

DISENTERÍA PORCINA. ANÁLISIS DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST) DE BRACHYSPIRA SPP. Y EVALUACIÓN DE DOS PREPARADOS VACUNALES

Jesús Osorio Argüello*. 2011. Universoporcino.com.

*Licenciado en Veterinaria. Tesis Doctoral. Sobresaliente "Cum Laude". Universidad de León, España.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Enfermedades infecciosas de los porcinos](#)

Las espiroquetas del género *Brachyspira* son bacterias anaerobias que colonizan el intestino de aves y mamíferos, incluido el hombre. La especie más conocida y relevante de este género es *Brachyspira hyodysenteriae*, agente etiológico de la disentería porcina. Otras cinco especies más del género *Brachyspira* han sido capaces de colonizar el intestino del cerdo, incluyendo tanto especies patógenas como comensales. Desde que en 1971 se confirmara por primera vez la colonización del cerdo por espiroquetas intestinales, no han parado las investigaciones en este campo que se han llevado a cabo en Europa, Estados Unidos y Australia. Estos estudios nos han aportado un importante grado de conocimiento de aspectos clínicos, epidemiológicos y bacteriológicos, quedando aún muchas cosas por aprender de estas peculiares bacterias.

En España, Carvajal y colaboradores (2006) hemos detectado la participación de *B. hyodysenteriae* en un 34,1% de los brotes de diarrea en granjas porcinas distribuidas por todo el país, mientras que *B. pilosicoli* se detectó únicamente en el 2,9% de los brotes. Más recientemente, según Osorio y colaboradores (2010), las especies de espiroquetas intestinales apatógenas del cerdo más frecuentemente detectadas en nuestro país fueron *B. murdochii* y *B. innocens*.

En esta tesis se han identificado y caracterizado genéticamente aislados débilmente β -hemolíticos del género *Brachyspira* de origen porcino obtenidos en nuestro laboratorio desde 2001 a 2007 (Grupo de investigación de enfermedades digestivas del ganado porcino de la Facultad de Veterinaria de León). Los 18 aislados se obtuvieron de 14 explotaciones tanto de cerdo blanco como ibérico y pertenecieron a 6 Comunidades Autónomas y 9 provincias de nuestro país, excepto uno que procedió de una granja de Portugal.

Se ha podido comprobar que el método de MLST (del inglés "multilocus sequence typing" o análisis de secuencias multilocus) desarrollado por Råsbäck y colaboradores (2007) es eficaz para la detección, identificación y análisis de las diferentes especies del género *Brachyspira*. Los *loci* (plural de "locus" que en latín significa genes) empleados en este estudio han mostrado una excelente diversidad entre nuestros aislados. Los resultados mostraron que los aislados débilmente β -hemolíticos son genéticamente heterogéneos con numerosas variantes por *locus* a nivel nucleotídico y un número menor a nivel aminoacídico que determinaron un total de 17 perfiles alélicos diferentes (denominados ST del inglés "Sequence type" o también conocidos como genotipos multilocus) y 16 tipos aminoacídicos (AATs del inglés "amino acid types"). Se comprobó que la resolución taxonómica de esta técnica fue muy elevada.

Estos aislados débilmente β -hemolíticos fueron identificados como *B. murdochii*, *B. innocens* y *B. pilosicoli*. Además, un nuevo grupo genético formado por únicamente dos aislados procedentes de cerdo ibérico de la zona de Extremadura ha sido descrito. No obstante, para que estos aislados sean reconocidos como una nueva especie del género es necesario que sean incluidos en la lista de nuevas especies que regularmente publica la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* y, para ello, se necesita una caracterización mucho más exhaustiva. En este sentido, el análisis filogenético basado en varios genes tendrá mucho protagonismo, especialmente cuando se haga más factible en un futuro cercano. Esto unido a la información obtenida por el conocimiento de las secuencias completas de cuatro genomas de especies del género (*B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. Murdochii* y *B. intermedia*) hace prever que en los próximos años se producirán nuevos hallazgos dentro de este género.

Además, mediante el análisis BURST de los datos obtenidos mediante MLST pudimos detectar la existencia de relaciones evolutivas estrechas entre aislados débilmente β -hemolíticos de diferentes países, lo que a su vez corrobora la utilidad de la técnica de MLST como herramienta en estudios epidemiológicos.

Por otro lado, se ha aplicado por primera vez a aislados españoles de origen porcino el esquema de MLST recientemente descrito para el análisis de la epidemiología molecular y la estructura poblacional de *B. hyodysenteriae* (La y colaboradores, 2009). De este análisis se dedujo que la técnica fue excelente en la identificación de clones estables en el tiempo y que englobaron aislados procedentes de diferentes Comunidades Autónomas de todo el país. También se dio el caso de aislados que aún siendo obtenidos de la misma granja presentaron un perfil alélico diferente y se pudo poner de manifiesto la presencia de transmisión de aislados entre diferentes granjas porcinas. Para las secuencias analizadas, el porcentaje de sustituciones nucleotídicas de los aislados de *B. hyody-*

sentariae con respecto a los aislados débilmente β -hemolíticos osciló entre el 3,7% y el 11,0% dependiendo del locus, con una media del 6,6%.

Se comprobó que la población de 52 aislados de *B. hyodysenteriae* de cerdos de nuestro país en su mayoría blancos, que incluyó aislados de 47 granjas diferentes de 11 Comunidades Autónomas y de 21 provincias presentó una estructura clonal, con un alto grado de desequilibrio de ligamiento detectado en los genes analizados. Un resultado muy similar se obtuvo cuando se emplearon además de los aislados españoles otros 111 aislados procedentes de muy diferentes países. Todos los aislados quedaron incluidos en 10 STs diferentes y en 7 AATs. Ninguno de los genotipos presentó diferencias con las restantes en todos los loci y el porcentaje de sustituciones nucleotídicas detectadas entre las cepas españolas no fue mayor del 0,5%. Estos resultados dan consistencia a la hipótesis de un origen no muy diverso de las cepas españolas de *B. hyodysenteriae*, ya que parece lógico pensar que las cepas pertenecientes a los genotipos multilocus de este estudio no divergieron hace mucho tiempo.

Se ha descrito la presencia de dos clones internacionales en granjas de nuestro país. Uno había sido previamente descrito en el Reino Unido en diferentes granjas porcinas y asociado con resistencia a la tiamulina, antibiótico de uso frecuente para el tratamiento de la DP. El otro, había sido descrito en granjas de Alemania y de Bélgica. El primero de ellos ha resultado ser el genotipo que ha conseguido un mayor éxito en la colonización de cerdos en nuestro país ya que incluyó al 41,2% del total de los aislados españoles. Todos los aislados españoles quedaron englobados en 3 clusters cuando se representó en el mismo diagrama las relaciones genéticas entre aislados de todo el mundo.

Dado que la técnica de MLST resulta apropiada para la epidemiología a largo plazo y que los datos son fácilmente intercambiables entre laboratorios vía Internet, pudimos comparar aislados de localizaciones geográficas muy diferentes así como muy separados en el tiempo a la vez que identificar las cepas que son miembros de un mismo linaje clonal globalmente distribuido. Estos clones descritos han presentado una diseminación internacional y su aparición en España demuestra la expansión global de algunas cepas de *B. hyodysenteriae*. Dichos aislados podría haber llegado a nuestro país y esos genotipos habría encontrado las condiciones ambientales propicias para su diseminación dado que en los últimos años se ha empleado rutinariamente tiamulina principalmente para el tratamiento y profilaxis de infecciones respiratorias en muchas granjas y también para el tratamiento de la DP.

El análisis basado en los AATs demostró un mayor agrupamiento que en el caso de las ST y se obtuvo información de la descendencia evolutiva de los aislados dentro de un complejo clonal, lo cual evidencia la presión negativa de selección en los cambios nucleotídicos que resultan en cambios en la secuencia aminoacídica. Se concluyó que el ancestro genético de los aislados de *B. hyodysenteriae* estudiados podría estar representado por alguna de las cepas de 7 países diferentes que fueron englobadas en el AAT9. Teóricamente, de este ancestro habrían surgido en la evolución de la especie los restantes tipos genéticos. En este fenotipo fundador se incluyeron 8 aislados españoles todos procedentes de cerdo blanco menos uno de origen desconocido.

Un total de 21 cerdos distribuidos aleatoriamente en 3 grupos fueron empleados para la valoración de la eficacia protectora de dos proteínas de membrana externa de *B. hyodysenteriae*, SmpA y BmpB. Se empleó la vía intramuscular para la primera inmunización y la vía oral para la revacunación. El desafío se llevó a cabo con la cepa de referencia B204 del serotipo 2 (ATCC 31212), la misma empleada para la obtención de las proteínas. Todos los cerdos del grupo control y la mayoría de los inmunizados con la proteína SmpA padecieron la enfermedad mientras que se observó una disminución de los animales afectados entre los inmunizados con la proteína BmpB, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas. Además el período de incubación se vio claramente aumentado en este último grupo con respecto a los otros dos, con diferencias en este caso significativas.

En virtud de estos resultados preliminares, la proteína SmpA no parece ser un buen candidato para ser incluida en estudios de seguridad y eficacia definitivos, mientras que la BmpB confirmó un cierto grado de protección. No obstante, cabe destacar que sólo una de las inmunizaciones se llevó a cabo vía oral que es la vía más adecuada para conferir al animal inmunidad de mucosas. Además, no se empleó adyuvante para la administración oral aunque si se observó seroconversión en los animales tras la administración. Parece interesante investigar más componentes de la bacteria que puedan ser empleados en el desarrollo de una vacuna inactivada acelular así como adyuvantes de mucosas que sean capaces de estimular el tejido linfóide asociado al intestino.

Hemos incluido en el trabajo de tesis una amplia revisión bibliográfica que incluye aspectos como las características morfológicas y biológicas de las espiroquetas, la historia del género *Brachyspira* e información de cada una de las once especies del género (cuatro de ellas aún no aceptadas: *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, “*B. canis*”, “*B. pulli*”, “*B. suanatina*” y “*B. corvi*”). La información mostrada pretende poner de manifiesto la capacidad que han mostrado las diferentes especies de *Brachyspira* para colonizar un amplio rango de hospedadores y resalta las similitudes en cuanto a morfología y a capacidad para producir enfermedad en dichos hospedadores. También se detallan las numerosas técnicas que se han desarrollado y usado para el diagnóstico y caracterización de las espiroquetas intestinales. Se hizo referencia a la historia del cultivo *in vitro*, a los métodos tradicionales de identificación y caracterización y, por último, a los métodos moleculares de diagnóstico y tipificación.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de una colección de aislados porcinos del género *Brachyspira* seleccionados de granjas de diferentes localizaciones geográficas de nuestro país y, también, en la evaluación de la eficacia de dos preparados vacunales para proteger al cerdo frente a la disentería porcina. Con ello, esperamos aportar nuestro grano de arena al conocimiento del complejo mundo de las espiroquetas intestinales del cerdo.

Esta tesis fue llevada a cabo en el grupo de investigación de enfermedades digestivas del cerdo de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, al que yo pertenecí. No obstante, no hubiese sido posible su realización sin sendas colaboraciones con la Universidad de Murdoch (Perth, Australia) y con Laboratorios INGENASA, S.A. (Madrid, España).

Volver a: [Enfermedades infecciosas de los porcinos](#)