	0	1	0		2 (Bh)	1	0	0	0
27		0	0 (Bh)	1	0 (Bh)		1	1	0	0	0
28		0	0	0	0		0	0	0	0	0
29		0	0	0	0		0	0	0	0	0
30		0	0	0	0		0 (Bh)	0	0	0	0
31		0	0	0	0		0	0	0	0	0
32		0	0	0	0		0	0	0	0	0
33		0 (Bh)	0	0	0		0	0	0	0	0
34		0	0	0	0		0	0	0	0	0
35		0	0	0	0		0	0	0	0	0
36		0	0	0	0		0	0	0	0	0
37		0 (Bh)	0 (Bh)	0	0		0	0 (UI)	0	0	0
38		0 (Bh)	0	0	0		0	0 (UI)	0	0	0
39		0	0	0	0		0	0	0	0	0
40		0	0	0	0		0	0 (UI)	0	0	0

PID, postinoculation days.

^a Faecal consistency was scored as follows: 0, formed-normal; 1, soft-wet cement consistency; 2, runny-watery; 3, mucoid diarrhoea; 4, bloody diarrhoea. Days with positive culture of spirochaetes are coloured and identified as Bh, isolation of '*B. hamptonii*'; Bm, isolation of *B. murdochii*; or UI, unidentified spirochaete.^b Inoculated pigs were orally administered on three consecutive days (PID 0, 1 and 2) 100 mL of a 10⁸ CFU/mL culture of AIS 50.^{c, d} Control pigs and sentinel pigs were orally administered 100 mL of BHI broth on the same days.^e Sentinel pigs were placed in the inoculated pen on PID 3.

large intestine, including evaluation for the presence of *Brachyspira*-like organisms, inflammation grade, number of inflammatory and plasma cells and depth of crypts was also carried out according to Burrough et al. (2012). Differences between groups were evaluated for significance using non-parametric tests; Kruskal–Wallis for data on a continuous scale and Mann–Whitney U tests for ordinal variables (scored parameters). Results were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Intermittent shedding of strongly haemolytic spirochaetes was shown in all inoculated animals; only weakly haemolytic spirochaetes were sporadically isolated from faeces of control pigs (Table 1). All the isolates were further characterized by the amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. partial *nox* gene (Martínez-Lobo et al., 2013). Twenty five of 26 strongly haemolytic isolates obtained from inoculated pigs were identified as '*B. hamptonii*' (100% of nucleotide homology with the isolate AIS 50 used as inoculum), showing the ability of a European '*B. hamptonii*' isolate recovered from a wild waterfowl to colonize porcine intestine and be shed into the environment. A total of seven weakly haemolytic spirochaete isolates

were recovered from control pigs. Three were identified as *B. murdochii* but we were not able to amplify the *nox* gene of the remaining four weakly haemolytic isolates, so they remained unidentified. Notably, shedding of '*B. hamptonii*' by inoculated animals led to the infection of one sentinel pig and probably to a second one, although in the latter sequence confirmation was not achieved.

In agreement with the results previously reported by Rubin et al. (2013b) using a Canadian avian isolate of '*B. hamptonii*', diarrhea was mild in 4/5 inoculated pigs, ranging from normal to wet cement consistency at PID 0–14. Control pigs also exhibited loose stools at PID 7–14 that might have been associated with the high levels of soybean meal in the pigs' diet to encourage the development of SD (Hampson et al., 2000; Rubin et al., 2013b). No statistically significant differences were observed when mean accumulative faecal scores among inoculated pigs (12.4; standard deviation = 8.62) and control pigs (7.3; standard deviation = 2.08) were compared ($P = 0.571$). However, one inoculated pig (no. 1) developed clinical signs and lesions typical for SD, including systemic clinical signs

(roughness of the hair coat and apathy), severe mucoid or mucohaemorrhagic diarrhoea (faecal consistency score 3 and 4) and deep colonization of the colon crypts by spirochaetes observed using the Warthin–Starry stain (Fig. 1). This suggests that the avian isolate AIS50 of '*B. hampsonii*' could perhaps cause a clinical disease and pathology indistinguishable from SD under certain circumstances.

All pigs except no.1 and no. 6 were euthanased on PID 50. Pig no. 1 was euthanased on PID 12, immediately after the peak of mucohaemorrhagic diarrhoea, while pig no. 6 was euthanased on PID 7 for animal welfare reasons (incarcerated hernia). No gross lesions were observed in any animal in the control group, but a mild fibrinous exudate adhering to the caecal mucosa of the ileocecal junction was recorded in 4/5 inoculated pigs (no. 2, 3, 4 and 5). Pig no. 1 showed a severe congestion of the caecal and colonic mucosa and a large amount of mucus in the colonic lumen. Characteristic microscopic SD lesions were only found in pig no. 1, which showed a thickened colonic and caecal mucosa with severe vascular congestion. Relevant parameters recorded during the histological evaluation are shown in Table 2. Only the proliferation of plasma cells was statistically higher in the inoculated group than in the control group ($P=0.036$). Differences in the inflammation score in the colon and in crypt depths came close to statistically significance ($P=0.071$ and $P=0.053$, respectively).

Our study demonstrated the ability of a European '*B. hampsonii*' isolate recovered from a wild waterfowl to colonize the pig intestine, to be transmitted among pigs, and to induce a clinical disease and a pathology similar to SD in at least some of the animals under experimental conditions. This suggests that wild waterfowl are a potential source of infection of '*B. hampsonii*', which could be transmitted to pigs, particularly in herds allowed outdoors.

Table 2

Histological evaluation of lesions in the large intestine after experimental inoculation with an avian isolate of '*B. hampsonii*' (AIS 50).

	Colon			Caecum
	Inflammation grade ^a	Number of plasma cells per hpf ^b	Depth of crypts (nm)	Depth of crypts (nm)
Inoculated				
1	1	3	811.81	ND
2	1	2	577.89	629.20
3	2	1	585.70	644.92
4	2	2	504.26	510.03
5	2	2	591.68	678.71
Sentinel				
6	1	2	650.77	671.97
7	0	1	592.03	656.61
8	2	1	482.62	711.48
Control				
9	1	0	508.15	481.00
10	0	0	453.29	411.47
11	0	1	365.98	488.13

hpf, High power field; ND, not determined.

^a Inflammation grade was evaluated in haematoxylin–eosin stained sections using a subjective scale as follows: 0, no inflammation; 1, slight inflammation; 2, moderate inflammation; 3, severe inflammation; 4, very severe inflammation.

^b The number of plasma cells per hpf was estimated and scored (0–4/4) and crypt depth was measured (nm).

Conflict of interest statement

None of the authors have any financial or personal relationships which could inappropriately influence or bias the content of the paper.

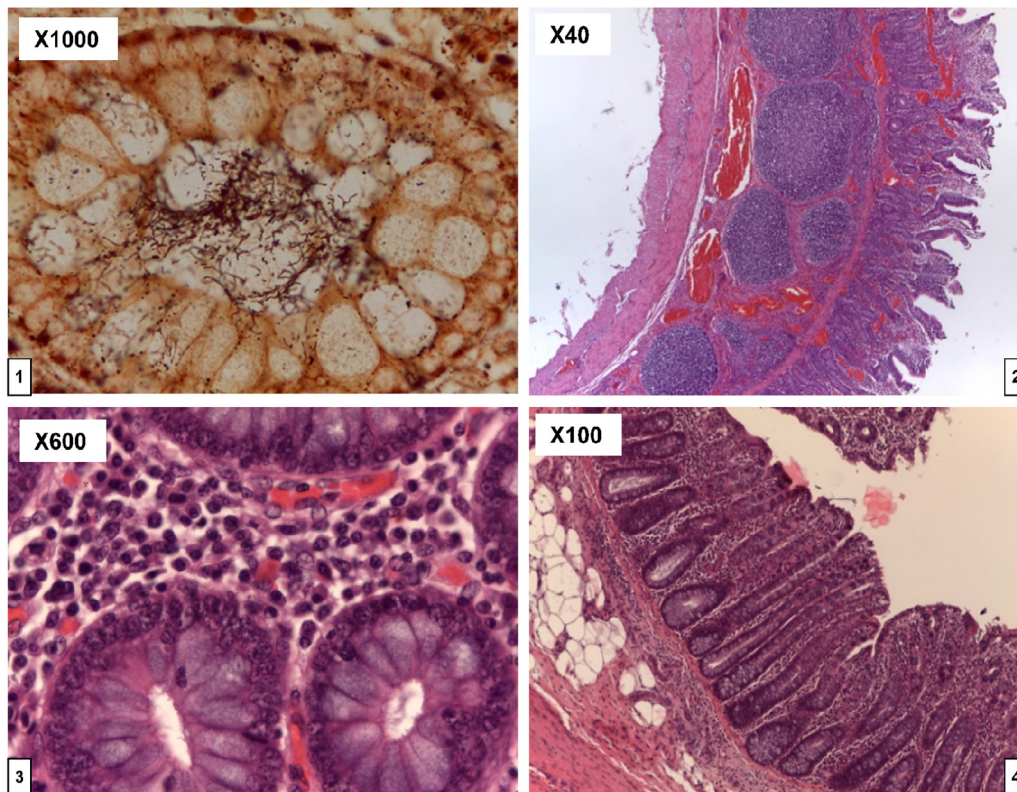


Fig. 1. Warthin–Starry (photo 1) and haematoxylin–eosin (photos 2–4) stained colonic sections after experimental inoculation of pigs with an avian isolate of '*B. hampsonii*' (AIS 50). Presence of *Brachyspira*-like organisms in the colonic crypts (photo 1; pig no. 1); vascular congestion (photo 2; pig no.1); number of plasma cells (photo 3; pig no.1); length of colonic crypts (photo 4; pig no. 1).

Acknowledgments

Preliminary results were presented orally at the 6th European Symposium of Pig Health Management, Sorrento, Italy, 7th–9th, May 2014. The authors wish to express their thanks to G.F. Bayón for providing excellent technical assistance. This work was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project AGL 2010-18804).

References

- Burrough, E.R., Strait, E.L., Kinyon, J.M., Bower, L.P., Madson, D.M., Wilberts, B.L., Schwartz, K.J., Frana, T.S., Songer, J.G., 2012. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 1025–1034.
- Chander, Y., Primus, A., Oliveira, S., Gebhart, C.J., 2012. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated '*Brachyspira hamptonii*'. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 903–910.
- Costa, M.O., Hill, J.E., Fernando, C., Lemieux, H.D., Detmer, S.E., Rubin, J.E., Harding, J.C.S., 2014. Confirmation that '*Brachyspira hamptonii*' clade I (Canadian strain 30599) causes mucohemorrhagic diarrhea and colitis in experimentally infected pigs. *BMC Veterinary Research* 10, 129.
- Hampson, D.J., Robertson, I.D., La, T., Oxberry, S.L., Pethick, D.W., 2000. Influences of diet and vaccination on colonisation of pigs by the intestinal spirochaete *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli*. *Veterinary Microbiology* 73, 75–84.
- Jacobson, M., Fellström, C., Lindberg, R., Wallgrem, P., Jensen-Waern, M., 2004. Experimental swine dysentery: Comparison between infection models. *Journal of Medical Microbiology* 53, 273–280.
- Mahu, M., De Jong, E., De Paul, N., Vande Maele, L., Vandenbroucke, V., Vandersmissen, T., Miry, C., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Martel, A., et al., 2014. First isolation of '*Brachyspira hamptonii*' from pigs in Europe. *Veterinary Record* 174, 47.
- Martínez-Lobo, F.J., Hidalgo, A., García, M., Argüello, H., Naharro, G., Carvajal, A., Rubio, P., 2013. First identification of '*Brachyspira hamptonii*' in wild European waterfowl. *PLoS ONE* 8, e82626. doi:10.1371.
- Mirajkar, N.S., Bekele, A.Z., Chander, Y.Y., Gebhart, C.J., 2015. Molecular epidemiology of novel pathogen '*Brachyspira hamptonii*' reveals relationships between diverse genetic groups, regions, host species, and other pathogenic and commensal *Brachyspira* species. *Journal Clinical Microbiology* 53, 2908–2918.
- Rohde, J., Habighorst-Blome, K., Seehusen, F., 2014. '*Brachyspira hamptonii*' clade I isolated from Belgian pigs imported to Germany. *Veterinary Microbiology* 168, 432–435.
- Rubin, J.E., Costa, M.O., Hill, J.E., Kittrell, H.E., Fernando, C., Huang, Y., O'Connor, B., Harding, J.S.H., 2013a. Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with '*Brachyspira hamptonii*' strain 30446. *PLoS ONE* 8, e57146. doi:10.1371.
- Rubin, J.E., Harms, N.J., Fernando, C., Soos, C., Detmer, S.E., Harding, J.C., Hill, J.E., 2013b. Isolation and characterization of *Brachyspira* spp. including '*Brachyspira hamptonii*' from lesser snow geese (*Chen caerulescens caerulescens*) in the Canadian Arctic. *Microbial Ecology* 66, 813–822.
- Wilberts, B.L., Arruda, P.H., Kinyon, J.M., Madson, D.M., Frana, T.S., Burrough, E.R., 2014. Comparison of lesion severity, distribution and colonic mucin expression in pigs with acute swine dysentery following oral inoculation with '*Brachyspira hamptonii*' or *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Pathology* 51, 1096–1108.

Estudio III

Cross reactions in specific *Brachyspira* spp.
PCR assays caused by “*Brachyspira*
hampsonii” isolates: implication for diagnosis.

Aller-Morán, L.M., Martínez-Lobo, F.J., Rubio, P., Carvajal, A.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 28(6), 755-759
(2016).

Cross-reactions in specific *Brachyspira* spp. PCR assays caused by “*Brachyspira hampsonii*” isolates: implications for detection

Luis M. Aller-Morán,¹ F. Javier Martínez-Lobo, Pedro Rubio, Ana Carvajal

Abstract. An emerging novel spirochete in swine, provisionally designated “*Brachyspira hampsonii*,” has been detected worldwide. It has been associated with swine dysentery and cannot be differentiated from *B. hyodysenteriae*, the classical etiologic agent of this disease, using standard phenotypic methods. We evaluated cross-reactions of “*B. hampsonii*” isolates recovered from avian species in some of the currently available species-specific polymerase chain reaction (PCR) assays for the identification of swine *Brachyspira* species. Ten avian “*B. hampsonii*” isolates recovered from wild waterfowl were used. No false-positive results were recorded with a *B. pilosicoli*-specific PCR based on the amplification of a fragment of the *16S rRNA* gene. However, the percentage of false-positive results varied, with a range of 10–80%, in the evaluated *B. hyodysenteriae*-specific assays based on the amplification of the *23S rRNA*, *nox*, and *tlyA* genes. Similarly, results of the *B. intermedia*-specific PCR assays yielded poor specificity, with up to 80% of the “*B. hampsonii*” isolates tested giving false-positive results. Finally, 2 “*B. hampsonii*” avian isolates yielded a positive result in a *B. innocens*- and *B. murdochii*-specific PCR. This result should be interpreted very cautiously as these 2 isolates could represent a recombinant genotype.

Key words: “*Brachyspira hampsonii*”; cross-reactions; PCR; swine dysentery.

The bacterial genus *Brachyspira* includes a number of officially named and unofficially proposed species of spirochetes that colonize the large intestine of different mammals and birds.¹² Seven *Brachyspira* species have been identified from swine.⁷ *Brachyspira hyodysenteriae* is the etiologic agent of swine dysentery, a well-known disease of pigs characterized, in the classical form, by severe mucohemorrhagic colitis.⁷ *Brachyspira pilosicoli* causes porcine intestinal spirochetosis, a less severe condition that resembles the early stages of swine dysentery.⁷ *Brachyspira innocens* is considered a non-pathogenic species; *B. intermedia* and *B. murdochii* are variably associated with diarrheal disease.⁷ In 2007, a new species within the genus, “*B. suanatina*,” was isolated from pigs and mallard ducks, and clinical signs and lesions compatible with swine dysentery were shown in experimentally infected pigs.¹⁸ Similarly, in 2012, atypical *Brachyspira* isolates were isolated from outbreaks of mucohemorrhagic colitis indistinguishable from swine dysentery in the United States and Canada. Phylogenetic analysis of these isolates showed that they represent a novel species for which the name “*B. hampsonii*” was proposed.⁵ In contrast to “*B. suanatina*,” this new proposed species has emerged as an important swine pathogen in the United States and Canada, even replacing *B. hyodysenteriae* as the predominant etiologic agent of swine dysentery.²¹ It has also been described in European pigs,^{11,19} as well as in wild waterfowl in the Canadian Arctic²¹ and in Spain.¹³

Definitive detection of *Brachyspira* infection is commonly based on the isolation of the bacteria from colonic tissues or feces using selective media containing blood and antimicrobials incubated under an anaerobic atmosphere.²² The degree of hemolysis is normally used for presumptive identification; *B. hyodysenteriae*, “*B. suanatina*,” and “*B. hampsonii*” are strongly β -hemolytic, whereas *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *B. intermedia*, and *B. murdochii* are normally weakly β -hemolytic.^{5,7}

Identification of pathogenic *Brachyspira* species is generally completed using specific molecular methods such as the polymerase chain reaction (PCR) assay, either directly from feces or colonic tissues or from primary cultures.¹⁵ However, false-positive results with “*B. hampsonii*” isolates in supposedly specific PCR assays for the *tlyA* gene of *B. hyodysenteriae* and for the *nox* and *23S ribosomal RNA (rRNA)* genes of *B. intermedia* have been described.¹¹ We evaluated cross-reactivity in some of the currently available species-specific PCR assays for identification of swine *Brachyspira* species using a collection of “*B. hampsonii*” isolates of avian origin.

Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Veterinary Faculty, University of León, León, Spain.

¹Corresponding author: Luis M. Aller-Morán, Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n. 24071 León, Spain. lallm@unileon.es

Table 1. Details on the *Brachyspira* species-specific PCR assays used in this study.

Target gene/Size of amplified fragment (bp)	Primers: forward (for) and reverse (rev) 5'–3'	Specificity	Reference
<i>16S</i>			
823	for-AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC rev-GCACCTATGTTAAACGTCCTTG	<i>B. pilosicoli</i>	16
<i>23S</i>			
1,301	for-CGGTAAGTGATGTACTTG rev-AGCCTCAACCTTAAAGA	<i>B. hyodysenteriae</i>	10
1,027	for-CCGTTGAAGGTTTACCGTG rev-CGCCTGACAATGTCCGG	<i>B. intermedia</i>	10
<i>nox</i>			
1,004	for-AGAGTTTGAAGACACTTATGAC rev-ATAAACATCAGGATCTTTGC	<i>B. intermedia</i>	16
435	for-GCTAGTCCTGAAAGTTTGAGAGG rev-AGCTTCATCAGTGATTTCTTTATCA	<i>B. hyodysenteriae</i>	2
821	for-TTAAAACAAGAAGGAECTACT rev-CTAATAAACGTCTGCTGC	<i>B. hyodysenteriae</i>	1
729	for-CCTGAAAGTTTAAAGCTG rev-CGATGTATTCTTCTTTCC	<i>B. innocens</i> and <i>B. murdochii</i>	1
<i>tylA</i>			
526	for-GCAGATCTAAAGCACAGGAT rev-GCCTTTTGAAACATCACCTC	<i>B. hyodysenteriae</i>	18

Bacterial isolates used in our study included 10 “*B. hamptonii*” isolates, the reference strain B204 of *B. hyodysenteriae* (ATCC 32121), the type strain P43/6/78 of *B. pilosicoli* (ATCC 51139), and 3 isolates from the bacterial collection held at the University of León identified as *B. murdochii*, *B. intermedia*, and *B. innocens* by PCR amplification and sequencing of the *nox* gene as described previously.¹ The “*B. hamptonii*” isolates were recovered from migratory wild waterfowl in Spain,¹³ and they are the only isolates reported of this species in Spain to date. Using multilocus sequence typing, 7 of the 10 isolates were classified in 3 of the 4 proposed genetic groups of “*B. hamptonii*” and showed a close relationship with the swine origin genotypes reported in Europe.¹⁴ Isolates were grown on sheep blood agar plates^a at 42°C in an anaerobic atmosphere.^b Genomic DNA was obtained from each isolate by boiling as described previously.¹³ Eight previously described species-specific PCR assays were evaluated (Table 1). Target genes included *nox*, *16S rRNA*, *23S rRNA*, and *tylA*. Of these targets, the *16S rRNA* and *23S rRNA* genes are usually recognized as more conserved among different *Brachyspira* species, whereas the *nox* gene seems to be less conserved and is the most frequently used target for the differentiation of *Brachyspira* species.^{1,22} The PCR assays were performed using a commercial kit^c in 50- μ L reaction mixtures and always included a positive and a negative control consisting of the specific *Brachyspira* species and ultrapure water, respectively. Each reaction was performed using primer and PCR conditions described previously.^{1,2,10,16,18} The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis and visualized by ultraviolet illumination in the presence of a

nucleic acid stain.^d The PCR reaction was classified, for each sample, as positive (strong band similar to positive control), weakly positive (weak band), or negative.

The *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. intermedia* isolates only yielded positive results in each relevant species-specific PCR (Table 2). However, some false-positive results were obtained when “*B. hamptonii*” isolates were tested in these species-specific PCR assays. The percentage of “*B. hamptonii*” isolates that give a false-positive result was 40–80% for the *B. intermedia*-specific PCRs, 10–80% for the *B. hyodysenteriae*-specific assays, and 20% for the *B. innocens*- and *B. murdochii*-specific PCR. On the other hand, the *B. pilosicoli*-specific PCR based on the amplification of the *16S rRNA* gene¹⁶ did not show any false-positive result when tested using “*B. hamptonii*” isolates, a finding that has been described previously with other *Brachyspira* species.⁴

Since the first description in 2012, “*B. hamptonii*” has emerged as a relevant swine pathogen in North America and is associated with a disease indistinguishable from classical swine dysentery caused by *B. hyodysenteriae*.^{5,7,20} Although “*B. hamptonii*” has been isolated from Belgian pigs imported to Germany¹⁹ and from 2 gilts brought from the Czech Republic to Belgium,¹¹ the actual distribution of the species in Europe is unknown. Several methods have been described for the detection or identification of “*B. hamptonii*”^{22,23}; however, in most laboratories, the diagnosis of swine dysentery is still supported by microbial culture and/or species-specific PCR for the identification of *B. hyodysenteriae*.^{22,23} According to our results, some of the most commonly used

Table 2. Results of *Brachyspira* species-specific PCR assays, by species and target gene.*

Isolate	Origin	GenBank accession	PCR assay								
			<i>B. hyodysenteriae</i>				<i>B. innocens</i> and <i>B. murdochii</i>		<i>B. intermedia</i>		<i>B. pilosicoli</i>
			<i>nox</i> ²	<i>nox</i> ¹	<i>23S</i> ¹⁰	<i>tlyA</i> ¹⁸	<i>nox</i> ¹	<i>23S</i> ¹⁰	<i>nox</i> ¹⁶	<i>16S</i> ¹⁶	
<i>“B. hamptonii”</i>											
AIS 8	Mallard	KF386039	+	–	–	+	–	–	+	–	
AIS 50	Goose	KF386054	+	–	–	–	–	+	+	–	
AIS 64	Mallard	KF386060	+	weakly +	–	+	–	+	+	–	
AIS 72	Mallard	KF386063	+	–	–	+	–	–	+	–	
AIS 85	Goose	KF386069	+	weakly +	–	+	–	–	+	–	
AIS 159	Goose	KF386073	+	–	+	–	–	+	+	–	
AIS 166	Goose	KF386078	+	–	–	+	–	+	+	–	
AIS 168	Goose	KF386079	–	–	–	–	+	–	–	–	
AIS 173	Goose	KF386082	–	–	–	–	+	–	–	–	
AIS 198	Goose	KF386086	+	–	–	+	–	–	+	–	
<i>B. hyodysenteriae</i> B204	Swine	U19610.1	+	+	+	+	–	–	–	–	
<i>B. pilosicoli</i> P43/6/78	Swine	AF060807	–	–	–	–	–	–	–	+	
<i>B. intermedia</i>	Swine		–	–	–	–	–	+	+	–	
<i>B. innocens</i>	Swine		–	–	–	–	+	–	–	–	
<i>B. murdochii</i>	Swine		–	–	–	–	+	–	–	–	

* Superscript numbers refer to the Reference list. + = positive (strong band similar to positive control); weakly + = weak band; – = negative.

B. hyodysenteriae-specific PCR assays are most likely to fail when differentiating between *B. hyodysenteriae* and “*B. hamptonii*” isolates, which could underestimate the real prevalence of this novel species.

In terms of the *B. hyodysenteriae*-specific PCR assays used on the “*B. hamptonii*” isolates, the most specific assay was based on the amplification of a 1,301-bp fragment located on the *23S rRNA* gene,¹⁰ and gave only 1 false positive. The next best performance was given by an assay based on the amplification of a 821-bp fragment of the *nox* gene,¹ with 2 weak false positives. These 2 weak false-positive results remained even when more stringent conditions were used, such as increasing the annealing temperature by 2°C. In contrast, 8 of 10 “*B. hamptonii*” isolates gave a positive result in the *B. hyodysenteriae*-specific PCR based on the amplification of a 435-bp fragment of the *nox* gene.² The proportion of false-positive results was also high using a PCR based on the amplification of a 521-bp fragment of the *tlyA* gene.¹⁸ According to our results, some of the evaluated species-specific PCR assays are of little use for the definitive identification of *B. hyodysenteriae* isolates when used at the conditions originally proposed. A similar cross-reaction was previously described for “*B. hamptonii*” isolates of porcine origin¹¹ using the PCR assay based on the amplification of the *tlyA* gene. False-positive results in *B. hyodysenteriae*-specific PCR assays based on the amplification of the *tlyA* and *nox* genes have also been described for some avian isolates identified as *B. alvinipulli*.⁹

In some laboratories, *Brachyspira* spp. isolates are further characterized using phenotypic methods. The isolation of

Brachyspira spp. from clinical samples is a time-consuming and technically challenging procedure.⁷ Furthermore, *B. hyodysenteriae* and “*B. hamptonii*” isolates have similar phenotypic profiles. The only phenotypic characteristic that can be used to differentiate the species is the lack of indole production in the case of “*B. hamptonii*” isolates.⁵ However, indole-negative *B. hyodysenteriae* isolates have been reported.^{5,8}

Cross-reactions with “*B. hamptonii*” were also very common in the 2 evaluated *B. intermedia*-specific PCR assays, a problem that has been described previously.^{3,11,19} These assays were based on the amplification of a 1,027-bp fragment of the *23S rRNA* gene¹⁰ (4 of 10 “*B. hamptonii*” isolates were positive) or a 1,004-bp fragment of the *nox* gene¹⁶ (8 of 10 of the “*B. hamptonii*” isolates were positive). *Brachyspira intermedia* is an extremely diverse indole-positive and weakly hemolytic intestinal spirochete that includes a great variety of sequence types or clusters.¹⁷ It has been reported that *B. intermedia*-specific PCR based on the amplification of the *nox* gene fails to detect all strains within the species, and this lack of sensitivity has been attributed to the genetic heterogeneity of this species.¹⁷ The results of our study indicate that available *B. intermedia*-specific PCR assays should also be optimized in terms of specificity.

Only 2 of the evaluated isolates, identified as “*B. hamptonii*” AIS 168 and AIS 173, yielded a positive result in the specific *B. innocens*- and *B. murdochii*-specific PCR evaluated. However, these results must be considered very carefully. These 2 isolates were classified as “*B. hamptonii*” based

on phenotypic characteristics and on the analysis of partial sequence of the *nox* gene, but they clustered with *B. innocens* and *B. murdochii* when *16S rRNA* gene sequence was taken into account.¹³ In the first recognition of “*B. hampsonii*” in wild European waterfowl, genomic rearrangements and recombination events were suggested as the explanation for the lack of correlation between the results obtained using different target genes.¹³ These events have been described when different species of spirochetes infect the same individual concurrently,^{6,18} particularly in avian hosts,^{9,13} making the identification of *Brachyspira* species even more difficult.

Misidentification of *Brachyspira* infections could occur very frequently.^{11,19} In the United States, it has been reported that >50% of the clinical *Brachyspira* isolates recovered from pig feces or intestines could not be identified at the species level using current PCR assays.^{5,6} Despite the low number of “*B. hampsonii*” isolates evaluated and their common avian origin, our results confirm that some of the currently available PCR assays for the identification of *Brachyspira* species could yield false-positive results, when used as initially described, given lack of detection of this novel proposed species. Our results suggest that PCR conditions should be carefully revised to increase specificity, and PCR results should be carefully interpreted if the amplified DNA products are not sequenced. In particular, *B. hyodysenteriae*- and *B. intermedia*-specific assays should be carefully evaluated for specificity and the inclusion of a “*B. hampsonii*”-specific PCR together with *B. hyodysenteriae*- and *B. pilosicoli*-specific assays is strongly recommended in routine panels for porcine colitis in post-weaning and fattening pigs.

Authors' note

Preliminary results were presented as a poster at the 6th European Symposium of Pig Health Management, Sorrento, Italy, 7–9 May, 2014.

Acknowledgments

We thank Gloria Fernández-Bayón for providing excellent technical assistance.

Authors' contributions

LM Aller-Morán contributed to conception and design of the study; contributed to acquisition, analysis, or interpretation of data; and drafted the manuscript. FJ Martínez-Lobo and A Carvajal contributed to conception and design of the study; contributed to acquisition, analysis, or interpretation of data; and critically revised the manuscript. P Rubio contributed to conception and design of the study and critically revised the manuscript. All authors gave final approval and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions relating to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Sources and manufacturers

- a. Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, United Kingdom.
- b. Bugbox anaerobic workstation, Ruskinn Technology Ltd., Bridgend, South Wales, United Kingdom.

- c. Invitrogen Platinum hot start PCR master mix, Thermo Fisher Scientific Inc., Madrid, Spain.
- d. GelRed, Biotium Inc., Hayward, CA.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

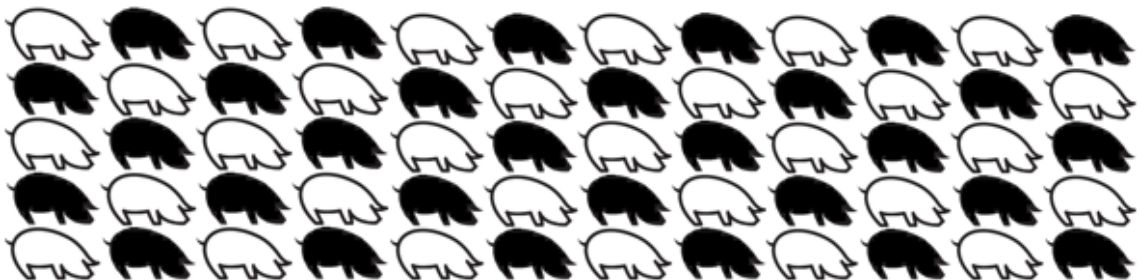
The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project AGL 2010-18804).

References

1. Atyeo RF, et al. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. *Vet Microbiol* 1999;67:47–60.
2. Barth S, et al. Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. *Vet Microbiol* 2012;155:438–443.
3. Burrough ER, et al. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest* 2012;24:1025–1034.
4. Calderaro A, et al. Comparative evaluation of molecular assays for the identification of intestinal spirochaetes from diseased pigs. *Vet Microbiol* 2006;118:91–100.
5. Chander Y, et al. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated “*Brachyspira hampsonii*”. *J Vet Diagn Invest* 2012;24:903–910.
6. Clothier KA, et al. Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *J Vet Diagn Invest* 2011;23:1140–1145.
7. Hampson DJ, et al. Emergence of *Brachyspira* species and strains: reinforcing the need for surveillance. *PHM* 2015;1:8.
8. Hidalgo A, et al. Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiol Infect* 2010;138:76–85.
9. Jansson DS, et al. Phenotypic and genetic diversity among intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) in free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*) sampled in southern Sweden. *Syst Appl Microbiol* 2011;34:566–575.
10. Leser TD, et al. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes* 1997;11:363–372.
11. Mahu M, et al. First isolation of “*Brachyspira hampsonii*” from pigs in Europe. *Vet Rec* 2014;174:47.
12. Mapple LJ, et al. *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. *Vet Microbiol* 2014;168:245–260.
13. Martínez-Lobo FJ, et al. First identification of “*Brachyspira hampsonii*” in wild European waterfowl. *PLoS One* 2013;8:e82626.
14. Mirajkar NS, et al. Molecular epidemiology of novel pathogen “*Brachyspira hampsonii*” reveals relationships between diverse genetic groups, regions, host species and other pathogenic and commensal *Brachyspira* species. *J Clin Microbiol* 2015;53:2908–2918.

15. Patterson AH, et al. Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of “*Brachyspira hampsonii*”-associated colitis. *BMC Vet Res* 2013;9:137.
16. Phillips ND, et al. A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. *Vet Microbiol* 2005;105:189–198.
17. Phillips ND, et al. *Brachyspira intermedia* strain diversity and relationships to the other indole-positive *Brachyspira* species. *Vet Microbiol* 2010;143:246–254.
18. Råsbäck T, et al. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated “*Brachyspira suanatina*” sp. nov. *Environ Microbiol* 2007;9:983–991.
19. Rohde J, et al. “*Brachyspira hampsonii*” clade I isolated from Belgian pigs imported to Germany. *Vet Microbiol* 2014;168:432–435.
20. Rubin JE. Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with “*Brachyspira hampsonii*” strain 30446. *PLoS One* 2013;8:e57146.
21. Rubin JE, et al. Isolation and characterization of *Brachyspira* spp. including “*Brachyspira hampsonii*” from lesser snow geese (*Chen caerulescens caerulescens*) in the Canadian Arctic. *Microb Ecol* 2013;66:813–822.
22. Warneke HL, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of *Brachyspira* species isolated from swine, including the newly described “*Brachyspira hampsonii*”. *J Vet Diagn Invest* 2014;26:635–639.
23. Wilberts BL, et al. Comparison of culture, polymerase chain reaction, and fluorescent in situ hybridization for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and “*Brachyspira hampsonii*” in pig feces. *J Vet Diagn Invest* 2015;27:41–46.

4.-RESUMEN GLOBAL Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS



4.1. Búsqueda de nuevas opciones antimicrobianas en el control de la disentería porcina.

De acuerdo a la información proporcionada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), a través del Centro de Información online de Medicamentos Veterinarios (CIMA Vet), en la actualidad, los antibióticos con indicación para el tratamiento y control de la DP se agrupan en cuatro familias e incluyen dos pleuromutilinas, la tiamulina y la valnemulina, un macrólido, la tilvalosina, una lincosamida, la lincomicina y tetraciclinas como la clortetraciclina. La tilosina, un macrólido indicado anteriormente con este fin, no está recomendado en la actualidad para el tratamiento de la DP en nuestro país, a consecuencia de la elevada frecuencia de la resistencia entre los aislados de *B. hyodysenteriae*, tal como figura en la ficha técnica de los productos que incluyen este antibiótico.

Por otra parte, como hemos mencionado en el capítulo de introducción, la resistencia a estos antibióticos en los aislados de campo de *B. hyodysenteriae* es un fenómeno relativamente común y en clara progresión en nuestro país (Hidalgo *et al.* 2011; Álvarez *et al.* 2016; Álvarez-González *et al.* 2016). Así, el análisis de los datos más recientes de CMI obtenidos con aislados de *B. hyodysenteriae* recuperados de brotes de DP en nuestro país demuestra que la concentración que inhibe al 50 % de los aislados o CMI₅₀ es significativamente superior al punto de corte propuesto por el CLSI para la tiamulina, la valnemulina y la tilosina mientras que es similar a este valor para la lincosamida (Álvarez *et al.* 2016).

Ambos factores, la limitada disponibilidad de antibióticos con indicación para el tratamiento de la DP y el incremento de las resistencias a estos antimicrobianos descrita en la última década en España y en la mayoría de países con producciones importantes de porcino hacen que la búsqueda de nuevas opciones antimicrobianas frente a esta enfermedad y la monitorización de las resistencias sean temas de importancia capital para el sector porcino en el momento actual.

El primero de nuestros trabajos se encuentra en esa línea, tratando de aportar conocimiento en este proceso de identificación de nuevas moléculas con actividad anti-*Brachyspira*. Las observaciones realizadas a nivel de campo por profesionales veterinarios implicados en sanidad porcina relativas a la mejoría de los cerdos afectados por disentería tras el tratamiento con flumequina en agua de bebida, despertó nuestro interés por este antibiótico, una fluoroquinolona, como posible alternativa en el tratamiento de esta enfermedad.

Las quinolonas se usan muy poco en la industria porcina en comparación con otros antibióticos (De Briyne *et al.* 2014) y ninguna quinolona está indicada para el tratamiento de la DP. La flumequina se emplea para el tratamiento de diferentes enfermedades causadas por bacterias Gram negativas en diversas especies animales y, en el caso del porcino, está indicada para el tratamiento de colibacilosis, enteritis, gastroenteritis y, de forma general, en enfermedades neonatales.

Las quinolonas son antimicrobianos sintéticos incluidos en las listas de antimicrobianos de importancia crítica o elevada para la OMS y la OIE (OIE 2015; WHO 2017). Las denominadas quinolonas de primera generación, representadas habitualmente por el ácido nalidíxico, se introdujeron en medicina humana en 1962 para el tratamiento de infecciones urinarias causadas por bacterias Gram negativas (Bisacchi 2015). Sin embargo, el uso de estas moléculas en medicina humana se generalizó a partir de los años 80 con la aparición de las fluoroquinolonas que incorporan un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo de piperazina en el carbono 7 (Correia *et al.* 2017) y que incluyen quinolonas de segunda, tercera y cuarta generación. Estos

cambios incrementan su rango de actividad biológica, mejorando la capacidad de entrada en las células de bacterias Gram positivas así como sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Tras más de 3 décadas de utilización en medicina humana, la ciprofloxacina, una fluoroquinolona de segunda generación se mantiene como uno de los antimicrobianos más frecuentemente prescritos y de importancia crítica de acuerdo a la OMS (WHO 2017). Por su parte, la flumequina fue la primera fluoroquinolona introducida en el mercado aunque su empleo en medicina humana fue muy limitado debido a su escasa distribución y actividad en comparación con otras moléculas descritas poco después, quedando su uso restringido a la medicina veterinaria. En este sentido, cabe destacar que la OIE la clasifica como agente antimicrobiano veterinario de importancia elevada y no como agente de importancia crítica (OIE, 2015), hecho relevante a la hora de plantear su posible utilización con fines profilácticos o metafilácticos en veterinaria.

En lo que respecta a su mecanismo de acción, las fluoroquinolonas inhiben la actividad de dos topoisomerasas bacterianas de tipo II, la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Ambas enzimas están implicadas en la síntesis de ADN, la transcripción y la división celular y son esenciales para los procesos de replicación y transcripción (Leyva & Leyva 2008; Correia *et al.* 2017). Las quinolonas actúan mediante su unión reversible a las hebras de ADN y a determinados puntos de las enzimas, favoreciendo la creación de complejos estables entre la enzima, el ADN y la molécula de antimicrobiano. La no reversión de estos complejos inicia procesos que desembocan, finalmente, en la lisis celular (Leyva & Leyva 2008).

La resistencia a fluoroquinolonas está relacionada, principalmente, con la conformación de las enzimas implicadas en su mecanismo de acción, habiéndose descrito cinco mecanismos principales: la alteración de la subunidad A de la girasa, la alteración de la subunidad B de esta misma enzima, la alteración de la topoisomerasa, la dificultad de paso del antibiótico a través de la pared bacteriana y el exceso de salida del antimicrobiano de la célula bacteriana a consecuencia de cambios en los mecanismos que regulan el flujo en la membrana. Todos ellos son consecuencia de mutaciones en los genes que codifican para las estructuras implicadas (Leyva & Leyva, 2008). En el caso concreto de la flumequina, los trabajos señalan que la resistencia es consecuencia de mutaciones puntuales en la *parC*, en el gen que codifica para la topoisomerasa, una de las regiones determinantes de resistencias a quinolonas (Vicca *et al.* 2007). Cabe destacar que tanto el mecanismo de acción como los mecanismos de resistencia bacteriana para las quinolonas son completamente diferentes a los descritos para los principales antibióticos usados actualmente para el tratamiento y control de la DP. Este hecho hace particularmente interesante el estudio de las CMI de este antibiótico frente a *B. hyodysenteriae*.

En nuestro trabajo, para evaluar la sensibilidad antibiótica *in vitro* se utilizaron 48 aislados de *B. hyodysenteriae*, seleccionados por nosotros a partir de la colección disponible en el cepario del grupo de investigación Digesporc. Los aislados habían sido recuperados de 48 explotaciones afectadas de DP, distribuidas por las principales regiones productoras de ganado porcino del país e incluyeron aislados resistentes a tiamulina (CMI \geq 2 $\mu\text{g/ml}$) así como aislados sensibles a este antibiótico (CMI $<$ 2 $\mu\text{g/ml}$).

Para la determinación de la CMI se empleó el método de microdilución en caldo de cultivo. En el caso de las bacterias del género *Brachyspira* se han descrito dos métodos de determinación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*, la dilución en agar y la dilución en caldo de cultivo (Mirajkar & Gebhart 2016). El primero es el método empleado clásicamente para determinar la sensibilidad antibiótica en bacterias anaerobias y es una técnica muy laboriosa que requiere preparar placas de cultivo con diferentes concentraciones de antibióticos. Necesita de un

estricto control de la caducidad de los lotes de placas elaboradas y de las condiciones de conservación de las mismas, así como incluir cepas control en cada lote procesado con el fin de homogeneizar al máximo los resultados. Es necesario incubar un ingente número de placas en condiciones de anaerobiosis con los consiguientes gastos en jarras o cámaras de anaerobiosis y en generadores de anaerobiosis o gases. Además, debido a la toxicidad del oxígeno para las especies del género *Brachyspira*, a la hora de procesar varias muestras para determinar su sensibilidad antibiótica mediante esta técnica es necesario fraccionar el trabajo para evitar que los aislados ya procesados puedan verse afectados por largos periodos de exposición al oxígeno antes de introducirlos en las condiciones anaerobias. Finalmente, la interpretación de los resultados, en ocasiones, puede ser complicada (Karlsson 2001; Mirajkar & Gebhart 2016).

La técnica de dilución en caldo de cultivo o, más recientemente, la microdilución en caldo es la técnica empleada habitualmente para la monitorización de las resistencias en aislados de *Brachyspira* spp. (Karlsson *et al.* 2003). Este método minimiza muchos de los problemas descritos para la técnica de dilución en agar; requiere poco espacio, permite procesar varios aislados simultáneamente y simplifica el proceso de interpretación de los resultados (Mirajkar & Gebhart 2016). Además, en la actualidad existen placas de microdilución con diferentes concentraciones de los antibióticos más usados frente a la DP disponibles comercialmente para la realización de esta técnica. Cabe destacar que los resultados de sensibilidad antibiótica obtenidos mediante la técnica de dilución o microdilución en caldo suelen ser de un orden de magnitud inferior a los obtenidos mediante dilución en agar para los mismos aislados (Wayne 2015).

Nuestros resultados mostraron que todas las cepas incluidas en el estudio fueron inhibidas por alguna de las concentraciones de flumequina valoradas, con un rango que varió entre los 6,25 µg/ml para el aislado más sensible y los 200 µg/ml para el aislado más resistente. Los valores de la CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron 50 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente. Con el fin de conocer la actividad bactericida de esta molécula se determinó, para cada uno de los aislados, la CMB, comprobándose que existía una cierta correlación entre los dos valores. La CMB fue para la gran mayoría de los aislados un logaritmo en base dos superior a la CMI, oscilando en un rango entre 12,5 µg/ml y 200 µg/ml. Un resultado similar para la comparación de los valores de CMI y CMB ha sido descrito para otras fluoroquinolonas como el marbofloxacino (Andraud *et al.* 2011).

Es importante indicar que las CMI y CMB determinadas para *B. hyodysenteriae* en el presente trabajo fueron muy superiores a las descritas para otros patógenos intestinales como *Salmonella enterica* o *E. coli*, con valores de CMI₉₀ próximos a 1 µg/ml (Mevius *et al.* 1990a). De acuerdo a la información proporcionada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), los valores de CMI₅₀ para flumequina en aislados de *E. coli*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Proteus* spp. y *Peptostreptococcus* spp. oscilan entre 0,33 µg/ml y 32 µg/ml, siendo *E. coli* el microorganismo más sensible. Aunque las características patogénicas y la localización dentro del tracto digestivo de estos microorganismos varían, haciendo difícil establecer comparaciones, los resultados obtenidos hacen difícil pensar en la flumequina como un antimicrobiano de elección para el tratamiento de la DP.

Debe tenerse en cuenta que la eficacia de los antibióticos empleados para el tratamiento de la DP está determinada por su biodisponibilidad a nivel del intestino grueso, donde deben ejercer su acción contra *B. hyodysenteriae* (Burch 1982). Los datos de la EMA indican que tras la administración de flumequina por vía intramuscular y a una dosis de 15 mg/kg, las concentraciones medias que se alcanzan a las 12 horas en músculo, piel, hígado o riñón son de 194, 190, 448 y 1879 µg/kg, respectivamente. Estas concentraciones descienden a valores entre

50 y 450 µg/ml a las 24 horas de la administración. En este mismo sentido, Villa *et al.* (2005) demostraron que la biodisponibilidad de la flumequina tras la administración por vía intramuscular en cerdos es muy elevada. En lo que respecta a la administración por vía oral se ha comprobado que la absorción es rápida y eficiente, con una biodisponibilidad elevada, próxima al 60 % en pollos broiler (Anadón *et al.* 2008) y entre el 80 y el 100 % en terneros (Mevius *et al.* 1990b). Sin embargo, no se dispone de estudios específicos de farmacocinética de la flumequina en el cerdo que nos permitan conocer las concentraciones alcanzadas a nivel de intestino grueso tras la administración oral o sistémica de este antibiótico.

Dado el elevado valor de CMI detectado para los aislados de *B. hyodysenteriae* evaluados, cabe preguntarse por las posibles razones que justificarían la mejoría observada a nivel de campo en animales afectados de DP y tratados con flumequina en el agua de bebida. Aparte de la propia actividad anti-*Brachyspira*, es importante mencionar que muchas otras bacterias de la microbiota podrían verse afectadas. En este sentido se ha demostrado que especies de los géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* o *Clostridium* (Harris *et al.* 1978; Whipp *et al.* 1997; Wilberts *et al.* 2013) participan activamente en la patogenia y la presentación clínica de la DP. Las CMI descritas para algunos de estos géneros bacterianos son muy inferiores a las determinadas por nosotros para los aislados de *B. hyodysenteriae* (Villa *et al.* 2005) por lo que algunos de estos géneros podrían verse afectados por concentraciones de flumequina en colon mucho más bajas que las necesarias para inhibir la multiplicación de *B. hyodysenteriae*, modificando el curso o la apariencia clínica de la DP. En este sentido, se ha descrito la gran importancia de la dieta en la aparición de cuadros clínicos de DP. Así, la adición de harina de soja y, por tanto, el incremento de la relación proteína:carbohidrato en el intestino grueso, que tendría como última consecuencia un aumento en las bacterias proteolíticas, induce un cuadro clínico más grave de DP (Jacobson *et al.* 2004). Por el contrario, se ha sugerido que las dietas altamente digeribles que reducen la actividad fermentativa en el intestino grueso pueden contribuir a inhibir la colonización por *B. hyodysenteriae* y, consecuentemente, a prevenir la aparición del cuadro clínico de la DP (Siba *et al.* 1996). Por último, se ha demostrado que la protección contra la enfermedad se logra mediante la suplementación con carbohidratos altamente fermentables (dietas prebióticas) (Thomsen *et al.* 2007). Todo ello indica que al igual que la dieta tiene un efecto sobre la microbiota y, por lo tanto, en el curso clínico de la DP, la alteración de esta por la aplicación de antibióticos eficaces frente a bacterias residentes con un papel sinérgico en el desencadenamiento de la DP podría explicar el efecto beneficioso observado tras el tratamiento con flumequina.

A modo de resumen, nuestros resultados indican que son necesarias concentraciones relativamente elevadas de flumequina para inhibir la multiplicación de *B. hyodysenteriae*, superiores a las CMI descritas para otros patógenos intestinales como *E. coli*. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que este antibiótico pueda actuar modificando la composición de la microbiota en el intestino grueso, eliminando bacterias con una acción sinérgica en la colonización y patogenia de *B. hyodysenteriae* que favorecen el desarrollo de la DP. Finalmente, sería de gran interés llevar a cabo estudios que permitan conocer la concentración a nivel de colon de la flumequina u otras fluoroquinolonas tras su administración por vía oral o sistémica en el cerdo.

4.2. Patogenicidad y transmisibilidad en cerdos de un aislado de *B. hamptonii* de origen aviar: infección experimental

Tradicionalmente, la única especie del género *Brachyspira* que producía hemólisis beta fuerte cuando se cultivaba *in vitro* en medios con sangre era *B. hyodysenteriae*, agente etiológico de la DP. Esta característica fenotípica permitía un diagnóstico presuntivo de la enfermedad, realizándose la confirmación mediante pruebas bioquímicas y/o moleculares. Sin embargo, a principios del presente siglo, en Escandinavia se aislaron a partir de heces de patos, espiroquetas con características fenotípicas similares a las de *B. hyodysenteriae*, fuertemente hemolíticas, pero que mostraban resultados negativos a la identificación mediante técnicas moleculares con técnicas específicas para esta especie (Jansson *et al.* 2004). Poco después, se obtuvieron algunos otros de estos aislados atípicos en granjas de cerdos con un cuadro clínico indistinguible de la DP en Suecia y Dinamarca. La secuenciación de los genes del ARNr 16S y el gen *nox* demostró que todos estos aislados presentaban secuencias muy similares y diferentes de las de *B. hyodysenteriae*, proponiéndose su inclusión como una nueva especie dentro del género denominada *B. suanatina* (Råsbäck *et al.* 2006; Råsbäck *et al.* 2007b). Los estudios de caracterización molecular empleando RAPD demostraron que estos nuevos aislados recuperados en explotaciones porcinas de Suecia eran un mismo clon. Utilizando un modelo de infección experimental similar al empleado con *B. hyodysenteriae*, se pudo demostrar que los aislados de *B. suanatina* recuperados de aves silvestres eran capaces de colonizar el intestino de cerdos inoculados y producir diarrea (Råsbäck *et al.* 2007b).

Paralelamente, en la segunda década del presente siglo, aunque en esta ocasión en Norteamérica, se produjo una reemergencia de los casos de DP en las explotaciones porcinas. En una proporción importante de estos casos los aislados recuperados presentaban características fenotípicas muy similares a las de *B. hyodysenteriae* aunque eran negativos cuando se empleaban técnicas moleculares para la identificación. De forma paralela a lo ocurrido con *B. suanatina*, se propuso que estos nuevos aislados se incluyeran en una nueva especie del género *Brachyspira*, denominada provisionalmente *B. hamptonii*. Los primeros trabajos demostraron experimentalmente que esta nueva espiroqueta fuertemente beta hemolítica era capaz de colonizar el intestino de los cerdos y de producir una enfermedad similar a la DP (Chander *et al.* 2012; Rubin *et al.* 2013b). Al contrario que *B. suanatina*, la distribución de *B. hamptonii* es global, habiéndose aislado de aves silvestres en España y en Canadá (Martínez-Lobo *et al.* 2013; Rubin *et al.* 2013a) y de cerdos en Estados Unidos, Canadá, Bélgica y Alemania (Mahu *et al.* 2014; Rohde *et al.* 2014). Más aún, se ha comprobado que un aislado atípico de *Brachyspira* spp. obtenido en el Reino Unido en los años 80 corresponde, en realidad, con esta nueva especie (Chander *et al.* 2012).

La irrupción de estas nuevas especies, capaces de producir en el cerdo una enfermedad indistinguible de la DP clásica, ha propiciado un cambio en la definición del agente etiológico de esta enfermedad. Actualmente ya no podemos asociar esta enfermedad únicamente a la infección por *B. hyodysenteriae*, siendo más correcto indicar que la DP es una enfermedad infecciosa del cerdo causada por espiroquetas fuertemente beta hemolíticas del género *Brachyspira* (La *et al.* 2016; Burrough 2017)

En España, hasta el momento actual, ni *B. suanatina* ni *B. hamptonii* han sido aisladas de heces de cerdos afectados de forma natural por DP. Sin embargo, como acabamos de mencionar, un estudio realizado con el fin de determinar las principales especies de espiroquetas presentes en las heces de aves acuáticas migratorias en la Reserva Natural de las lagunas de Villafáfila, en

Zamora, permitió identificar la presencia de *B. hamptonii* por primera vez en nuestro país (Martínez-Lobo *et al.* 2013). Este hallazgo tiene una importancia capital en la epidemiología de la DP en la región ya que las aves migratorias utilizan zonas como la Reserva Natural de las Lagunas de Villafáfila para pasar el invierno, volando largas distancia para dispersarse en los meses más cálidos y alcanzando diferentes países del norte de Europa (Almaraz *et al.* 2012). Todo ello, unido al tradicional papel que las aves desempeñan como reservorio de muchas de las especies del género *Brachyspira*, implica un riesgo muy importante para la dispersión de la infección y la transmisión de aislados entre áreas geográficas muy separadas entre sí (Jansson *et al.* 2011). En España, además, existe otro factor de riesgo adicional que eleva las posibilidades de que el ganado porcino se pueda infectar por espiroquetas intestinales excretadas por aves acuáticas y que es el modelo tradicional de producción del cerdo ibérico en extensivo. En estos sistemas los animales pasan largos periodos de tiempo al aire libre en la dehesa, donde conviven con animales silvestres y donde pueden contaminarse fácilmente con bacterias de las heces de aves acuáticas al compartir con estas las charcas donde beben.

La detección de *B. hamptonii* en ánades reales (*Anas platyrhynchos*) y ánsares comunes (*Anser anser*) de las Lagunas de Villafáfila constituyó la primera descripción de esta nueva especie en el continente europeo. Poco tiempo después, se confirmó su presencia en cerdos de origen belga importados a Alemania (Rohde *et al.* 2014) así como en dos reproductoras procedentes de la República Checa e importadas a Bélgica (Mahu *et al.* 2014). Además, cabe destacar que prácticamente de forma simultánea al hallazgo realizado en España, se describió la presencia de *B. hamptonii* en poblaciones de gansos blancos del ártico (*Chen caerulescens*), en Canadá (Rubin *et al.* 2013a), siendo, por el momento, las aves migratorias el único reservorio propuesto para esta nueva especie del género *Brachyspira*. Teniendo en cuenta el riesgo que suponen las aves migratorias como posible fuente de infección para las explotaciones porcinas y, muy particularmente, para las explotaciones porcinas extensivas en nuestro país como acabamos de mencionar, nos planteamos la realización de una infección experimental con el fin de determinar si estos aislados de *B. hamptonii*, fuertemente hemolíticos y de origen aviar eran capaces de colonizar el intestino grueso del cerdo y de producir lesiones y desarrollar una enfermedad similar a la DP.

Previamente a nuestra infección experimental, Rubin *et al.* fueron los primeros en llevar a cabo un desafío experimental inoculando cerdos con un aislado de *B. hamptonii* de origen aviar y recuperado de gansos del Ártico (Rubin *et al.* 2013a). Sus resultados permitieron demostrar que este aislado era capaz de colonizar el intestino grueso del cerdo, demostrando la excreción de la bacteria en heces hasta 14 días tras la inoculación, aunque no se observaron signos clínicos de DP en los cerdos desafiados. También con anterioridad a nuestro estudio, se habían llevado a cabo infecciones experimentales empleando aislados de origen porcino (Rubin *et al.* 2013b) en los Estados Unidos, comprobándose que causaban un cuadro de diarrea mucohemorrágica indistinguible de la forma clínica clásica de la DP.

Un aspecto relevante en el diseño del experimento fue el relativo a la selección del aislado a emplear. Es importante conocer que los estudios de caracterización molecular de *B. hamptonii* han demostrado que se trata de una población heterogénea. Ya desde las primeras descripciones se pudieron distinguir dos clados bien diferenciados en esta especie (Chander *et al.* 2012) y estudios posteriores han demostrado la existencia de, al menos, tres grupos genéticos dentro de la especie, dos de los cuales se corresponden con los antiguos clados descritos (Mirajkar *et al.* 2015). Los resultados obtenidos en aves migratorias en nuestro país indicaban que en esta población circulaban los dos clados inicialmente descritos

(Martínez-Lobo *et al.* 2013). Teniendo que en cuenta que las limitadas infecciones experimentales que se habían llevado a cabo cuando nos planteamos nuestra investigación habían empleado para el desafío aislados del clado II (Rubin *et al.* 2013a; Rubin *et al.* 2013b), decidimos utilizar para el desafío el aislado identificado como AIS50 que había sido clasificado en este mismo clado en base a los resultados obtenidos en la secuenciación del gen *nox* (Martínez-Lobo *et al.* 2013). El hecho de que existieran resultados contrapuestos en lo que respecta al cuadro clínico y lesional asociado a la infección por aislados de este clado en función de su origen, porcino y aviar, hizo que orientásemos nuestras preguntas hacia la especie de origen del aislamiento y que no introdujésemos una nueva variable relativa al clado bacteriano implicado. Cabe mencionar que la capacidad de los aislados del clado I de origen porcino para causar colitis y diarrea mucohemorrágica fue demostrada poco tiempo después del inicio de nuestro experimento (Costa *et al.* 2014a).

Para el desafío experimental empleamos un total de 11 cerdos de 7 semanas de edad que separamos inicialmente en 2 grupos, un grupo control con 6 animales y un grupo infectado con 5 animales. La elección de animales de 7-8 semanas de edad se realizó teniendo en cuenta que, en condiciones de campo, las colitis y otros procesos digestivos son particularmente frecuentes a esta edad, coincidiendo con cambios en la dieta y con el incremento de la ingesta. El desafío en los animales del grupo infectado se llevó a cabo inoculando por vía oral a los 5 cerdos de este grupo durante 3 días consecutivos con 100 ml de un cultivo en fase exponencial de *B. hampsonii*, reproduciendo las condiciones que habitualmente se emplean para las infecciones experimentales por *B. hyodysenteriae* en nuestro grupo investigador. Así, teniendo en cuenta nuestras experiencias previas con *B. hyodysenteriae* así como el hecho de que los signos clínicos asociados a la infección de cerdos con un aislado de *B. hampsonii* de origen aviar habían sido moderados (Rubin *et al.* 2013a) decidimos favorecer la infección induciendo disbiosis en los animales. Para ello, se modificó la dieta de todos los animales, grupo control y grupo infectado, mediante la suplementación del pienso empleado (pienso comercial de cebo y sin antibióticos) con soja al 50 % desde el primer día de inoculación y hasta el día 21 postinfección (Hampson *et al.* 2000; Jacobson *et al.* 2004). Con el fin de evaluar la transmisión de la infección de forma natural entre los cerdos, un día después de la última inoculación, 3 animales del grupo control fueron introducidos en el grupo infectado, manteniéndose en este grupo hasta el final del experimento en el día 50 postinfección para actuar como cerdos centinelas.

Los resultados obtenidos en este experimento fueron similares a los observados por Rubin *et al.* (2013a) empleando otro aislado de *B. hampsonii* de origen aviar. Los signos clínicos fueron moderados, con diarrea leve en la mayoría de los animales, entre los días 1 y 15 postinoculación. Sin embargo, al contrario que en el estudio de Rubin *et al.* (2013a), uno de los cerdos inoculados mostró signos agudos de DP con diarrea mucohemorrágica severa que condujo a la eutanasia del animal por razones éticas de bienestar en el día 12 postinoculación. La adición de un porcentaje elevado de soja al pienso que recibían los animales en nuestro experimento probablemente pudo favorecer la colonización y el desarrollo de una forma clínica más severa de la DP en este animal. Como ya hemos mencionado, numerosos estudios han demostrado que situaciones de estrés, determinados cambios en la dieta o la edad de los animales y su peso son factores que modifican la colonización del intestino del cerdo por parte de las espiroquetas y la gravedad de los procesos asociados (Whipp *et al.* 1979; Siba *et al.* 1996; Hampson *et al.* 2000; Jacobson *et al.* 2004; Thomsen *et al.* 2007). Aunque la disbiosis que pudimos ocasionar mediante la incorporación de una elevada concentración de proteína en la dieta fue la principal diferencia con el protocolo usado por el grupo de investigación canadiense, no podemos descartar que otras muchas variables como el aislado utilizado, el estrés de los animales asociado a las

diferentes manipulaciones o su estatus inmunitario entre otras, también pudieran haber influido en el desarrollo de un cuadro de DP aguda en nuestro experimento.

Es importante mencionar que los cerdos del grupo control, no inoculados, pero que recibieron la misma dieta con elevada concentración de proteína también presentaron una consistencia de las heces ligeramente alterada entre los días 3 y 14 del experimento. La calificación del grado de diarrea empleando un índice en una escala de 0 (sin diarrea) a 4 (diarrea con sangre) permitió demostrar que los animales del grupo inoculado presentaban más diarrea entre el día 0 y el día 14 postinfección (índice de diarrea acumulado promedio $12,4 \pm 0,68$) que los controles (índice de diarrea acumulado promedio $7,33 \pm 0,42$), aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Mediante cultivo en medio selectivo con antibióticos se demostró la excreción de *B. hamptonii* en todos los cerdos desafiados y en ninguno de los cerdos control. La excreción comenzó en el día 6 postinoculación en dos cerdos y, en la mayoría de los animales, fue intermitente prolongándose hasta la práctica finalización del experimento, con una muestra positiva en el día 38 del experimento y dos en el día 37. Este patrón de eliminación nos permite concluir que el aislado de *B. hamptonii* AIS50 empleado en el experimento es capaz de colonizar el intestino de los cerdos y ser eliminado en el ambiente. Además, teniendo en cuenta que el cuadro clínico asociado a esta infección fue moderado en 4 de los 5 cerdos inoculados, cabe pensar que sería posible que aislados similares pudieran circular de forma inadvertida en la población porcina de nuestro país.

Ocasionalmente, los cerdos tanto del grupo experimental como los controles excretaron espiroquetas débilmente hemolíticas que fueron identificadas como *B. murdochii* en algunos casos. Un resultado similar ha sido descrito en otras infecciones experimentales con *B. hamptonii* en cerdos, detectándose la excreción de *B. intermedia*, *B. murdochii* o, incluso, *B. pilosicoli* (Vanucci *et al.* 2013; Rubin *et al.* 2013b). Además, algunos de estos cultivos no pudieron ser identificados por las técnicas moleculares empleadas. En este sentido, se ha propuesto que estos fallos en la amplificación y/o secuenciación están asociados, generalmente, a la presencia de cultivos mixtos (Jansson *et al.* 2011; Patterson *et al.* 2013). Probablemente, esta misma razón explicaría la identificación, en nuestro estudio, de un cultivo con hemólisis fuerte como *B. murdochii* en uno de los cerdos del grupo experimental, puesto que este mismo animal eliminó *B. hamptonii* en los días inmediatamente anteriores y posteriores. De acuerdo a lo propuesto por otros autores, consideramos que es necesario llevar a cabo subcultivos sucesivos o incluso técnicas de filtrado con el fin de asegurar la obtención de cultivos puros de las diferentes especies del género *Brachyspira* cuando existan resultados inconcluyentes o contrapuestos entre las características genotípicas y fenotípicas de los aislados (Jansson *et al.* 2011; Martínez-Lobo *et al.* 2013; Patterson *et al.* 2013).

Adicionalmente al cultivo microbiológico, todas las muestras de heces fueron evaluadas mediante la observación en fresco con microscopio de contraste de fases, valorando el número de espiroquetas presentes en una escala que varió entre 0 (ausencia de espiroquetas), 1 (menos de 1 espiroqueta por campo), 2 (1 a 5 espiroquetas por campo), 3 (6 a 20 espiroquetas por campo) y 4 (más de 20 espiroquetas por campo). Esta observación directa demostró la presencia de un número bajo de espiroquetas, entre 1 y 5 por campo, en un número significativo de muestras que resultaron negativas mediante el cultivo bacteriológico. Este hecho también ha sido descrito anteriormente (Patterson *et al.* 2013) sin que se conozca si es consecuencia de una falta de viabilidad de los aislados o de una escasa sensibilidad de la técnica microbiológica. Cabe

destacar que todas las muestras, a excepción de una, con más de 6 espiroquetas por campo resultaron positivas al cultivo microbiológico.

La incorporación de tres cerdos centinelas al grupo infectado permitió demostrar la transmisión de la infección, produciéndose la colonización de al menos uno de estos animales. Este cerdo centinela eliminó *B. hampsonii* intermitentemente, de forma similar a los animales inoculados, y mostró diarrea acuosa durante 3 días coincidiendo con esta eliminación. Este punto tiene gran importancia en la epidemiología de la enfermedad porque no solo demuestra que el aislado inoculado es capaz de colonizar el intestino grueso del cerdo sino que también puede ser transmitido a cerdos sanos, pudiéndose propagar de esta manera en las explotaciones porcinas.

Tan solo el cerdo que sufrió DP aguda mostró lesiones macroscópicas típicas de esta enfermedad. La evaluación de las lesiones microscópicas en los cerdos sacrificados al final del experimento demostró diferencias estadísticamente significativas entre los cerdos control y los infectados en el número de células plasmáticas. El grado de inflamación y la profundidad de las criptas fueron parámetros que mostraron diferencias próximas a la significación estadística. De forma general, estas lesiones son similares a las descritas anteriormente por Rubin *et al.* (2013b) con otro aislado de origen aviar aunque en este caso no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos para ninguno de los parámetros evaluados. A nivel histológico, sólo observaron colonización superficial de la mucosa del colon mientras que, en nuestro desafío, la colonización profunda de las criptas fue demostrada en varios animales. Esta característica podría estar relacionada con la patogenicidad del aislado empleado o con el resto de factores que modifican la infección como la dieta.

La capacidad para colonizar el intestino y transmitirse entre cerdos que hemos demostrado para un aislado de origen aviar de esta nueva especie del género *Brachyspira* constituye un desafío para el sector porcino. La limitada patogenicidad demostrada en los dos desafíos realizados hasta el momento empleando aislados de aves podría, a priori, permitir la circulación de esta espiroqueta en granjas de cerdos sin ser detectada, infraestimándose su prevalencia. Adicionalmente y como veremos más adelante, la existencia de reacciones cruzadas en algunas de las técnicas moleculares puede conducir a diagnósticos erróneos. Aunque la información relativa a la resistencia antimicrobiana en aislados de *B. hampsonii* es limitada, los limitados trabajos disponibles señalan que los aislados de esta especie son muy sensibles a muchos de los antibióticos empleados habitualmente en el control de la DP (Martínez-Lobo *et al.* 2013; Mirajkar *et al.* 2016c), en contra de lo que ocurre en el caso de aislados de *B. hyodysenteriae*. Cabe destacar que un inadecuado diagnóstico etiológico puede conducir al empleo de herramientas no adecuadas para el control, especialmente en lo que respecta a los antibióticos y puede favorecer el desarrollo de resistencias antimicrobianas de manera innecesaria.

4.3. Nuevos retos en el diagnóstico de las infecciones por espiroquetas intestinales en cerdos

El primer paso para el control de las enfermedades infecciosas es la utilización de herramientas de diagnóstico que permitan confirmar la presencia del agente infeccioso involucrado, de manera directa o indirecta, en el paciente afectado. En el caso de la DP, aunque los signos clínicos, particularmente la diarrea mucohemorrágica, son relativamente característicos, no son patognomónicos y, además, suelen aparecer cuando el curso de la enfermedad está relativamente avanzado y no necesariamente en todos los casos (Hartnack *et al.* 2014). Por ello, es fundamental llevar a cabo un diagnóstico etiológico que permita diferenciar esta enfermedad de otras como la ileítis porcina, la salmonelosis, la trichurosis o la espiroquetosis intestinal porcina, fundamentalmente.

Además, este diagnóstico etiológico es fundamental para poder determinar la especie del género *Brachyspira* que está causando el proceso dado que en la actualidad se reconocen tres especies que pueden estar implicadas en la etiología de la DP. La importancia de un diagnóstico lo más preciso posible implica el posterior establecimiento de un tratamiento eficaz y la instauración de adecuados programas de control de la enfermedad (Hartnack *et al.* 2014).

Tradicionalmente en el diagnóstico de DP se han empleado muestras de heces que eran analizadas mediante técnicas de cultivo microbiológico basadas en medios selectivos. La confirmación de la especie implicada se realizaba, hasta hace unos años, mediante pruebas fenotípicas (Jensen 1997). Sin embargo, este sistema presentaba importantes problemas debido al lento crecimiento de las espiroquetas del género *Brachyspira* y a la necesidad de obtener el aislado en cultivo puro mediante la realización de pases sucesivos. Además, como hemos mencionado en el apartado relativo a la identificación fenotípica, en el capítulo de introducción de esta tesis, las escasas diferencias fenotípicas entre algunas de las especies más importantes del género y la presencia de aislados con fenotipos atípicos limitan en gran medida la utilidad de estas pruebas fenotípicas en el diagnóstico de la DP. Por todo ello, se han ido desarrollando diferentes técnicas moleculares que buscan obtener un diagnóstico certero, a nivel de especie, en las muestras analizadas, unido a un coste asumible y a una facilidad de aplicación en el laboratorio. La principal técnica molecular empleada con este fin es la técnica de PCR, basada en la amplificación y posterior detección mediante electroforesis en gel de agarosa, de fragmentos específicos de especie del ADN bacteriano (Saiki *et al.* 1985).

Aunque la técnica de PCR convencional puede llevarse a cabo de forma directa, permitiendo la detección de genes específicos en el ADN extraído de muestras de heces, la mayoría de los autores coinciden en señalar que para obtener unos resultados adecuados en cuanto a la sensibilidad analítica es recomendable intercalar una etapa intermedia de cultivo en medio selectivo y con sangre, habitualmente agar sangre suplementado con antibióticos, recogiendo el crecimiento bacteriano en zonas con hemólisis para la extracción del ADN y la realización de la PCR (Råsbäck *et al.* 2006; Mahu *et al.* 2014). Así, la PCR realizada directamente sobre ADN bacteriano extraído de muestras de heces proporciona valores de sensibilidad entre 1.000 y 10.000 veces inferiores a los obtenidos mediante la combinación de cultivo en medio selectivo y de test bioquímicos para la detección de espiroquetas del género *Brachyspira*, probablemente a consecuencia de la presencia de factores de inhibición de la PCR en las heces. Sin embargo, la comparación de la PCR sobre ADN extraído de cultivos en medio selectivo y del uso combinado de estos cultivos y test bioquímicos demostró una sensibilidad similar para ambos protocolos (Råsbäck *et al.* 2006). De forma general, el empleo de la combinación de cultivo y

PCR permite una identificación precisa a nivel de especie pero exige entre 3 y 6 días desde la recepción de las muestras hasta la obtención de los resultados.

Más recientemente, se han introducido técnicas de PCR a tiempo real que han demostrado una sensibilidad mayor que la mostrada por la PCR convencional o por el uso de cultivo y pruebas bioquímicas en la identificación de *B. hyodysenteriae* (Akase *et al.* 2009). Adicionalmente, el empleo de PCR a tiempo real ha permitido desarrollar técnicas cuantitativas que permiten la detección y cuantificación de espiroquetas en concentraciones muy bajas en heces y que se ven afectadas mínimamente por factores de inhibición presentes en las mismas (Borgström *et al.* 2017). Cuando estas técnicas se emplean para el diagnóstico de varias especies de espiroquetas simultáneamente nos referimos a PCR cuantitativas multiplex que permiten disminuir al máximo el tiempo necesario para obtener los resultados del diagnóstico de diferentes especies del género *Brachyspira*. Desde mediados de los años 2000 algunos laboratorios utilizan únicamente este tipo de técnicas para el diagnóstico de DP, evitando el cultivo rutinario de muestras de heces (Song & Hampson 2009b; Hampson *et al.* 2015). De hecho, actualmente ya existen PCRs multiplex y a tiempo real que permiten detectar directamente en las heces casi todas las especies del género *Brachyspira* que colonizan el intestino del cerdo (Borgström *et al.* 2017). Sin embargo y como principal limitación, cabe destacar que estas técnicas al no asociarse al aislamiento de la cepa implicada no permiten llevar a cabo estudios de sensibilidad antimicrobiana o estudios de caracterización molecular o bioquímica de los aislados.

Las secuencias diana más frecuentemente utilizadas para identificar mediante PCR especies del género *Brachyspira* son las de los genes ARNr 16S, ARNr 23S, *tlyA* y *nox* (La *et al.* 2003). Los genes ARNr 16S y ARNr 23S se consideran genes muy conservados dentro del género *Brachyspira*, presentando diferencias al comparar las secuencias de diferentes especies del 2 y 3 % respectivamente (Stanton *et al.* 1996; Leser *et al.* 1997). Por su parte, el gen *nox* se considera un gen relativamente conservado y las diferencias en las secuencias de las diferentes especies del género son próximas al 20 %, considerándose una diana particularmente apropiada para diferenciar especies dentro de este género. (Atyeo *et al.* 1999). El gen *tlyA* se ha asociado con la virulencia en aislados de *B. hyodysenteriae* (Ter Huurne *et al.* 1994; Barth *et al.* 2012) y es empleado como diana en técnicas de PCR específicas de esta especie (Plawinska *et al.* 2004; Råsbäck *et al.* 2006; Hidalgo *et al.* 2010a). Aunque la presencia de este gen ha sido descrita ocasionalmente en aislados de espiroquetas débilmente hemolíticas (Pati *et al.* 2010; Wanchanthuek *et al.* 2010), su homología con el gen *tlyA* de *B. hyodysenteriae* es moderada (82-83 %), permitiendo su empleo como diana en las PCR específicas de especie (Barth *et al.* 2012).

Sin embargo, existen algunas descripciones de falsos positivos en algunas de las PCRs específicas de las diferentes especies del género *Brachyspira*. Particularmente, la aparición de aislados de *B. hamptonii* se asoció a resultados falsos positivos en algunas de las técnicas diseñadas para la detección de *B. hyodysenteriae* o incluso de algunas otras espiroquetas como *B. intermedia* (Mahu *et al.* 2014), hecho que puede dar lugar a errores en el diagnóstico de brotes de DP. Con el fin de conocer las reacciones cruzadas asociadas a aislados de *B. hamptonii* en algunas de las PCR específicas de *Brachyspira* spp. más frecuentemente empleadas en el diagnóstico de las infecciones por espiroquetas intestinales en porcino llevamos a cabo el tercero de nuestros estudios.

En total se valoró la especificidad de especie en 8 PCRs diferentes, diseñadas y empleadas de forma rutinaria para la identificación de *B. hyodysenteriae* (4 PCRs), *B. pilosicoli* (1 PCR), *B. intermedia* (2 PCRs) y *B. innocens*/*B. murdochii* (1 PCR). Todas las técnicas fueron valoradas

empleando aislados de *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. murdochii*, *B. innocens* y *B. hampsonii* y todas ellas produjeron, como cabía esperar, resultados positivos cuando se valoraron con aislados de la especie correspondiente. Sin embargo y en coincidencia con resultados previos (Mahu *et al.* 2014), se detectaron reacciones falsas positivas cuando se valoraron con aislados de *B. hampsonii*. La proporción de falsos positivos más elevada se encontró con las PCRs específicas de *B. intermedia* (40-80 %) y de *B. hyodysenteriae* (10-80 %). Por su parte, no existieron reacciones inespecíficas en el caso de la PCR específica de *B. pilosicoli* valorada.

En el caso de las técnicas de PCR específicas para la detección de *B. hyodysenteriae*, existieron claras diferencias; tan solo se detectaron dos resultados calificados como positivos débiles en la PCR basada en la amplificación de un fragmento de 821 pb del gen *nox* (Atyeo *et al.* 1999) y un falso positivo en la PCR que amplifica un fragmento de 1.301 pb del gen 23S (Leser *et al.* 1997). Por el contrario, la proporción de falsos positivos fue elevada empleando una técnica basada en la amplificación de un fragmento de menor tamaño, 435 pb, del gen *nox* (Barth *et al.* 2012) o empleando la PCR que tiene como diana el gen *tlyA* (Råsbäck *et al.* 2007a), con un 80 y 60 % de resultados falsos positivos respectivamente. Cabe destacar que ambas dianas, el gen *tlyA* y el gen *nox* son muy utilizadas en el diagnóstico de rutina mediante PCR en casos de DP. Los resultados de nuestro estudio indican que se pueden estar cometiendo errores en el diagnóstico de brotes de DP, identificando aislados de *B. hampsonii* como *B. hyodysenteriae*, hecho que se ve favorecido por las similitudes en los fenotipos de ambas especies.

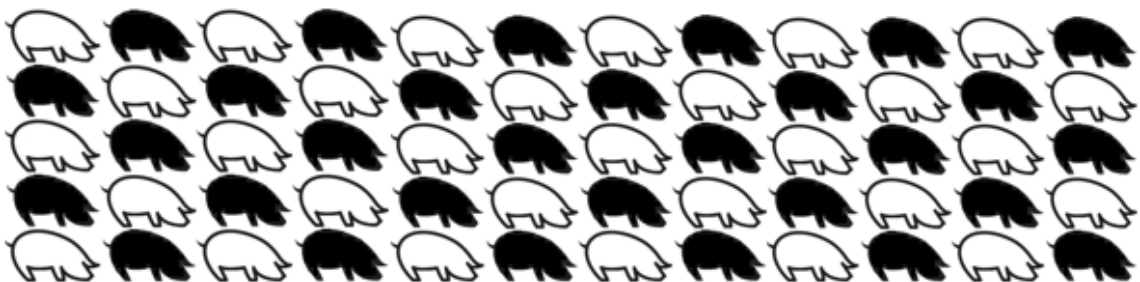
También fueron muy numerosos los falsos positivos observados en el caso de las PCRs específicas de *B. intermedia* (Leser *et al.* 1997; Phillips *et al.* 2005). En este caso, es importante conocer que se ha descrito que la enorme heterogeneidad de esta especie, hace que estas técnicas tengan una limitada sensibilidad para la detección de aislados de la propia especie (Phillips *et al.* 2010) y, a este hecho, se une la falta de especificidad demostrada en nuestro trabajo.

En el caso de la PCR diseñada para la detección del gen *nox* de *B. innocens* y *B. murdochii* (Atyeo *et al.* 1999), el porcentaje de falsos positivos fue bajo (20 %). Además, es importante señalar que los dos aislados que dieron este resultado falso positivo habían sido identificados como *B. hampsonii* mediante la secuenciación parcial del gen *nox* pero eran identificados como *B. innocens* o *B. murdochii* cuando se empleaban los resultados de secuenciación de un fragmento del gen *ARNr 16S* (Martínez-Lobo *et al.* 2013). Este resultado y la reacción cruzada detectada podrían ser consecuencia de un fenómeno de reorganización genómica y recombinación entre distintas especies de espiroquetas. Se ha descrito que este fenómeno se produce cuando varias de estas especies de espiroquetas conviven en el intestino de un mismo individuo, hecho que ocurre con relativa frecuencia en el intestino de las aves, consideradas por muchos autores como el principal reservorio de espiroquetas intestinales (Jansson *et al.* 2001; Råsbäck *et al.* 2007b; Clothier *et al.* 2011; Martínez-Lobo *et al.* 2013).

Aunque en la actualidad ya se dispone de PCRs específicas para la detección de *B. hampsonii* (Rubin *et al.* 2013b; Costa *et al.* 2014b; La *et al.* 2016; Burrough 2017), en muchos casos estas técnicas no han sido incorporadas de forma rutinaria en los protocolos de diagnóstico de la DP y tan solo aquellos aislados que proporcionan resultados no concluyentes son evaluados, generalmente mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen *nox*, para completar su identificación. Nuestros resultados permiten concluir que una cierta proporción de los casos de DP asociados a la infección por *B. hampsonii* podrían estar siendo identificados, incorrectamente, como *B. hyodysenteriae* o incluso como alguna otra especie de espiroqueta

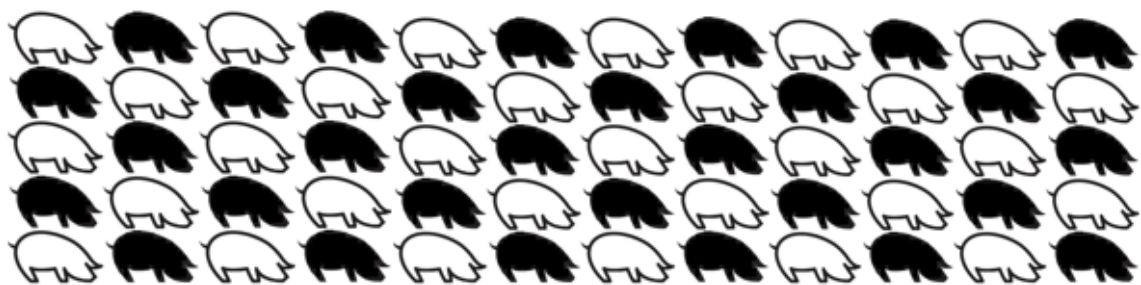
débilmente hemolítica como *B. intermedia*. Por ello, sería recomendable realizar cambios en estos protocolos para incorporar PCRs específicas para *B. hampsonii* o para substituir las técnicas específicas empleadas por aquellas que han demostrado una menor proporción de resultados falsos positivos.

5.-CONCLUSIONES



1. La flumequina, una fluoroquinolona, es capaz de inhibir la multiplicación de *B. hyodysenteriae* *in vitro*. Sin embargo, los valores de CMI y CMB determinados son muy superiores a los descritos para otros patógenos intestinales. Por ello, la mejoría descrita en cerdos afectados por DP tras su tratamiento con flumequina en agua de bebida no parece ser consecuencia de la acción directa del antibiótico sobre *B. hyodysenteriae*. Este efecto podría estar asociado a una acción indirecta sobre la microbiota intestinal del cerdo, inhibiendo a otros microorganismos que actúan de manera sinérgica facilitando la colonización del intestino grueso por parte de *B. hyodysenteriae*.
2. A pesar de que no existen en nuestro país descripciones clínicas de DP asociada a la infección por *B. hampsonii*, hemos demostrado la capacidad de un aislado de origen aviar de esta nueva especie bacteriana, recuperado de aves migratorias en una reserva natural del noroeste de España, para colonizar el intestino grueso de cerdos sanos, eliminándose de forma intermitente en las heces durante un periodo de tiempo superior a las 5 semanas. Además, los cerdos infectados fueron capaces de transmitir la infección a cerdos centinelas alojados en las mismas instalaciones. Las condiciones de cría en extensivo de ganado porcino en nuestro país facilitan el contacto con estas aves y podrían permitir la transmisión de esta nueva especie de forma directa o indirectamente a través de la contaminación del suelo, del alimento o del medio acuático con las heces de las aves infectadas.
3. La infección experimental de cerdos de 8 semanas de edad con un aislado de origen aviar de *B. hampsonii* asociada a una dieta con elevada concentración de proteína reprodujo el cuadro clínico característico de DP en un único animal del total de cinco inoculados. En el resto de cerdos existió infección, pero el cuadro clínico asociado fue moderado, con una cierta disminución de la consistencia de las heces, pero sin presencia de mucus o sangre. De acuerdo a este resultado, la detección de la circulación de aislados de *B. hampsonii* en la población porcina requiere de una vigilancia activa puesto que las investigaciones centradas en brotes de DP clásicos podrían infraestimar la verdadera incidencia de esta infección.
4. Las técnicas de PCR empleadas para la confirmación de las infecciones por diferentes especies del género *Brachyspira* que colonizan el intestino grueso del cerdo presentan diferentes proporciones de resultados falsos positivos cuando se valoran empleando aislados de *B. hampsonii*. Por ello, es fundamental la revisión de los protocolos de diagnóstico de estas infecciones que son empleados en los laboratorios para incluir, de forma rutinaria, técnicas moleculares que permitan la identificación de *B. hampsonii*. Estas técnicas deberán realizarse paralelamente a la detección de otras especies patógenas para el cerdo como *B. hyodysenteriae* o *B. pilosicoli*.
5. El diagnóstico de la DP causada por nuevas especies del género *Brachyspira* fuertemente hemolíticas como *B. hampsonii* presenta múltiples retos. Al hecho de estar causada por aislados fenotípicamente muy similares o idénticos a *B. hyodysenteriae* se unen las dificultades asociadas a la presencia de signos clínicos leves y a la existencia de reacciones cruzadas asociadas a *B. hampsonii* en algunas de las técnicas de PCR específicas de especie empleadas. Todo ello complica el diagnóstico certero y, consecuentemente, la instauración de tratamientos y estrategias de control adecuadas.

6.-BIBLIOGRAFÍA



- Achacha, M. & Messier, S., 1992. Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), pp.249–251.
- Adachi, Y., Kashiwazaki, M. & Kume, T., 1979. Comparison of antigenic properties among various strains of *Treponema hyodysenteriae*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 245(4), pp.527-533.
- Adachi, Y., Sueyoshi, M., Miyagaw, E., Minato, H. & Shoya, S., 1985. Experimental Infection of Young Broiler Chicks with *Treponema hyodysenteriae*. *Microbiology and Immunology*, 29(8), pp.683-688.
- Akase, S., Uchitani, Y., Sohmura, Y., Sohmura, Y., Tatsuta, K., Sadamasu, K. & Adachi, Y., 2009. Application of real time PCR for diagnosis of Swine Dysentery. *The Journal of veterinary medical science*, 71(3), pp.359–362.
- Albassam, M., Olander, H.J., Thacker, H.L. & Turek, J.J., 1985. Ultrastructural characterization of colonic lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*. *Canadian journal of comparative medicine*, 49(4), pp.384–390.
- Almaraz, P., Green, A.J., Aguilera, E., Rendón, M.A. & Bustamante, J., 2012. Estimating partial observability and nonlinear climate effects on stochastic community dynamics of migratory waterfowl. *Journal of Animal Ecology*, 81(5), pp.1113–1125.
- Álvarez, L., Martínez-Lobo, F.J., Aller-Morán, L.M., Naharro, G., Carvajal, A., Rubio, P., 2013. Antimicrobial susceptibility of 78 isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* recovered from swine dysentery outbreaks in Spain during 2011 & 2012. En: *Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*, Guildford, United Kingdom, Poster, pp.82.
- Álvarez, L., Miranda, R., Marca, J., Rubio, P. & Carvajal, A., 2016. Antimicrobial resistance trends among *Brachyspira* isolates recovered from swine dysentery outbreaks in Spain. En: *Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*, Hannover, Germany, Poster, P19.
- Álvarez-González, L., García-Díez, M., Marca-Puig, J., Carvajal-Urueña, A., Rubio-Nistal, P., 2016. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Spanish pig farms from 2011 to 2015. En: *Proceedings of the 24th International Pig Veterinary Society Congress & 8th European Symposium of Porcine Health Management*, Dublin, Ireland, Poster.
- Alvarez-Ordóñez, A., Martínez-Lobo, F.J., Arguello, H., Carvajal, A. & Rubio, P., 2013. Swine dysentery: Aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(5), pp.1927–1947.
- Anadón, A., Martínez, M.A., Martínez, M., De la Cruz, C., Díaz, M.J. & Martínez-Larrañaga, M.R., 2008. Oral bioavailability, tissue distribution and depletion of flumequine in the food producing animal, chicken for fattening. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), pp.662–670.
- Andraud, M., Chauvin, C., Sanders, P. & Laurentie, M., 2011. Pharmacodynamic modeling of *in vitro* activity of marbofloxacin against *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), pp.756–761.

- Atyeo, R.F., Oxberry, S.L. & Hampson, D.J., 1996. Pulsed-field gel electrophoresis for sub-specific differentiation of *Serpulina pilosicoli* (formerly '*Anguillina coli*'). Federation of European Microbiological Societies. *Microbiology Letters*, 141(1), pp.77–81.
- Atyeo, R.F., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Suriyaarachichi, D.S. & Hampson, D.J., 1999. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. *Veterinary Microbiology*, 67(1), pp.47–60.
- Backhans, A., Johansson, K.E. & Fellström, C., 2010. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from wild rodents. *Environmental microbiology reports*, 2(6), pp.720–727.
- Backhans, A., Jansson, D.S., Aspán, A. & Fellström, C., 2011. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Veterinary Microbiology*, 153(1–2), pp.156–162.
- Barcellos, D.E., De Uzeda, M., Ikuta, N., Lunge, V.R., Fonseca, A.S., Kader, I.I. & Duhamel, G.E., 2000a. Identification of porcine intestinal spirochetes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. *Veterinary Microbiology*, 75(2), pp.189–198.
- Barcellos, D.E., Mathiesen, M.R., De Uzeda, M., Kader, I.I. & Duhamel, G.E., 2000b. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Veterinary Record*, 146(14), pp.398–403.
- Barth, S., Richter, M. & Herbst, W., 2009. Virulence and fitness gene patterns in German *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. En: Proceedings of the 5th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in animals and humans, León, Spain, Abstract 10, p. 31.
- Barth, S., Gömmel, M., Baljer, G. & Herbst, W., 2012. Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. *Veterinary Microbiology*, 155(2–4), pp. 438–443.
- Baum, D.H. & Joens, L.A., 1979. Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae*. *Infection and Immunity*, 25(3), pp. 792–796.
- Bellgard, M.I., Wanchanthuek, P., La, T., Ryan, K., Moolhuijzen, P., Albertyn, Z., Shaban, B., Motro, Y., Dunn, D.S., Schibeci, D., Hunter, A., Barrero, R., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2009. Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS ONE*, 4(3), e4641.
- Biksi, I., Lorincz, M., Molnár, B., Kecskés, T., Takács, N., Mirt, D., Cizek, A., Pejsak, Z., Martineau, G.P., Sevin, J.L. & Szenci, O., 2007. Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Acta veterinaria Hungarica*, 55(2), pp. 219–227.
- Bisacchi, G.S., 2015. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded 'Discovery Story'. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(12), pp. 4874–4882.
- Blunt, R. & McOrist, S., 2008. On-farm insect vector carriage of swine pathogens. *Brachyspira* and *Lawsonia*. En: Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, Poster, p. 291.

- Blunt, R. & McOrist, S., 2009. The potential transmission of swine dysentery by cockroach vectors. En: Proceedings of the 5th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, León, Spain, Abstract 1, p. 12.
- Borgström, A., Scherrer, S., Kirchgässner, C., Schmitt, S., Frei, D. & Wittenbrink, M.M., 2017. A novel multiplex qPCR targeting 23S rDNA for diagnosis of swine dysentery and porcine intestinal spirochaetosis. BMC Veterinary Research, 13(1), p. 42.
- Brorson, O., Brorson, S.H., Scythes, J., MacAllister, J., Wier, A. & Margulis, L., 2009. Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic Tigecycline. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(44), pp. 18656–18661.
- Burch, D.G., 1982. Tiamulin feed premix in the prevention and control of swine dysentery under farm conditions in the UK. The Veterinary record, 110(11), pp. 244–246.
- Burch D. 2005. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in the pig and break-point determinations. The Pig Journal, 56, pp. 8–24.
- Burrough, E.R., Strait, E.L., Kinyon, J.M., Bower, L.P., Madson, D.M., Wilberts, B.L., Schwartz, K.J., Frana, T.S. & Songer, J.G., 2012. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 24(6), pp. 1025–1034.
- Burrough, E., 2013. Swine dysentery. Re-emergence in the United States and Canada. En: Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Guildford, United Kingdom, pp. 55-56.
- Burrough, E.R., 2017. Swine Dysentery. Veterinary Pathology, 54(1), pp. 22–31.
- Calderaro, A., Bommezzadri, S., Gorrini, C., Piccolo, G., Peruzzi, S., Dettori, G. & Chezzi, C., 2006. Comparative evaluation of molecular assays for the identification of intestinal spirochaetes from diseased pigs. Veterinary Microbiology, 118(1–2), pp. 91–100.
- Card, R., Burrough, E.R., Ellis, R., Nunez-Garcia, J., Rohde, J., Thomson, J., Tucker, A.W. & Weinert, L., 2016. En: Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Hannover, Germany, Season 1, T03.
- Carlertz, A., Fellström, C., Jacobson, M., Lindberg, M., Råsbäck, T., Unnerstad, H.E. & Backhans, A., 2016. Occurrence and epidemiology of *Brachyspira hyodysenteriae* in Swedish pig herds. En: Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Hannover, Germany, Poster P11.
- Carranza, A., Illanes, N., Pelliza, B., Tamiozzo, P., Ambrogi, A. & Corona-Barrera, E., 2009. En: Proceedings of the 5th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, León, Spain, Abstract 7, p. 22.
- Carvajal, A., De Arriba, M.L., Rodríguez, H., Vidal, A.B., Duhamel, G.E. & Rubio, P., 2006. Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. The Veterinary Record, 158, pp. 700–701.
- Casas, V., Vadillo, S., San Juan, C., Carrascal, M. & Abian, J., 2016. The exposed proteomes of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. Frontiers in Microbiology, 7, p. 1103.

- Chander, Y., Primus, A.E., Oliveira, S. & Gebhart, C.J., 2012. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated '*Brachyspira hampsonii*'. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(5), pp. 903–910.
- Charon, N.W., Greenberg, E.P., Koopman, M.B. & Limberger, R.J., 1992. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. *Research in Microbiology*, 143(6), pp. 597–603.
- Clothier, K.A., Kinyon, J.M., Frana, T.S., Naberhaus, N., Bower, L., Strait, E.L. & Schwartz, K., 2011. Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(6), pp. 1140–1145.
- Combs, B., Hampson, D.J., Mhoma, J.R. & Buddle, J.R., 1989. Typing of *Treponema hyodysenteriae* by restriction endonuclease analysis. *Veterinary Microbiology*, 19(4), pp. 351–359.
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J.L. & Igrejas, G., 2017. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology*, 66(5), pp. 551–559.
- Costa, M.O., Hill, J.E., Fernando, C., Lemieux, H.D., Detmer, S.E., Rubin, J.E. & Harding, J.C., 2014a. Confirmation that '*Brachyspira hampsonii*' clade I (Canadian strain 30599) causes mucohemorrhagic diarrhea and colitis in experimentally infected pigs. *BMC veterinary research*, 10(1), p. 129.
- Costa, M.O., Chaban, B., Harding, J.C. & Hill, J.E., 2014b. Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with '*Brachyspira hampsonii*'. *PLoS ONE*, 9(8).
- Cummings, J.H. & Englyst, H.N., 1991. Measurement of starch fermentation in the human large intestine. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 69(1), pp. 121–129.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L. & Borriello, S.P., 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record*, 175(13), p. 325.
- Diego, R., Lanza, I., Carvajal, A., Rubio, P. & Cármenes, P., 1995. *Serpulina hyodysenteriae* challenge of fattening pigs vaccinated with an adjuvanted bivalent bacterin against swine dysentery. *Vaccine*, 13(7), pp. 663–667.
- Dors, A., Pomorska-Mól, M., Czyżewska, E., Wasyl, D. & Pejsak, Z., 2015. Prevalence and risk factors for *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in finishing pigs in Polish farrow-to-finish swine herds. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(4), pp. 825–831.
- Doyle, L.P., 1944. A *Vibrio* associated with swine dysentery. *American journal of Veterinary research* 5, pp. 3-5.
- Dreau, D., Lalles, J.P., LeJan, C., Toullec, R. & Salmon, H., 1995. Hypersensitivity to soybean proteins in early weaned piglets: humoral and cellular components. *Advances in experimental medicine and biology*, 371B, pp. 865–869.
- Dröge, S., Fröhlich, J., Radek, R. & König, H., 2006. *Spirochaeta Coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), pp. 392–397.

- Duff, J.W., Pittman, J.S., Hammer, J.M. & Kinyon, J.M., 2014. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* in sows and suckling piglets. *Journal of Swine Health and Production*, 22(2), pp. 71–77.
- Duhamel, G.E., Muniappa, N., Mathiesen, M.R., Johnson, J.L., Toth, J., Elder, R.O. & Doster, A.R., 1995. Certain canine weakly beta-hemolytic intestinal spirochetes are phenotypically and genotypically related to spirochetes associated with human and porcine intestinal spirochetosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), pp. 2212–2215.
- Duhamel, G.E., Trott, D.J., Muniappa, N., Mathiesen, M.R., Tarasiuk, K., Lee, J.I. & Hampson, D.J., 1998a. Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a newly identified group provisionally designated '*Serpulina canis*' sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(8), pp. 2264–2270.
- Duhamel, G.E., Kinyon, J.M., Mathiesen, M.R., Murphy, D.P. & Walter, D., 1998b. In vitro activity of four antimicrobial agents against North American isolates of porcine *Serpulina pilosicoli*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(4), 350-356.
- Duinhof, T.F., Dierikx, C.M., Koene, M.G., van Bergen, M.A., Mevius, D.J., Veldman, K.T., van Beers-Schreurs, H.M. & de Winne, R.T., 2008. [Multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* in a Dutch sow herd]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 133(14–15), pp. 604–608.
- Durmic, Z., Pethick, D.W., Mullan, B.P., Accioly, J.M., Schulze, H. & Hampson, D.J., 2002. Evaluation of large-intestinal parameters associated with dietary treatments designed to reduce the occurrence of swine dysentery. *The British journal of nutrition*, 88(2), pp. 159–169.
- Durmic, Z., Pethick, D.W., Mullan, B.P., Accioly, J.M., Schulze, H. & Hampson, D.J., 2000. Extrusion of wheat or sorghum and/or addition of exogenous enzymes to pig diets influences the large intestinal microbiota but does not prevent development of swine dysentery following experimental challenge. *Journal of Applied Microbiology*, 89(4), pp. 678–686.
- Elder, R.O., Duhamel, G.E., Schafer, R.W., Mathiesen, M.R. & Ramanathan, M., 1994. Rapid Detection of *Serpulina-Hyodysenteriae* in Diagnostic Specimens by Pcr. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(6), pp. 1497–1502.
- Feberwee, A., Hampson, D.J., Phillips, N.D., La, T., van der Heijden, H.M., Wellenberg, G.J., Dwars, R.M. & Landman, W.J., 2008. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced production or both. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), pp. 593–600.
- Fellström, C. & Gunnarsson, A., 1995. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Research in Veterinary Science*, 59(1), pp. 1–4.
- Fellström, C., Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A. & Aspan, A., 1999. Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology*, 70(3–4), pp. 225–238.
- Fellstrom, C., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A. & Feinstein, R., 2001. Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs. *Anim Health Res Rev*, 2(1), pp. 75–82.
- Fellström, C., Råsbäck, T., Johansson, K.E., Olofsson, T. & Aspán, A., 2008. Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), pp. 133–140.

- Flø, H. & Bergsjø, B., 2000. The prevalence of *Brachyspira* in Norwegian pig herds. En: The 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, p. 46.
- Fossi, M., Pohjanvirta, T., Sukura, A., Heinikainen, S., Lindecrona, R. & Pelkonen, S., 2004. Molecular and ultrastructural characterization of porcine hippurate-negative *Brachyspira pilosicoli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), pp. 3153–3158.
- Gabe, J.D., Chang, R.J., Slomiany, R., Andrews, W.H. & McCaman, M.T., 1995. Isolation of extracytoplasmic proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and molecular cloning of the flaB1 gene encoding a 38-kilodalton flagellar protein. *Infection and Immunity*, 63(1), pp. 142–148.
- Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), pp. 1401–1412.
- Glávits, R., Ivanics, E., Thuma, A., Kaszanyitzky, E., Samu, P., Ursu, K., Dencso, L. & Dán, A., 2011. Typhlocolitis associated with spirochaetes in duck flocks. *Avian Pathology*, 40(1), pp. 23–31.
- Glock, R.D. & Harris, D.L., 1972. Swine dysentery-II. Characterization of lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae* in pure and mixed culture. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, 67(1), pp. 65–68.
- Guedes, R.M.C., Sato, J.P.H. & Daniel, A.G.S., 2016. Swine dysentery in South America and genetic characterization of Brazilian *Brachyspira hyodysenteriae* isolates. En: Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Hannover, Germany, Season 4, T17.
- Gupta, R.S., Mahmood, S. & Adeolu, M., 2013. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum spirochaetes and its major clades: Proposal for a taxonomic revision of the phylum. *Frontiers in Microbiology*, 4(217).
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R. & Decostere, A., 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? *Veterinary Microbiology*, 100(3–4), pp. 255–268.
- Hampson, D.J., Mhoma, J.R. & Combs, B. 1989. Analysis of lipopolysaccharide antigens of *Treponema hyodysenteriae*. *Epidemiology and infection*, 103, pp. 275-284.
- Hampson, D.J., Combs, B.G., Harders, S.J., Connaughton, I.D. & Fahy, V.A., 1991. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from a wild rat living on a piggery. *Australian Veterinary Journal*, 68(9), p. 308.
- Hampson, D.J., 1997a. Rapid identification of porcine *Serpulina* species. *The Veterinary record*, 140(2), pp. 51–52.
- Hampson D.J., & McLaren, A.J., 1997b. Prevalence, genetic relationships and pathogenicity of intestinal spirochaetes infecting Australian poultry. En: Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium, Sydney, Australia, pp. 108-112.
- Hampson, D.J., Atyeo, R.F. & Combs, B.G., 1997c. Swine dysentery. En: Hampson, D.J. & Stanton, T.B. (Eds.) *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans*. CAB International, Wallingford, England, pp. 175-209.
- Hampson, D.J., Robertson, I.D. & Oxberry, S.L., 1999. Isolation of *Serpulina murdochii* from the joint fluid of a lame pig. *Australian veterinary journal*, 77(1), p. 48.

- Hampson, D.J., Robertson, I.D., La, T., Oxberry, S.L. & Pethick, D.W., 2000. Influences of diet and vaccination on colonisation of pigs by the intestinal spirochaete *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli*. *Veterinary Microbiology*, 73(1), pp. 75–84.
- Hampson, D.J., Phillips, N.D. & Pluske, J.R., 2002. Dietary enzyme and zinc bacitracin reduce colonisation of layer hens by the intestinal spirochaete *Brachyspira intermedia*. *Veterinary Microbiology*, 86(4), pp. 351–360.
- Hampson, D.J., Fellstrom, C. & Thomson, J.R., 2006a. Swine Dysentery. En: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D’Allaire, S. *et al* (Eds.), *Diseases of swine*. Novena edición. Blackwell publishing professional, Ames, Iowa, USA., pp. 785-805.
- Hampson, D.J. & La, T., 2006b. Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia* comb. nov. and *Brachyspira murdochii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), pp. 1009–1012.
- Hampson, D.J., La, T. & Phillips, N.D., 2015. Emergence of *Brachyspira* species and strains: reinforcing the need for surveillance. *Porcine Health Management*, 1(1), p. 8.
- Hansen, C.F., Phillips, N.D., La, T., Hernandez, A., Mansfield, J., Kim, J.C., Mullan, B.P., Hampson, D.J. & Pluske, J.R., 2010. Diets containing inulin but not lupins help to prevent swine dysentery in experimentally challenged pigs. *Journal of Animal Science*, 88(10), pp. 3327–3336.
- Hansen, C.F., Hernández, A., Mansfield, J., Hidalgo, Á., La, T., Phillips, N.D. Hampson, D.J. & Pluske, J.R., 2011. A high dietary concentration of inulin is necessary to reduce the incidence of swine dysentery in pigs experimentally challenged with *Brachyspira hyodysenteriae*. *British Journal of Nutrition*, 106(10), pp. 1506–1513.
- Harding, J., 2013. Emergence of mucohaemorrhagic diarrhoea associated with "*B. hamptonii*" in western Canada. En: *Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*, Guildford, United Kingdom, p. 61.
- Harel, J. & Forget, C., 1995. DNA probe and polymerase chain reaction procedure for the specific detection of *Serpulina hyodysenteriae*. *Molecular and Cellular Probes*, 9(2), pp. 111–119.
- Harris, D.L., Glock, R.D., Christensen, C.R. & Kinyon, J.M., 1972. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, 67(1), pp. 61–64.
- Harris, D.L., Alexander, T.J., Whipp, S.C., Robinson, I.M., Glock, R.D. & Matthews, P.J., 1978. Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *Journal of the Veterinary Medical Association*, 172(4), pp. 468–471.
- Harris, D.I., Hampson, D.J., & Glock, R.D., 1999. Swine dysentery. En: Straw, B.E., D’Allaire, S.D., Mengeling, W.D. & Taylor, D.J. (Eds.) *Disease of swine*. Iowa State University Press, Ames Iowa USA, pp. 579-600.
- Hartnack, S., Nathues, C., Nathues, H., Grosse Beilage, E. & Lewis, F.I., 2014. Estimating diagnostic test accuracies for *Brachyspira hyodysenteriae* accounting for the complexities of population structure in food animals. *PLoS ONE*, 9(6).
- Heinonen, M., Fossi, M., Jalli, J.P., Saloniemi, H. & Tuovinen, V., 2000. Detectability and prevalence of *Brachyspira* species in herds rearing health class feeder pigs in Finland. *Veterinary Record*, 146(12), pp. 343–347.

- Herbst, W., Willems, H. & Baljer, G., 2004. [Distribution of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in healthy and diarrhoeic pigs]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 117(11–12), pp. 493–498.
- Herbst, W., Schneider, S., Baljer, G. & Barth, S.A., 2017. An update of *Brachyspira hyodysenteriae* serotyping. *Research in Veterinary Science*, 111, pp. 135–139.
- Hidalgo, A., Osorio, J., Pappaterra, G.J., Llanos, A., Marca, J., Ferro, A., Hernández-Caravaca, I., Carvajal, A. & Rubio, P., 2008. Control of swine dysentery with an inactivated autovaccine against *Brachyspira hyodysenteriae* in a multiplier herd. En: *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress*, Durban, South Africa, Poster, p. 242.
- Hidalgo, Á., Carvajal, A., García-Feliz, C., Osorio, J. & Rubio, P., 2009. Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Research in Veterinary Science*, 87(1), pp. 7–12.
- Hidalgo, Á., Carvajal, A., La, T., Naharro, G., Rubio, P., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2010a. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of the swine dysentery pathogen, *Brachyspira hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), pp. 2859–2865.
- Hidalgo, Á., Carvajal, A., Pringle, M., Rubio, P. & Fellström, C., 2010b. Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiology and infection*, 138(1), pp. 76–85.
- Hidalgo, A., Rubio, P., Osorio, J. & Carvajal, A., 2010c. Prevalence of *Brachyspira pilosicoli* and '*Brachyspira canis*' in dogs and their association with diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, 146(3–4), pp. 356–360.
- Hidalgo, Á., Carvajal, A., Vester, B., Pringle, M., Naharro, G. & Rubio, P., 2011. Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), pp. 3330–3337.
- Hillen, S., Willems, H., Herbst, W., Rohde, J. & Reiner, G., 2014. Mutations in the 50S ribosomal subunit of *Brachyspira hyodysenteriae* associated with altered minimum inhibitory concentrations of pleuromutilins. *Veterinary Microbiology*, 172(1–2), pp. 223–229.
- Holden, J., Moutafis, G., Istivan, T., Coloe, P.J. & Smooker, P.M., 2006. SmpB: A novel outer membrane protein present in some *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *Veterinary Microbiology*, 113(1–2), pp. 109–116.
- Holt, S.C., 1978. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiological reviews*, 42(1), pp. 114–60.
- Hommez, J., Castryck, F., Haesebrouck, F. & Devriese, L.A., 1998. Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Veterinary Microbiology*, 62(2), pp. 163–169.
- Hontecillas, R., Wannemeulher, M.J., Zimmerman, D.R., Hutto, D.L., Wilson, J.H., Ahn, D.U. & Bassaganya-Riera, J., 2002. Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. *The Journal of nutrition*, 132(7), pp. 2019–2027.
- Hovind-Hougen, K., Birch-Andersen, A., Henrik-Nielsen, R., Orholm, M., Pedersen, J.O., Teglbjaerg, P.S. & Thaysen, E.H., 1982. Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(6), pp. 1127–1136.

- Hsu, T., Hutto, D.L., Minion, F.C., Zuerner, R.L. & Wannemuehler, M.J., 2001. Cloning of a beta-hemolysin gene of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69(2), pp. 706–711.
- Hughes, R., Olander, H.J., Kanitz, D.L. & Qureshi, S., 1977. A study of swine dysentery by immunofluorescence and histology. *Veterinary pathology*, 14(5), pp. 490–507.
- Huisman, J., Heinz, T., van der Poel, A.F., van Leeuwen, P., Souffrant, W.B. & Verstegen, M.W., 1992. True protein digestibility and amounts of endogenous protein measured with the 15N-dilution technique in piglets fed on peas (*Pisum sativum*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*). *The British Journal of Nutrition*, 68(1), pp. 101–110.
- Ivanics, E., Dobos-Kovács, M., Glávits, R., Kaszanyitzky, E., Nemes, C., Szeredi, L., Beregszászi, A. & Dencso, L., 2007. Experimental study on the role of *Brachyspira alvinipulli* in intestinal spirochaetosis of geese. *Acta veterinaria Hungarica*, 55(3), pp. 315–26.
- Jacobson, M., Fellström, C., Lindberg, R., Wallgren, P. & Jensen-Waern, M., 2004. Experimental swine dysentery: Comparison between infection models. *Journal of Medical Microbiology*, 53(4), pp. 273–280.
- Jacobson, M., Gerth Löfstedt, M., Holmgren, N., Lundeheim, N. & Fellström, C., 2005. The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(9), pp. 386–391.
- Jansson, D.S., Bröjer, C., Gavier-Widén, D., Gunnarsson, A. & Fellström, C., 2001. *Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds. *Animal health research reviews*, 2(1), pp. 93-100.
- Jansson, D.S., Johansson, K.E., Olofsson, T., Råsbäck, T., Vågsholm, I., Pettersson, B., Gunnarsson, A. & Fellström, C., 2004. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly beta-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Medical Microbiology*, 53(4), pp. 293-300.
- Jansson, D.S., Fellström, C., Råsbäck, T., Vågsholm, I., Gunnarsson, A., Ingermaa, F. & Johansson, K.E., 2008a. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens in different housing systems. *Veterinary Microbiology*, 130(3-4), pp. 348-362.
- Jansson, D., Fellström, C. & Johansson, K.E., 2008b. Intestinal spirochetes isolated from wild-living jackdaws, hooded crows and rooks (genus *Corvus*): Provisionally designated '*Brachyspira corvi*' sp. nov. *Anaerobe*, 14(5), pp. 287-295.
- Jansson, D.S., Råsbäck, T., Fellström, C. & Feinstein, R., 2009. Experimental Challenge of Mallards (*Anas platyrhynchos*) with *Brachyspira hyodysenteriae* and '*Brachyspira suanatina*' Isolated from Pigs and Mallards. *Journal of Comparative Pathology*, 141(4), pp. 211–222.
- Jansson, D.S., Persson, M., Zimmerman, U. & Johansson, K.E., 2011. Phenotypic and genetic diversity among intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) in free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*) sampled in southern Sweden. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(8), pp. 566–575.
- Jansson, D.S., Mushtaq, M., Johansson, K.E., Bonnedahl, J., Waldenström, J., Andersson, D.I., Broman, T., Berg, C. & Olsen, B., 2015. Intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) colonise wild birds in the southern Atlantic region and Antarctica. *Infection ecology & epidemiology*, 5, p. 29296.

- Jenkinson, S.R. & Wingar, C.R., 1983. Sensitivity to dimetridazole of field isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Veterinary Record*, 112(3), p. 58.
- Jensen, N.S., Stanton, T.B. & Swayne, D.E., 1996. Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea americana*). *Veterinary Microbiology*, 52(3–4), pp. 259–269.
- Jensen, N.S., 1997. Detection, identification and subspecific differentiation of intestinal spirochaetes. En: Hampson, D.J. & Stanton, T.B. (Eds.) *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans*. CAB International, United Kingdom, pp. 323–341.
- Jensen, T.K., Møller, K., Boye, M., Leser, T.D. & Jorsal, S.E., 2000. Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* infection in growing pigs. *Veterinary pathology*, 37(1), pp. 22–32.
- Jensen, T.K., Boye, M., Ahrens, P., Korsager, B., Teglbjaerg, P.S., Lindboe, C.F. & Møller, K., 2001. Diagnostic examination of human intestinal spirochetosis by fluorescent in situ hybridization for *Brachyspira aalborgi*, *Brachyspira pilosicoli*, and other species of the genus *Brachyspira (Serpulina)*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), pp. 4111–4118.
- Jensen, T.K., Christensen, A. & Boye, M., 2010. *Brachyspira murdochii* colitis in pigs. *Veterinary pathology*, 47(2), pp. 334–338.
- Kajiwaru, K., Kozawa, M., Kanazawa, T., Uetsuka, K., Nakajima, H. & Adachi, Y., 2015. Drug-susceptibility of isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from colonic mucosal specimens of pigs collected from slaughter houses in Japan in 2009. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 78(3), pp. 517–519.
- Karlsson, M., Fellström, C., Heldtander, M.U., Johansson, K.E. & Franklin, A., 1999. Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*, 172(2), pp. 255–260.
- Karlsson, M., 2001. Antibiotic resistance in *Brachyspira hyodysenteriae*. Doctoral thesis. Department of Antibiotics, National Veterinary Institute and Department of Veterinary Microbiology, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Sweden.
- Karlsson, M., Oxberry, S.L. & Hampson, D.J., 2002. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Veterinary Microbiology*, 84(1–2), pp. 123–133.
- Karlsson, M., Fellström, C., Gunnarsson, A., Landén, A. & Franklin, A., 2003. Antimicrobial Susceptibility Testing of Porcine *Brachyspira (Serpulina)* Species Isolates, 41(6), pp. 2596–2604.
- Karlsson, M., Aspán, A., Landén, A. & Franklin, A., 2004. Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *Journal of Medical Microbiology*, 53(4), pp. 281–285.
- Kennedy, M.J., Rosey, E.L. & Yancey, R.J., 1997. Characterization of *flaA*- and *flaB*- mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: Both flagellin subunits, *flaA* and *flaB*, are necessary for full motility and intestinal colonization. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*, 153(1), pp. 119–128.
- Kent, K.A., Sellwood, R., Lemcke, R.M., Burrows, M.R. & Lysons, R.J., 1989. Analysis of the axial filaments of *Treponema hyodysenteriae* by SDS-PAGE and immunoblotting. *Journal of general microbiology*, 135(6), pp. 1625–1632.

- Kinyon, J.M. & Harris, D.L., 1979. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29(2), pp. 102–109.
- Koopman, M.B., Käsbohrer, A., Beckmann, G., van der Zeijst, B.A. & Kusters, J.G., 1993. Genetic similarity of intestinal spirochetes from humans and various animal species. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(3), pp. 711–716.
- Kunkle, R.A., Harris, D.L. & Kinyon, J.M., 1986. Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(4), pp. 669–671.
- Kunkle, R. a & Kinyon, J.M., 1988. Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), pp. 2357–2360.
- La, T. & Hampson, D.J., 2001. Serologic detection of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* infections. *Animal health research reviews*, 2(1), pp. 45–52.
- La, T., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2003. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), pp. 3372–3375.
- La, T., Phillips, N.D., Reichel, M.P. & Hampson, D.J., 2004. Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology*, 102(1–2), pp. 97–109.
- La, T., Tan, P., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2005. The distribution of *bmpB*, a gene encoding a 29.7 kDa lipoprotein with homology to MetQ, in *Brachyspira hyodysenteriae* and related species. *Veterinary Microbiology*, 107(3–4), pp. 249–256.
- La, T., Phillips, N.D., Harland, B.L., Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I. & Hampson, D.J., 2009a. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology*, 138(3–4), pp. 330–338.
- La, T., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2009b. Evaluation of recombinant Bhlp29.7 as an ELISA antigen for detecting pig herds with swine dysentery. *Veterinary Microbiology*, 133(1–2), pp. 98–104.
- La, T., Phillips, N.D., Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., O'Hara, A.J. & Hampson, D.J., 2011. Evidence that the 36kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. *Veterinary Microbiology*, 153(1–2), pp. 150–155.
- La, T., Phillips, N.D., Thomson, J.R. & Hampson, D.J., 2014. Absence of a set of plasmid-encoded genes is predictive of reduced pathogenic potential in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary research*, 45(1), p. 131.
- La, T., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2016. An investigation into the etiological agents of swine dysentery in Australian pig herds. *Plos One*, 11(12).
- Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D. & Dewulf, J., 2013. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *Veterinary Journal*, 198(2), pp. 508–512.
- Lasa, A., Mira, A., Camelo-Castillo, A., Belda-Ferre, P. & Romalde, J.L., 2016. Characterization of the microbiota associated to *Pecten maximus* gonads using 454-pyrosequencing, 19(2), pp. 93–99.

- Lau, T.T.A. & Hampson, D.J., 1992. The serological grouping system for *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*, 109(2), pp. 255–263.
- Lee, J.I., Hampson, D.J., Lymbery, A.J. & Harders, S.J., 1993. The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. *Veterinary Microbiology*, 34(3), pp. 273–285.
- Lee, J.I. & Hampson, D.J., 1994. Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. *Journal of Medical Microbiology*, 40(5), pp. 365–371.
- Lee, B.J. & Hampson, D.J., 1999. Lipo-oligosaccharide profiles of *Serpulina pilosicoli* strains and their serological cross-reactivities. *Journal of Medical Microbiology*, 48(4), pp. 411–415.
- Leser, T.D., Møller, K., Jensen, T.K. & Jorsal, S.E., 1997. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Molecular and cellular probes*, 11(5), pp. 363–72.
- Leser, T.D., Lindecrona, R.H., Jensen, T.K., Jensen, B.B. & Møller, K., 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), pp. 3290–3296.
- Leyva, S. & Leyva, E., 2008. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. En: *Boletín de la Sociedad Química de México*, 2(1), pp. 1-13.
- Li, Z., Belanger, M. & Jacques, M., 1991. Serotyping of Canadian isolates of *Treponema hyodysenteriae* and description of two new serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12), pp. 2794–2797.
- Lindecrona, R.H., Jensen, T.K. & Moller, K., 2004. Influence of diet on the experimental infection of pigs with *Brachyspira pilosicoli*. *The Veterinary record*, 154(9), pp. 264–267.
- Lindstedt, B.A., 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26(13), pp. 2567–2582.
- Lobert, S., Löbert, S., Zimmermann, W., Bürki, S., Frey, J., Nathues, H., Scheer, P., Doherr, M.G., Stalder, U. & Zeeh, F., 2016. Occurrence of *Brachyspira hyodysenteriae* in multiplier pig herds in Switzerland. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*, 44(1), pp. 13–18.
- Lobova, D., Prasek, J., Cizek, A. & Celer, V., 2011. Evaluation of the use of recombinant Bhlp29.7 in immunoblotting with pig serum as a means to identify herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), pp. 466–472.
- Long, K.S., Poehlsgaard, J., Hansen, L.H., Hobbie, S.N., Böttger, E.C. & Vester, B., 2009. Single 23S rRNA mutations at the ribosomal peptidyl transferase centre confer resistance to valnemulin and other antibiotics in *Mycobacterium smegmatis* by perturbation of the drug binding pocket. *Molecular Microbiology*, 71(5), pp. 1218–1227.
- Madigan, T.L., Bott, N.J., Torok, V.A., Percy, N.J., Carragher, J.F., de Barros Lopes, M.A. & Kiermeier, A., 2014. A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Food Microbiology*, 38, pp. 219–227.

- Mahu, M., de Jong, E., De Pauw, N., Vande Maele, L., Vandenbroucke, V., Vandersmissen, T., Miry, C., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Martel, A. & Boyen, F., 2014. First isolation of '*Brachyspira hampsonii*' from pigs in Europe. *Veterinary Record*, 174(2), p. 47.
- Mahu, M., De Pauw, N., Vande Maele, L., Verlinden, M., Boyen, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Martel, A. & Pasmans, F., 2016. Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Veterinary Research*, 47(1), pp. 1–10.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. & Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), pp. 3140–3145.
- Mappley, L.J., Black, M.L., AbuOun, M., Darby, A.C., Woodward, M.J., Parkhill, J., Turner, A.K., Bellgard, M.I., La, T., Phillips, N.D., La Ragione, R.M. & Hampson, D.J., 2012. Comparative genomics of *Brachyspira pilosicoli* strains: genome rearrangements, reductions and correlation of genetic complement with phenotypic diversity. *BMC genomics*, 13, p. 454.
- Mappley, L.J., La Ragione, R.M. & Woodward, M.J., 2014. *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. *Veterinary Microbiology*, 168(2–4), pp. 245–260.
- Margawani, K.R., Robertson, I.D., Brooke, C.J. & Hampson, D.J., 2004. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of *Brachyspira pilosicoli* in humans on the island of Bali, Indonesia. *Journal of Medical Microbiology*, 53(4), pp. 325–332.
- Margulis, L., Ashen, J.B., Solé, M. & Guerrero, R., 1993. Composite, large spirochetes from microbial mats: spirochete structure review. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(15), pp. 6966–6970.
- Martinez-Lobo, F.J., Hidalgo, Á., García, M., Argüello, H., Naharro, G., Carvajal, A. & Rubio, P., 2013. First Identification of '*Brachyspirahampsonii*' in Wild European Waterfowl. *PLoS One*, 8(12).
- McLaren, A.J., Trott, D.J., Swayne, D.E., Oxberry, S.L. & Hampson, D.J., 1997. Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2), pp. 412–417.
- Mevius, D.J., Breukink, H.J., Guelen, P.J., Jansen, T. & De Grève, B., 1990a. Pharmacokinetics, metabolism and renal clearance of flumequine in veal calves. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 13(2), pp. 159–169.
- Mevius, D.J., Breukink, H.J. & van Miert, A.S., 1990b. In vitro activity of flumequine in comparison with several other antimicrobial agents against five pathogens isolated in calves in The Netherlands. *The Veterinary quarterly*, 12(4), pp. 212–220.
- Meyer, R.C., Simon, J. & Byerly, C.S., 1975. The Etiology of Swine Dysentery. *Veterinary Pathology*, 12, pp. 46–54.
- Miao, R.M. & Fieldsteel, A.H., 1980. Genetic relationship between *Treponema pallidum* and *Treponema pertenuis*, two noncultivable human pathogens. *Journal of Bacteriology*, 141(1), pp. 427–429.
- Mikosza, A.S., La, T., Margawani, K.R., Brooke, C.J. & Hampson, D.J., 2001. PCR detection of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in human faeces. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*, 197(2), pp. 167–170.

- Milner, J.A. & Sellwood, R., 1994. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: Potential role in intestinal colonization. *Infection and Immunity*, 62(9), pp. 4095–4099.
- Mirajkar, N.S. & Gebhart, C.J., 2014. Understanding the molecular epidemiology and global relationships of *brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: A multi-locus sequence typing approach. *PLoS ONE*, 9(9).
- Mirajkar, N.S., Bekele, A.Z., Chander, Y.Y. & Gebhart, C.J., 2015. Molecular epidemiology of novel pathogen '*Brachyspira hampsonii*' reveals relationships between diverse genetic groups, regions, host species, and other pathogenic and commensal *brachyspira* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(9), pp. 2908–2918.
- Mirajkar, N.S., Phillips, N.D., La, T., Hampson, D.J. & Gebhart, C.J., 2016a. Characterization and recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(12), pp. 2942–2949.
- Mirajkar, N.S. & Gebhart, C.J., 2016b. Comparison of agar dilution and antibiotic gradient strip test with broth microdilution for susceptibility testing of swine *Brachyspira* species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(2), pp. 133–43.
- Mirajkar, N.S., Davies, P.R. & Gebhart, C.J., 2016c. Antimicrobial susceptibility patterns of *brachyspira* species isolated from swine herds in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), pp. 2109–2119.
- Møller, K., Jensen, T.K., Jorsal, S.E., Leser, T.D. & Carstensen, B., 1998. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Veterinary Microbiology*, 62(1), pp. 59–72.
- Montagne, L., Piel, C. & Lalles, J.P., 2004. Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutrition reviews*, 62(3), pp. 105–114.
- Mushtaq, M., Zubair, S., Råsbäck, T., Bongcam-Rudloff, E. & Jansson, D.S., 2015. *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics. *BMC microbiology*, 15(1), p. 208.
- Naresh, R. & Hampson, D.J., 2010. Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. *Microbiology*, 156(1), pp. 191–197.
- Neef, N.A., Lysons, R.J., Trott, D.J., Hampson, D.J., Jones, P.W. & Morgan, J.H., 1994. Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity*, 62(6), pp. 2395–2403.
- Nemes, C.S., Glávits, R., Dobos-Kovács, M., Ivanics, E., Kaszanyitzky, E., Beregszászi, A., Szeredi, L. & Dencso, L., 2006. Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks. *Avian pathology*, 35(1), pp. 4–11.
- Neo, E., La, T., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2013. Multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) of the pathogenic intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli*. *Veterinary Microbiology*, 163(3–4), pp. 299–304.
- Nibbelink, S.K. & Wannemuehler, M.J., 1991. Susceptibility of inbred mouse strains to infection with *Serpula (Treponema) hyodysenteriae*. *Infection and Immunity*, 59(9), pp. 3111–3118.

- Ochiai, S., Adachi, Y. & Mori, K., 1997. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachyspira innocens* Comb. Nov. and *Brachyspira pilosicoli* Comb. Nov. *Microbiology and immunology*, 41(6), pp. 445–52.
- Ohya, T., Araki, H. & Sueyoshi, M., 2008. Identification of weakly beta-hemolytic porcine spirochetes by biochemical reactions, PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis and species-specific PCR. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 70(8), pp. 837–40.
- OIE, 2015. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. Organización Mundial de Sanidad Animal. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Sp_OIE_List_antimicrobials_Mayo2015.pdf
- Osorio, J., Carvajal, A., Naharro, G., La, T., Phillips, N.D., Rubio, P. & Hampson, D.J., 2012. Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries. *PLoS ONE*, 7(6).
- Osorio, J., Carvajal, A., Naharro, G., Rubio, P., La, T., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2013. Identification of weakly haemolytic *Brachyspira* isolates recovered from pigs with diarrhoea in Spain and Portugal and comparison with results from other countries. *Research in Veterinary Science*, 95(3), pp. 861–869.
- Oxberry, S.L., Trott, D.J. & Hampson, D.J., 1998. *Serpulina pilosicoli*, waterbirds and water: potential sources of infection for humans and other animals. *Epidemiology and infection*, 121(1), pp. 219–25.
- Oxberry, S.L. & Hampson, D.J., 2003. Epidemiological studies of *Brachyspira pilosicoli* in two Australian piggeries. *Veterinary Microbiology*, 93(2), pp. 109–120.
- Park, N.Y., Chung, C.Y., McLaren, A.J., Atyeo, R.F. & Hampson, D.J., 1995. Polymerase chain reaction for identification of human and porcine spirochaetes recovered from cases of intestinal spirochaetosis. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*, 125(2–3), pp. 225–229.
- Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Weisburg, W.G., Tordoff, L.A., Fraser, G.J., Hespell, R.B., Stanton, T.B., Zablén, L., Mandelco, L. & Woese, C.R., 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *Journal of Bacteriology*, 173(19), pp. 6101–6109.
- Paster, B.J. & Dewhirst, F.E., 2000. Phylogenetic foundation of spirochetes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(4), pp.341–344.
- Pati, A., Sikorski, J., Gronow, S., Munk, C., Lapidus, A., Copeland, A., Glavina Del Tio, T., Nolan, M., Lucas, S., Chen, F., Tice, H., Cheng, J.F., Han, C., Detter, J.C., Bruce, D., Tapia, R., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.J., Jeffries, C.D., Spring, S., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C. & Klenk, H.P., 2010. Complete genome sequence of *Brachyspira murdochii* type strain (56-150). *Standards in genomic sciences*, 2(3), pp. 260-269.
- Patterson, A.H., Rubin, J.E., Fernando, C., Costa, M.O., Harding, J.C. & Hill, J.E., 2013. Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of ‘*Brachyspira hampsonii*’-associated colitis. *BMC veterinary research*, 9, p. 137.
- Pearce, G.P., 1999. Epidemiology of enteric disease in grower-finisher pigs: a postal survey of pig producers in England. *The Veterinary record*, 144(13), pp. 338–342.

- Pearson, H.E., Toribio, J.A., Lapidge, S.J. & Hernández-Jover, M., 2016. Evaluating the risk of pathogen transmission from wild animals to domestic pigs in Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 123, pp. 39–51.
- Pejsak, Z., Żmudzki, J., Wasak, M., Porowski, M., Wojciechowski, J. & Mirt, D., 2007. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* infections in Polish swine population. *Medycyna weterynaryjna*, 63, pp. 994–996.
- Pettersson, B., Fellström, C., Andersson, A., Uhlén, M., Gunnarsson, A. & Johansson, K.E., 1996. The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of bacteriology*, 178(14), pp. 4189–4199.
- Phillips, N.D., La, T. & Hampson, D.J., 2005. A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. *Veterinary Microbiology*, 105(3–4), pp. 189–198.
- Phillips, N.D., La, T. & Hampson, D.J., 2006. Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. *Veterinary Microbiology*, 116(1–3), pp. 239–245.
- Phillips, N.D., Adams, P.J., Harland, B.L., La, T. & Hampson, D.J., 2007. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in feral pigs from Western Australia. En: *The 4th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*, Prague, Czech Republic, abstract 19.
- Phillips, N.D., La, T., Adams, P.J., Harland, B.L., Fenwick, S.G. & Hampson, D.J., 2009. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Veterinary Microbiology*, 134(3–4), pp. 294–299.
- Phillips, N.D., La, T., Amin, M.M. & Hampson, D.J., 2010. *Brachyspira intermedia* strain diversity and relationships to the other indole-positive *Brachyspira* species. *Veterinary Microbiology*, 143(2–4), pp. 246–254.
- Plawinska, J., Jakubowski, T., Rzewuska, M. & Binek, M., 2004. Occurrence of *Lawsonia Intracellularis* and *Brachyspira* spp. infection in swine suffering from diarrhoea. *Polish journal of veterinary sciences*, 7(3), pp. 203–206.
- Pluske, J.R., Siba, P.M., Pethick, D.W., Durmic, Z., Mullan, B.P. & Hampson, D.J., 1996. The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *The Journal of nutrition*, 126(11), pp. 2920–2933.
- Pluske, J.R., Durmic, Z., Pethick, D.W., Mullan, B.P. & Hampson, D.J., 1998. Confirmation of the Role of Rapidly Fermentable Carbohydrates in the Expression of Swine Dysentery in Pigs after Experimental Infection. *The Journal of Nutrition*, 128(10), pp. 1737–1744.
- Pringle, M., Landén, A., Unnerstad, H.E., Molander, B. & Bengtsson, B., 2012. Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), p. 54.
- Råsbäck, T., Fellström, C., Gunnarsson, A. & Aspán, A., 2006. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), pp. 347–353.
- Råsbäck, T., Johansson, K.E., Jansson, D.S., Fellström, C., Alikhani, M.Y., La, T., Dunn, D.S. & Hampson, D.J., 2007a. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiology*, 153(12), pp. 4074–4087.

- Råsbäck, T., Jansson, D.S., Johansson, K.E. & Fellström, C., 2007b. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environmental Microbiology*, 9(4), pp. 983–991.
- Reiner, G., Winkelmann, M. & Willems, H., 2011. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, 57(3), pp. 443–448.
- Roberfroid, M.B., 1998. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *The British journal of nutrition*, 80(4), pp. 197-202.
- Robinson, I.M., Whipp, S.C., Bucklin, J.A. & Allison, M.J., 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), pp. 964–969.
- Rohde, J., Rothkamp, A. & Gerlach, G.F., 2002. Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7), pp. 2598–2600.
- Rohde, J., Habighorst-Blome, K. & Seehusen, F., 2014. '*Brachyspira hamptonii*' clade I isolated from Belgian pigs imported to Germany. *Veterinary Microbiology*, 168(2–4), pp. 432–435.
- Rohde, J., Grüning, P. & Habighorst-Blome, K., 2016. *Brachyspira suanatina* and "*Brachyspira hamptonii*" in German Pigs. En: Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Hannover, Germany, Poster P12.
- Ronne, H. & Szancer, J., 1990. In vitro susceptibility of Danish field isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemotherapeutics in swine dysentery (SD) therapy: interpretation of MIC results based on the pharmacokinetic properties of the antibacterial agents. En: Proceedings of the 11th International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne, Switzerland, Oral paper, 11, 126.
- Rubin, J.E., Harms, N.J., Fernando, C., Soos, C., Detmer, S.E., Harding, J.C. & Hill, J.E., 2013a. Isolation and characterization of *Brachyspira* spp. including '*Brachyspira hamptonii*' from lesser snow geese (*Chen caerulescens caerulescens*) in the Canadian arctic. *Environmental microbiology*, 66(4), pp. 813–822.
- Rubin, J.E., Costa, M.O., Hill, J.E., Kittrell, H.E., Fernando, C., Huang, Y., O'Connor, B. & Harding, J.C., 2013b. Reproduction of Mucohaemorrhagic Diarrhea and Colitis Indistinguishable from Swine Dysentery following Experimental Inoculation with '*Brachyspira hamptonii*' Strain 30446. *PLoS ONE*, 8(2). e57146.
- Rubio, P., 2016. Is there an emergence of swine dysentery in Spain?. En: Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Hannover, Germany, Season 4, T18.
- Rugna, G., Bonilauri, P., Carra, E., Bergamini, F., Luppi, A., Gherpelli, Y., Magistrali, C.F., Nigrelli, A., Alborali, G.L., Martelli, P., La, T., Hampson, D.J. & Merialdi, G., 2015. Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003-2012. *Veterinary Journal*, 203(1), pp. 115–119.

- Sagartz, J.E., Swayne, D.E., Eaton, K.A., Hayes, J.R., Amass, K.D., Wack, R. & Kramer, L., 1992. Necrotizing typhlocolitis associated with a spirochete in rheas (*Rhea americana*). *Avian diseases*, 36(2), pp. 282–289.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), pp. 1350–1354.
- Sato, H., Nakamura, S., Habano, W., Wakabayashi, G. & Adachi, Y., 2010. Human intestinal spirochaetosis in northern Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 59(7), pp. 791–796.
- Scherrer, S., Borgström, A., Frei, D. & Wittenbrink, M.M., 2016. First screening for *Brachyspira hamptonii* in Swiss pigs applying a new high resolution melting assay. *Veterinary Microbiology*, 193, pp. 17–21.
- Schmall, L.M., Argenzio, R.A. & Whipp, S.C., 1983. Pathophysiologic features of swine dysentery: cyclic nucleotide-independent production of diarrhea. *American Journal of Veterinary Research*, 44(7), pp. 1309–1316.
- Shivaprasad, H.L. & Duhamel, G.E., 2005. Cecal Spirochetosis Caused by *Brachyspira pilosicoli* in Commercial Turkeys. *Avian Diseases*, 49(4), pp. 609–613.
- Siba, P.M., Pethick, D.W. & Hampson, D.J., 1996. Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidemiology and infection*, 116(2), pp. 207–16.
- Song, Y. & Hampson, D.J., 2009a. Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. *Veterinary Microbiology*, 137(1–2), pp. 129–136.
- Song, Y., La, T., Phillips, N.D., Bellgard, M.I. & Hampson, D.J., 2009b. A reverse vaccinology approach to swine dysentery vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 137(1–2), pp. 111–119.
- Song, Y., Frey, B. & Hampson, D.J., 2012. The use of ELISAs for monitoring exposure of pig herds to *Brachyspira hyodysenteriae*. *BMC veterinary research*, 8, p. 6.
- Song, Y., La, T., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2015. Development of a serological ELISA using a recombinant protein to identify pig herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Journal*, 206(3), pp. 365–370.
- Songer, J.G., Kinyon, J.M. & Harris, D.L., 1976. Selective medium for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(1), pp. 57–60.
- Songer, J.G., Glock, R.D., Schwartz, K.J. & Harris, D.L., 1978. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from sources other than swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(4), pp. 464–466.
- Sotiropoulos, C., Coloe, P.J. & Smith, S.C., 1994. Identification and characterization of *Serpulina hyodysenteriae* by restriction enzyme analysis and Southern blot analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5), pp. 1397–1401.
- Speicer, S.A., Goy, N., Albin, S., Zimmermann, W., Scheer, P., Doherr, M.G. & Zeeh, F., 2008. Occurrence of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* and assessment of risk factors in Switzerland. En: *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress*, Durban, South Africa, Oral Paper, p. 127.

- Sperling, D., Smola, J. & Cizek, A., 2011. Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *The Veterinary record*, 168(8), p. 215.
- Sperling, D., Vitkova, O.N., Dukhovskiy, A. & Smola, J., 2013. Prevalence of swine dysentery on large-scale Russian farms. En: *Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*, Guildford, United Kingdom, Poster , p.89.
- Stamm, L. V., Bergen, H.L. & Shangraw, K.A., 2001. Natural rifampin resistance in *Treponema* spp. Correlates with presence of N531 in RpoB Rif cluster i. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10), pp. 2973–2974.
- Stanton, T.B., 1992. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 42(1), pp. 189–90.
- Stanton, T.B., Trott, D.J., Lee, J.I., McLaren, A.J., Hampson, D.J., Paster, B.J. & Jensen, N.S., 1996. Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology letters*, 136(2), pp. 181–186.
- Stanton, T.B., Fournié-Amazouz, E., Postic, D., Trott, D.J., Grimont, P.A., Baranton, G., Hampson, D.J. & Saint Girons, I., 1997. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 47(4), pp. 1007–12.
- Stanton, T.B., Postic, D. & Jensen, N.S., 1998. *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. 3, pp. 669–676.
- Stege, H., Jensen, T.K., Møller, K., Baekbo, P. & Jorsal, S.E., 2001. Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 50(1–2), pp. 153–164.
- Stephens, C.P. & Hampson, D.J., 1999. Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in Eastern Australia. *Avian pathology: Journal of the World Veterinary Poultry Association*, 28(5), pp. 447–454.
- Stephens, C.P. & Hampson, D.J., 2001. Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Animal health research reviews*, 2(1), pp. 83–91.
- Stephens, C.P., Oxberry, S.L., Phillips, N.D., La, T. & Hampson, D.J., 2005. The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) colonising hens in commercial flocks. *Veterinary Microbiology*, 107(1–2), pp. 149–157.
- Suenaga, I. & Yamazaki, T., 1983. Experimental infection with *Treponema hyodysenteriae* in nude mice. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene*, 254(4), pp. 528–533.
- Sueyoshi, M. & Adachi, Y., 1990. Diarrhea induced by *Treponema hyodysenteriae*: A young chick cecal model for swine dysentery. *Infection and Immunity*, 58(10), pp. 3348–3362.
- Suh, D.K. & Song, J.C., 2005. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. *Journal of Veterinary Science*, 6, pp. 289–293.
- Swayne, D.E., Eaton, K.A., Stoutenburg, J., Trott, D.J., Hampson, D.J. & Jensen, N.S., 1995. Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity for chickens. *Infection and Immunity*, 63(2), pp. 430–436.

- Swedish National Veterinary Institute, 2014. Swedres-Svarm 2014: consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/swedres_svarm_2014.pdf
- Szynkiewicz, Z.M. & Binek, M., 1986. Evaluation of selective media for primary isolation of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 9(1), pp. 71–77.
- Tachibana, H., Nakamura, S., Hampson, D.J., & Adachi, Y., 2002. Proposal of *Brachyspira ibaraki* sp. nov. for Japanese human intestinal spirochetes. En: Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, USA, p. 63.
- Tae, J.K. & Jae, I.L., 2006. The 23S rRNA gene PCR-RFLP used for characterization of porcine intestinal spirochete isolates. *Journal of Veterinary Science*, 7(3), pp. 277–280.
- Taylor, D.J. & Alexander, T.J., 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *The British Veterinary Journal*, 127(11), pp. 58–61.
- Ter Huurne, A.A., Muir, S., van Houten, M., Koopman, M.B., Kusters, J.G., van der Zeijst, B.A. & Gaastra, W., 1993. The role of hemolysin(s) in the pathogenesis of *Serpulina hyodysenteriae*. *Zentralblatt für Bakteriologie : International Journal of Medical Microbiology*, 278(2–3), pp. 316–325.
- Ter Huurne, A.A., Muir, S., van Houten, M., van der Zeijst, B.A., Gaastra, W. & Kusters, J.G., 1994. Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins. *Microbial pathogenesis*, 16(4), pp. 269–82.
- Terpstra, J.I., Akkermans, I.P.U.M. & Ouwerkerk, H., 1968. Investigations in the etiology of vibriion dysentery (Doyle) in pigs. *Netherlands Journal of Veterinary Science* 1, 5-13.
- Thomsen, L.E., Knudsen, K.E., Jensen, T.K., Christensen, A.S., Møller, K. & Roepstorff, A., 2007. The effect of fermentable carbohydrates on experimental swine dysentery and whip worm infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, 119(2–4), pp. 152–163.
- Thomson, J.R., Smith, W.J. & Murray, B.P., 1998. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *The Veterinary record*, 142(10), pp. 235–239.
- Thomson, J., 2013. Sensitivity and resistance of *Brachyspira* species and consequences for global swine/poultry production. En: Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Guildford, United Kingdom, Season 5 , pp. 47-48.
- Thuma, A., Dán, A., Kaszanyitzky, E., Fazekas, B., Tóth, A. & Glávits, R., 2011. Experimental inoculation of day-old ducks with *Brachyspira pilosicoli* and *B. alvinipulli*. *Acta veterinaria Hungarica*, 59(2), pp. 165–174.
- Trott, D.J., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Duhamel, G.E., Johnson, J.L. & Hampson, D.J., 1996a. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), pp. 206–15.
- Trott, D.J., Atyeo, R.F., Lee, J.I., Swayne, D.A., Stoutenburg, J.W. & Hampson, D.J., 1996b. Genetic relatedness amongst intestinal spirochaetes isolated from rats and birds. *Letters in applied microbiology*, 23(6), pp. 431–436.

- Trott, D.J., Mikosza, A.S., Combs, B.G., Oxberry, S.L. & Hampson, D.J., 1998. Population genetic analysis of *Serpulina pilosicoli* and its molecular epidemiology in villages in the eastern Highlands of Papua New Guinea. *International journal of systematic bacteriology*, 48 (Pt 3), pp.659–668.
- Tsinganou, E. & Gebbers, J.O., 2010. Human intestinal spirochetosis-a review. *German Medical Science : GMS e-journal*, 8, pp. 1–7.
- Vallejo, M.T., 1969. Spirochaetales micro-organisms: an agent possibly associated with swine dysentery. *The Veterinary record*, 85(20), pp. 562–563.
- Vanucci, F.A., Rovira, A., Bekele, A.Z., Larson, B. & Gebhart, C.J., 2013. Experimental reproduction of brachyspiral colitis in pigs infected with “*Brachyspira hamptonii*”. En: *Proceedings of the 44th Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians*, San Diego, California, pp 53-55.
- Vester, B. & Douthwaite, S., 2001. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA Minireview. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), pp. 1–12.
- Vicca, J., Maes, D., Stakenborg, T., Butaye, P., Minion, F., Peeters, J., de Kruif, A., Decostere, A. & Haesebrouck, F., 2007. Resistance mechanism against fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Microbial drug resistance*, 13(3), pp. 166–170.
- Villa, R., Cagnardi, P., Acocella, F., Massi, P., Anfossi, P., Asta, F. & Carli, S., 2005. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of flumequine in pigs after single intravenous and intramuscular administration. *The Veterinary Journal*, 170(1), pp. 101–107.
- Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., La, T., Ryan, K., Moolhuijzen, P., Chapman, B., Black, M., Schibeci, D., Hunter, A., Barrero, R., Phillips, N.D. & Hampson, D.J., 2010. The complete genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* and comparison with other *Brachyspira* genomes. *PLoS ONE*, 5(7). e11455.
- Wassenaar, T.M. & Gaastra, W., 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*, 201(1), pp. 1–7.
- Wayne, P.A., 2015. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. 10th ed.: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI Document No.: M07-A10.
- Welsh, J., Rampino, N., McClelland, M. & Perucho, M., 1995. Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. *Mutation Research*, 338(1–6), pp. 215–229.
- Westerman, L.J., Stel, H.V., Schipper, M.E., Bakker, L.J., Neefjes-Borst, E.A., van den Brande, J.H., Boel, E.C., Seldenrijk, K.A., Siersema, P.D., Bonten, M.J. & Kusters, J.G., 2012. Development of a Real-Time PCR for Identification of *Brachyspira* Species in Human Colonic Biopsies. *PLoS ONE*, 7(12). e52281.
- Whipp, S.C., Robinson, I.M., Harris, D.L., Glock, R.D., Matthews, P.J. & Alexander, T.J., 1979. Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity*, 26(3), pp. 1042–1047.
- WHO, 2017. The 20th essential medicines list. World Health Organization. http://www.who.int/medicines/news/2017/20th_essential_med-list/en/

- Wilberts, B.L., Arruda, P.H., Kinyon, J., Madson, D.M., Frana, T. & Burrough, E.R., 2013. Differential colonic mucin expression in pigs with acute dysentery following oral inoculation with "*B. hamptonii*" or *B. hyodysenteriae*. En: Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochetal Infections in Animals and Humans. Guildford, United Kingdom, p. 35.
- Wilberts, B.L., Arruda, P.H., Kinyon, J.M., Madson, D.M., Frana, T.S. & Burrough, E.R., 2014. Comparison of sesion severity, distribution, and colonic mucin expression in pigs with acute swine dysentery following oral inoculation with "*Brachyspira hamptonii*" or *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary pathology*, 51(6), pp. 1096-108.
- Wilcock, B.P. & Olander, H.J., 1983. Studies on the pathogenesis of swine dysentery. *Dissertation Abstracts International*, 43(12), p. 3785.
- Willems, H. & Reiner, G., 2010. A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 123(5-6), pp. 205-209.
- Whiting, R.A., Doyle, L.P. & Spray, R.S., 1921. Swine dysentery. *Purdue University Agriculture Experimental Station Bulletin*, 257, pp. 1-15.
- Wys, C., Choi, B.K., Schüpbach, P., Guggenheim, B. & Göbel, U.B., 1996. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *International journal of systematic bacteriology*, 46(3), pp. 745-752.
- Zmudzki, J., Szczotka, A., Nowak, A., Strzelecka, H., Grzesiak, A. & Pejsak, Z., 2012. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from 21 Polish farms. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(2), pp. 259-265.
- Zuerner, R.L. & Stanton, T.B., 1994. Physical and genetic map of the *Serpulina hyodysenteriae* B78T chromosome. *Journal of Bacteriology*, 176(4), pp. 1087-1092.