



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**“DETECCIÓN DE *Brachyspira* spp. EN CERDOS DE
CRIANZA – ENGORDA EN CHILE”**

Catherine Marcela Rodríguez Gutiérrez

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: DR. PEDRO ABALOS P.

SANTIAGO – CHILE

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**"DETECCIÓN DE *Brachyspira* spp. EN CERDOS DE
CRIANZA – ENGORDA EN CHILE"**

Catherine Marcela Rodríguez Gutiérrez

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL: _____

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA : PEDRO ABALOS _____ _____

PROFESOR CONSEJERO: PATRICIO RETAMAL _____ _____

PROFESOR CONSEJERO: IÑIGO DIAZ _____ _____

SANTIAGO, CHILE
2012

A Celso, sólo porque si.

A Alfredo, Mauricio y Sebastián por seguir aquí.

A mi madre por volver a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron en todos estos años como estudiante y en mi memoria de título, muy especialmente:

Al Dr. Pedro Abalos Pineda, profesor guía de esta memoria, quien cuando llegué siguiendo mis sueños me tendió una mano y luego me apoyó y orientó con su experiencia y conocimiento.

A la Dra. María Sol Morales, Dr. Hernán Agüero y Dr. Iñigo Díaz quienes me orientaron cuando perdía mi horizonte.

A queridísimos profesores que lamentablemente ya no son parte de nuestra escuela: Dr. Luis Adaro y Dra. Raquel Cepeda quienes en larguísimas conversaciones siempre me alentaron a seguir adelante.

A mis profesores consejeros, Dr. Patricio Retamal y Dr. Iñigo Díaz quienes me brindaron su consejo y apoyo.

Al personal no académico del Departamento de Medicina Preventiva, Srta. Patricia Álvarez Sr. Carlos Campos, Sr. Humberto Antilef, Sr. Patricio Toledo y Sra. Anita Martínez quienes me soportaron cuando, cual pulga en la oreja, llegaba a pedirles material, ayuda, consejo o simplemente a "molestar".

A los que he escogido llamar "familia" y amigos por apoyarme y regalarme parte de sus vidas.

A aquellos que nacieron siendo compañeros y hoy son grandes amigos y nuestras interminables jornadas de estudio: Alfredo, Mauricio, Sebastián, Judith, Valentina, Karina y Karen.

A Tía Sussy, Miguel Villarroel, Luis Santis, Antonieta Viera, Luis Muñoz, Octavio González, Juan Canales, José Campos y a todas aquellas preciosas personas de mi querida escuela, que han pasado por mi vida en estos largos casi 13 años, algunos aún están, otros ya se han ido incluso para siempre, pero cada uno de ellos fue capaz de entibiar con una sonrisa aquellos largos días de soledad.

A todos ellos y todos los que se me quedan en el tintero, gracias por haber puesto un ladrillo en esta construcción que hoy se ve finalizada...

...sinceramente, muchísimas gracias.

Registro de Propiedad Intelectual N° 222.850 del 09 de noviembre de 2012

Departamento de Derechos Intelectuales
Dirección de Bibliotecas Archivos y Museos
Ministerio de Educación

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Aspectos Generales de la Producción Porcina	3
2.2	Patologías Digestivas del Cerdo en Crianza – Engorda.....	3
2.3	Espiroquetas porcinas	5
2.3.1	Etiología	7
2.3.2	Epidemiología	11
2.3.3	Patogenia	18
2.3.4	Cuadro Clínico y Lesiones.....	21
2.3.5	Inmunidad.....	26
2.3.6	Diagnóstico.....	27
2.3.7	Tratamiento.....	29
2.3.8	Prevención y Control.....	32
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo General.....	40
3.2	Objetivos Específicos.....	40
4	MATERIAL Y MÉTODOS	41
4.1	Localización del estudio	41
4.2	Características del muestreo	41
4.3	Tamaño de muestra.....	41
4.4	Obtención de muestras fecales	42
4.5	Caracterización de los criaderos, descripción de las instalaciones	42
4.6	Normas de bioseguridad:.....	43
4.7	Indicaciones del estudio	43
4.7.1	Protocolo de diagnóstico bacteriológico	44
4.7.2	Protocolo de caracterización bioquímica	46
4.7.3	Protocolo de PCR-Doble	47
4.7.4	Protocolo de Secuenciación	50
5	RESULTADOS.....	52

6	DISCUSIÓN.....	57
7	CONCLUSIONES.....	61
8	BIBLIOGRAFÍA.....	62

RESUMEN

La espiroquetosis intestinal porcina cuyo agente etiológico es *Brachyspira pilosicoli* y la disentería porcina producida por *B. hyodysenteriae*, son las enfermedades sub-clínicas y que afectan la eficiencia de conversión alimentaria, que representan un desafío productivo y de las cuales existe sospecha clínica y patológica en el país.

En este trabajo se implementó la detección de *Brachyspira* spp. en cerdos en etapa de crecimiento-engorda a partir de muestras de heces. Se incluyeron 9 planteles distribuidos en cuatro regiones administrativas del país, donde se sospechaba de su presencia, debido a episodios de diarrea y baja ganancia diaria de peso.

Se muestrearon 170 cerdos de entre 100 y 150 días, que no habían sido tratados con antibióticos desde 20 días previos al muestreo. Las muestras fueron tomadas desde heces frescas o desde el recto mediante tómulas con medio de transporte Cary-Blair (COPAN, Murrieta, CA, USA) y mantenidas en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio antes de 48 horas de colectadas. Las tómulas fueron sembradas en placas Petri con medio tripticasa soya (ATS) (Bacton, Dickinson & Co., Le Pont de Claix, France) con 5% de sangre ovina estéril y con la adición de espectinomicina 200 mg/L, vancomicina 50 mg/L, rifampicina 12.5 mg/L y colistina 12.5 mg/L. Las placas previamente reducidas fueron incubadas en anaerobiosis (Gaspak[®], BBL, Division of ioQuest Cockeysville, Maryland. Div. Becton, Dickinson & Co) por 5 a 7 días a 37°C.

Se obtuvieron 56 (32,9%) cultivos sospechosos con desarrollo bacteriano en película y presencia de hemólisis en 8 (88,9%) planteles. Estas muestras fueron sometidos a ensayo de D-PCR para la detección del gen 16S rDNA de *B. pilosicoli* y gen NADH oxidasa de *B. hyodysenteriae*, utilizando los partidores P1 (AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC) y P2 (GCACCTATGTAAACGTCCTTG) y, H1 (ACTAAAGATCCTGATGTATTTG) y H2 (CTAATAACGTCTGCTGC) respectivamente, obteniendo nueve muestras que presentaron bandas de peso molecular cercano al buscado para *B. pilosicoli*, una resultó con bandas de peso molecular cercano al buscado para *B. hyodysenteriae*, y una presentó bandas de ambos pesos moleculares buscados.

Todos los cultivos sospechosos a D-PCR fueron resembrados, pero sólo fue posible obtener cultivos puros de 4 de ellos, los que fueron sometidos a pruebas de

caracterización bioquímica. Esta caracterización bioquímica, resultó acorde a los resultados esperados para *B. pilosicoli*.

Para confirmar este hallazgo, un producto de 823 bp del gen 16S rDNA de *B. pilosicoli* fue purificado y secuenciado (Genbank N° JX486100), demostrando una identidad completa con otras secuencias publicadas del mismo gen (Genbank N° JF430717 Suecia, HM450982 Tailandia, CP002025 Australia, NR025674 Francia, AB120008 Japón).

Estos resultados confirman, por primera vez, la presencia de *Brachyspira pilosicoli* en Chile.

SUMMARY

Porcine intestinal spirochetosis, caused by *Brachyspira pilosicoli*, and swine dysentery caused by *B. hyodysenteriae*, are sub-clinical diseases that affect food conversion efficiency. For both diseases there are a pathological and clinical suspicion and represent a productive challenge in this country.

In this study was implemented a method to detect the presence of *Brachyspira* spp in fecal samples from pigs in the growth-finishing phase. This study included nine hog farms, located on four administrative regions of the country, where diseases associated to *Brachyspira* spp were suspected being the cause of diarrhea episodes and low daily weight gains.

One hundred and seventy pigs ranging from 100 to 150 days old, without any previous antibiotic treatment for 20 days, were sampled. Specimens were collected from fresh feces or directly from the rectum using swabs preserved in Cary-Blair transport medium (Copan, Murrieta, CA, USA) and were kept refrigerated until their laboratory processing within 48 hours from being collected. The swabs were seeded in pre-reduced Petri dishes containing trypticase soy agar (TSA) (Becton, Dickinson & Co., Le Pont de Claix, France) with 5% sterile sheep blood plus spectinomycin 200 mg/L, vancomycin 50 mg/L, rifampin 12.5 mg/L and colistin 12.5 mg/L (6). The plates were incubated in anaerobic conditions (GasPak ® BBL Division of ioQuest Cockeysville, Maryland. Div Becton, Dickinson & Co.) for 5-7 days at 37°C.

Fifty-six (32.9%) suspicious cultures presenting a film-like bacterial growth or hemolysis were obtained from 8 (88.9%) hog farms. These samples were submitted to a D-PCR assay in order to detect the *B. pilosicoli* 16S rDNA gene and *B. hyodysenteriae* NADH oxidase gene, using the primers P1 (AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC) and P2 (GCACCTATGTAAACGTCCTTG), and H1 (ACTAAAGATCCTGATGTATTTG) and H2 (CTAATAAACGTCCTGCTGC), respectively. Nine of the obtained samples showed bands with a molecular weight near to what was expected for *B. pilosicoli*, one for *B. hyodysenteriae*, and one showed bands for both molecular weights.

All these suspicious samples were re-cultured but only 4 pure cultures were obtained, which were biochemically characterized. The biochemical characterization results were consistent with the expected results for *B. pilosicoli*.

In order to confirm this finding, an 823 bp product of the *B. pilosicoli* 16S rDNA gene was purified and sequenced (Genbank N° JX486100), showing complete identity with other published sequences of the same gene (Genbank N° JF430717 Sweden, HM450982 Thailand, CP002025 Australia, NR025674 France, AB120008 Japan).

These results confirm for the first time, the presence of *Brachyspira pilosicoli* in Chile.

1 INTRODUCCIÓN

El género *Brachyspira* está integrado por bacterias móviles, Gram negativas, del tipo de las espiroquetas de forma helicoidal, que miden entre 0,2–0,4 X 1,7-9 µm. La estructura más externa de la célula helicoidal es una membrana externa de varias capas, denominada a menudo como “cubierta externa” o “envoltura celular externa”. Presentan flagelos periplásmicos que se insertan en cada extremo de la célula. El número total de flagelos periplásmicos por célula va desde 2 a más de 100, dependiendo de la especie. Los flagelos periplásmicos son componentes del aparato de movilidad de la célula y realizan una función esencial de locomoción y de los otros movimientos típicos de las espiroquetas. A diferencia de otros flagelos bacterianos, el flagelo periplásmico está permanentemente sujeto alrededor del cuerpo de la célula y es completamente endocelular, permaneciendo cubierto por la cubierta externa. Las espiroquetas tienen tres tipos principales de movimientos en ambiente líquido: locomoción, rotación sobre su eje longitudinal y movimientos de flexión (Holt *et al.*, 1994).

Entre las espiroquetas del género *Brachyspira* se encuentran *B. hyodysenteriae*, *B. innocens*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. aalborgi* y *B. murdochii*. De este grupo de bacterias las que importan por su impacto económico en producción porcina son *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*.

B. hyodysenteriae es el agente causal de disentería porcina, una enfermedad digestiva causante de diarrea muco-hemorrágica severa, que afecta a los cerdos a partir de las 6 semanas de edad aproximadamente, tiene un fuerte impacto económico y se encuentra extendida prácticamente en todos los países donde la producción porcina es intensiva (Messier *et al.*, 1990; Ferro, 2007). Por su parte *B. pilosicoli* es el agente causal de espiroquetosis intestinal porcina, también una enfermedad digestiva causante de colitis crónica moderada, diarrea con contenido mucoso, usualmente sin sangre que afecta a cerdos que entre 4 y 20 semanas de edad (Trott *et al.*, 1996).

Para el diagnóstico definitivo de disentería porcina y/o espiroquetosis intestinal porcina, es importante el aislamiento e identificación de aislados a nivel de especie, debido a la presencia de espiroquetas intestinales de baja patogenicidad o no patógenas (*B.*

intermedia, *B. innocens* y *Brachyspira* grupo III) (Novotna y Skardova, 2002). Son necesarios métodos de diagnóstico rápidos y específicos para la detección de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, por su impacto económico en la producción porcina. Para un diagnóstico certero de disentería porcina o espiroquetosis intestinal porcina se requiere del aislamiento de las espiroquetas asociadas y confirmación de identidad mediante pruebas fenotípicas. Sin embargo, este enfoque se ve obstaculizado por el fastidioso y lento crecimiento natural de las espiroquetas intestinales y el limitado rango de diferencias fenotípicas entre ellas (La *et al.*, 2003).

Por todo lo anterior, el presente trabajo pretende detectar esta especie mediante la implementación de una técnica mixta de cultivo específico en base a material fecal y su posterior confirmación mediante técnicas bioquímicas y moleculares.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Generales de la Producción Porcina

La demografía de la industria porcina mundial ha cambiado sustancialmente durante las últimas dos décadas. En los EEUU, por ejemplo, el inventario total nacional de porcinos y el tamaño promedio del rebaño se ha incrementado, en tanto que el número total de criaderos, ha decrecido (Osorio, 2010), situación muy parecida a la de Chile, donde el número de explotaciones industriales al año 1997 era de 281 con una existencia total de 1.716.881 cabezas; cifras que al año 2009 eran de sólo 127 criaderos con una existencia de 3.187.270 animales (Chile, 2007).

La producción porcina primaria presenta como gran desafío satisfacer las demandas de la población y para conseguirlo debe cumplir una serie de requisitos como son: tecnología aplicada, alimentación y nutrición, reproducción y genética, y salud animal. En este último punto, las enfermedades infecciosas que afectan al aparato digestivo del cerdo se presentan como un gran desafío, ya que aun cuando afectan a cerdos de todas las edades sus efectos negativos repercuten más sobre los animales en crecimiento. Además, clásicamente han sido, y son aún, una de las principales preocupaciones de los médicos veterinarios puesto que, en conjunto con las enfermedades respiratorias, son las responsables de buena parte de las pérdidas económicas de las explotaciones porcinas (Carvajal *et al.*, 2000b).

2.2 Patologías Digestivas del Cerdo en Crianza – Engorda

Conjuntamente con la patología respiratoria, la patología intestinal es la que ocasiona un mayor impacto económico en las explotaciones porcinas. Los deterioros en cerdos de crecimiento-engorda ocasionan un incremento del costo de producción debido tanto a la reducción del beneficio económico como al incremento del costo de producción (Lapuente y Rosell, 2004).

En cuanto a la presencia de alteraciones digestivas de los cerdos en crecimiento-engorda, se puede afirmar que ocasionan un incremento del costo de producción y aunque menos frecuente que en lechones, enfermedades como la disentería porcina, ileítis, salmonelosis y clostridiosis se pueden evitar no sólo estableciendo un buen programa de prevención sanitaria en granja (vacunación de madres, medidas de higiene y manejo, etc.) sino también con la administración de alimentos medicados muy digestibles a la entrada en protocolo alimentario de iniciación (7-14 días), de composición nutritiva muy parecida a los administrados en la fase de transición, junto a la inclusión de nuevos aditivos con menor o nula contaminación ambiental y de purines (Riopérez y Rodríguez, 2004).

Históricamente, en la prevención de las patologías digestivas se ha apuntado a la incorporación de antimicrobianos en el alimento y agua de bebida, entre estos, antibióticos y óxido de Zn. Sin embargo, hoy en día, la presión social y legislativa apunta a limitar cada vez más su uso, por lo que se convierte en un reto optimizar los procesos digestivos y mecanismos de autodefensa del lechón (Pérez y Nofrarías, 2008; Riopérez y Rodríguez, 2004).

Sobre el aparato digestivo interactúan cuatro factores que están constantemente en cambio, como son la ingesta del animal (alimento y agua), condiciones ambientales, microflora (incluyendo patógenos), y respuesta inflamatoria y del sistema inmune del animal. La manifestación clínica de la inflamación del aparato digestivo, es la diarrea y sólo ocurre cuando la capacidad de absorción del agua se excede. No es inusual ver diarrea esporádica o intermitente en cerdos en crecimiento-engorda (Lapiente y Rosell, 2004).

Un grupo de enfermedades entéricas causantes de diarrea durante la crianza y engorda son disentería porcina (*B. hyodysenteriae*), espiroquetosis intestinal porcina (*B. pilosicoli*), enteropatía proliferativa porcina (*Lawsonia intracellularis*), colibacilosos (*E. coli*) Salmonelosis (*Salmonella* spp.), enteritis por rotavirus y coronavirus, trichuriasis, y coccidiosis, entre otros. Su incidencia ocasiona importantes pérdidas económicas a nivel mundial, con descenso en el crecimiento de los animales y un empeoramiento de los índices de conversión (Harris *et al.*, 1999; Lapiente y Rosell, 2004; Carpenter y Burlatschenko, 2005). Todas las patologías anteriormente nombradas, cursan clínicamente con diarrea franca o una disminución de la consistencia de las heces por la pérdida de

fluidos, ambas situaciones llevan a la deshidratación del animal. Además, las heces pueden presentar restos de mucus, fibrina, sangre o grasa. Serán entonces indicadores de la etiología: la edad de presentación de los primeros signos clínicos, el tipo de diarrea, o el tramo intestinal afectado (Pérez y Nofrarías, 2008).

Las condiciones apropiadas de instalación, alimentación, manejo y sanidad señalan la posibilidad de aumentar la eficiencia en la utilización de los alimentos y así reducir la mortalidad al disminuir considerablemente la relación entre la carga microbiana intestinal, el alimento y la incidencia de diarreas (Álvarez *et al.*, 2006).

2.3 Espiroquetas porcinas

La disentería y la diarrea por espiroquetas son infecciones comunes en producción porcina y su incidencia clínica ha aumentado considerablemente, especialmente en aquellas explotaciones con menos medidas de bioseguridad y que tienen deficiencias sanitarias, tras la prohibición del empleo de antibióticos como promotores del crecimiento. Esta situación es muy probable que se mantenga, lo que hace necesario extremar las medidas de profilaxis en las granjas libres y buscar nuevas estrategias de control en las ya infectadas con el fin de hacer que su costo económico sea soportable (Carvajal *et al.*, 2000b).

La disentería porcina es una enfermedad bacteriana importante en el sector porcino a nivel mundial (Harris *et al.*, 1999) siendo quizás la más grave que pueden afectar a una granja de cerdos, sobre todo por su carácter endémico en las granjas y por los grandes costos indirectos que provoca a largo plazo. Cuando las condiciones no son buenas y cuando el tratamiento se retrasa el porcentaje de mortalidad puede superar el 10%. No obstante, las pérdidas que causa se deben principalmente al deterioro de los índices productivos de la explotación: aumenta muy considerablemente el índice de conversión de alimento, disminuye la ganancia de peso diaria y origina una gran desigualdad en los grupos de cerdos afectados que se traduce en una fuerte penalización de los precios en el matadero (Carvajal *et al.*, 2000a).

La presencia de la disentería en una granja exige además gastos de control muy elevados, los que pesan durante años en el rendimiento económico. Entre unos y otros, la disentería origina un aumento del costo de producción que puede llegar a superar el 20% (Carvajal *et al.*, 2000a).

La disentería porcina causada por la espiroqueta anaerobia *B. hyodysenteriae*, corresponde a una colitis muco-hemorrágica que aparece en cerdos en crecimiento (y en ocasiones en lechones destetados), afectando al ciego, colon y recto. Las manifestaciones clínicas varían ampliamente pues la enfermedad puede presentar una forma aguda, caracterizada por una diarrea hemorrágica severa, con muerte ocasional; o la forma crónica, caracterizada por heces diarreicas amarillo-grisáceas con presencia de fibrina y mucus (Harris y Lysons, 1992; Harris *et al.*, 1999). Esta última forma es la más frecuentemente encontrada. Las categorías de animales susceptibles son destete, engorde y terminación (Moredo *et al.*, 1997).

En los casos típicos, los cerdos infectados inicialmente muestran una ligera depresión y una reducción en el consumo de alimento. Desarrollan diarrea, la cual va de un color gris oscuro a negra y en ocasiones acuosa pero lo más común en forma de pequeñas fracciones blandas. Esta diarrea se desarrolla hacia la formación de tapones mucosos de fibrina, conjunto de células epiteliales y salpicaduras de sangre fresca. Los animales afectados muestran manchas de heces en los cuartos traseros, sufren deshidratación y pérdida de peso, con el abdomen hundido y el dorso arqueado. Si no son tratados, alrededor de un 10% de los cerdos afectados pueden morir en los 5 días posteriores a la aparición de los primeros síntomas clínicos (Hampson y Trott, 1995; Pluske *et al.*, 2003). La disentería porcina típicamente se manifiesta en brotes, generalmente de elevada morbilidad y mortalidad variable (Davies, 1999).

En cuanto a espiroquetosis intestinal porcina, la importancia de *B. pilosicoli* como patógeno todavía no está absolutamente determinada. Las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que se han desarrollado y que se están utilizando a nivel experimental en Australia y EEUU, son útiles para definir la prevalencia del organismo. Se ha sugerido que el aislamiento y pruebas de los cerdos que entran en una explotación pueden ser eficaces para prevenir la introducción de la infección en una granja (Davies, 1999).

Duhamel (1997) considera que *B. pilosicoli*, junto con espiroquetosis intestinal porcina, serán cada vez más importantes a medida que mejora la sanidad general de los rebaños y que los veterinarios se enfocan en mejorar los índices biológicos y productivos de los cerdos. No obstante, debido a las catástrofes sanitarias provocadas por fiebre aftosa, PRRS o peste porcina en países como Paraguay, Rusia, México, Reino Unido, Alemania y Holanda entre otros, es posible que la importancia de *B. pilosicoli* quede relegada a un segundo término por algún tiempo.

2.3.1 Etiología

El grupo de bacterias que conforman las espiroquetas porcinas ha experimentado varios cambios de nomenclatura a nivel de su género y hoy se les llaman *Brachyspira*. Primeramente se les llamó *Treponema* y después *Serpulina* (Rodríguez, 2008).

La historia de las espiroquetas porcinas es casi tan confusa como la de las enteritis proliferativas. En cuanto a disentería porcina, la enfermedad se describió por primera vez en 1921, pero su etiología exacta no se aclaró hasta 1968, cuando Terpstra *et al.*, comprobaron que los sueros de cerdos que la habían padecido reaccionaban con espiroquetas procedentes del intestino de los cerdos enfermos. Al mismo tiempo Tesouro (1969) observó mediante microscopía óptica y electrónica del contenido de colon y de heces de cerdos enfermos espiroquetas asociadas con los signos clínicos y lesionales de la disentería.

En los años 70, varios estudios realizados en diferentes países indicaron que una espiroqueta de gran tamaño, fuertemente beta-hemolítica, era el agente etiológico primario de la disentería porcina. Este organismo se llamó originalmente *Treponema hyodysenteriae*. Pronto se hizo evidente que no todas las espiroquetas eran patógenas y se describieron, de un modo bastante simple, dos especies (Kinyon y Harris, 1979): *T. hyodysenteriae*, muy hemolítica, indol positiva y patogénica y, *T. innocens*, poco hemolítica, indol negativa y no patogénica. Dentro de la especie *T. hyodysenteriae* se descubrió que existía una variabilidad genética con diferencias serológicas debida a los antígenos lipopolisacáridos (Baum y Joens, 1979), siendo la protección inmune serotipo

específica. Posteriores investigaciones en Australia pusieron de manifiesto una variabilidad serológica aún mayor, indicando una considerable heterogenicidad dentro de las especies (Hampson y Lee, 1994).

En 1971 Taylor y Alexander aislaron por primera vez espiroquetas beta-hemolíticas anaerobias de las heces de cerdos enfermos y reprodujeron la enfermedad. Simultáneamente en Estados Unidos Harris *et al.* (1972) llegaron a las mismas conclusiones y denominaron al agente *Treponema hyodysenteriae*. Stanton *et al.* en 1991 utilizaron análisis genómicos para demostrar que esta bacteria era distinta a otras del género *Treponema* y propusieron la denominación de *Serpulina hyodysenteriae*. En 1997 Ochiai *et al.* demostraron que esta bacteria tenía una homología mayor con bacterias del género *Brachyspira* que con las del género *Serpulina* y propusieron la denominación actual de *Brachyspira hyodysenteriae*.

En 1980, Taylor *et al.* reprodujeron una colitis moderada tras una infección experimental con una espiroqueta poco hemolítica. Tanto el microorganismo (descrito como cepa P43/6/78) como la patología descrita tenían factores diferenciales de la disentería porcina.

El filamento axial de la P43/6/78 tenía de 4 a 6 fibrillas, mientras *T. hyodysenteriae* tiene 7 o más, y los organismos observados se unían por un extremo a la mucosa intestinal de los cerdos afectados lo cual no ocurre en los casos de la disentería porcina. Investigadores de otros países, incluyendo Polonia, EEUU y Canadá describieron síndromes similares asociados a espiroquetas poco hemolíticas. Estos informes llevaron a concluir que las espiroquetas no pueden dividirse convenientemente en dos grupos basándose en su capacidad hemolítica y en su patogenicidad (Davies, 1999).

Mediante la técnica de MEE (Multifocus Enzyme Electrophoresis) el grupo de Hampson (1997) propuso la identificación de 5 especies de *Serpulina*: *S. hyodysenteriae*, el agente de la disentería que es muy beta hemolítico, y otras 4 especies poco hemolíticas:

- *S. innocens*: cepa tipo B256 descrita por Kinyon y Harris (1979): indol negativa y considerada no patogénica.
- *S. intermedius*: aislamientos indol positivos, muy relacionados con *S. hyodysenteriae*.

- *S. murdochii*: originalmente llamado cepas del grupo B. Se señala que no incluyen cepas patógenas.
- *S. pilosicoli*; antes conocida como *Anguillina coli*, y morfológicamente diferente de las otras especies. La cepa tipo es la P43/6/78 utilizada para reproducir colitis por Taylor *et al.* (1980). El DNA de este organismo sólo tiene una homología del 25-30% con el de *S. hyodysenteriae* o *S. innocens*, y se consideró como el agente causante de la espiroquetosis intestinal porcina (Trott *et al.*, 1996).

En cuanto a *B. pilosicoli*, Hampson *et al.* (1997) ha diferenciado a *B. pilosicoli* del resto de las espiroquetas porcinas y confirmado su participación en la colitis del cerdo. Sin embargo, esta no es una enfermedad nueva ya que Taylor *et al.* (1980) la describieron, observando este síndrome en los años 70.

Davies (1999) plantea que probablemente esta enfermedad no se ha reconocido como tal debido a las siguientes razones: la gravedad relativa de la enfermedad, que generalmente no es mortal, la falta de un diagnóstico adecuado que diferencia entre espiroquetas patógenas y no-patógenas y, la aceptación general de la espiroquetosis porcina como causa general de una diarrea transitoria y disminución de los índices productivos en lechones. El mismo autor sugiere que *B. pilosicoli* parece estar ampliamente distribuida geográficamente. Se han descrito casos en Australia, Europa y EEUU. También parece tener un rango de hospederos naturales bastante amplio, que incluyen a humanos, perros, aves y ratones.

Estas especies pueden representar una fuente continua de transmisión para los cerdos. Se ha demostrado que los roedores pueden ser portadores de *B. hyodysenteriae* y que pueden ser colonizados por espiroquetas poco hemolíticas, mientras que los aislamientos de roedores examinados en Australia pertenecen al grupo de especies no patógenas de *B. murdichii*. Sin embargo, se ha conseguido infectar experimentalmente a roedores con la cepa P43/6/78 de *B. pilosicoli*, y por lo tanto se pueden considerar como portadores potenciales (Trott *et al.*, 1996).

También existen varias evidencias de que *B. pilosicoli* es causante de un síndrome de espiroquetosis intestinal en humanos. La prevalencia entre la población de países

occidentales es baja, con la excepción de pacientes de SIDA, pero puede ser mayor en países en vías de desarrollo (Trott *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que los aislamientos de porcino, perros y humanos están relacionados genéticamente (Hampson y Lee, 1994), sin embargo, la evidencia directa de transmisión zoonótica sólo se ha demostrado entre perros y humanos (Trott *et al.*, 1996).

Los humanos colonizados con *B. pilosicoli* son, por lo general, pacientes inmunocomprometidos o que habitan en países subdesarrollados. No se considera que los trabajadores de granjas de porcino sean una población con riesgo de adquirir esta enfermedad a partir del cerdo (Trott *et al.*, 1997).

A diferencia de *B. hyodysenteriae*, en que la infección de una explotación está causada por una única cepa, en el caso de *B. pilosicoli* se pueden encontrar varias cepas del microorganismo en la misma explotación, incluso de un mismo corral (Hampson y Lee 1994; Atyeo *et al.*, 1996).

La demostración de la existencia de múltiples cepas en un mismo plantel puede explicar la recurrencia de espiroquetosis intestinal porcina en lechones convalecientes o tratados con antibióticos. De igual manera, este hecho confunde los esfuerzos encaminados a definir la importancia clínica de la enfermedad, ya que la variabilidad de virulencia entre las diferentes cepas puede ser importante. Todavía no hay pruebas serológicas específicas que puedan determinar títulos individuales en animales expuestos, pero se está desarrollando una prueba de ELISA que ayudará a entender la epidemiología de la espiroquetosis intestinal porcina (Hampson *et al.*, 1997).

Taylor *et al.* (1980) describieron que la espiroquetosis intestinal afecta sobre todo a lechones de entre 4 y 20 semanas de edad, y que la enfermedad ocurre, con mayor frecuencia, en el periodo inmediatamente post-destete. Sin embargo, Atyeo *et al.* (1996) encontraron cerdos infectados predominantemente entre los animales de una sección de los pabellones de engorda, y probablemente hay una considerable variación entre las explotaciones.

Otros métodos para la diferenciación de estos agentes son las pruebas de caracterización bioquímica. Es necesario tener en cuenta que además de una hemólisis fuerte, las cepas

de *B. hyodysenteriae* incluyen como características bioquímicas respuesta positiva a pruebas de hidrólisis de esculina, alfa glucosidasa y beta glucosidasa, respuesta negativa para la hidrólisis de hipurato y producción de alfa galactosidasa. La producción de indol es una característica variable según las cepas. Además, *B. hyodysenteriae* fermenta galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manosa, rafinosa y trehalosa. Por el contrario, no fermenta adonitol, inositol, ramnosa y sorbitol. La capacidad de fermentar la fructosa es variable según la cepa (Euzéby, 1998).

Por su parte, *B. pilosicoli* produce una hemólisis débil, no produce indol, da respuesta positiva para la hidrólisis de hipurato, la producción de alfa galactosidasa y alpha glucosidasa es variable y negativa la producción de beta glucosidasa (Trott *et al.*, 1997).

2.3.2 Epidemiología

La enfermedad disentería porcina es propia de animales en crecimiento y engorda, se caracteriza por diarrea mucohemorrágica y lesiones en el intestino grueso, que resulta en disminución de consumo de alimento, pérdida de peso y deshidratación. Si no se trata, este síndrome resulta en tasas altas de mortalidad. La enfermedad no siempre se expresa clínicamente a pesar de la presencia de la bacteria en la granja (Canibe y Jensen, 2005).

Los cerdos enfermos pueden eliminar de 10⁷ a 10⁹ bacterias por gramo de heces. Para el aislamiento es necesario utilizar medios enriquecidos con sangre, atmósfera anaerobia y antibióticos que inhiban el crecimiento de otra flora (Schultz *et al.*, 1999; Rodríguez, 2008).

La característica más importante de *B. hyodysenteriae* es su resistencia en el ambiente. A temperatura de 10°C y en presencia de materia orgánica puede mantenerse viable más de 70 días. Se mantiene viable mucho menos tiempo si la temperatura es más elevada. En heces mantiene la viabilidad 7 días a 25°C y sólo 24 horas a 37°C. También es muy sensible a la desecación y a la acción de la mayor parte de los desinfectantes, principalmente a los fenólicos y a los compuestos de cloro (Schultz *et al.*, 1999).

Según Nistal (2005), dentro de la especie *B. hyodysenteriae* y en función de la composición del lipopolisacárido de la membrana externa, se distinguen 11 serogrupos denominados con letras de la A a la K, cada uno de los cuales puede contener diferentes serovares. La prevalencia de los serovares varía con cada país y en cada serovar puede haber cepas de distinta virulencia.

B. hyodysenteriae infecta principalmente al cerdo, pero puede infectar a otras especies de forma transitoria y sin cuadro clínico, como los ratones, las ratas, los perros y aves como los estorninos. Se han descrito cuadros clínicos en granjas de ñandúes (Carvajal *et al.*, 2000a).

El ratón juega un papel importante en la epidemiología de la enfermedad porque puede infectarse con dosis bajas de bacterias y excretarlas en las heces durante 6 meses. Los otros portadores tienen un papel epidemiológico menos importante. El perro es portador durante 13 días, la rata durante 2 días y los estorninos durante sólo 8 horas (Nistal, 2005).

Según Rodríguez (2008) la principal fuente de infección son los cerdos portadores que pueden tener cuadro clínico o ser asintomáticos. Los cerdos curados de la enfermedad pueden continuar eliminando la bacteria en las heces durante más de 70 días sin signos clínicos, aunque generalmente esta excreción es mucho más corta, de forma que sólo un 20% de los cerdos siguen siendo eliminadores a los 20 días. El mismo autor indica que una vez infectada una granja, la infección se hace enzoótica y las cerdas madres contaminan a sus camadas durante la lactancia aunque el cuadro clínico no se suele observar hasta la fase de engorda.

La transmisión a través de fómites también es muy fácil debido a la alta resistencia de la bacteria a las condiciones ambientales. Los vehículos, la ropa, el calzado o los utensilios contaminados con heces pueden transportar la bacteria desde granjas infectadas a granjas libres o bien de una parte de la granja a otra (Rodríguez, 2008).

La infección se produce por vía fecal-oral (Thompson, 2002). El principal riesgo de introducción de la infección lo constituyen los cerdos infectados a nivel subclínico, los camiones de cerdos infectados y las botas contaminadas que llevan los visitantes. Las ratas, ratones y perros también pueden ser portadores de la infección. Cuando se

introduce por primera vez en una granja susceptible, pueden verse afectados los cerdos de todas las edades, desde 6 semanas de edad en adelante (incluidos los adultos). En las granjas que presentan la infección en forma endémica, la enfermedad se observa principalmente en cerdos de crecimiento y engorde (entre 2 y 5 meses de edad).

En cuanto a *B. pilosicoli*, el periodo de infección varía entre 1 a 2 semanas. La morbilidad varía entre 5 - 50% según autores y la mortalidad es inferior al 2% (Romero *et al.*, 1998). Además Trott *et al.* (1997) indican que el organismo sobrevive en heces durante un tiempo parecido a *B. hyodysenteriae*.

La espiroquetosis intestinal porcina, por su parte, es propia de lechones, animales en crecimiento y engorda y, se caracteriza por colitis leve, diarrea intermitente y retraso de crecimiento. La mortalidad debida a este proceso es muy rara. La enfermedad no siempre se expresa clínicamente a pesar de la presencia de la bacteria en la granja (Canibe y Jensen, 2005).

Para ambas enfermedades, la incidencia y severidad de la enfermedad en un rebaño afectado varía con la dosis infectiva, inmunidad del grupo de animales, presencia o ausencia de antibióticos, manejo, sanidad o factores estresantes favorecen que el cuadro clínico sea más grave. Se ha comprobado que el frío, la sobrepoblación, el transporte y la mezcla de cerdos son factores predisponentes. El estrés del parto también puede hacer que una cerda no eliminadora comience a excretar la bacteria en las heces y contamine a sus lechones (Lapuente y Rosell, 2004).

Otro factor importante es la virulencia de la cepa. Se han encontrado cepas en cerdos sanos que son completamente avirulentas en condiciones experimentales y otras que tienen una gran capacidad patógena. Las condiciones de alojamiento de los cerdos también pueden hacer que el cuadro sea más o menos grave. Si existe un gran contacto con heces, las dosis infectantes son mucho más elevadas y, en consecuencia, el cuadro clínico es más grave (Rodríguez, 2008).

El empleo de promotores del crecimiento puede dificultar la observación de la enfermedad. Cabe pensar que, en un futuro próximo, cuando se prohíban los promotores del crecimiento que aún están autorizados, la incidencia de la disentería aumente. En Estados Unidos, donde aun se puede emplear el carbadox, la disentería es un problema

mucho menor que en Europa, donde no se puede emplear este producto que tiene una eficacia muy elevada contra *B. hyodysenteriae* (Rodríguez, 2008)

La enfermedad suele persistir en explotaciones infectadas por la persistencia del organismo en cerdos portadores asintomáticos y otros portadores como los ratones (Lapuente y Rosell, 2004).

En cuanto a la prevalencia de estos patógenos, de acuerdo a los estudios realizados en otras partes del mundo, es muy variada presentando rangos que van de 0 a 45% para *B. hyodysenteriae* y de 12 a 85% para *B. pilosicoli*. En estos países la presencia de ambos agentes fue determinada por aislamiento bacteriológico o PCR previo al cultivo (Illanes *et al.*, 2008), pero estos datos pueden estar influenciados por el uso de antibióticos, la edad de los cerdos examinados, los límites de detección de las técnicas de cultivo y el grado de contaminación con otros microorganismos fecales que pueden inhibir el crecimiento de las espiroquetas (Fellström *et al.*, 1996). Hasta el momento no se registran trabajos de prevalencia o frecuencia en Chile.

2.3.2.1 Espiroquetas porcinas y su relación con la dieta

Con el propósito de controlar las espiroquetosis porcinas a través de estrategias dietéticas orientadas a reducir la proliferación de estas especies bacterianas es que el grupo australiano de Hampson *et al.* (2001) evaluaron factores de riesgo asociados a dos situaciones dietéticas posibles: (a) un reducido aporte de sustrato para la fermentación en intestino posterior, o (b) un incremento en la fermentación posterior y la posible instauración de un ambiente limitante a la colonización por agentes patógenos. Los resultados de estos autores son en general consistentes con las ventajas de la primera de las hipótesis. Así, raciones compuestas de arroz cocido o copos de maíz y sorgo (Pluske *et al.*, 1996) reducen la incidencia de espiroquetosis tras una infección experimental. Mientras que la administración de trigo molido (Durmic *et al.*, 1998) o goma arábica y almidón resistente de forma purificada (Pluske *et al.*, 1998) conlleva una mayor incidencia de disentería. Similares resultados han sido observados por los mismos autores al administrar trigo o sorgo extruido, o tras la incorporación de enzimas (Durmic *et al.*, 1998)

La reunión de toda esta información permite a los autores justificar un 51% de la variación en la incidencia de disentería asociada a diferentes factores determinantes de la fermentación posterior. Entre ellos, el que parece ejercer una mayor influencia es la presencia de polisacáridos no amiláceos (PNA) solubles de rápida fermentación, lo que sugiere el interés de los cereales de reducido contenido en PNA solubles, como el maíz o el sorgo y la utilización de procesados térmicos que favorecen la gelatinización del almidón (Pérez y Gasa, 2002).

En consecuencia, la velocidad con la que los sustratos fermentan y, en menor medida la extensión de esta fermentación, parece determinar la dinámica de poblaciones bacterianas a lo largo del intestino posterior. Conforme los carbohidratos desaparecen, las bacterias gram positivas acidófilas son eliminadas por microorganismos gram negativos capaces de metabolizar la proteína (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Brachyspira*), que pasan a ser dominantes (Pluske *et al.*, 1998; Pérez y Gasa, 2002).

En este sentido, otros autores como Prohászka y Lukács (1984) describieron estudios de campo en los que una ración de maíz fue sustituida por ensilado de maíz, lo que permitió reducir la disentería, asociada a una mayor fermentación posterior y un menor pH digestivo. El ensilado de maíz se caracteriza por presentar carbohidratos de fermentación lenta, debido a la desaparición durante el ensilaje de los carbohidratos de fermentación más rápida. Se podría sugerir que un mayor aporte de ingredientes celulósicos o determinados almidones resistentes (por ej. pulpa de remolacha, almidón de papa), junto con un reducido aporte de PNAs, puede determinar una situación de fermentación más estable y prolongada a lo largo del intestino posterior, que limita la autólisis y el desarrollo de agentes patógenos.

La patogénesis exacta de las espiroquetosis porcinas no está clara, sin embargo es evidente que la enfermedad no siempre se manifiesta clínicamente en rebaños porcinos a pesar de la presencia de las bacterias (Hampson *et al.*, 1992; Mhoma *et al.*, 1992). Los factores implicados en la etiología de estas enfermedades son numerosos, incluyendo la nutrición. Con este antecedente, Prohászka y Lukács (1984), encontraron que una dieta basada en silo de maíz que redujo el pH e incrementó los niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el intestino grueso tuvo un efecto bactericida sobre *Brachyspira* y redujo la manifestación clínica de la enfermedad. Estos autores atribuyeron la intensidad

del efecto antibacteriano de la dieta a la menor basicidad, y por tanto mayor acidificación de la digesta en el intestino grueso. Siba *et al.* (1996) intentaron repetir el trabajo con cerdos (25-30 Kg) a los que les fue inoculada experimentalmente una cepa virulenta de *B. hyodysenteriae* tras ser alimentados con dietas diseñadas para promover o limitar la fermentación en el intestino grueso. En contraste con el trabajo de Prohászka y Lukács (1984), Siba *et al.* (1996) encontraron que una dieta basada en arroz cocido y, predominantemente, proteínas de origen animal (harina de sangre, harina de carne y hueso) redujo el grado de fermentación en el intestino grueso y disminuyó la proliferación tanto de *B. hyodysenteriae* como la manifestación clínica de la enfermedad. Una dieta basada en trigo, cebada y lupino dulce australiano que estimuló la fermentación en el intestino delgado (evidenciado por un pH bajo, un incremento de los niveles de AGCC, mayores pesos de los órganos) provocó la mayor incidencia de disentería porcina (Pluske *et al.*, 2003).

Experimentos posteriores (Pluske *et al.*, 1996; 1998) confirmaron estos hallazgos y, han demostrado que una dieta con concentraciones bajas tanto en polisacáridos no amiláceos solubles como almidón resistente, generalmente confiere protección frente a *B. hyodysenteriae* tras una infección experimental. Sin embargo, la forma en la cual los granos han sido procesados también parece ser importante, especialmente en cereales con bajos contenidos de PNA (< 1 g/100 g). Los datos sugieren que una reducción en los niveles de almidón resistente sólo será efectiva contra la disentería porcina si el grano en cuestión tiene un nivel bajo de PNS. Un trabajo danés de Lindecrona *et al.* (2000) encontró que aunque un incremento del nivel de PNA o almidón resistente no dio lugar a una mayor incidencia de la enfermedad, los síntomas clínicos y las lesiones patológicas en cerdos fueron más graves al aumentar los niveles de PNA. A este respecto, Durmic *et al.* (2002) reportaron, en base a análisis de regresión múltiple a partir de numerosos estudios que la colonización por espiroquetas estaba altamente relacionada con las concentraciones en la dieta de PNA solubles, mientras que el desarrollo de la disentería porcina estaba igualmente influido por el contenido en almidón resistente de la dieta (Pluske *et al.*, 2003).

Sin embargo, muchos otros investigadores no han tenido éxito en confirmar estos hallazgos. Leser *et al.* (2000), por ejemplo, no detectaron las mismas bacterias sinérgicas en cerdos infectados con *B. hyodysenteriae*, aunque sí informaron de cambios en la

población bacteriana cuando los cerdos fueron alimentados a partir de una dieta de arroz cocido, o bien, a partir de alimento líquido fermentado seguido de una infección con el agente causante. Además, Kirwood *et al.* (2000) y Leser *et al.* (2000) no encontraron un efecto protector de la alimentación con una dieta de arroz parcialmente cocido y proteína animal seguida de la infección experimental de los cerdos con *B. hyodysenteriae*. Las posibles razones para los resultados dispares incluyen diferencias en los factores de virulencia de las cepas de *B. hyodysenteriae*, cambios en los ingredientes de la dieta, la preparación del arroz y variaciones en la composición de la microbiota del intestino grueso de los cerdos en los distintos países (Pluske *et al.*, 2003).

Una evolución lógica del trabajo en la relación de espiroquetosis y dieta era examinar si la adición de enzimas al alimento podría reducir la incidencia de la enfermedad. Durmic *et al.* (2000) emplearon una arabinoxilanasas en el alimento en un intento de prevenir la disentería porcina. La hipótesis fue que la llegada al intestino grueso de una cantidad reducida de sustratos fermentables, conseguida a través de la rotura enzimática de las moléculas de PNA, reduciría la incidencia de la disentería. Se proporcionó a cerdos trigo tanto extruido (para reducir la contribución del almidón resistente a la expresión de la disentería) como molido, añadiéndose o no arabinoxilanasas. Los cerdos fueron infectados con una cepa virulenta de *B. hyodysenteriae* a los 25 kg de peso vivo, siendo posteriormente controlados para detectar la aparición de la enfermedad (Pluske *et al.*, 2003).

Tanto la extrusión del trigo como la adición de arabinoxilanasas al alimento incrementaron la digestión pre-cecal del almidón, a juzgar por los reducidos niveles de almidón en el intestino grueso. La inclusión de arabinoxilanasas en la dieta no redujo la incidencia de disentería porcina. El fracaso de la extrusión y la adición de la enzima en la protección contra la disentería podrían estar relacionados con el incremento aparente de la fermentación en áreas proximales del intestino grueso, a juzgar por el incremento en la concentración de ATP bacteriano. Se observó un efecto significativo de la inclusión de enzima sobre el pH de la digesta, pero únicamente en la parte distal del colon, de forma que los cerdos alimentados con dietas en las que se añadió arabinoxilanasas presentaban un pH más alto (6.68) que aquellos en los que el pienso no tenía enzima (6.35). Estos datos sugieren que al tiempo que la digesta hubo llegado al colon distal, la enzima ya

habría degradado las cadenas de arabinoxilano y, por tanto, hubo escaso o ningún resto de carbohidratos fermentables, en su lugar, estaba ocurriendo la fermentación de proteínas. El paso de moléculas de PNA más pequeñas puede, por tanto, haber permitido la colonización de *B. hyodysenteriae* de las partes anteriores del intestino grueso al proporcionar tipos y niveles de sustrato apropiados, con la consiguiente expresión de la disentería porcina. En este estudio, por consiguiente, el uso de una enzima cuyo objetivo es la hidrólisis de los PNA del trigo potenció la incidencia de la disentería. Estos datos sirven para poner de manifiesto las complejas interacciones que tienen lugar *in vivo* entre los componentes de la dieta, la microbiota y más probablemente el epitelio, en la etiología de una enfermedad. Esta es una de las razones del por qué la simple sustitución de los agentes antimicrobianos con alternativas/sustitutivos será difícil de conseguir en la práctica (Pluske *et al.*, 2003).

Por otro lado, está claro que la nutrición sí que tiene un impacto importante en la gravedad clínica de la disentería porcina, por lo que es de esperar un efecto similar en el caso de *B. pilosicoli*.

El descubrir las interacciones entre dieta, flora intestinal y enfermedad es un desafío fascinante que puede llevar a procedimientos de control no microbianos para estos microorganismos, y posiblemente para patógenos de origen alimentario en humanos tales como *Salmonella* y *Campylobacter* (Davies, 1999).

2.3.3 Patogenia

La patogénesis exacta de la disentería porcina no está clara, sin embargo es evidente que la enfermedad no siempre se manifiesta clínicamente en rebaños porcinos a pesar de la presencia de las bacterias (Hampson *et al.*, 1992; Mhoma *et al.*, 1992). Los factores implicados en la presentación clínica de la disentería porcina son numerosos, incluyendo la nutrición (Pluske *et al.*, 2003).

La disentería del cerdo provocada por *B. hyodysenteriae* afecta prioritariamente ciego y colon (Ochiai *et al.*, 1997). Esta enfermedad cursa con una enteritis, normalmente de

naturaleza hemorrágica. Ataca sólo en intestino grueso, donde la mucosa se observa inflamada y con presencia de exudado. El agente infeccioso coloniza la capa de mucina y las criptas del intestino grueso provocando una intensa colitis mucohemorrágica y disentería, que afecta a la producción y puede provocar mortalidad. El desarrollo del proceso puede verse favorecido por la presencia de otras bacterias anaerobias, *Bacteroides* spp. o *Fusobacterium* spp. (Meyer *et al.*, 1975), por lo que cualquier estrategia dietética en el control de la disentería debe orientarse a reducir la proliferación de estas especies (Pérez y Gasa, 2002).

B. hyodysenteriae tiene una serie de factores de patogenicidad que le permiten colonizar la mucosa del intestino grueso y lesionarla. Los principales según Shultz *et al.* (1999) son su motilidad mediante endoflagelos, su capacidad de adherirse a los enterocitos e invadirlos, la producción de una hemolisina citotóxica y la capacidad de sobrevivir en presencia de cierta cantidad de oxígeno. El lipopolisacárido de su membrana externa actúa como una endotoxina que activa la producción de citoquinas, que desencadenan una respuesta inflamatoria en la mucosa, y del factor de necrosis tumoral que induce trombosis vasculares y causa necrosis en los tejidos. Además produce proteasas que contribuyen a la virulencia disociando la capa de mucus y provocando alteraciones de la barrera formada por los enterocitos, de las membranas celulares y de la matriz extracelular (Rodríguez, 2008).

Refiere Nistal (2005) que la infección es siempre oral. *B. hyodysenteriae* resiste el pH ácido del estómago y alcanza el intestino grueso. Su capacidad de movimiento le permite atravesar la capa de mucus y alcanzar las criptas del colon donde se multiplica dando lugar a cuadro clínico y lesiones cuando la concentración de bacterias supera las 10⁶ por cm² de mucosa. En los cerdos infectados hay un cambio en la flora bacteriana del intestino grueso, que pasa de ser una flora compuesta principalmente por bacterias gram positivas no móviles a otra formada principalmente por gram negativas.

En una revisión llevada a cabo por Rodríguez (2008) se indica que en los cerdos infectados se observan espiroquetas en la capa de mucus que cubre el epitelio y en las criptas, en las células caliciformes, en los espacios intercelulares, en el citoplasma de las células epiteliales degeneradas y, a veces, en la lámina propia en cavidades alrededor de los vasos sanguíneos.

El mismo autor sugiere que esta espiroqueta no se une a la superficie luminal de las células epiteliales sanas, sino que se adhiere y penetra en el citoplasma de las células alteradas. Una característica importante de la disentería es la alteración rápida de la cohesión entre las células epiteliales del colon, principalmente en el fondo de las criptas.

La necrosis y la eliminación de las células epiteliales alteradas exponen los pequeños vasos sanguíneos y origina hemorragias variables. La mucosa lesionada también se hace susceptible a la invasión por otros componentes de la microflora como el protozoo *Balantidium coli* y la exposición a material antigénico de la luz intestinal puede causar potencialmente otras lesiones inmunomediadas. En zonas adyacentes a las colonizadas por las espiroquetas hay también degeneración epitelial y necrosis. Estas lesiones pueden ser debidas a los efectos tóxicos del material de la membrana externa, que induce la producción del factor de necrosis tumoral y de IL-1 β , así como a la acción citotóxica de las hemolisinas (Rodríguez, 2008).

En la mencionada revisión se indica que la función intestinal se mantiene sin cambios en los cerdos infectados, pero en el intestino grueso hay una pérdida masiva de Na⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ y agua como resultado del fallo en la absorción. Este fallo es especialmente importante en el cerdo, puesto que en esta especie el intestino grueso es el lugar principal para la absorción de agua y electrolitos. Hay una disminución en el flujo de sodio y cloro desde la luz al torrente circulatorio, pero el flujo desde la sangre a la luz intestinal y la permeabilidad de la mucosa no sufre alteraciones esenciales.

Thompson (2002) describe que luego de producirse la infección, el organismo coloniza el intestino grueso en 2-4 días, se multiplica en las criptas, invade las células caliciformes y las células epiteliales y las daña o destruye. En el plazo de 5-7 días de infección se desarrolla tiflocolitis o colitis, la mucosa se congestiona y el contenido del colon se puede volver hemorrágico. Se produce una hiperplasia de las células caliciformes y un exceso de producción de moco que da lugar a heces diarreicas mucosanguinolentas. Algunas cepas de *B. hyodysenteriae* parecen tener un bajo potencial de virulencia y en estos casos, la enfermedad clínica y la patología son muy leves o subclínicas.

Euzéby (1997) sugiere que la movilidad de estas bacterias tiene un papel decisivo en la patogenia, puesto que al realizar experimentalmente mutaciones de los genes *flaA*

(codifica para una proteína de 44 kdal presente en los flagelos) y *flaB1* (codifica para una proteína de 32 kdal presente en el corpúsculo basal), las bacterias pierden parcialmente su facultad de colonizar la mucosa del ciego del ratón, provocando mínimas lesiones y siendo incapaces de originar los síntomas clínicos que aparecen en las lesiones de disentería.

B. hyodysenteriae rodea completamente a los enterocitos, mientras que *B. pilosicoli* se adhiere al polo apical de los mismos. Como todas las especies del género *Brachyspira*, *B. pilosicoli* posee una hemolisina, que juega un papel importante en la sintomatología de la enfermedad. Este poder de hemólisis nos permite diferenciarla clásicamente con la ayuda de pruebas bioquímicas (Romero *et al.*, 1998).

Por otra parte, la membrana externa *B. pilosicoli* posee un lipopolisacárido (LPS) que también influye en la presentación de la patología, pues en líneas de ratones poco sensibles a este LPS no se desarrollan lesiones. Posiblemente este LPS influya en la infección estimulando la producción de IL 1 y de TNF e impidiendo el efecto lítico del complemento (Romero *et al.*, 1998).

2.3.4 Cuadro Clínico y Lesiones

La disentería porcina se caracteriza clínicamente por diarrea que varía de muco-hemorrágica a fibrinonecrótica (Moredo *et al.*, 1999). Comienza a aparecer en el destete (aunque también puede afectar a las madres) y se manifiesta definitivamente en la etapa de engorda (Sitjar, 2000).

La manifestación del cuadro clínico de disentería porcina es muy variable pudiendo presentarse exclusivamente con un reblandecimiento de las heces hasta cursar como un cuadro clínico clásico de disentería (diarrea con sangre y mucus en las heces), por lo que se vuelve de vital importancia contar con un eficiente y confiable programa de gestión ya que éste será quien detecte como primeros indicios de la presentación de una patología digestiva el deterioro del índice de conversión y de la ganancia media diaria de peso (Carvajal *et al.*, 2000a).

A pesar de que la enfermedad se circunscribe al aparato digestivo, concretamente a la zona del ciego y el colon, se debe tener en cuenta que su lipopolisacárido estructural tiene poder endotóxico causante de una beta-hemolisina citotóxica responsable de un fenómeno de coagulación intravascular (Sitjar, 2000).

Para León Vizcaíno (2006) el periodo de incubación de *B. hyodysenteriae* oscila de 2 a 19 días con una media de 6 a 7 días. La enfermedad muestra un curso variable, con formas clínicas sobreagudas a crónicas, aunque predominan las intermedias.

Los signos clínicos de la disentería porcina según Nistal (2005) pueden ser muy variables. El cuadro más típico comienza por una ligera apatía y anorexia y una diarrea oscura que al principio puede ser difícil de observar en un grupo de cerdos alojados en piso de rejilla. Más tarde, la mayoría de los cerdos tienen una diarrea de consistencia similar a cemento, más o menos líquida que mancha la zona perineal y los flancos y que puede verse en el suelo de los corrales.

Rodríguez (2008) indica que el color de las heces varía de gris a un marrón oscuro y progresivamente van apareciendo estrías de sangre fresca, mucus brillante y material necrótico. En algunos cerdos se ve diarrea francamente sanguinolenta con eliminación de sangre fresca que mancha la zona perineal. Los cerdos van quedando progresivamente retrasados, con el lomo arqueado y los flancos hundidos, el pelaje se observa largo y con mal aspecto. Los cerdos afectados tienen emaciación y, algunos, una grave deshidratación y mueren.

Thompson (2002) apunta como síntomas clínicos: la diarrea comienza a los 5-7 días de la infección, se puede observar sangre fresca en las heces y el exceso de mucosidad en las heces es una característica desde 10 días después de la infección. En algunos cerdos durante todo el curso de la enfermedad las heces no evidencian presencia de sangre, mientras que en otros, ya sea desde el principio o a los dos o tres días, la diarrea se torna sanguinolenta en proporción también muy variable (Rodríguez, 2008). La enfermedad clínica dura de 10 a 14 días.

Según Rodríguez (2008) el característico color rojo de la sangre en las heces de los jóvenes es más oscuro ("diarrea negra") en los cerdos de más edad. A medida que la enfermedad progresa, las heces contienen menos sangre, su color es más claro (aspecto

“achocolatado”) hasta adoptar una tonalidad gris (aspecto de “cemento”), y es frecuente que arrastren diminutos y abundantes trocitos de epitelio intestinal necrosado (aspecto “agua de arroz”). A causa de la incontinencia fecal el cerdo defeca sin realizar esfuerzo alguno; las heces manchan el periné y la cola, goteándole y ensuciando suelos y paredes. En los lechones lactantes la enfermedad resulta infrecuente y las heces diarreicas no tienen aspecto hemorrágico. Como el tipo, la intensidad y la duración de la diarrea son muy variables y la instauración de proceso no ocurre al unísono, en el rebaño pueden observarse en un momento dado todas las modalidades clínicas de este síndrome. Se pueden dar altas tasas de mortalidad en los brotes graves. El mismo autor indica que la enfermedad ocasiona un dolor cólico que se manifiesta precozmente (desde el inicio de la diarrea), por hundimiento de los ijares, ligero arqueamiento del dorso y abdomen rígido y doloroso a la presión. Se constata ligera hipertermia (41°C) previa a la diarrea, pero luego la temperatura corporal suele permanecer normal. El apetito no se afecta de manera manifiesta en los casos subagudos y crónicos, pero si hay anorexia en los casos agudos. La polidipsia es intensa. A partir del segundo o tercer día ya se aprecian los signos de delgadez, deshidratación y ataxia provocada por la debilidad y, se afectan muy negativamente los índices de producción (consumo de alimento, conversión, ganancia diaria de peso).

En la misma revisión también se indica que el curso de la enfermedad dura de unos pocos días hasta cuatro semanas. Aunque algunas muertes ocurren sin mostrar síntomas (forma sobreaguda), en los casos benignos sólo se observa reblandecimiento de las heces y pérdida de peso, las muertes suelen producirse en los casos agudos-subagudos durante las dos primeras semanas. En los casos crónicos la diarrea se hace intermitente mientras persiste un estado general de debilidad y apetito variable. La convalecencia suele ser lenta. Cuando la curación se logra mediante tratamientos no resultan infrecuentes las recidivas al suprimirse el quimioterápico.

El cuadro hemático de la serie blanca presenta una breve (2-5 días) y poco marcada leucocitosis por aumento de neutrófilos inmaduros. Luego se normaliza aunque persista el cuadro diarreico (Rodríguez, 2008).

Las lesiones macroscópicas dependen de la gravedad de la enfermedad y de la virulencia potencial de la cepa de *B. hyodysenteriae* implicada. Se caracterizan por congestión y

engrosamiento de la mucosa que aparece recubierta de mucus, fibrina o sangre limitada al colon en particular el colon proximal y la región espiral media. En algunos casos puede resultar afectado ciego, que normalmente se presenta hiperémico y edematoso, también hay difteresis, erosión y ulceración. Puede haber serosis fibrinosa en el colon y los nódulos linfáticos del colon aparecen congestionados y agrandados (Thompson, 2002; Lapuente y Rosell, 2004). En los casos crónicos se observa necrosis superficial. A ella se adhiere, en los casos más avanzados, cantidad variable de exudado mucofibroso, de aspecto difteroides (León Vizcaíno, 2006).

De acuerdo a León Vizcaíno (2006) el intestino delgado suele estar vacío y en apariencia normal; como reacciones inespecíficas el estómago se observa congestivo, dilatado y flácido y el hígado algo degenerado. Las lesiones en el recto resultan poco externas y menos intensas, a lo sumo una inflamación catarral.

En cuanto a las lesiones microscópicas dejadas por *B. hyodysenteriae*, las primeras alteraciones histológicas consisten en congestión de los vasos de la mucosa, edema en la lámina propia, proliferación e hiperactividad (aumento de los gránulos de mucina) de las células caliciformes y dilatación de las criptas, que aparecen repletas de moco y espiroquetas, y de las glándulas de la submucosa. En una fase posterior hay extenuación de las células mucinógenas, desprendimiento de la línea de enterocitos y acumulo de células inflamatorias mononucleadas y, en cantidad variable, neutrófilos. Se incrementa la cantidad de fibrina, formándose membranas difteroides (mezcla de fibrina, moco, células epiteliales, eritocitos, neutrófilos y bacterias) que se adhieren a la superficie mucosa. La necrosis alcanza a las capas más profundas de la mucosa donde se aprecian lesiones hemorrágicas y extravasación de neutrófilos (López, 2001; León Vizcaíno, 2006). Masas de espiroquetas aparecen primero mezcladas con eritrocitos y con moco, después se suma con exudado fibrinoso, depositándose sobre la superficie mucosa y llenando las criptas. *B. hyodysenteriae* invade el citoplasma de las células epiteliales y caliciformes así como la mucosa; pero las células ya se ven alteradas antes de ser penetradas (pérdida de microvellosidades, engrosamiento del retículo endoplásmico y de las mitocondrias) (Duhamel, 1997).

Según Rodríguez (2008), la mortalidad sin tratamiento puede superar el 50% y las muertes comienzan unos cinco días después de verse los primeros signos clínicos.

Habitualmente la mortalidad es menor pero hay un retraso del crecimiento que puede retrasar la salida a matadero hasta en un mes y un aumento del índice de conversión de alimento que puede superar los 0.8 puntos. Muchos cerdos quedan como saldos que hay que enviar al matadero a un precio muy por debajo del de un cerdo sano.

La expresión clínica de la disentería se ve influenciada por diversos factores que pueden hacer que el cuadro clínico varíe desde uno con signos clínicos leves y difíciles de observar, hasta uno mortal. La microflora digestiva es de capital importancia. Es posible producir la enfermedad en cerdos notobióticos, pero el inóculo necesario es mucho más elevado que en cerdos convencionales. La dieta es otro de los factores que modulan el cuadro clínico y que influyen también en la composición de esta microflora. La suplementación con Zn tiene un efecto protector y la deficiencia de Selenio y vitamina E aumenta la receptividad. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son más leves cuanto más digestible sea la dieta y menos material sin digerir alcance el intestino delgado. En este sentido, las dietas suplementadas con enzimas, con ácidos o con probióticos tienen un efecto protector (Rodríguez, 2008).

La espiroquetosis intestinal porcina o diarrea espiroquetal es una enfermedad infecciosa que se manifiesta clínicamente con colitis crónica por colonización del colon, diarrea con contenido mucoso, usualmente sin sangre; deficiente conversión de alimento y depresión en las tasas de crecimiento o pérdida de peso. Además, *B. pilosicoli* causa enfermedades similares en un amplio rango de hospederos, incluyendo humanos (Jensen *et al.*, 2004).

Las lesiones provocadas por *B. pilosicoli* se localizan en el intestino grueso, preferentemente en las secciones de colon proximal y espiral aunque pueden presentarse también en la zona del ciego. Al examen *post mortem*, entre las lesiones dejadas por *B. pilosicoli* destacan: la presencia de colon flácido con contenido poco digerido, heces fluidas al final de transición, principio de engorde la superficie de la mucosa es normal a ligeramente hiperémica, con grandes cantidades de mucus y sin ulceraciones, hiperplasia y elongación de las criptas e infiltrado mononuclear en la lámina propia (Jensen *et al.*, 2004; Lapuente y Rosell, 2004). Hay áreas localizadas de la mucosa con masas de ingesta adheridas. Los nódulos linfáticos mesentéricos están agrandados de tamaño (Davies, 1999).

Las lesiones microscópicas son de colitis subaguda mucosal, que se caracteriza por una hiperplasia de la lámina propia, también se han observado en cerdos sanos. Ocasionalmente, se ha visto *Balantidium coli*. En los cerdos afectados clínicamente, las lesiones son más aparatosas, e incluyen exocitosis neutrofílica, grandes cantidades de mucus, espiroquetas en las células de la cripta y un índice mitótico aumentado de las células de las criptas. *B. pilosicoli* se ha visto en gran número adyacentes a la mucosa (Trott *et al.*, 1996).

Histológicamente se considera patognomónico la observación de un considerable número de organismos adheridos por un extremo a la mucosa. Sin embargo, unos pocos cerdos infectados experimentalmente han demostrado este hallazgo y su ausencia no descarta la posibilidad de espiroquetosis intestinal. La enfermedad, incluyendo la inducción de las lesiones patognomónicas, se ha reproducido experimentalmente inoculando *B. pilosicoli* a pollos, cerdos gnotobióticos y cerdos convencionales de 4 semanas de edad recién destetados. Los cerdos pueden infectarse con cepas de origen porcino o humano (Trott *et al.*, 1996). Sin embargo, no todos los animales infectados exhiben la enfermedad, y las lesiones se observan solamente en los cerdos infectados que presentan diarrea (Davies, 1999).

2.3.5 Inmunidad

Nistal (2005) opina que no todos los cerdos recuperados de la enfermedad tienen una inmunidad total. En estudios experimentales se ha comprobado que una proporción variable de ellos vuelven a padecerla tras una segunda infección. Esto explica porqué a veces un grupo de cerdos padece varios brotes de la enfermedad.

La inmunidad natural se cree que es inespecífica del serotipo determinado por el lipopolisacárido de la membrana externa, aunque hay una protección heteróloga limitada entre unos serotipos y otros. Aunque este hecho no suele ser importante a nivel de criadero porque lo normal es que esté infectado con un solo serotipo, si lo es para el desarrollo de vacunas en las zonas donde existe más de un serotipo (Rodríguez, 2008).

2.3.6 Diagnóstico

En el caso de Chile se ha constatado en encuestas realizadas a Médicos Veterinarios dedicados a producción porcina, que los cuadros digestivos sugerentes de disentería porcina son frecuentes, sin embargo, no se realiza confirmación de este diagnóstico; para el caso de espiroquetosis intestinal porcina, el diagnóstico presuntivo es muy bajo y se piensa que se debe a el desconocimiento de esta enfermedad¹.

El diagnóstico de estas enfermedades se realiza sobre la base de los antecedentes sanitarios del plantel, los signos clínicos (edad/etapa de presentación), los hallazgos anatomopatológicos y el aislamiento del agente etiológico. Las dos especies son indistinguibles morfológicamente y comparten gran parte de componentes proteicos. (Moredo *et al.*, 1999).

Para conseguir un diagnóstico acertado, lo más importante es lograr una aproximación correcta a través de la selección de los animales para toma de muestras. Como norma general, los animales deben estar afectados en la fase aguda de la enfermedad y no haber sido tratados (Moredo *et al.*, 1999).

Tanto en el caso de disentería porcina como de la espiroquetosis intestinal porcina, deben considerarse diagnósticos diferenciales de las diarreas en cerdos en engorda, junto con salmonelosis, enteritis vírica (GET), parásitos (*Isospora*, *Trichuris*) y otras causas no infecciosas. La anatomopatología macroscópica sigue siendo una herramienta muy útil para el diagnóstico provisional de estas enfermedades, ya que generalmente se ve afectada la zona terminal del íleon e intestino grueso, entonces el examen histológico puede proporcionar un apoyo importante en estos casos (Davies, 1999).

El cuadro clínico y lesional y, la epidemiología de la enfermedad en la granja, permiten hacer un diagnóstico presuntivo de estas patologías, pero la confirmación exacta debe hacerse mediante diagnóstico de laboratorio. La calidad de este diagnóstico depende de la calidad de las muestras que reciba el laboratorio. Si las muestras proceden de cerdos tratados, las posibilidades de obtener un resultado falso negativo son elevadas. Asimismo,

¹ Comunicación Personal con Dr. Patricio Retamal

el envío de una sola muestra puede dar resultados falsos negativos. Deben enviarse aproximadamente 10 muestras de heces de cerdos sin tratar (Rodríguez, 2008).

En una revisión realizada el año 2008 por Rodríguez se señala que para realizar un buen diagnóstico es necesario realizar una buena toma de muestras, para lo cual se deben cumplir los siguientes pasos:

1. Preparar el material a utilizar.
2. Conviene limpiar el exterior del ano con un papel para evitar la contaminación bacteriana.
3. Introducir los dedos por el recto protegidos por un guante. Nos podemos ayudar sujetando el animal por la cola y mojando los dedos con agua o con un poco de vaselina.
4. Con los dedos se estimula la defecación del animal.
5. En cada recipiente se pueden incluir las heces de varios animales.
6. Con un volumen final de 20 a 25 cc de heces es suficiente para hacer una coprología, y el estudio de *Lawsonia intracelularis*, *Brachyspira* sp., *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, etc.

En los brotes donde exista alta morbilidad y mortalidad se debe realizar necropsia de los animales muertos o se sacrifican enfermos para tomar muestras de intestino grueso (colon y ciego), o de heces tomadas directamente del recto. Los hisopos intestinales o rectales también son útiles. Las muestras tomadas (órganos, hisopos y heces) se transportan hacia el laboratorio en refrigeración, nunca en congelación, lo más rápidamente posible para asegurar la viabilidad de las bacterias. No obstante, para algunos autores, la sensibilidad del aislamiento es algo menor en hisopos (Fernández *et al.*, 2006).

Una vez cultivada la espiroqueta, la primera forma de diferenciarlas es por el tipo de hemólisis que producen en cultivo. *B. hyodysenteriae* es fuertemente hemolítica, mientras que *B. pilosicoli* produce una hemólisis débil. Cabe destacar que el cultivo de estas bacterias es difícil y lento, requiere medios especiales con antibióticos, incubación en anaerobiosis por 5 a 7 días a 37 °C (Novotna y Skardova, 2002). Además existen diversas pruebas bioquímicas para la identificación de las espiroquetas aisladas, pero hoy día el sistema de identificación más exacto es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que

permite diferenciar entre *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* y otras espiroquetas apatógenas (Rodríguez, 2008).

Aún no se dispone de técnicas de diagnóstico indirecto (serológico) de la suficiente especificidad para la infección de *Brachyspira*. La estructura antigénica de *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* son similares entre sí y con otras espiroquetas y las pruebas serológicas dan reacciones cruzadas entre los anticuerpos inducidos por unas u otras (Thompson, 2002).

Aunque existen otras técnicas de diagnóstico más rápidos y menos laboriosos como IFD (Inmunofluorescencia directa), inmunocitoquímica, visualización de frotis de mucosa en microscopio de campo oscuro, tinción de Gram en corte de mucosa, hibridación *in situ*, el aislamiento microbiológico sigue siendo la prueba de referencia, además de permitir hacer antibiogramas y elaborar autovacunas (López, 2001).

2.3.7 Tratamiento

En lo referente al tratamiento de estas enfermedades, la bibliografía apunta a indicaciones de disentería porcina más que de espiroquetosis intestinal porcina ya que sobre esta última no hay datos realmente comprobados sobre su tratamiento, aunque los estudios *in vitro* indican que un 100% de los aislamientos son sensibles a carbadox y tiamulina, medicamentos usualmente utilizados en el control de la disentería (Duhamel, 1997).

Los productos utilizados en el control de la enfermedad primeramente fueron los derivados arsenicales como el caso del arsenilato de sodio y los antibióticos del grupo de los macrólidos, como la tilosina y la espiramicina (Vaissaire *et al.*, 1970), con el curso de los años la *B. hyodysenteriae* ha desarrollado una resistencia total al arsenilato de sodio y parcial en el caso de la tilosina (Olson y Rodabaugh, 1986). A partir de la década del 70 se comenzó a utilizar la lincomicina tanto en la profilaxis como en la terapéutica de la enfermedad. Se aplicó con buena efectividad en el agua de bebida en dosis de 250 ppm (Hamdy, 1987; Biehl *et al.*, 1988), también por vía intramuscular (Hamdy, 1987; Fujioka *et al.*, 1990; Okamura *et al.*, 1990) en dosis de 4,4 a 11 mg/kg de peso, pero la mayoría

de los autores lo utilizan mezclado con el alimento (Tasker *et al.*, 1981; Olson, 1986; Fujioka *et al.*, 1990) en dosis que varían entre 44 – 110 ppm. La lincomicina se ha empleado así mismo con buenos resultados en combinación con la espectinomicina (Van Leengoed *et al.*, 1985).

En el año 1989, Talavera determinó la sensibilidad de tres cepas obtenidos de cerdos con disentería porcina frente a 11 agentes antimicrobianos (sulfaguanidina, sulfatiazol, sulfametazina, tetraciclina, esteptomicina, cloranfenicol, penicilina, oxacilin, tilosina, metronidazol y furodone). Encontró gran variedad de sensibilidad entre las diferentes cepas, donde todas resultaron resistentes a la sulfaguanidina, sulfatiazol, estreptomicina, penicilina y oxacilin; dos de las tres fueron resistentes a tilosina y todas presentaron mayor sensibilidad al metronidazol.

Actualmente los antibióticos más eficaces son las pleuromutilinas: valnemulina y tiamulina, con resistencia mucho más rara, especialmente en condiciones de campo (Rodríguez, 2008). La valnemulina ha estado prohibida en la Unión Europea por determinados problemas de toxicidad que han aparecido en algunos países, pero recientemente se ha vuelto a autorizar su empleo. La valnemulina tiene excelente actividad *in vitro* frente a *B. hyodysenteriae*. Se han establecido concentraciones eficaces en alimento de 25 y 75 ppm para la prevención y el tratamiento de la disentería porcina clínica respectivamente (Burch, 1982; Bouwkamp, 1987; Plonait y Bickhardt, 2001; Nistal, 2005). La dosis indicada para el tratamiento de la disentería porcina es de 3-4 mg/Kg de peso corporal al día, durante 10 días (Berrocal *et al.*, 2002).

La tiamulina, por su parte, es el antibiótico con el que existe más experiencia en el tratamiento y profilaxis de la disentería porcina en condiciones de campo. Las dosis preventivas son de 35 – 50 ppm en alimento y la dosis curativa de 100 ppm. En casos graves es fundamental inyectar además con tiamulina a los cerdos más afectados porque el consumo de alimento en éstos va a ser muy bajo y en consecuencia no van a recibir la dosis adecuada de antibiótico. La no utilización del tratamiento intramuscular en los casos graves, puede hacer fracasar la eficacia del tratamiento oral (Rodríguez, 2008).

No obstante a estos resultados se informan casos en que la tiamulina ha provocado reacciones adversas en los animales. En tal sentido se notificó la presentación de eritemas, edemas, cojeras y muertes al administrar este producto (Bouwkamp, 1987).

Hay que tener en cuenta que no se pueden administrar estos antibióticos (valnemulina y tiamulina) a cerdos que estén recibiendo una ración que contenga salinomicina por los efectos tóxicos que tiene la combinación de ambos (Alexander *et al.*, 1980; Burch, 1982; Bouwkamp, 1987; Plonait y Bickhardt, 2001; Nistal, 2005).

Otro de los quimioterapéuticos más utilizados es el carbadox, producto que demostró ser efectivo en dosis que varían de 50 a 55 ppm mezclado con el alimento. Este producto tiene como principal inconveniente el largo periodo de residualidad por lo que no se recomienda su uso en animales en engorde (Molnar y Magyar, 1987; Moredo *et al.*, 1997).

Un grupo diferente de medicamentos que se utilizan en el control de la disentería es el de los nitroimidazoles, de este grupo, se ha empleado con más intensidad el dimetridazol, que presenta efectividad al mezclarse con el alimento y el agua de bebida en dosis de 1,5 kg del producto al 40% por 2500 lts de agua y 1,5 kg al 40% por tonelada de alimento (600 ppm) ambos por 21 días (Lysons, 1979).

Además de los ya mencionados se utilizan con mayor o menor efectividad en el tratamiento y profilaxis de la disentería otros productos como estreptomina, bacitracina, olaquinox, furazolindona, virginiamicina, monecina y oxitetraciclina (Rodríguez, 2008).

Se evaluó la sedecamicina (Hayashi *et al.*, 1991a; Hayashi *et al.*, 1991b) derivada del grupo de las lankacidinas. Esta se viene comercializando en Japón como aditivo de los alimentos para el tratamiento de la disentería. En Alemania usaron también este producto con buenos resultados en un programa de erradicación.

Debido a la gran variabilidad que se obtiene en la resistencia a los diferentes productos, la selección de uno u otro para el tratamiento de la enfermedad, debe realizarse según la sensibilidad de las cepas de *B. hyodysenteriae* que circulan en el rebaño a tratar, lo que se puede lograr mediante su estudio sistemático (Plonait y Bickhardt, 2001).

Cuando existen fallos en la eficacia de un tratamiento, antes de pensar en la presencia de cepas resistentes es preciso descartar otras causas. La primera causa de fallos es la

reinfección de los cerdos. El tratamiento puede eliminar la espiroqueta de los cerdos enfermos, pero no la elimina del ambiente y si el contacto con las heces es muy amplio (piso sólido), los cerdos tratados pueden estar reinfectando constantemente. Otra causa de la falla en el tratamiento son las infecciones mixtas, especialmente la salmonelosis. Una tercera causa de falla es la presencia de ratones en la granja. Como se ha indicado, los ratones pueden ser portadores de la espiroqueta durante más de 6 meses y, en consecuencia, los cerdos pueden reinfectarse con las heces de éstos. (Wood y Lysons, 1988; Wannemuehler *et al.*, 1990; Nistal, 2005).

A la hora de establecer un tratamiento correcto debemos tener en cuenta lo siguiente (Lapuente y Rosell, 2004):

- Se debe establecer un tratamiento específico de los patógenos involucrados: medicación curativa.
- El tratamiento antibiótico funciona bien si utilizamos el antibiótico adecuado.
- Debemos establecer un buen control sobre las infecciones concomitantes.
- Se deben extremar las medidas de higiene y limpieza en el pabellón o en el criadero.
- Deben separarse los animales afectados.

Son necesarios más estudios realizados *in vivo* sobre la eficacia de los tratamientos. Se han sugerido medidas de control basadas en los principios básicos para prevenir la transmisión oro-fecal, en la reducción del estrés y medicaciones estratégicas. De igual manera se recomiendan medidas de manejo tales como todo dentro/todo fuera, manejo en bloques, unificar orígenes y adoptar medidas de bioseguridad (Duhamel 1997; Carpenter y Burlatschenko, 2005).

2.3.8 Prevención y Control

La forma más común de contaminación de una granja es la llegada de cerdos infectados que pueden ser completamente asintomáticos. La mejor medida para evitar esta forma de contaminación es conocer el estado sanitario del criadero de origen de los reproductores

que se van a introducir en la explotación. Independiente de ello, en la prevención de estas enfermedades lo más recomendado es la cuarentena. Esto se refiere a un lugar destinado al aislamiento de los animales de reposición antes de poder introducirlos en una explotación. La permanencia de los animales en la cuarentena debe ser entre 40-60 días por dos motivos: (López y López, 2006)

- Conseguir una inmunidad sólida y duradera de los animales de reposición para prepararlos frente a la población microbiana que existe en el plantel. El tiempo mínimo para obtener un buen estatus inmunitario tras un contacto microbiano oscila entre los 10 y los 20 días, siendo recomendable algo más de tiempo para asegurar una correcta exposición al antígeno.
- Asegurar la eliminación de la carga microbiana, cuyos periodos de excreción en el animal pueden llegar a alcanzar hasta 60 días tras la infección.

Los mismos autores indican que durante la cuarentena se deben aplicar una serie de medidas preventivas y de adaptación, incluyendo la administración de alimento no medicado para observar la posible aparición de signos clínicos sospechosos de espiroquetosis y así asegurar que la reposición viene libre de ciertos patógenos y para ir adaptándola al nuevo microbismo.

La búsqueda de soluciones nutricionales alternativas a los antibióticos como promotores del crecimiento son abundantes. Sin embargo, para prevenir las enfermedades y desordenes digestivos es necesario la consideración de varios aditivos (probióticos) administrados al alimento para suplir su efecto junto a otros aspectos de la producción intensiva del cerdo, tales como el manejo de la alimentación, alojamientos y bioseguridad, para hacer frente a las enfermedades porcinas económicamente importantes de la crianza - engorda como son: la disentería porcina y espiroquetosis intestinal porcina (Álvarez *et al.*, 2006).

Se ha reportado una reducción considerable del número de casos de disentería porcina y espiroquetosis intestinal porcina, en animales tratados con cepas de *L. acidophilus* y *S. thermophilus* con respecto a los no tratados. También se reportan reducciones en la incidencia de estas enfermedades cuando se aplicó un producto a base de bacterias lácticas en cerdos recién destetados. Estos resultados coinciden con los de aquellos que

comunican que en estudios *in vitro* han investigado el efecto de cepas lácticas contra varios patógenos, incluyendo *Brachyspira*, encontrando efecto inhibitor de estas al crecimiento de dicho patógeno (Álvarez *et al.*, 2006).

Otra de las alternativas al uso de antibióticos en producción porcina es el uso de alimento líquido fermentado (ALF). La utilización del ALF como estrategia para prevenir o tratar procesos digestivos como disentería y espiroquetosis intestinal, ha sido investigada en varios estudios, y se han obtenido resultados diferentes según el proceso, pero positivos en muchos casos. Sin embargo, el ALF es el resultado de una fermentación microbiana, y la presencia de microorganismos convierte al ALF en un producto "vivo" que, por tanto, requiere un manejo adecuado y continuo para poder obtener resultados óptimos (Canibe y Jensen, 2005).

En cuanto al uso de vacunas, Nistal (2005) indica que el uso de vacunas inactivadas ha demostrado su eficacia en combinación con otras medidas para la profilaxis de la disentería porcina. Experimentalmente se han utilizado otros tipos de antígenos como bacterias sonicadas, proteínas flagelares y de la membrana externa de *B. hyodysenteriae* y bacterias modificadas genéticamente. Se ha demostrado que todos ellos inducen algún grado de protección. No obstante, actualmente no hay ninguna vacuna en el mercado contra la disentería porcina, por lo que la profilaxis debe estar basada en evitar la llegada de la enfermedad a los plantales libres (Rodríguez, 2008).

En el control deben emplearse una serie de medidas combinadas para obtener la máxima eficacia. Los plantales que están libres de disentería porcina adoptan rigurosas medidas de bioseguridad y compran futuras reproductoras en criaderos SPF (*Specific Pathogen Free*) o *Minimal Disease*. La higiene ha de extremarse sobre todo en el sentido de evitar el contacto de los cerdos con heces infectadas. El empleo de sistemas todo dentro-todo fuera ha de ser riguroso en cada sala o en cada nave. Los pasillos han de mantenerse perfectamente limpios y hay que disponer baños para las botas a la entrada de cada sala para evitar la contaminación entre unas y otras. Además se recomienda medicaciones estratégicas de los cerdos antes de moverlos a edificios limpios. Los antibióticos de elección son la tiamulina, valnemulina y lincomicina (Thompson, 2001; Rodríguez, 2008).

La erradicación de la disentería porcina es muy difícil, se puede llevar a cabo por diferentes vías (Thompson, 2001):

1. Despoblación completa de la granja con estricta limpieza y desinfección de todas las instalaciones para eliminar todos los restos de heces que queden, incluso en grietas mínimas, y de un programa de desratización también riguroso. Al menos 3 semanas de vaciado y repoblando con cerdos libres de espiroquetosis.
2. Despoblación de granja de engorda (todos los cerdos desde el destete al final de la etapa de engorda), moviendo las cerdas fuera del sitio por un mínimo de 2 semanas y medicando el alimento; limpieza, desinfección y desratización de los edificios vacíos igual al caso anterior. Traslado de nuevo de las cerdas a la granja, destetando lechones de aquí en adelante en la granja.
3. Despoblación de las granjas de engorda (todos los lechones desde destete a final de la etapa de engorda), cerdas están en la granja y reciben medicación en el alimento, limpieza y desinfección a fondo de edificios vacíos y alojamiento de las cerdas de la mejor forma posible.

A pesar de que el sistema 1 tiene un costo económico muy elevado, es el único que garantiza el éxito en aquellas granjas que no reúnen las condiciones adecuadas para emplear otros sistemas (Rodríguez, 2008).

El problema principal de la erradicación lo plantea la gran resistencia de *B. hyodysenteriae* en las heces y, lo mismo que sucede con los tratamientos, muchos programas de erradicación fallan porque los cerdos vuelven a contaminarse por el contacto con heces infectadas. En el programa de erradicación es imprescindible aplicar un programa de desratización muy enérgico para eliminar a los ratones, que tienen un papel epidemiológico muy importante como mantenedores de la infección (Olson, 1986; Olson y Rodabaugh, 1986).

No existe ningún programa de erradicación estándar que se pueda aplicar a todos los criaderos, por ello, antes de abordarla es preciso estudiar detenidamente las características del pabellón en la que se va a aplicar. Si las medidas de despoblación parcial, manejo e higiene que es imprescindible emplear no pueden cumplirse

rigurosamente, es mejor no plantear un programa de erradicación puesto que las posibilidades de falla son muy elevadas (Rodríguez, 2008).

Según Prieto García (2003) para establecer poblaciones libres de enfermedades endémicas hay que hacerlo desde dos perspectivas:

- I. Creación de una nueva granja (poblaciones con mayor estatus sanitario)
 - a. Histerectomía: obtención de lechones mediante la cirugía de cerdas donantes que deben ser criadas en condiciones especiales y muestreadas convenientemente antes de su introducción en la nueva granja.
 - b. *Piglet Snatching*: obtención de lechones reuniéndolos directamente desde la vagina en el momento del parto.
 - c. Destete precoz medicado (MEW): se separan los lechones más fuertes de los partos, se establece un programa concreto de medicación y vacunación para las cerdas y los lechones.
 - d. Destete precoz segregado (SEW): este procedimiento de un mínimo de aplicación de medicamentos inyectables y orales.
 - e. Destete precoz medicado modificado o *Isowean*: es un sistema de destete precoz segregado, el término *Isowean* es la abreviación del término *Isolated Weaning* (destete aislado) una de las bases teóricas más importantes de este sistema de manejo (Alexander *et al.*, 1980; Prieto García, 2003). Tanto uno como otros métodos han tenido éxito en la eliminación de enfermedades, el éxito de estos depende básicamente de los siguientes factores:
 - Carga del agente a eliminar en la población de origen.
 - Estatus inmune de la población de origen.
 - Edad al destete aplicada.
 - Calidad de la realización de la selección de las cerdas.
 - Separación entre la granja de origen y las instalaciones de destete.
 - f. Despoblación y repoblación: es sin duda el método más efectivo para la mejora sanitaria de las explotaciones pero implica evidentemente un gran costo, tanto por la compra de nuevos animales como por la pérdida de

producción que se produce durante el tiempo en que la granja permanece vacía y vuelve a recuperar niveles normales de productividad.

II. Mejora del estatus sanitario de una granja ya existente: Existen diversos métodos dependiendo de la enfermedad a eliminar y del tipo de producción del que se hable:

- a. El método suizo de eliminación de enfermedades: consiste en la despoblación de todos los animales de la granja menores de una edad (generalmente unos 10 meses) y el tratamiento antibiótico intensivo durante un período variable de tiempo de los animales que permanecen en la granja.
- b. Método para la eliminación de otras enfermedades: en el caso de la disentería se basa tanto en la eliminación de portadores del agente (mediante el uso de un antibiótico efectivo) como en la eliminación del agente en el ambiente (puesto que este tiene una alta persistencia). La mayor parte de los planes de erradicación incluyen los siguientes puntos:
 - Reparación de suelos de la granja (evitar grietas y lugares de difícil limpieza y desinfección)
 - Reducción del número de animales en la explotación al máximo para facilitar la limpieza y desinfección y reducir la presión de infección.
 - Eliminación de los animales crónicamente enfermos.
 - Limpieza y desinfección constante.
 - Programas de desratización.
 - Otras medicaciones variables.

Para Pérez Ruano (2002) los principales esquemas de control y erradicación mediante el uso de medicamentos son:

- I. Medicación combinada con técnicas de destete temprano (Alexander *et al.*, 1980; Meszaros *et al.*, 1985): así se designa al movimiento de cerdos de alto valor genético, que conlleva a cuarentena y la mejora en el nivel de salud de éstos en el proceso.

El programa requiere del suministro de altos niveles de antibióticos a las cerdas antes y después del parto, así como a los cerditos desde el nacimiento hasta los diez días de edad. Con ellos se logran erradicar varias enfermedades endémicas, es relativamente costoso pero resulta más barato que la despoblación total.

- II. Medicación antes del parto y traslado de los animales a locales considerados limpios, combinados con saneamiento, limpieza y desinfección: este método fue utilizado por Wood y Lysons (1988) en la erradicación de la enfermedad de rebaños en Gran Bretaña; el mismo consiste en la eliminación de *B. hyodysenteriae* de los cerdos por medio de una medicación continua de los alimentos y una medicación estratégica del agua que consumen las cerdas antes del parto.

Estos autores parten de que las cerdas que pasan el periodo de tratamiento son libres de la infección al igual que sus crías. Estas cerdas y crías consideradas "limpias" se trasladan a instalaciones "limpias" dentro del mismo rebaño, el resto de las cerdas consideradas "infectadas" y los animales de ceba se separan de los animales limpios hasta que reciben el tratamiento o vayan al matadero.

Se va realizando progresivamente la limpieza de las instalaciones mediante limpieza profunda y desinfección y se toman medidas para eliminar los vectores.

- III. Tratamientos masivos unidos a medidas de limpieza y desinfección: este método es el más utilizado, el mismo consiste en la eliminación de la enfermedad del rebaño sin la despoblación. Requiere de la limpieza y eliminación de las heces así como de la desinfección antes y después de iniciado el tratamiento.

La medicación a los cerditos destetados, reproductoras y en algunos casos a los cerditos lactantes se les realiza por lo general durante un largo período de tiempo.

Si las condiciones son favorables este método es efectivo en la erradicación, pero las posibilidades de que suceda son considerablemente inferiores que la despoblación. Numerosos autores han logrado buenos resultados con programas de este tipo.

- IV. Otros regímenes que incluyen tratamiento limpieza y desinfección: Se propone el control de la enfermedad a partir del tratamiento continuo de los cerditos, desde el destete hasta los 112 días.

Se ha logrado la eliminación de la enfermedad en unidades de ceba mediante la medicación combinada con rigurosas medidas de control de vectores y desinfección.

- V. La despoblación: para ello se sacrifica o se traslada completamente el rebaño; las instalaciones se limpian y desinfectan, las heces fecales se eliminan y se realiza un programa de desratización. Se recomienda un periodo de descanso entre 30 a 60 días antes de repoblar las instalaciones con animales procedentes de rebaños libres de disentería.

- VI. Creación de rebaños SPF (Libres de Patógenos Específicos): la enfermedad se elimina por técnicas de SPF y los rebaños establecidos de esta manera y mantenidos cerrados, culminarían por librarse de la enfermedad. Los mayores problemas ocurren cuando es necesario introducir material genético nuevo.

De ser imprescindible la introducción e animales, se requiere de su diagnóstico para identificar portadores asintomáticos de *B. hyodysenteriae*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Detectar y caracterizar *Brachyspira* spp. en cerdos en crecimiento en Chile.

3.2 Objetivos Específicos

- Aislar y caracterizar fenotípicamente cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* y *Brachyspira pilosicoli* en heces de cerdos en crecimiento en Chile.
- Confirmar el hallazgo de *Brachyspira hyodysenteriae* y/o *Brachyspira pilosicoli* mediante detección del gen NADH oxidasa y gen 16S rDNA respectivamente en cultivos sospechosos.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Localización del estudio

El estudio se realizó entre Julio de 2011 y Abril de 2012, obteniendo 170 muestras de heces provenientes de cerdos en crianza-engorda (100-150 días), procedentes de 9 planteles porcinos (6 empresas) de diversas regiones de Chile (Metropolitana, del Libertador Bernardo O´Higgins, del Maule y de Los Lagos) que tenían antecedentes de diarrea en las etapas de crianza y/o engorda y un diagnóstico presuntivo de disentería. Estas muestras fueron recogidas por los médicos veterinarios encargados de los respectivos planteles, cuidando por sobre todo, no generar eventos estresantes para los animales.

4.2 Características del muestreo

El muestreo fue dirigido, preferentemente, a aquellos animales que tenían antecedentes de diarrea (hemorrágica o no), baja ganancia diaria de peso, y que estuvieran sin tratamiento antibiótico al menos 20 días antes de la toma de muestra.

4.3 Tamaño de muestra

Al no conocer antecedentes de espiroquetas intestinales en Chile, el tamaño muestral debió considerar la disponibilidad de acceso a criaderos, ya que la gran mayoría de los planteles industriales, no permiten el ingreso de personas externas para la obtención de dichas muestras o bien presentan su propio equipo de evaluación y análisis sanitario por lo que no entregan muestras a laboratorios externos. Ya que la prevalencia reportada en estudios extranjeros es muy variada, con rangos de 0 a 45% para *B. hyodysenteriae* y de 12 a 85% para *B. pilosicoli*, se calculó un tamaño de muestra de 170 animales, asumiendo

un 12,5% de prevalencia, 95% de confianza y un error esperado del 5%. Se utilizó la siguiente fórmula (Mateu y Casal, 2003):

$$n = \frac{Z^2 * pq}{B^2}$$

Donde:

n = tamaño de muestras
Z= 1,96 para 95% de confianza
p= prevalencia estimada
q= 1-p
B= porcentaje de error esperado

4.4 Obtención de muestras fecales

En cuanto a la metodología de recolección de muestras, estas fueron muestras individuales de heces frescas o tómulas rectales, almacenadas en bolsas tipo Ziploc o tómulas con medio de transporte Cary-Blair (COPAN®, Murrieta, CA, USA) y conservadas a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su llegada a los laboratorios de la Unidad de Enfermedades Infecciosas de FAVET, Universidad de Chile.

4.5 Caracterización de los criaderos, descripción de las instalaciones

Los criaderos de cerdos correspondieron en su mayoría a planteles comerciales monositio (fuera del Programa PABCO); dos de los criaderos estudiados fueron planteles multisitio incorporado al Programa PABCO y al Convenio de Producción Limpia (APL) y con programa de Bioseguridad en todos los sitios (Sitio 1: Reproducción y maternidad, Sitio 2: Recría, Sitio 3: Crianza y Engorda y un sitio para el *Stud* de Machos).

Todos los planteles trabajan bajo un sistema intensivo confinado (SIC), con cerco perimetral, con sistema de inseminación artificial. El programa de alimentación es manual en los planteles monositio y automática para los planteles multisitio, todos según función reproductiva y crecimiento (franjas etarias).

Todos los planteles realizan manejo de Riles, programa de vacunaciones, manejo sanitario preventivo (antibióticos en dietas de lechones, recría y crianza) y curativo (casos clínicos), La mayoría además presenta sistema computacional de registros.

Muchos de los criaderos cuentan con infraestructura específica por etapa productiva, como: pabellón de chanchillas, verraqueras, brete de extracción de semen, laboratorio de inseminación artificial, pabellones de hembras en gestación, pabellones de maternidad, pabellones de recría en piso elevado, pabellones de crianza y engorda en piso de concreto y en algunos casos, fábrica de alimentos.

Además, los criaderos cuentan con una Unidad de Procesamiento de Riles (desecho fecal porcino DFP), oficinas administrativas y asistencia técnica medico veterinaria externa.

4.6 Normas de bioseguridad:

El procesamiento de las muestras se realizó en los laboratorios de la Unidad de Enfermedades Infecciosas de FAVET, Universidad de Chile y por ello se debieron contemplar las medidas de bioseguridad que rigen el trabajo de laboratorio, realización de los procedimientos bajo gabinete de bioseguridad, desinfección de superficies y manos con alcohol 70% antes y después del procedimiento, separación del material utilizado y posterior esterilización en autoclave a 121°C por 30 minutos.

4.7 Indicaciones del estudio

Todas las muestras fueron sometidas en un máximo de 48 hrs desde que fueron obtenidas, al protocolo de diagnóstico bacteriológico basado en los estudios realizados por Novotna y Skardova (2002).

Todo desarrollo bacteriano que presentó halos de hemólisis de algún grado, fueron sometidos a pruebas de D-PCR según protocolo descrito por La *et al.* (2003); las placas que no presentaron hemolisis fueron descartadas.

A partir de las placas de cultivo primario que presentaron desarrollo bacteriano, se realizó una segunda siembra para obtención de cultivo puro, y de dichos cultivos se realizaron pruebas de caracterización bioquímica: hidrólisis de hipurato y producción de indol. Además se realizó prueba de PCR y posterior secuenciación para confirmar la presencia de *B. hyodysenteriae* y/o *B. pilosicoli*. Estas indicaciones se diagraman en la Figura 1.

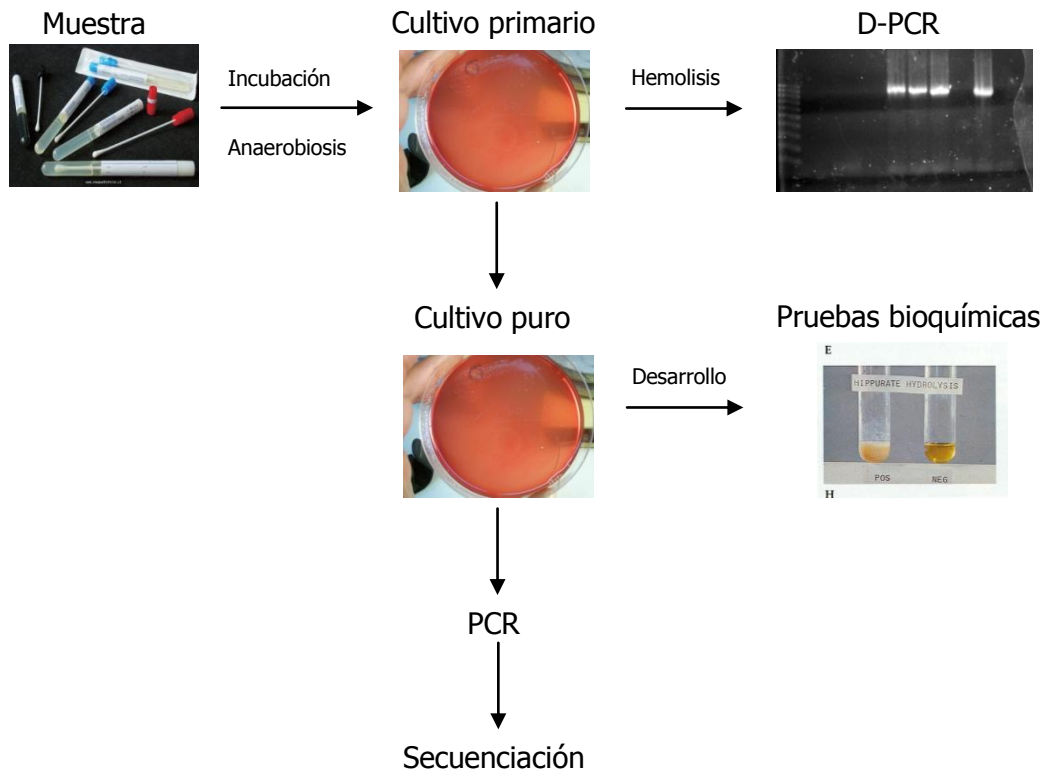


Figura 1. Diagrama de indicaciones del estudio.

4.7.1 Protocolo de diagnóstico bacteriológico

El protocolo diagnóstico bacteriológico se realizó según los estudios realizados por Novotna y Skardova (2002).

Medio de Cultivo:

El medio de cultivo para el aislamiento de *Brachyspira* spp. considera placas Petri con Agar Tripticasa Soya (ATS) (Becton, Dickinson & Co., Le Pont de Claix, France) con 5% sangre

ovina, y que contiene Espectinomicina (200 mg/L), Vancomicina (50 mg/L), Rifampicina (12,5 mg/L) y Colistina (12,5 mg/L). Los antibióticos fueron preparados en dilución madre y se adicionaron las cantidades suficientes al medio (1mL por cada 250 mL de medio).

Condiciones de Cultivo:

Se inocularon las placas por agotamiento y se incubaron en anaerobiosis (Gaspak[®], BBL, Division of ioQuest Cockeysville, Maryland. Div. Becton, Dickinson & Co) por 5 a 7 días a 37°C (debió pre-reducirse el medio previo a la incubación por 24 hrs.).

Control de anaerobiosis: (Brewer *et al.*, 1966)

Cada cámara de anaerobiosis debe contener un indicador de anaerobiosis. Este indicador consiste en un tubo que contiene 3,0 mL de una solución compuesta en partes iguales de tris 60% (hydroxi metil aminometano), dextrosa al 4%, y azul de metileno 0,02%, todas las soluciones deben estar a temperatura ambiente antes de ser combinadas. El azul de metileno actúa como un receptor de hidrógeno y pierde su color en la forma reducida. Esta reacción es fácilmente revertida por la exposición al aire o por adición de oxígeno.

Los tubos de control de anaerobiosis fueron conveniente ubicados en el frasco para poder ser observados desde el exterior. En un sistema eficiente, la anaerobiosis progresiva puede ser detectada dentro de 1 hora por la decoloración gradual de la solución. La pérdida completa del color ocurre dentro de varias horas, dependiendo de la efectividad del sistema de anaerobiosis. La unidad es reutilizable pero se debe almacenar en un área oscura cuando no se use.

Interpretación:

Las muestras sospechosas corresponden al desarrollo de colonias poco visibles (casi película) y con algún grado de hemólisis. Las dos especies de *Brachyspira* se diferenciarán por PCR *Doble*.

Modificaciones:

Luego del crecimiento en las primeras placas, se buscó obtener cultivos puros de estas bacterias. Para ello se preparan nuevos medios de cultivo en placas Petri y Agar Tripticasa

Soya pero esta vez sin antibióticos. El volumen de estos es reemplazado por agua destilada previo a la esterilización.

Una vez obtenidas placas de cultivos puros, las cepas que resultaron positivas en las siguientes pruebas (caracterización bioquímica y PCR) fueron procesadas y almacenadas con el sistema Microbank[®] en el cepario del laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET.

4.7.2 Protocolo de caracterización bioquímica

Las pruebas de caracterización bioquímicas se realizaron según indicaciones de Mac Faddin (2003):

Las pruebas bioquímicas que se realizaron a partir de cultivos puros son:

4.7.2.1 Prueba de Hidrólisis de Hipurato:

(-) para *B. hyodysenteriae*; (+) para *B. pilosicoli*.

En caldo infusión corazón (HIB) con 1% de hipurato de sodio y utilizando como reactivo cloruro férrico.

Medio de Cultivo:

Tubos con tapa con caldo infusión corazón (HIB) con 1% hipurato de sodio (*N*-benzoilglicina, ácido benzoilaminoacético).

Condiciones de Cultivo:

Se inocularon los tubos con cultivos puros y se incubaron en anaerobiosis (Gaspak[®]) por 48 hrs (42-66 hrs.) a 37°C.

Transferir una alícuota de cultivo (0,8 mL) a tubos de ensayo pequeños.

Agregar el reactivo de cloruro férrico 0,2 mL.

Interpretación:

Las muestras positivas dieron origen a un precipitado de color castaño, floculoso, insoluble, que persiste al agitar después de 10 minutos.

4.7.2.2 Prueba de Indol:

(+) para *B. hydysenteriae*; (-) para *B. pilosicoli*.

En caldo triptófano y utilizando reactivo de Ehrlich.

Medio de Cultivo:

Tubos con caldo triptófano.

Condiciones de Cultivo:

Se inocularon los tubos con inóculos livianos de cultivos puros y se incubaron en anaerobiosis (Gaspak[®]) por 24 a 48 hrs a 37°C.

Agregar 1 mL de éter o xileno a cada.

Suavemente agregar 0,5 mL del reactivo de Ehrlich al tubo.

Interpretación:

Las muestras positivas dieron origen en segundos a un anillo de color rojo (fucsia brillante) en la interfase del medio con la porción inferior de la fase alcohólica, sobre el medio. En las muestras negativas no hubo ningún desarrollo de color en la capa de alcohol o aparece un anillo turbio; toma el color del reactivo de Ehrlich (amarillo).

4.7.3 Protocolo de PCR-Doble

El protocolo D-PCR se realizó según estudios de La *et al.* (2003):

Preparación del DNA desde placas aisladas:

D-PCR fue aplicado para diferenciar las dos especies de espiroquetas desde las cosechas crecidas en las placas de cultivo bacteriológico selectivo. Con un asa estéril se arrastraron áreas de crecimiento de espiroquetas. Cuando áreas de crecimiento fuertemente hemolítico y débilmente hemolítico eran observadas en una placa, ambas áreas fueron consideradas para la extracción de DNA.

- 1) Extracción de DNA por calor: El material adherido fue re-suspendido en 100 µL de agua ultra pura y hervido por 10 min. a baño de maría empleando siempre los flotadores y los seguros para los tubos 1,5 mL. Centrifugar 5 min a 3000 rpm. Este método fue utilizado para las pruebas D-PCR de rutina, ya que presenta mayor facilidad y menor costo.
- 2) Extracción DNA mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®): según instrucciones del fabricante. Este método fue utilizado tratando de obtener un DNA más puro a utilizar para la secuenciación del gen, sin embargo no se obtuvo cantidad suficiente de DNA para este propósito.
- 3) Extracción DNA mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®) con la modificación que la ruptura de las membranas celulares se consigue mediante la adición de perlas de sirconia. Este método fue utilizado para obtener el DNA a utilizar en la secuenciación del gen, obteniendo buena cantidad de DNA y de mayor pureza.

Con cualquiera de estos métodos de extracción se obtiene el templado para PCR.

Amplificación de DNA:

El mix de PCR se elaboró con cantidades protocolizadas de partidores H1 y H2 de *B. hyodysenteriae* y partidores P1 y P2 de *B. pilosicoli*, los cuales fueron diseñados para amplificar una región de 354 pb del gen NADH oxidasa y una región de 823 pb del gen 16S rDNA, respectivamente.

	Partidor	Secuencia 5' → 3'
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	H1	ACTAAAGATCCTGATGTATTTG
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	H2	CTAATAAACGTCTGCTGC
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	P1	AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	P2	GCACCTATGTTAAACGTCCTTG

Se probaron tres protocolos en la elaboración del mix de PCR:

- 1) Para un volumen total de 25 µl por muestra, con 2,5 µl de templado y utilizando HotStartTaq DNA polimerasa (QIAGEN®).
- 2) Para un volumen total de 20 µl por muestra, con 1 µl de templado y utilizando JumpStart Taq DNA polimerasa (Sigma-Aldrich®).
- 3) Para un volumen total de 15 µl por muestra, con 1 µl de templado y utilizando Taq DNA polymerase (Invitrogen®).

Las condiciones que se utilizaron en el ciclo involucran un primer paso de activación de 15 minutos a 95°C cuando se utilizó HotStartTag DNA polimerasa, tiempo que se redujo a sólo 5 minutos cuando se utilizaron cualquiera de las otras dos polimerasas; luego y para todos los protocolos se continúa con 35 ciclos cuyas condiciones son: denaturación a 94°C por 30 segundos, apareamiento de partidores a 55°C por 30 segundos, y elongación a 72°C por un minuto. Finalmente se contempla un periodo de 10 minutos a 72°C para finalizar la extensión.

Electroforesis:

Los productos del PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1,0% (peso/vol) en 1 x buffer TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA).

1. 3 µl de buffer de carga a cada una de las muestras. Se cargan 15 µL de cada muestra por pocillo del gel, dejando un pocillo para el estándar de peso molecular.
2. Cargar 2,5 µL del estándar de peso molecular.

3. Conectar los electrodos a la fuente de poder, conectar la fuente de poder y encender este equipo, disponer 110 Volts hasta que el frente de corrida llegue al 75% del largo total de la cámara de electroforesis.

Visualización de DNA:

En la tinción se utilizaron dos métodos:

- 1) Teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. (Se prepara en una fuente 150 mL buffer TAE + 15 µl de Bromuro de etidio). Se sumerge el gel en la fuente con bromuro por aproximadamente 15 minutos y luego visualizar en un transiluminador. Todo el proceso debe realizarse con guantes, por la toxicidad del bromuro de etilio, y lentes con filtro UV en la visualización.
- 2) Teñido con GelRed[®]. Agregar 1,0 µl del reactivo por cada 100 mL de agarosa y directamente al frasco de preparación de ésta última. Permite visualizar el gel inmediatamente salido de la cámara de electroforesis. Tanto el GelRed[®] como la agarosa que lo contiene deben almacenarse a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

4.7.4 Protocolo de Secuenciación

De las mismas placas de cultivo puro anterior se realizó una nueva extracción de DNA, esta vez debió realizarse con Kit Roche MODIFICADO para asegurar su pureza. Este DNA se utilizó para realizar un PCR simple, y con un volumen final de 100 µl. Las bandas obtenidas en la electroforesis fueron recortadas del gel con una hoja de bisturí y este material fue sometido al kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System para purificar el DNA presente.

Luego se realizó una cuantificación del DNA por electrofotometría mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{\text{OD}_{260} \times 100 \text{ (factor de dilución)} \times 50 \mu\text{g} / \text{mL}}{1000}$$

Este DNA purificado fue enviado al Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica para su secuenciación. Luego las secuencias fueron comparadas mediante el programa Blast de NCBI con otras secuencias reportadas en bases de datos de Gen-Bank (Nº JF430719.1) para determinar la identidad del aislado.

5 RESULTADOS

Mediante aislamiento bacteriológico se obtuvieron 56 cultivos sospechosos de *Brachyspira* spp. (Figura 2).

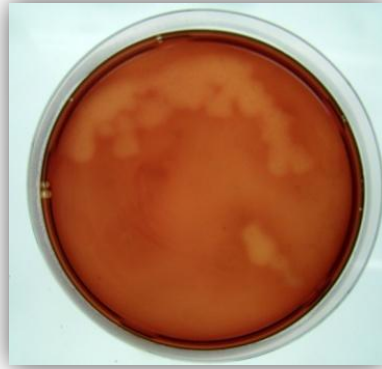


Figura 2. Placa sospechosa al cultivo biológico selectivo por su débil β -hemólisis.

Todas estas placas fueron sometidas a D-PCR, una resultó con bandas de peso molecular cercano al buscado para *B. hyodysenteriae*, nueve presentaron bandas de peso molecular cercano al buscado para *B. pilosicoli* (Figuras 3 y 4), y una presentó bandas de ambos pesos moleculares buscados (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de 170 muestras de heces de cerdos provenientes de 9 planteles, sospechosos a *Brachyspira* spp., por cultivo bacteriológico selectivo y D-PCR.

Plantel	Nº Muestras	Sospecha al cultivo	Resultado al D-PCR	
			<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>
1	10	1	0	0
2	10	7	0	0
3	30	6	0	0
4	10	0	0	0
5	20	6	0	0
6	20	4	0	0
7	20	7	0	3
8	30	12	2*	2*
9	20	13	0	5
Total	170	56	2	10

* En este caso 1 animal resultó sospechoso a ambas especies de *Brachyspira* spp.

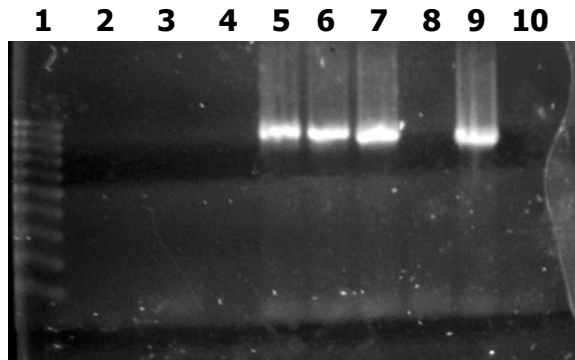


Figura 3. D-PCR: Línea 1 corresponde al estándar de peso molecular. Líneas 5, 6, 7 y 9 corresponden a bandas cercanas a 800 pb, sospecha de *B. pilosicoli*. Tinción con bromuro de etidio.

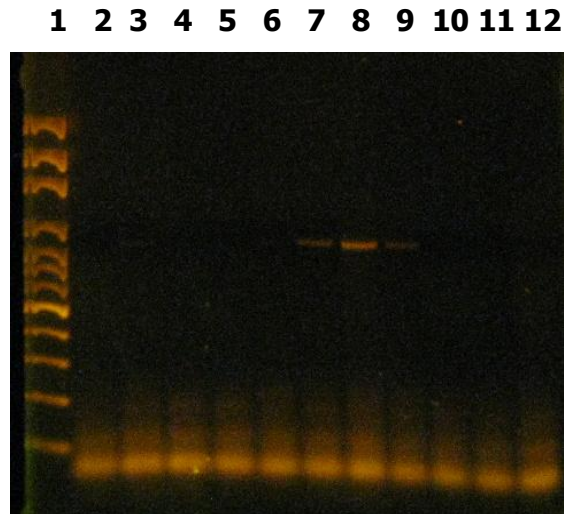


Figura 4. D-PCR: Línea 1 corresponde al estándar de peso molecular. Líneas 7, 8 y 9 corresponden a bandas cercanas a 800 pb, sospecha de *B. pilosicoli*. Tinción con GelRed®.

Todos los cultivos sospechosos a D-PCR fueron resembrados, pero sólo fue posible obtener cultivos puros de 4 de ellos, los que fueron sometidos a pruebas de caracterización bioquímica.

Esta caracterización bioquímica, resultó acorde a los resultados esperados para *B. pilosicoli*, mostrando reacciones como las indicadas en las Figuras 5 y 6.



Figura 5. Prueba Hidrólisis de Hipurato.
El tubo de la izquierda corresponde a una reacción positiva (+).
El tubo de la derecha corresponde a una reacción control negativo (-).

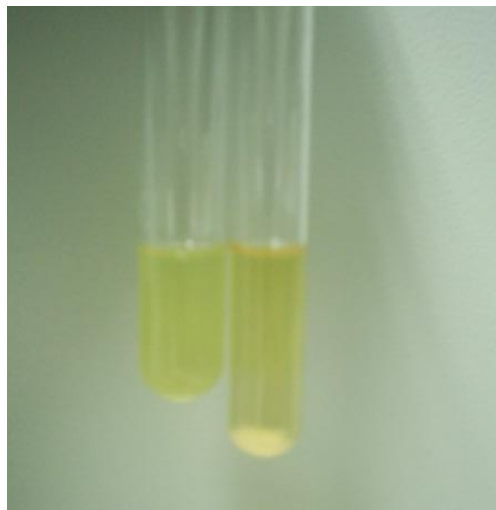


Figura 6. Prueba de Indol.
El tubo de la izquierda corresponde al control negativo (-).
El tubo de la derecha corresponde a una reacción negativa (-).

Desde una de las placas de cultivo puro (Figura 7) se realizó un arrastre de colonias y extracción de DNA con High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche[®]) (modificado).

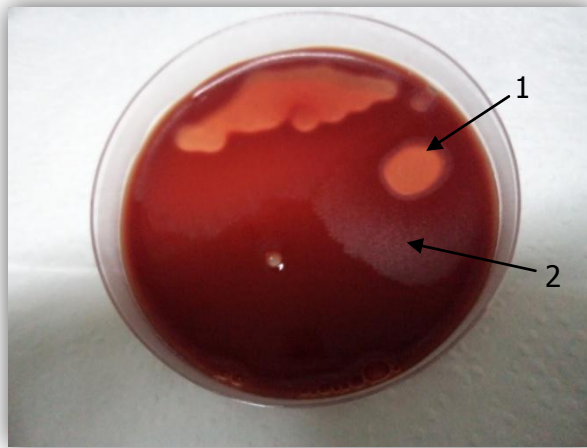


Figura 7. Placa de 4 días de cultivo puro sospechoso de *B. pilosicoli* por su débil β -hemólisis. Cabe destacar las zonas de colonias hemolíticas (flecha 1) y zonas de difusión (flecha 2).

El DNA obtenido se utilizó para realizar un PCR simple y con un volumen final de 100 μ l. Las bandas obtenidas en la electroforesis (Figura 8) fueron recortadas del gel purificando un fragmento de 524 pb del rDNA 16S presente, el que fue enviado a secuenciar.

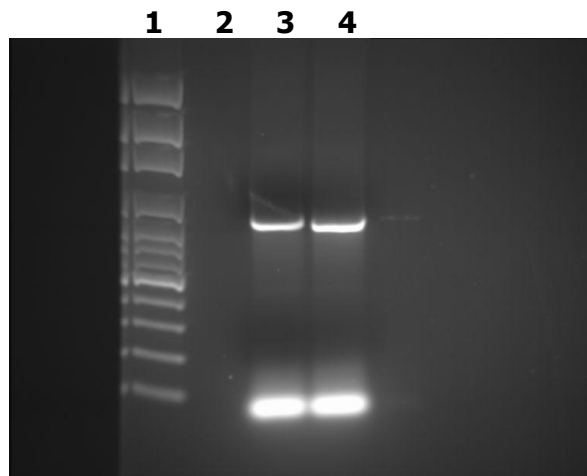


Figura 8. Fotografía del gel de PCR siempre utilizado para purificación. Línea 1 corresponde al Estándar de Peso Molecular. Segundo carril vacío. Carriles 3 y 4 corresponden a bandas cercanas a 800 pb, con un volumen te carga de 60 μ l cada uno. Tinción con GelRed®.

La secuenciación demostró identidad completa (100%) con otras secuencias publicadas del mismo gen (Genbank N° JF430717 Suecia, HM450982 Tailandia, CP002025 Australia,

NR025674 Francia, AB120008 Japón) confirmando por primera vez en Chile la presencia de *B. pilosicoli*.

Lamentablemente ninguna muestra sospechosa de *B. hydysenteriae* se pudo replicar en cultivo puro para realizar tanto las pruebas de caracterización bioquímicas como la secuenciación posterior que confirmaran su identidad.

6 DISCUSIÓN

En el presente estudio, se obtuvieron cultivos sospechosos tanto de *B. hyodysenteriae* como de *B. pilosicoli*, aunque solo se logró aislar, caracterizar y confirmar, por primera vez, la presencia de *B. pilosicoli* en cerdos en crecimiento en Chile.

En las pruebas de caracterización fenotípicas realizadas a los cultivos sospechosos éstas coincidieron con los resultados reportados en la literatura para *B. pilosicoli*, esto es: prueba de hidrólisis de hipurato (+) y prueba de indol (-) (Euzéby, 1998).

Al realizar pruebas de PCR doble a los cultivos sospechosos, once animales resultaron también sospechosos, uno de ellos a *B. hyodysenteriae*, nueve a *B. pilosicoli*, y uno a ambas especies bacterianas.

Para confirmar el hallazgo de ambas especies de *Brachyspira* se pretendió obtener al menos un producto de PCR de cada tamaño esperado, en cantidad suficiente para ser secuenciado y comparado con secuencias reportadas en bases de datos de Gen-Bank (Nº acceso: JF430735.1 del gen NADH oxidasa de *B. hyodysenteriae*; y JF430719.1 de gen 16S rDNA de *B. pilosicoli*), esto solo se consiguió para *B. pilosicoli* y se pudo así confirmar la identidad de los aislados según programa Blast de NCBI, confirmando por primera vez en Chile la presencia de *B. pilosicoli*.

Cuando se observa la frecuencia de cultivos sospechosos por hemólisis y características de crecimiento bacteriano (56 de 170 cultivos, 32,9%), este resultado concuerda con los trabajos registrados en la literatura internacional donde se ha informado aislamiento de la bacteria en rangos que van de 0 a 45% para *B. hyodysenteriae* y de 12 a 85% para *B. pilosicoli*. (Illanes *et al.*, 2008). Desgraciadamente, en este trabajo no se pudo avanzar hacia la identificación plena de las sospechas por las dificultades para obtener cultivos puros y mantenerlos viables (Euzéby, 1998; Schultz *et al.*, 1999).

La confirmación sólo de 8 de los 56 cultivos sospechosos y correspondientes solamente a *B. pilosicoli* puede indicar una baja presencia de *Brachyspira* en cerdos en crecimiento en Chile. Esto podría estar ligado al tipo de sistema productivo del cual provinieron mayoritariamente las muestras, puesto que solo dos de los planteles muestreados, siendo industriales, no tenían los máximos estándares de manejo. Es muy posible que los

cambios tanto tecnológicos como de manejo, desarrollados en las últimas décadas en la producción porcina, reflejen una mejor calidad sanitaria de estos animales.

De los 9 criaderos muestreados, se obtuvo cultivo sospechoso en 8 de ellos, pero en solo dos se pudo confirmar la presencia de los patógenos buscados. Esto indica que pudo existir una limitación en las técnicas utilizadas o que, efectivamente, los animales muestreados no presentaban la infección.

Otro factor que podría haber incidido en la baja frecuencia de *Brachyspira* en los planteles muestreados es el no haber contado con registros oficiales confirmando que los animales no estaban siendo tratados con antibióticos en la dieta por al menos veinte días. Según las características de muestreo y la información entregada verbalmente por los contactos en los respectivos planteles, esta condición se habría cumplido.

En relación a la metodología de detección, el protocolo de diagnóstico bacteriológico es el indicado, el uso de medios selectivos es considerado de importancia crítica para el aislamiento de *Brachyspira*, esto por el fácil crecimiento de otras bacterias anaerobias que están presentes en este tipo de muestras (Novotna y Skardova, 2002; La *et al.*, 2003). Esto se pudo comprobar puesto que en un alto número de las muestras cultivadas anaeróticamente en medio con antibiótico hubo escaso desarrollo (19 muestras) o no hubo desarrollo bacteriano (95 muestras).

Se pudo constatar en este estudio la alta sensibilidad de estas bacterias a condiciones de cultivo, tanto para la condición de anaerobiosis estricta como para la calidad nutritiva del medio agar sangre (Euzéby, 1998; Novotna y Skardova, 2002). Cuando se hicieron subcultivos de muestras sospechosas en agar sangre de baja calidad nutritiva (agar-agar), no se obtuvo desarrollo de los cultivos sospechosos, e igualmente, cuando por algún motivo el control de anaerobiosis indicaba que esta condición no se había alcanzado completamente, tampoco se obtuvo el desarrollo esperado.

Una vez obtenidos los cultivos puros, y en el proceso de la identificación fenotípica de las cepas aisladas se debe considerar que es difícil basarse sólo en las pruebas bioquímicas debido a su inespecificidad. Por esta razón se seleccionaron las dos pruebas que diferenciaban de mejor forma ambas especies bacterianas buscadas: prueba hidrólisis de hipurato y prueba de indol. Aunque podría bastar para la identificación de estas especies

bacterianas su desarrollo en anaerobiosis, grado de hemólisis, desarrollo en presencia de los antibióticos del medio de cultivo, las características del crecimiento en película, en conjunto con las pruebas bioquímicas mencionadas, en el presente estudio la confirmación se realizó en base a los resultados de la prueba de PCR.

En cuanto a la técnica de D-PCR, aun cuando la extracción de DNA mediante hervido de los cultivos sospechosos no es recomendable si el producto final se utilizará para purificación y/o secuenciación, fue un método de extracción apropiado para pruebas de rutina ya que se obtiene cantidad suficiente de DNA para la realización de PCR. Además, debido a la estructura lipídica de la cubierta externa de las espiroquetas (Holt *et al.*, 1994) la extracción en base a la acción de polimerasas podría resultar bastante baja y que aun cuando la extracción con perlas de sirconia da resultados bastante parecidos a la extracción por calor, este último método es, sin duda, más costoso.

Por su parte, los tres protocolos para elaboración de *mix* de PCR fueron exitosos, sin embargo, aún cuando la literatura recomienda a la HotStartTaq DNA polimerasa como la más adecuada para esta prueba (La *et al.*, 2003), se obtuvieron mejores resultados utilizando Taq DNA polymerase (Invitrogen®). Se deben considerar siempre las recomendaciones del fabricante para cada una de las polimerasas en cuanto a concentraciones, condiciones de almacenamiento, periodo de activación y temperatura de activación.

En lo referente a las metodologías de tinción del gel para su visualización, ambas resultaron adecuadas, siendo el bromuro de etidio más recomendado cuando la cantidad de producto de PCR es baja y por tanto las bandas son muy tenues. Sin embargo siempre hay que considerar la toxicidad del bromuro de etidio y normas de bioseguridad relacionadas a su uso, manejo, mantención y eliminación. Por su parte GelRed® es más sencillo de utilizar y ofrece también la posibilidad de realizar la tinción posterior a la corrida del gel. Para esta tinción se debe trabajar con las cantidades recomendadas de GelRed® (1 µl por cada 100 mL de agarosa) ya que un exceso provoca una corrida irregular del gel de electroforesis y una difícil visualización de las bandas.

Parece interesante plantear para el estudio de estos agentes infecciosos, otro tipo de técnica como IFD (Inmunofluorescencia directa), inmunocitoquímica, visualización de frotis

de mucosa en microscopio de campo oscuro, tinción de Gram en corte de mucosa, hibridación *in situ*, de modo de comparar los resultados obtenidos con diferentes técnicas, y aportando con esto mayor conocimiento sobre su posible impacto epidemiológico. Sin embargo, frente a todas las técnicas de diagnóstico anteriormente mencionadas, las realizadas en este estudio como son cultivo bacteriológico y PCR presentan como principal ventaja que se pueden realizar desde muestras de heces, a diferencia de otras que requieren muestras de tejidos obtenidas tras la muerte por enfermedad o el sacrificio del animal.

Para finalizar, se estima que se debe seguir investigando la presencia de *Brachyspira* spp. en Chile. Sería interesante realizar un estudio similar al descrito anteriormente, pero abarcando una mayor cantidad de planteles y animales de diferentes regiones de Chile y así buscar estimar la prevalencia tanto de Disentería Porcina como de Espiroquetosis Intestinal Porcina en el país.

7 CONCLUSIONES

Se logró aislar y caracterizar fenotípicamente cepas de *B. pilosicoli* en heces de cerdos de crianza-engorda en plantas porcinas de diferentes regiones de Chile.

Se logró confirmar, por primera vez en Chile, la presencia de *B. pilosicoli* mediante prueba de D-PCR y secuenciación.

No se logró confirmar la presencia de *B. hyodysenteriae* en cerdos de crianza-engorda.

8 BIBLIOGRAFÍA

Alexander, T.J.L.; Thornton, I.L.; Boon, G.; Lysons, R. J.; Gush, A. F. 1980. Medicated early weaning, to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet. Rec.* 106: 114-119.

Álvarez, J.M.; Rodríguez, J.C.; Guerra, A. 2006. Utilización de probióticos en el lechón. Efecto sobre la flora intestinal y la presentación de patologías digestivas. *Mun. Ganad.* 186: 66-69.

Atyeo, R.F.; Oxberry, S.L.; Hampson, D.J. 1996. Pulsed-field gel electrophoresis for sub-specific differentiation of *Serpulina pilosicoli* (formerly "*Anguillina coli*"). *FEMS Microbiol. Lett.* 141: 77-81.

Baum, D.H.; Joens, L.A. 1979. Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae*. *J. Amn. Soc. Microbiol.* 3: 792-796

Berrocal, F.; Bretón, J.; Piqué, X.; Augé, L. 2002. Aplicación terapéutica de Econor 1% en pienso ante diarreas en cebo. *Ganadería*, ISSN 1695-1123. 16: 60-61. <<http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=2600343>> [consulta: 26-08-2011].

Biehl, L.G. Zinn, GM. Meyer, R, C. 1988. Research studies comparing programs for endemic swine dysentery control. *Agri. Practice.* 9:31-33.

Bouwkamp, F.T. 1987. Is Tiamulin a dangerous drug? (for pigs). *Tijdschr. Diergeneesk.* 112: 1295-1296.

Brewer, J.H.; Allgeier, D.L.; Mc Laughlin, C.B. 1966. Improved anaerobic indicator. *Appl. Microbiol.* 14 (1): 135-136.

Burch, D.G.S. 1982. Tiamulin feed premix in the prevention and control of swine dysentery under farm conditions in the U. K. *Vet. Rec.* 110:244.

Canibe, N.; Jensen, B. 2005. Alimentación líquida y prevención de alteraciones digestivas. *Mun. Ganad.* 183: 25-28.

Carpenter, J.; Burlatschenko, S. 2005. Diarrea en la transición asociada a múltiples patógenos recurrentes. Solo Cerdos. 8: 1-2.

Carvajal, A.; Arriba, M.L.; Pozo, J.; Vidal, A.; Rubio, P. 2000a. Diagnostico diferencial de las enfermedades digestivas del cerdo. Información Veterinaria, Unidad de enfermedades infecciosas, epidemiología, medicina preventiva y policía sanitaria. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. <http://www.veterinaria.org/revistas/veteninf/vet_enf_inf_tripod/porcinos/enter/diagnosticoenfermedadesdiarreicasporcinas.htm> [consulta: 17-04-2011].

Carvajal, A.; Arriba, M.L.; Pozo, J.; Vidal, A.; Rubio, P. 2000b. Situación actual de la patología digestiva en cerdos en España. Información Veterinaria, Unidad de enfermedades infecciosas, epidemiología, medicina preventiva y policía sanitaria. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Información Veterinaria. 218:35-46. <<http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=95709>> [consulta: 24-08-2011].

Chile. Instituto Nacional de Estadísticas (INE). 2007. Estadísticas pecuarias. Criaderos de Aves y Cerdos. Informe Anual 2007. <http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/estadisticas_agropecuarias/estadisticas_pecuarias/pecuarias.php> [consulta 13-12-2011].

Davies, P. 1999. Nuevos síndromes entéricos en el cerdo. Mun. Ganad. 110: 50-56.

Duhamel, G. E. 1997. Spirochetosis associated with *Serpulina pilosicoli*. Experimental reproduction, epidemiology and control. Proceeding Am. Assoc. Swine Pract. pp: 487-493.

Durmic, Z.; Pethick, D.W.; Pluske, J.R.; Hampson, D.J. 1998. Changes in bacterial populations of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection. J. Appl. Microbiol. 85: 574-582.

Durmic, Z.; Pethick, D.W.; Mullan, B.P.; Schulze, H.; Accioly, J.M.; 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. J. Appl. Microbiol. 89: 678-686.

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. *Br. J. Nutr.* 88: 159-169.

Euzeby, J.P. 1997. Infection à *Brachyspira* chez le porc. UCAAB, Paris.

Euzéby, J.P. 1998. *Brachyspira hyodysenteriae*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Créé le 25 novembre 1998. Dernière mise à jour le 04 mars 2005. <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdicto/bb/hyodysenteriae.html>> [consulta: 13-07-2011].

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

Fernández, A.; García, E.; Baselga, R. 2006. Guía Práctica para Toma de Muestras. [www. Exopol.com](http://www.exopol.com). <<http://www.exopol.com/micro/index.html>> [consulta: 24-08-2011].

Ferro, A. 2007. Actualización en disentería porcina. *Av. Tecnol. Porc.* 4 (11): 85-88.

Fujioka, K.; Nakamoto, S.; Nishida, H.; Ibayashi, T.; Okamura, Y.; Leonardis, T. 1990. A trial of Lincomix 44 premix for eradication of swine dysentery. *Proc. I.P.V.S. 11th Congress Switzerland*. pp: 132.

Hamdy, A.H. 1987. Therapeutic effects of various concentrations of Lyncomycin in drinking water on experimentally transmitted swine dysentery. *Am. J. Vet. Res* 42: 178-182.

Hampson, D.J.; Lee, J.I. 1994. Genetic characterization of intestinal spirochetes and their association with disease. *J. Med. Microbiol.* 40 (5): 365-371.

Hampson, D.J.; Trott, D.J. 1995. Intestinal spirochaete infections of pigs: an overview with an Australian perspective. **In:** *Manipulating pig production V* (Eds. D.J. Hennessy y P.D. Cranwell). Australasian Pig Science Association, Werribee, Australia. pp: 139-169.

Hampson, D.J.; Cutler, R.; Lee, B.J. 1992. Virulent *Serpulina hyodysenteriae* from a pig in a herd free of clinical swine dysentery. *Vet. Rec.* 131 (14): 318-319.

Hampson, D.J.; McLaren A.J.; Trott, D.J; Swayne, D.E.; Oxberry, S.L. 1997. Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chicken and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J. Med. Microbiol.* 35 (2): 412-417.

Hampson, D.J.; Pluske, J.R.; Pethick, D.W. 2001. **In:** Digestive Physiology of Pigs. J.E. Lindberg y B. Ogle Eds. 8^a edition. Wallingford, Oxon. CAB International. Part V. Cap 69. pp: 247-260.

Harris, D.L.; Lysons, R.J. 1992. Swine dysentery **In:** Diseases of swine. Leman, A.; Straus, B.E.; Mengeling, W.L.; D´Allairen, S. y Taylor, D.L. Eds. 7th edition. Iowa State Uni. Press. pp: 599-616.

Harris, D.L.; Kinyon, J.M.; Mullin, M.T. 1972. Isolation and propagation of spirochetes from the colon of swine dysentery affected pigs. *Can. J. Comp. Med.* 36: 74-78.

Harris, D.L.; Hampson, D.J.; Glock, R.D. 1999. Swine dysentery. **In:** Diseases of Swine. Straw, B.E.; D´Allairen S.; Mengeling W.L. y Taylor, D.J. Eds. 8th edition. Blackwell Science, Oxford, UK. pp: 579-600.

Hayashi, T.; Okada, J.; Kondo, S.; Yamazaki, T. 1991a. Role of intestinal excretion in the effect of subcutaneously administered Sedecamycin on cecal infections caused by *Treponema hyodysenteriae* in mice. *Antimicrob. Agents Ch.* 35: 1601-1604.

Hayashi, T.; Suenaga, I.; Narukawa, N.; Yamazaki, T. 1991b. *In vitro* and *in vivo* activities of Sedecaycin against *Treponema hyodysenteriae*. *Antimicrob. Agents Ch.* 32: 458-461.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. 1994. The Spirochetes. **In:** Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology. Hensyl, W. R., ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore MD. Ninth Edition. pp: 27-30.

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

<http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/00-ix_congreso_pp/47-presencia.pdf> [consulta 13-07-2011].

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

Kinyon, J.; Harris, D.L. 1979. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. Int. J. Syst. Evol. Micr. 29: 102-109.

Kirkwood, R.N.; Huang, S.X.; McFall, M.; Aherne, F.X. 2000. Dietary factors do not influence the clinical expression of swine dysentery. J. Swine Health Prod. 8: 73-76.

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. J. Clin. Microbiol. 41 (7): 3372-3375.

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

León Vizcaíno, L. 2006. Enfermedades infecciosas. (Departamento de Patología Animal) Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España.

Leser, T.D.; Lindecrona, R.H.; Jensen, T.K.; Jensen, B.B.; Moller, K. 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3290-3296.

Lindecrona, R.H.; Jensen, B.B.; Jensen, T.K.; Moller, K. 2000. The influence of diet on the development of swine dysentery. **In:** 16th International pig veterinary society congress (C. Cargill y S. McOrist Eds.). Causal production, Adelaide, South Australia. p: 7

López, D. 2001. Patologías digestivas en el cerdo de cebo. Mun. Ganad. 133: 67-70.

López, D.; López, A. 2006. Bioseguridad. El arma sanitaria más barata y rentable (I). Mun. Ganad. 17 (188): 32-35.

Lysons, R.J. 1979. Swine dysentery. Br. Vet. J. 135: 395-400.

Mac Faddin, J.F. 2003. Prueba de hidrólisis de hipurato y prueba de indol. **In:** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina. pp: 177-191 y 206-216.

Mateu, E.; Casal, J. 2003. Tamaño de la muestra. Rev. Epidem. Med. Prev. 1: 8-14.

Messier, S.; Higgins, R.; Moore, C. 1990. Minimal inhibitory concentration of five antimicrobials against *Treponema hyodysenteriae* and *T. innocens*. J. Vet. Diagn. Invest. 2: 330-333.

Meszaros, J.; Slipkovits, L.; Antal, T.; Szabo, I.; Veszely, P. 1985. Eradication of some infectious pig diseases by perinatal Tiamulin treatment and early weaning. Vet. Rec. 116: 8-12.

Meyer, R.C; Simon, J.; Byerly, C.S. 1975. The etiology of swine dysentery. III. The role of selected gram-negative obligate anaerobes. Vet. Pathol. 12 (1): 46-54.

Mhoma, J.R.L.; Hampson, D.J.; Robertson, I.D. 1992. A serological survey to determine the prevalence of infection with *Treponema hyodysenteriae* in Western Australia. Aust. Vet. J. 69 (4): 81-84.

Molnar, L.; Magyar K. 1987. Studies on the efficacy of Getroxel against *Treponema hyodysenteriae* and its role in the control of swine dysentery. Acta Vet. Hungarica. 35: 405-413.

Moredo, F.; Giacoboni, G.; Pantozzi, F.; Perfumo, C. 1997. Susceptibilidad *in vitro* frente a cinco antimicrobianos de cepas de *Serpulina hyodysenteriae* aisladas en Argentina. Av. Ciencs. Vet. 12: 61-63.

Moredo, F.A.; Giacoboni, G.I.; Perfumo, C.J.; Mittal, R.T. 1999. Serotipificación de cepas de *Serpulina hyodysenteriae* aisladas de cerdos con cuadros de disentería porcina en la Provincia de Buenos Aires. Rev. Latinoam. Microbiol. 41: 63-66.

Nistal, P. 2005. Las Enteropatías porcinas. Disentería porcina partes I y II. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España. <http://www.calier.es/cgi-bin/html/sp/wview_n.pl?p_file=20020505124339_trabajos&p_cat=trabajos&top_inf=31&top_max=40> [consulta: 28-08-2011].

Novotna, M.; Skardova, O. 2002. *Brachyspira hyodysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility. Vet. Med. – Czech, 47 (4): 104-109.

Ochiai, S.; Mori, K.; Adachi, Y. 1997. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb nov, *Brachyspira innocens* comb nov and *Brachyspira pilosicoli* comb nov. Microbiol. Immunol. 41: 445-452.

Okamura, Y.; Ibayashi, T.; Kamphuis, A. 1990. A study of the administration of Lincomycin in drinking water for the treatment of swine dysentery. Proc. I.P.V.S. 11th Congress, Switzerland. pp: 133.

Olson L.D. 1986. Probable elimination of swine dysentery after feeding Ronidazole, Carbadox or Lincomycin and verification by feeding Sodium Arsenilate. Can. J. Vet. Res. 50: 365-368.

Olson L.D; Rodabaugh D.E. 1986. Feeding sodium arsenilate for exciting diarrhea and identifying carriers of swine dysentery. Can. J. Vet. Res. 50 (3): 359-364.

Osorio, F. 2010. Principales enfermedades virales porcinas emergentes y reemergentes a nivel mundial: Estatus 2010. **In:** X Congreso Nacional de Producción Porcina, Mendoza, Argentina 2010. pp: 145-156.

Pérez, J.F.; Gasa, J. 2002. Importancia de los carbohidratos de la dieta y de la utilización de aditivos sobre la salud intestinal en el ganado porcino. **In:** XXIII Curso de Especialización FEDNA. Madrid, España. 4 y 5 Noviembre 2002: 55-70.

Pérez, F.; Nofrías, M. 2008. Influencia de la nutrición sobre la patología digestiva del lechón. **In:** XXIV Curso de Especialización FEDNA. Madrid, España. 23 y 24 Octubre 2008: 81-105.

Pérez Ruano, M. 2002. Disentería porcina. Estrategias actuales para su control y erradicación. Rev. Salud Animal. 24 (1): 11-21.

Plonait, H.; Bickhardt, K. 2001. Manual de las enfermedades del cerdo. 2ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp: 617.

- 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. *J. Nutr.* 126: 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. *J. Nutr.* 128: 1737-1744.
- Pluske, J.R.; Pethick, D.W.; Hampson, D.J.** 2003. El impacto de la nutrición sobre desórdenes y enfermedades de tipo entérico en porcinos. **In:** XIX Curso de Especialización FEDNA. Madrid, España. 23 y 24 Octubre 2003: 01-21.
- Prieto García, L.** 2003. Métodos de manejo del estatus sanitario. *Producción Hypor.* pp: 1-7.
- Prohászka, L.; Lukács, K.** 1984. Influence of the diet on the antibacterial effect of volatile fatty acids and on the development of swine dysentery. *Zbl. Vet. Med. B.* 31: 779-785.
- Riopérez, J.; Rodríguez, M.L.** 2004. Nutrición y patología digestiva del cerdo en crecimiento. *Mun. Ganad.* 172: 25-29.
- Rodríguez, F.** 2008. La disentería hemorrágica porcina: Elementos para su diagnóstico y control. < <http://www.bibliomaster.com/pdf/439.pdf>.> [consulta: 24-08-2011].
- Romero, M.A.; Bernard, F.; Pronost, S.; Fortier, G.; Loinsard, D.; Montier, S.** 1998. Origen bacteriano y parasitario de las diarreas en transición en Francia. *Anaporc. Rev. Porc.* 180: 5-29.
- Schultz, R. A.; Mc Orist, S.; Shearm, M.** 1999. Titration of BMD/CTC combination for control of porcine proliferative enteropathy. *Proceedings Am Assoc of Swine Pract.* Quebec. Canada. pp: 109-111.
- 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. *Epidemiol. Infect.* 116: 207-216.

Sitjar, M. 2000. Enfermedades entéricas en porcinos. Información Veterinaria 2000. <http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/porcinos/enter/enfermedadesentericaspor.htm> [consulta: 14-04-2011].

Stanton, T.B.; Jensen, N.S.; Casey, T.A.; Tordoff, L.A.; Dewhirst, F.E.; Paster, B.J. 1991. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innocens* comb. nov. Int J. Syst. Bacteriol. 41(1): 50-58.

Talavera, A. 1989. Sensibilidad de cepas de *Treponema hyodysenteriae* a diferentes agentes antimicrobianos. Rvta Cub. Cienc. Vet. 20: 219-222.

Tasker, J.B.; Heard, T.W.; Williamson, C. 1981. Eradication of swine dysentery from closed pig herds. Vet. Rec. 108: 382.

Taylor, D.J.; Alexander, T.J. 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. Br. Vet. J. 127 (11): 58-61.

Taylor, D.J.; Simmons, J.R.; Laird, H.M. 1980. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. Brit. Vet. J. 106: 326-332.

Terpstra, J.I.; Akkermans, J.P.; Ouwerkerk, H. 1968. Investigations into the etiology of vibronic dysentery (Doyle) in pigs. Neth. J. Vet. Sci 1:5.

Tesouro, M. 1969. Spirochaetales micro-organisms: an agent possibly associated with swine dysentery. Vet. Res. 85: 562.

Thompson, J. 2001. Etiología y control de las enfermedades entéricas en porcino. Anaporc. Rev. Porc. 21 (210): 36-55.

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

Trott, D.J.; Stanton, T.B.; Jensen, N.S.; Duhamel, G.E.; Johnson, J.L.; Hampson, D.J. 1996. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (1): 206-215.

Trott, D.J.; Jensen, N.S.; Saint Girons, I.; Oxberry, S.; Stanton, T.B.; Lindquist, D.; Hampson, D.J. 1997. Identification and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients. J Clin Microbiol. 35 (2): 482-485.

Vaissaire, J.; Renault, L.; Maire, C.L.; Palisse, M.; Linder, Th. 1970. Contribution a l'etude del' enterite hemorragique du porc. Rec. Med. Vet. 145: 433-447.

Van Leengoed, L.A.M.G.; Smit, H.F.; Braand, A.; Frik, J.F. 1985. Swine dysentery in a sow herd. I. Clinical manifestation and elimination of the disease with a combination of Lincomycin and Spectomycin. Vet Quarterly. 7: 164-170.

Wannemuehler, J. M.; Ostle, A. G.; Nibbelink, S. K.; Coyle, D.C.; Welter, C.J. 1990. Pathogenesis of swine dysentery. Preparation of protective vaccine. Proc. I.P.V.S., 11th Congress, Switzerland. pp: 124.

Wood, E. N.; Lysons, R.J. 1988. Financial benefit from the eradication of swine dysentery. Vet. Rec. 122 (12): 277-279.