

Comparación de aislamientos de *Brachyspira Hyodysenteriae* recuperados de cerdos multiplicadores aparentemente sanos con aislamientos de lotes con disentería porcina

LA T¹, ROHDE J², DALLE PHILLIPS N¹, HAMPSON DJ¹.

¹Escuela de Veterinaria y Ciencias de la Vida. Murdoch University, Murdoch, Australia.

²Instituto de Microbiología. Universidad de Medicina Veterinaria, Hannover, Alemania.

RESUMEN

La disentería porcina (DP) es una colitis mucohemorrágica clásica de cerdos de crecimiento/finalización como resultado de una infección por la espiroqueta intestinal anaeróbica *Brachyspira hyodysenteriae*. Este estudio tuvo como objetivo determinar si los aislamientos de *hyodysenteriae* de cerdos sanos en tres lotes alemanes que suministraban primerizas a otras granjas, diferían de los aislamientos de nueve hatos de producción alemanes con

disentería porcina. Los aislamientos se sometieron a secuenciación genómica completa y la tipificación de secuencias multilocus *in silico* mostró que dos de los tres lotes multiplicadores eran de tipos de secuencia no descritos previamente (ST132, ST133 y ST134), con todos los aislamientos del mismo lotes que tienen el mismo ST. Todos los aislamientos se examinaron para detectar la presencia de 332 genes que codifican factores asociados con virulencia, y estaban bien conservados. Los aislamientos de un lote multiplicador fueron atípicos por ser hemolíticos débiles: tuvieron 10 sustituciones de aminoácidos en la proteína hemolisina III y cinco en la proteína de activación de la hemolisina en comparación con la cepa de referencia WA1, y tuvieron una interrupción en el sitio promotor del gen *hlyA*.



Estos cambios probablemente contribuyan al fenotipo débilmente hemolítico y la supuesta falta de virulencia. Estos mismos aislamientos también tenían inserciones de nueve pares de bases en los genes del metabolismo del hierro *bitB* y *bitC* y carecían de cinco de los seis genes de plásmidos que anteriormente se habían asociado con la colonización.

Otras diferencias generales entre los aislamientos de los diferentes grupos fueron en los genes de tres de las cinco proteínas de la membrana externa, que no se encontraron en todos los aislamientos, y en los miembros de un bloque de seis genes de plásmidos. Los aislamientos de tres rebaños con DP tenían los seis genes de plásmidos, mientras que los aislados que carecían de algunos de estos genes se encontraron en los tres lotes sanos, pero también en aislamientos de seis rebaños con DP. Otras diferencias en los genes de función desconocida o en la expresión génica pueden contribuir a la variación en la virulencia.

Alternativamente, una mejor crianza en granja y una mejor salud en general pueden haber hecho que los cerdos en los dos lotes multiplicadores, colonizados por aislamientos "típicos" altamente hemolíticos, sean menos susceptibles a la expresión de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La espiroqueta intestinal *Brachyspira hyodysenteriae* es el agente causal clásico de la disentería porcina (DP), una enfermedad asociada típicamente con colitis severa y diarrea mucoide sanguinolenta que se observa principalmente en cerdos de cebo y de finalización¹. También se ha demostrado que dos especies relacionadas, *Brachyspira suanatina* y "*Brachyspira hampsonii*", aparecen en cerdos y causan DP en ocasiones^{2,3}. La DP es una enfermedad común que ocurre en todos los países de producción porcina y puede causar grandes pérdidas económicas en la cría de cerdos debido a la reducción de la producción, la mortalidad y los altos costes de tratamiento. Además, la enfermedad puede representar un problema de bien-

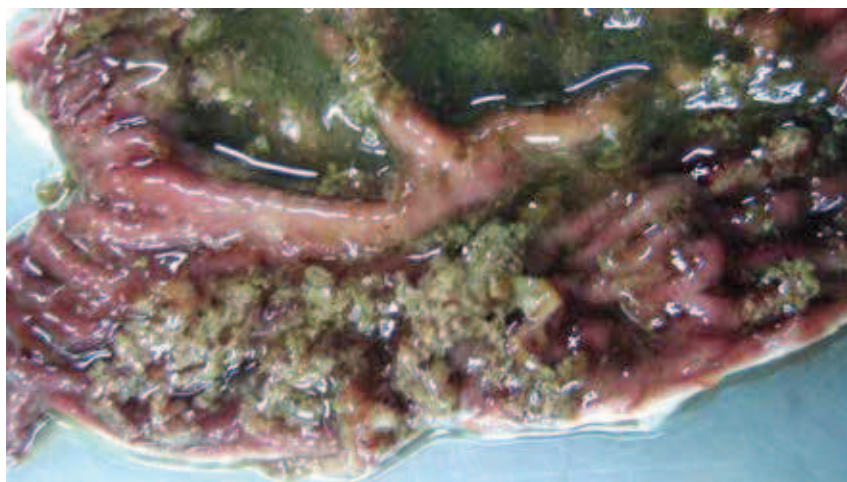
estar animal si no se controla adecuadamente. Las *hyodysenteriae* en hatos de reproducción y multiplicadores también pueden causar grandes trastornos en la industria al impedir el comercio y el movimiento de animales. Aunque la infección con *B. hyodysenteriae* puede conducir a DP típica, los aislamientos de la espiroqueta también se han recuperado de rebaños aparentemente sanos^{4,6}. La falta de enfermedad en un rebaño colonizado podría estar asociada con la presencia de cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* con virulencia reducida⁷. El uso de un régimen de medicación eficaz y/o la aparición de cambios relacionados con la dieta en condiciones físicas o microbiológicas en el intestino grueso, hacen que el entorno sea desfavorable para la colonización por espiroquetas⁸⁻¹².

La preocupación por la presencia de los espiroquetas en los rebaños de reproducción y multiplicación podría mejorarse si hubiera una forma fácil y confiable de reconocer cepas con bajo potencial de virulencia que, probablemente, no causen enfermedades si se transfieren a los rebaños de producción. La infección experimental de cerdos con tales cepas puede dar una indicación de su potencial de virulencia^{4-6,13}, pero este procedimiento es costoso y complicado y, como resultado, no es práctico para el uso rutinario.

Alternativamente, el desarrollo de métodos para el reconocimiento de los atributos de la cepa que los haría menos propensos a causar enfermedades sería altamente útil. Una serie de factores potenciales de virulencia que promueven la colonización se han descrito en *B. Hyodysenteriae*^{14,15}. Estos incluyen hemolisinas, fosfolipasas y lipooligosacáridos (factores de virulencia), y aquellos asociados con quimiotaxis, motilidad, factores accesorios para la utilización de sustratos, enlace de hierro, aerotolerancia y lipoproteínas de la superficie celular (factores de estilo de vida de virulencia). Además, se ha sugerido que un bloque de seis genes de función incierta en el plásmido de ~ 36 kB son factores de virulencia en el estilo de vida, promoviendo la colonización^{16,17}. Las cepas que carecen de genes virulentos

pueden ser menos capaces de colonizar o colonizar en números críticos, mientras que las que carecen de genes asociados con daño tisular pueden no ser capaces de causar lesiones típicas en cerdos colonizados.

Este estudio comparó a *B. Hyodysenteriae* aislada de tres hatos multiplicadores alemanes aparentemente sanos >



Colon de un lechón de 10 semanas de vida con disentería porcina. Necrosis superficial de la mucosa asociada a hemorragia discreta y contenido catarral.

➤ a aislamientos recuperados de cerdos con DP en hatos de producción del mismo país. El objetivo era determinar si los aislamientos de los rebaños multiplicadores tenían diferencias que pudieran explicar su aparente falta de virulencia.

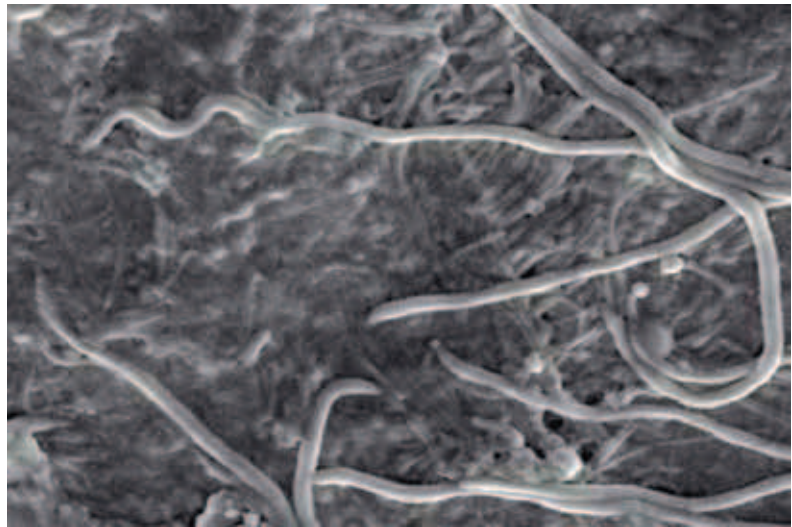
No se encontraron diferencias genómicas consistentes que pudieran explicar las diferencias en la expresión de la enfermedad por los aislamientos de los tres rebaños multiplicadores, excepto en el caso de aislamientos débilmente hemolíticos de un rebaño multiplicador que tuvieron una alteración en la región promotora para el gen de la hemolisina *hlyA*, así como cambios en la hemolisina III y las proteínas de activación de la hemolisina, y en los genes del metabolismo del hierro *bitB* y *bitC*.

Ninguno de los aislamientos de los tres rebaños multiplicadores poseía los seis bloques de genes plasmídicos, pero también se encontraron aislamientos con una falta similar de genes plásmidos en algunos grupos con enfermedad, lo que indica que incluso si estos genes aumentan el potencial de colonización no son esenciales para la producción de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de aislados de *Brachyspira hyodysenteriae*

Este estudio utilizó 23 aislados de *B. hyodysenteriae* obtenidos de la recogida de cultivos de la Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover (Alemania). Los aislamientos originalmente se habían recuperado de muestras fecales de diagnóstico recibidas de 12 hatos de cerdos alemanes presentados en 2014. Trece aislamientos provenían de tres hatos multiplicadores sanos A, B y C (n = 6, 4 y 3 aislamientos, respectivamente) y se recuperaron durante el



Brachyspira hyodysenteriae.

análisis de rutina de muestras fecales de cerdos sanos para confirmar el alto estado de salud en curso de los rebaños. Estos rebaños suministraron existencias genéticamente mejoradas a los rebaños de producción. No se utilizaron regularmente antimicrobianos que pudieran enmascarar la presencia de enfermedades en los cerdos. Los otros diez aislamientos se enviaron de nueve rebaños de producción que tenían una historia clínica de DP, pero que no estaban directamente vinculados a los rebaños multiplicadores (Tabla 1).

Inesperadamente, *B. Hyodysenteriae* se aisló del hato multiplicador A en 2014 durante la evaluación de rutina de la salud general de los cerdos. A medida que el rebaño proporcionaba cerdos a otros rebaños, se realizó un programa de erradicación en el cual el rebaño se despobló durante seis semanas antes de ser repoblado. Una empresa profesional llevó a cabo un programa de limpieza, desinfección y control de plagas a fondo durante el período de despoblación; posteriormente, el muestreo de rutina indicó que

la granja estaba libre de *B. hyodysenteriae*. Seis meses después, se aislaron nuevamente las espiroquetas de muestras fecales durante el examen de rutina. Los aislamientos anteriores (n = 1) y posteriores (n = 5) del intento de erradicación estaban disponibles para el examen. Posteriormente, se encontró una colonización aparentemente subclínica similar en el rebaño multiplicador B ubicado a aproximadamente 30 kilómetros del rebaño A, y que recibió pruebas adicionales

Aislado	Lote	Enfermedad	ST ^a	Hemólisis ^b	Bloque de genes plasmídicos ^c					
					ORF11	ORF12	ORF13	ORF14	ORF15	ORF16
JR11	A	Sin DP	130	S	N	N	P	P	P	P
JR12	A	Sin DP	132	S	N	N	P	P	P	P
JR13	A	Sin DP	132	S	N	N	P	P	P	P
JR14	A	Sin DP	132	S	N	N	P	P	P	P
JR15	A	Sin DP	132	S	N	N	P	P	P	P
JR16	A	Sin DP	132	S	N	N	P	P	P	P
JR17	B	Sin DP	133	S	N	N	N	N	P	N
JR18	B	Sin DP	133	S	N	N	N	N	P	N
JR19	B	Sin DP	133	S	N	N	N	N	P	N
JR110	B	Sin DP	133	S	N	N	N	N	P	N
JR111	C	Sin DP	134	W	N	N	N	N	P	N
JR112	C	Sin DP	134	W	N	N	N	N	P	N
JR113	C	Sin DP	134	W	N	N	N	N	P	N
JR120	D	DP	138	S	P	P	P	P	P	P
JR127	D	DP	139	S	P	P	P	P	P	P
JR25	E	DP	118	S	P	P	P	P	P	P
JR27	F	DP	104	S	P	P	P	P	P	P
JR21	G	DP	112	S	N	N	P	P	P	P
JR23	H	DP	137	S	N	N	N	N	P	N
JR19	I	DP	52	S	N	N	N	N	P	N
JR20	J	DP	136	S	N	N	N	N	N	N
JR24	K	DP	120	S	N	N	N	N	N	N
JR26	L	DP	120	S	N	N	N	N	N	N

^aST: Secuencia tipo
^bS: Hemólisis fuerte; W: Hemólisis débil
^cN: Los seis plásmidos ORFs.

TABLA 1

Origen, estado de la enfermedad, tipo de secuencia, fuerza de la hemólisis y perfiles del gen plasmídico (ORF) de 23 aislados de *B. hyodysenteriae*.

porque existían lechones del mismo origen que el rebaño A. Igualmente, se recuperó durante la vigilancia *B. hyodysenteriae*, un aislado de *B. hampsonii* que posteriormente se identificó como grupo genético III en la secuenciación multilocus tipificación¹⁸. La manada C era una manada cerrada que no había recibido ningún cerdo vivo durante 15 años, y estaba ubicada en una región diferente de Alemania a las manadas A y B. Ninguna de las tres manadas tenía contacto directo entre sí.

CULTURA E IDENTIFICACIÓN

Las muestras fecales de diagnóstico y el contenido del colon se cultivaron en agar selectivo con *Trypticase Soy* (TSA) suplementado con 0,1% de extracto de levadura, 6 µg / ml de vancomicina, 6,25 µg / ml de colistina, 12,5 µg / ml de rifampicina, 15,25 µg / ml de espiramicina, 200 µg / ml de espectinomicina y 5% de sangre bovina¹⁹ y en agar sangre *Columbia* (CBA), todos suministrados por Oxoid, Wesel (Alemania), y se incubaron anaeróbicamente en un *AnaeroJar* con un generador de *AnaeroGen* (Oxoid) a 42° C para seis días. El crecimiento de *Brachyspira* sospechado se confirmó mediante microscopía de contraste de fase y se identificó a nivel de especie utilizando *nox-RFLP* como se describió anteriormente²⁰⁻²². Aislamientos identificados posteriormente como *B. hyodysenteriae* se confirmaron su identidad utilizando PCR específica para especies de *hyodysenteriae*²³ y secuenciación de genes *nox* utilizando los mismos cebadores que para *nox-RFLP*. La interpretación de los resultados de la secuenciación se basó en la guía *CLSI MM18-A*²⁴. Antes de la secuenciación genómica, la identidad de los aislamientos de *B. hyodysenteriae* nuevamente se confirmaron de forma independiente utilizando una PCR basada en *nox* modificada²⁵.

Fuerza de la hemólisis

Se registró la fuerza de la hemólisis beta alrededor del crecimiento braquiespiral en las placas de aislamiento para todos ellos. La fuerza de la hemólisis para todos los aislamientos se probó nuevamente tanto en TSA con 10% de sangre bovina como en CBA con 5% de sangre ovina, donde se hizo un corte en el agar durante la inoculación para mejorar cualquier hemólisis (la prueba del “fenómeno del anillo”). La producción de hemolisina también se indujo durante hasta dos horas a partir de células en reposo utilizando el tipo de *ARN XI-C* (*Sigma-Aldrich*, *St. Louis*, *EE. UU.*). Como se describió anteriormente²⁶, las células de espiroquetas en crecimiento exponencial se recogieron de placas de TSA después de 5 días de crecimiento. Las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) antes de resuspenderse en PBS suplementado con glucosa 2 mM, MgSO₄ 2 mM y núcleo de ARN al 0,2% (p/v). Las espiroquetas se contaron en una cámara de hemocitómetro vista con un microscopio

de contraste de fase, los números se ajustaron a aproximadamente 1 x 10⁶ células por ml con el mismo tampón y se incubaron 2 ml de suspensión celular a 37 ° C.

Secuenciación genómica completa

El ADN bacteriano se extrajo de cultivos de cinco días de *B. hyodysenteriae* utilizando el kit de tejido y sangre *DNeasy* (*Qiagen*, *Hilden*, *Alemania*). Secuencias genómicas de *B. hyodysenteriae* generaron cepas en un *Illumina MiSeq* utilizando química v3 y lecturas de pares pareados de 300 pares de bases (pb) utilizando bibliotecas *Nextera XT* de doble índice. El tamaño medio del inserto fue de alrededor de 250 a 300 pb y la secuenciación se realizó a una profundidad de cobertura de 70x. Las secuencias contiguas ensambladas se mapearon a la secuencia del genoma de la cepa de *B. Hyodysenteriae* WA1 (número de acceso NC_012225) utilizando *CONTIGuator*²⁷ con un valor *Blast E* de 1e-20.

Investigación del entorno genómico alrededor de los genes de la hemolisina

Las regiones genómicas directamente adyacentes a la secuencia de codificación de los ocho genes asociados a la hemolisina se examinaron utilizando la herramienta de alineación *MUSCLE* del software *Geneious R9* para identificar posibles diferencias en las regiones promotoras entre los aislados.

RESULTADOS

Aislamiento de espiroquetas.

El crecimiento del espiroquetal se registró como escaso u ocasionalmente moderado a partir de muestras fecales de los tres hatos multiplicadores, mientras que fue pesado para todas las muestras recuperadas de los nueve hatos de producción con DP. Veinte muestras de colon que se examinaron de cerdos de la manada B mostraron colitis linfoplasmocítica crónica con hiperplasia del tejido linfoidal asociado al intestino. Las muestras de un animal también mostraron el agotamiento de las células caliciformes, y se aisló *Brachyspira murdochii* de esta muestra. Un fuerte crecimiento de *B. hampsonii* se recuperó de una muestra de colon, y crecimientos grandes y escasos de *B. Hyodysenteriae* se recuperaron de otras dos muestras de colon. Se realizó una necropsia de tres cerdas de la manada C y no se observaron hallazgos histológicos o macroscópicos compatibles con la DP, aunque el crecimiento de *B. Hyodysenteriae* fue moderado o intenso. Ninguno de los productores que recibieron cerdos de los tres rebaños multiplicadores antes de que dejaran de suministrar el stock informó sobre la aparición subsiguiente de DP.

Montaje del genoma

Secuenciación de la cobertura de las lecturas finales emparejadas de la base de *Illumina 300* y estadísticas >

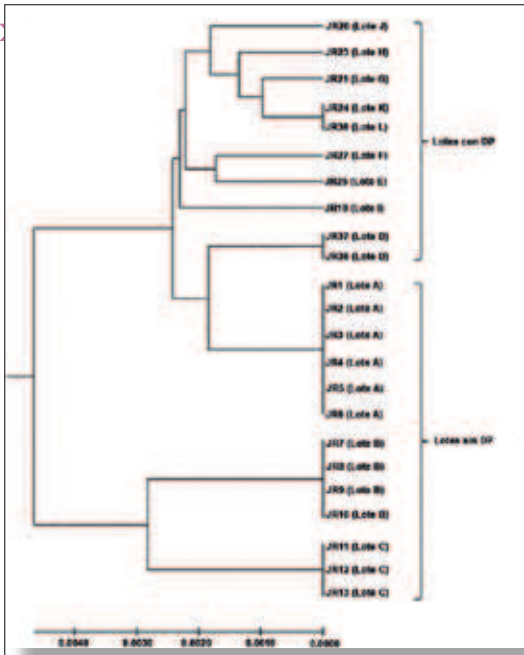


FIGURA 1
Dendrograma MLST que muestra las relaciones entre las 11 ST del alemán B. Aislamientos de *hyodysenteriae* de este estudio.

► de ensamblaje para las 23 cepas de *B. hyodysenteriae* se muestra en la *tabla 2*. El tamaño del genoma de todas las cepas fue de aproximadamente 3 Mb (3.172.065 a 3.622.295 pb), que es similar a la cepa de referencia WA1 de *B. Hyodysenteriae*. El contenido de GC fue de alrededor del 27,1%, lo que también está de acuerdo con los valores para la cepa de referencia^{14,15}.

Genoma y plásmido de la cepa WA1

Los resultados para mapear las secuencias contiguas ensambladas con el genoma de la cepa WA1 de referencia se muestran en la *Tabla 3*. Todas las cepas tuvieron una cobertura de alineación de la secuencia del genoma entre 2,28% y 18,2% en comparación con el genoma WA1. De las secuencias mapeadas, la similitud con el genoma WA1 varió de 94.04% a 96.98%.

Escritura de secuencia multilocus

Los tipos de secuencia (STs) para los aislados de *B. hyodysenteriae* se muestran en la *Tabla 1*, y el dendrograma MLST se muestra en la *Figura 1*. Los 23 aislamientos alemanes se asignaron a 11 ST (*Figura 1*). Los aislamientos de los rebaños multiplicadores B y C estaban más estrechamente relacionados entre sí que con los de los otros nueve tipos de secuencia (ST), originados a partir del reba-

ño multiplicador A y los rebaños de producción. Los aislamientos de los rebaños multiplicadores A, B y C eran de ST no descritos anteriormente (ST132, ST133 y ST134, respectivamente), y todos los aislamientos del mismo rebaño tenían el mismo ST. Los aislamientos recuperados del hato A antes y después del programa de erradicación tuvieron el mismo ST (ST132), lo que sugiere que la misma cepa había vuelto a aparecer. Los dos aislamientos de la manada D también compartieron un ST común (ST138) y los aislamientos simples de los rebaños K y L fueron ambos de ST120, mientras que todos los demás aislamientos de los diferentes rebaños tuvieron diferentes ST. Tres de las ST de las nueve manadas con SD fueron descritas recientemente, mientras que las otras cinco tenían ST que se describieron anteriormente. Estas últimas incluyeron cepas de Alemania (ST52, ST112, ST118 y ST120), Bélgica e Italia (ST52), y Estados Unidos (ST104), recuperadas en las décadas de 1990, 2000 y 2010 (*Tabla 2*).

La cepa débilmente hemolítica D28 de Bélgica pertenecía a un ST diferente (ST172) de los aislados en el presente estudio³². Un árbol de expansión mínima que muestra las relaciones de las ST entre sí y con las ST descritas anteriormente se presenta como la *Figura 2*. Aunque los aislamientos de los rebaños A, B y C pertenecían a las ST recién descritas, estaban estrechamente relacionados con otras ST. Por ejemplo, el ST de los aislamientos de la manada A (ST132) compartió cuatro alelos MLST con ST23 que contenía un aislado australiano de la década de 1980 y cuatro con ST53 que contenía un aislado de Estados Unidos. De la década de 1970; el ST de aislamientos de la manada B (ST133) compartió cuatro alelos con ST87 que contenía un aislado italiano de 2006, pero también compartió tres alelos con ST52 que contenía aislamientos de Alemania, Bélgica, Italia y Austria aislados entre 1996 y 2009; el ST de los aislamientos del hato C (ST134) compartió tres alelos con ST112 y con ST120 que incluyó aislamientos alemanes recuperados en 2005 (ST112) y 2013 (ST120),

TABLA 2

Nombre, origen y fecha de aislamiento para los aislamientos porcinos anteriores que tenían el mismo tipo de secuencia (ST) que los de este estudio.

DP	Aislado	País de origen	Año del aislado
52	A5677/96	Alemania	1996
52	Be45	Bélgica	1990s
52	T20	Alemania	1990s
52	30i	Italia	2005
52	227	Italia	2009
104	NM62	Estados Unidos	2012
104	NM35	Estados Unidos	2012
104	NM63	Estados Unidos	2012
112	V0779/05	Alemania	2005
118	V2641/04	Alemania	2004
120	V332/13	Alemania	2013

doi:10.1371/journal.pone.0160362.t002

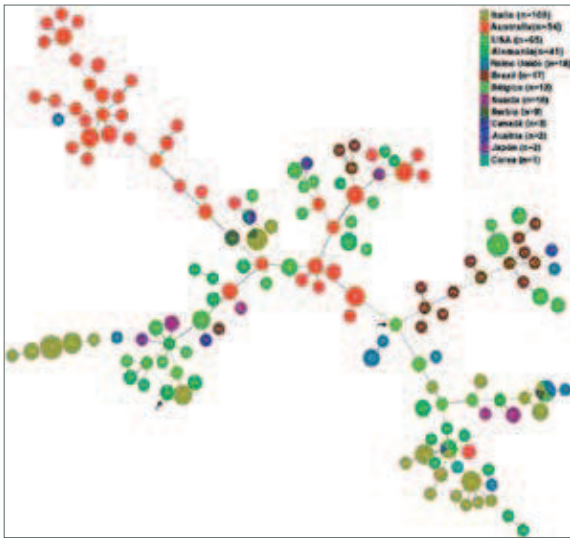


FIGURA 2

Árbol de expansión mínima que muestra las relaciones de aislamientos de *B. hyodysenteriae* de este estudio (marcados con un asterisco) y 349 aislamientos previamente descritos que se obtuvieron de PubMLST. Los aislamientos mostrados se originaron en Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Alemania, Italia, Japón, Corea, Serbia, Suecia, el Reino Unido y los Estados Unidos. En el MST, cada nodo representa un ST diferente (etiquetado) y el color representa el país de origen. El tamaño del nodo indica el número de cepas que tienen el mismo ST.

y los aislamientos actuales de los rebaños G, y K y L respectivamente.

Aislamientos y hemólisis

Los aislamientos de la manada C fueron todos débilmente hemolíticos, mientras que todos los demás aislamientos fueron fuertemente hemolíticos. Cuando se indujeron células en reposo en presencia de núcleo de ARN, se detectó actividad hemolítica en el sobrenadante de los aislamientos fuertemente hemolíticos después de 30 minutos de incubación, mientras que no se detectó actividad hemolítica en el sobrenadante de los aislamientos débilmente hemolíticos, incluso después de 120 minutos de incubación.

Presencia de genes que codifican factores asociados al estilo de vida virulencia y virulencia

En todos los casos, los aislamientos que compartían un ST tenían los mismos perfiles de genes de virulencia y

podían considerarse representativos de una sola cepa. En consecuencia, el nombre de la cepa utilizada es el del primer aislamiento recuperado de cada hato (p. Ej., JR11 para el hato C). De los 332 genes investigados, 12 (3,8%) estaban ausentes en uno o más aislamientos. Los primeros seis fueron genes de proteínas de membrana: *bhlp16* (que estuvo ausente en los aislados con STs 133, 134, 112 y 137 de los rebaños B, C, G y H respectivamente), *bhlp17*. 6 (que solo se encontró en el aislado en ST137 del hato H), *bhmp39e* y *bhmp39f* (ambos genes ausentes de los aislados con STs 133, 134 y 137 en los hatos B, C y H respectivamente), supuesta cisteína peptidasa BHWA1_RS01825 (ausente de los aislados) con STs 132, 120, 138, 118 y 137 en los rebaños A, C, D, E, H y K respectivamente), y proteína putativa de membrana interna BHWA1_RS02825 (ausente de aislados con STs 132, 133, 134, 120, 138, 152 y 136 en las manadas A, B, C, D, I, J y K respectivamente). Además, hubo diferencias entre los aislamientos en los

miembros del bloque de seis genes de plásmidos (ORF 11-16; *Tabla 1*). Los aislamientos con STs 138, 118 y 104 de los rebaños D, E y F (todos con SD) tenían los seis genes plasmídicos presentes; Los aislamientos con ST132 (sin enfermedad) y ST112 (con SD) carecían de dos genes (ORFs 11 y 12); los aislados con ST 133 y 134 (sin enfermedad) y ST 137 y 52 (con SD) solo tenían uno de los >



Diarrea porcina.

➤ genes presentes (ORF15); y los aislados con STs 136 y 120 (con SD) no tenían ninguno de los seis genes.

Similitud de secuencia entre los genes estudiados.

En general, las comparaciones entre cepas de las secuencias de los genes y sus secuencias de aminoácidos traducidas mostraron que estas estaban altamente conservadas, con una similitud mayor al 90% a nivel de nucleótidos y una similitud mayor al 92.1% a nivel de aminoácidos.

DISCUSIÓN

El primer hallazgo importante en este estudio fue la confirmación de que cada una de las tres manadas multiplicadoras fue colonizada por cepas de *B. Hyodysenteriae* que no fueron genéticamente atípicas de la especie (Figura 2). El segundo fue que cada uno de los rebaños multiplicadores tenía su propia nueva cepa de *B. hyodysenteriae* y, en consecuencia, que era poco probable que se hubieran infectado de una fuente común. Esto fue particularmente importante para los hatos A y B, ya que ambos recibieron lechones del mismo hato de cría. Como los aislamientos del hato A que se recuperaron antes y después del programa de erradicación compartieron el mismo perfil genético de ST y virulencia, la explicación más probable es que se trata de una cepa única que persistió en el entorno de la granja después del procedimiento de desabastecimiento y limpieza.

No estaba claro cuánto tiempo estuvo presente la colonización subclínica en los rebaños multiplicadores, pero como se encontraron casi por casualidad, pudieron haber estado presentes durante algún tiempo, y esto lleva a la implicación de que otros rebaños multiplicadores aparentemente saludables podrían potencialmente colonizarse de manera similar, pero quedan sin identificar. Los rebaños fueron atendidos por consultores veterinarios expertos y tenían una rutina de presentar muestras fecales normales para su examen cada seis meses, así como muestras de cerdos productores y finalistas con diarrea. Desafortunadamente, este régimen de detección aparentemente no es lo suficientemente sensible para la detección, ya que inicialmente solo se identificó a la manada A como colonizada a través de esta ruta. Un escenario de colonización subclínica podría tener importantes consecuencias para la propagación de la infección a través de la industria porcina alemana. De hecho, el problema no se limita a Alemania, ya que recientemente se identificó un rebaño multiplicador suizo infectado³³ al igual que otros rebaños aparentemente sanos en Australia^{7,34}. Los últimos rebaños infectados se detectaron inicialmente mediante detección serológica, y se obtuvo confirmación de la colonización mediante el cultivo de las paredes colónicas de cerdos aparentemente sanos en el matadero. Parece probable que el problema de

la colonización no reconocida también pueda ocurrir en otros países de cría de cerdos, pero puede que no haya sido investigado adecuadamente.

Una posible explicación de por qué las cepas en los rebaños multiplicadores no causaban enfermedad es que eran de virulencia reducida en comparación con la *B* típica. Los aislados de *hyodysenteriae* son menos capaces de colonizar en cantidades lo suficientemente grandes como para causar enfermedad y / o ser detectados, y / o carecen de factores de virulencia capaces de inducir lesiones típicas^{4,6,13,35}. Dado que se identificaron diferentes cepas (ST) en los tres rebaños multiplicadores, intuitivamente tal falta de virulencia es menos probable que sea el caso para los tres rebaños. Sin embargo, en apoyo de una posible reducción del potencial de colonización, se encontró que en los tres rebaños solo se recuperaron cantidades relativamente bajas de espiroquetas de las heces, mientras que se recuperaron números altos de los rebaños de producción con enfermedad. Por otro lado, los números de espiroquetas en el colon tendían a ser más altos que en las heces. En relación con la capacidad de producir lesiones, en la manada B, las muestras de colon de diagnóstico examinadas mostraron una colitis linfoplásmica crónica, que no es compatible con la SD aguda donde los cerdos suelen presentar colitis mucohemorrágica. *B. murdochii* y *b. hamptonii* también se aislaron de la manada B, y la colonización potencialmente persistente por parte de los miembros de estas especies podría contribuir a una colitis linfoplasmática crónica. En contraste, no se encontraron lesiones en tres cerdas de la manada C, a pesar de que tenían un gran crecimiento de *B. Hyodysenteriae* en sus dos puntos. Estos hallazgos son consistentes con los aislamientos de estos dos rebaños que tienen un potencial de virulencia diferente pero relativamente reducido en comparación con los aislamientos de los rebaños de producción. La cepa J11 de la manada C parecía ser particularmente inocua.

Los aislamientos de las nueve manadas con SD pertenecían a tres ST recién identificadas y a cinco que anteriormente se habían registrado en países europeos o en los Estados Unidos (Tabla 2). Por consiguiente, estos aislamientos también podrían considerarse como típicos de los que circulan en rebaños con SD en Europa, por lo que deberían representar un buen conjunto para compararlos con los aislamientos de los tres rebaños multiplicadores donde no se observó la enfermedad.

De los factores de virulencia, la actividad hemolítica de *B. Se cree que la hyodysenteriae* es particularmente importante para la producción de lesiones, y se han descrito ocho genes que codifican proteínas predichas para participar en la actividad hemolítica^{14,15,43,44}. El número y las secuencias de todos estos genes en general se conservaron bien en los aislamientos del estudio actual. En relación con la cepa



débilmente hemolítica J11 de la manada C, el gen de la hemolisina III y la proteína fueron los más disímiles de los de WA1 (Tabla 3), con 10 sustituciones de aminoácidos que se pronosticaron en ambas regiones de dominio transmembrana y topológico del canal-forma proteica, basada en la estructura de yqfA en *Escherichia coli*. Desafortunadamente, los rebaños de cría y multiplicación con cerdos que no muestran signos de enfermedad, pero que albergan cepas de *B. hyodysenteriae* se colocan en una posición difícil. En el caso de los tres rebaños descritos aquí, se dejaron de vender cerdos vivos. En el trabajo actual, no fue posible usar definitivamente el genotipo para identificar cepas que tenían virulencia reducida, pero la cepa J11 en el hat C tuvo diferencias significativas con respecto a tener hemólisis débil, y potencialmente disminuyó la unión de hierro y la falta de genes de plásmidos que sugieren un potencial reducido para causar enfermedades. Es importante tener en cuenta que las cepas que carecen de parte o la totalidad del bloque de seis genes de plásmidos aún pueden ser capaces de causar enfermedades en condiciones de mal manejo, estrés o cambios en la dieta que pueden mejorar la colonización y predisponer al desarrollo de la enfermedad. ■

REFERENCIAS

- Hampson DJ. Brachyspiral colitis. In: Zimmerman JJ, Karkiker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, (editors). Diseases of swine. Chichester: Wiley-Blackwell; 2012. p. 680–96.
- Mushtaq M, Zubair S, Råsbäck T, Bongcam-Rudloff E, Jansson DS. *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics. BMC Microbiol. 2015; 15(1):208.
- Chander Y, Primus A, Oliveira S, Gebhart CJ. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hamptonii*". J Vet Diagn Invest. 2012; 24(5):903–10. PMID:22914820
- Lysons RJ, Lemcke RM, Bew J, Burrows MR, Alexander TJJL. 1982. An avirulent strain of *Treponema hyodysenteriae* isolated from herds free of swine dysentery. In: Proceedings of the 7th International Pig Veterinary Society Congress; 1982; Mexico City, Mexico. p. 40.
- Hampson DJ, Cutler R, Lee BJ. Virulent *Serpulina hyodysenteriae* from a pig in a herd free of clinical swine dysentery. Vet Rec. 1992; 131(14):318–9. PMID:1441137
- Thomson JR, Murray BP, Henderson LE, Moore L, Meikle CS. Virulence studies in porcine *Brachyspira* species by experimental challenge of pigs. In: Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans; 2003; Eddleston, Scotland. abstract 10.
- Hampson DJ, La T, Phillips ND. Emergence of *Brachyspira* species and strains: reinforcing the need for surveillance. Porc Health Manag. 2015; 1:8.
- Siba PM, Pethick DW, Hampson DJ. Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. Epidemiol Infect. 1996; 116(2):207–16. PMID:8620913
- Pluske JR, Siba PM, Pethick DW, Durmic Z, Mullan BP, Hampson DJ. The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. J Nutr. 1996; 116(2):2920–33.
- Thomsen LE, Knudsen KE, Jensen TK, Christensen AS, Møller K, Roepstorff A. The effect of fermentable carbohydrates on experimental swine dysentery and whip worm infections in pigs. Vet Microbiol. 2007; 119(2–4):152–63. PMID:17049759
- Hansen CF, Phillips ND, La T, Hernandez A, Mansfield J, Kim JC, et al. Diets containing inulin but not lupins help to prevent swine dysentery in experimentally infected pigs. J Anim Sci. 2010; 110(10):3327–36. PMID:20525927
- Hansen CF, Hernandez A, Mansfield J, Hildago A, La T, Phillips ND, et al. A high dietary concentration of inulin is necessary to reduce the incidence of swine dysentery in pigs experimentally challenged with *Brachyspira hyodysenteriae*. Br J Nutr. 2011; 106(10):1506–13. PMID:21736788
- Achacha M, Messier S, Mittal KR. Development of an experimental model allowing discrimination between virulent and avirulent isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. Can J Vet Res. 1996; 60(1):45–9. PMID:8825993
- Bellgard MI, Wanchanthuek P, La T, Ryan K, Moolhuijzen P, Albertyn Z, et al. Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. PLoS One. 2009; 4(3):e4641. PMID:19262690
- Black M, Moolhuijzen P, Barrero R, La T, Phillips ND, Hampson DJ, et al. Analysis of multiple *Brachyspira hyodysenteriae* genomes confirms that the species is relatively conserved but has potentially important strain variation. PLoS One. 2015; 10(6):e0131050. PMID:26098837

16. La T, Phillips ND, Wanchanthuek P, Bellgard MI, O'Hara AJ, Hampson DJ. Evidence that the 36kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. *Vet Microbiol.* 2011; 153(1-2):150-5. PMID:21458173
17. La T, Phillips ND, Thomson JR, Hampson DJ. Absence of a set of plasmid-encoded genes is predictive of reduced pathogenic potential in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Res.* 2014; 45:131. PMID:25512147
18. Mirjakar NS, Bekele AZ, Chander YY, Gebhart CJ. 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(9):2908-18. PMID:26135863
19. Dünser M, Schweighart H, Pangerl R, Awad-Masalmeh M, Schuh M. Swine dysentery and spirochaetal diarrhea—investigations into enteritis caused by *Serpulina* species. *Wiener Tierärztl Monatsschr.* 1997; 84:151-61.
20. Rohde J, Rothkamp A, Gerlach GF. Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7):2598-600. PMID:12089283
21. Rohde J, Habighorst-Blome K. An up-date on the differentiation of *Brachyspira* species from pigs with *nox*-PCR-based restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol.* 2012; 158(1-2):211-5. PMID:22386675
22. Rohde J, Habighorst-Blome K. Corrigendum to "An up-date on the differentiation of *Brachyspira* species from pigs with *nox*-PCR-based restriction fragment length polymorphism" [*Vet Microbiol.* 2012; 158:211-5] *Vet Microbiol.* 2013; 162(1):303.
23. Atyeo RF, Stanton TB, Jensen NS, Suriyaarachichia DS, Hampson DJ. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. *Vet Microbiol.* 1999; 67(1):47-60. PMID:10392777
24. CLSI. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline. CLSI document MM18-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
25. La T, Phillips ND, Hampson DJ. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):3372-5. PMID:12843096
26. Lemcke RM, Burrows MR. Studies on a haemolysin produced by *Treponema hyodysenteriae*. *J Med Microbiol.* 1982; 15(2):205-14. PMID:6754943
27. Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. CONTI-Guato: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med.* 2011; 6(11)
28. La T, Phillips ND, Harland BL, Wanchanthuek P, Bellgard MI, Hampson DJ. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol.* 2009; 138(3-4):330-8. PMID:19369014
29. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30:2725-9. PMID:24132122
30. Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinform.* 2012; 13:87.
31. Barth S, Gömmel M, Baljer G, Herbst W. Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. *Vet Microbiol.* 2012; 155(2-4):438-43. PMID:22047713
32. Mahu M, De Pauw N, Vande Maele L, Verlinden M, Boyen F, Ducatelle R, et al. Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Vet Res.* 2016; 47:66. PMID:27338265
33. Löbert S, Zimmermann W, Bürki S, Frey J, Nathues H, Scheer P, et al. Occurrence of *Brachyspira hyodysenteriae* in multiplier pig herds in Switzerland. *Tierärztl Prax.* 2016; 44:13-8.
34. Hampson DJ, La T, Phillips ND, Holyoake PK. *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from apparently healthy pig herds following an evaluation of a prototype commercial serological ELISA. *Vet Microbiol.* 2016; 191:15-9. PMID:27374902
35. Jensen NS, Stanton TB. Comparison of *Serpulina hyodysenteriae* B78, the type strain of the species, with other *S. hyodysenteriae* strains using enteropathogenicity studies and restriction fragment length polymorphism analysis. *Vet Microbiol.* 1993; 36(3-4):221-31. PMID:7903832
36. Nuessen ME, Joens LA, Glock RD. Involvement of lipopolysaccharide in the pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *J Immunol.* 1983; 131(2):997-9. PMID:6863941
37. Nibbelink SK, Sacco RE, Wannemuehler MJ. Pathogenicity of *Serpulina hyodysenteriae*: in vivo induction of tumor necrosis factor and interleukin-6 by a serpulinal butanol/water extract (endotoxin). *Microb Pathog.* 1997; 23(3):181-7. PMID:9281475
38. Backhans A, Jansson DS, Aspán A, Fellström C. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Vet Microbiol.* 2011; 153(1-2):156-62. PMID:21497461
39. Kennedy MJ, Yancey RJ Jr. Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. *Vet Microbiol.* 1996; 49(1-2):21-30. PMID:8861640
40. Naresh R, Hampson DJ. Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. *Microbiol.* 2010; 156(Pt 1):191-7.
41. Dugourd D, Martin C, Rioux CR, Jacques M, Harel J. Characterization of a periplasmic ATP-binding cassette iron import system of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*. *J Bacteriol.* 1999; 181(22):6948-57. PMID:10559160
42. La T, Phillips ND, Hampson DJ. Evaluation of recombinant Bhlp29.7 as an ELISA antigen for detecting pig herds with swine dysentery. *Vet Microbiol.* 2009; 133(1-2):98-104. PMID:18619744
43. ter Huurne AA, Muir S, van Houten M, van der Zeijst BA, Gastra W, Kusters JG. Characterization of three putative *Serpulina* *hyodysenteriae* hemolysins. *Microb Pathog.* 1994; 16(4):269-82. PMID:7968456
44. Hsu T, Hutto DL, Minion FC, Zuerner RL, Wannemuehler MJ. Cloning of a beta-hemolysin gene of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2001; 69(2):706-11. PMID:11159958
45. Gömmel M, Barth S, Heydel C, Baljer G, Herbst W. Adherence of *Brachyspira hyodysenteriae* to porcine intestinal epithelial cells is inhibited by antibodies against outer membrane proteins. *Curr Microbiol.* 2013; 66(3):286-92. PMID:23192304
46. Naresh R, Song Y, Hampson DJ. The intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* attaches to cultured Caco-2 cells and induces pathological changes. *PLoS One.* 2009; 4(12):e8352. PMID:20020053
47. Durmic Z, Pethick DW, Pluske JR, Hampson DJ. Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental challenge. *J Appl Microbiol.* 1998; 85(3):574-82. PMID:9750287
48. Naresh R and Hampson DJ. Exposure to norepinephrine enhances *Brachyspira pilosicoli* growth, attraction to mucin and attachment to Caco-2 cells. *Microbiol.* 2011; 157(Pt 2):543-7.

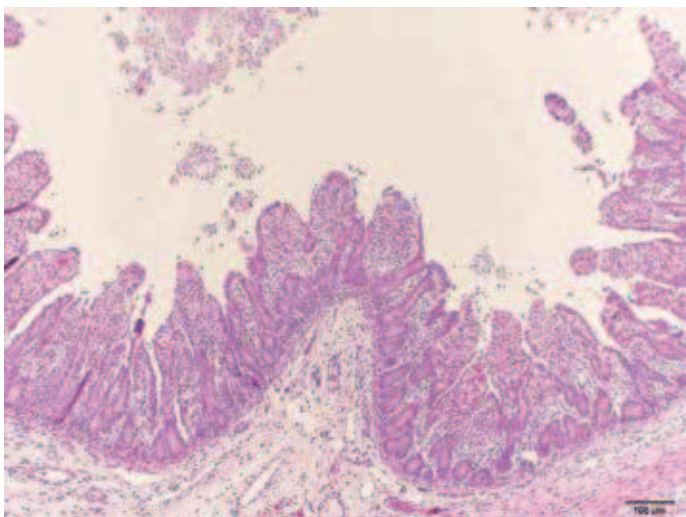


Imagen al microscopio de diarrea epidémica porcina.