

porci
FORUM



Características a considerar de la disentería porcina

Roberto Guedes

*Universidade Federal de Minas Gerais
(Brasil).*

Ponencia
patrocinada por:



s.p.[®] veterinaria



Roberto Guedes

Actualmente es profesor asociado en la Universidad Federal de Minas Gerais y tesorero de la Asociación de veterinarios especializados en porcino de Brasil, regional de Minas Gerais.

Tiene experiencia en patología y enfermedades infecciosas porcinas.



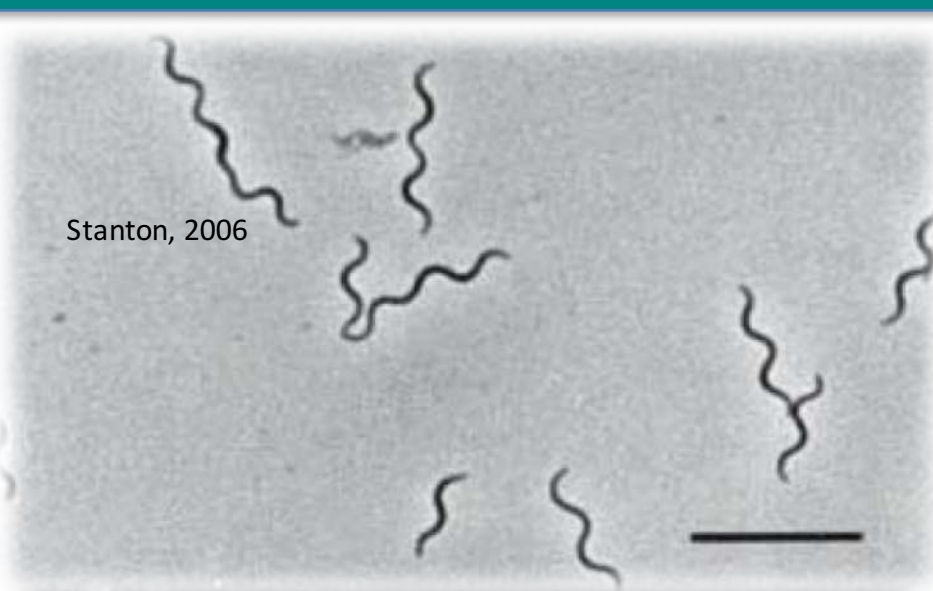
Características a considerar de la disentería porcina

Roberto M.C. Guedes
guedesufmg@gmail.com

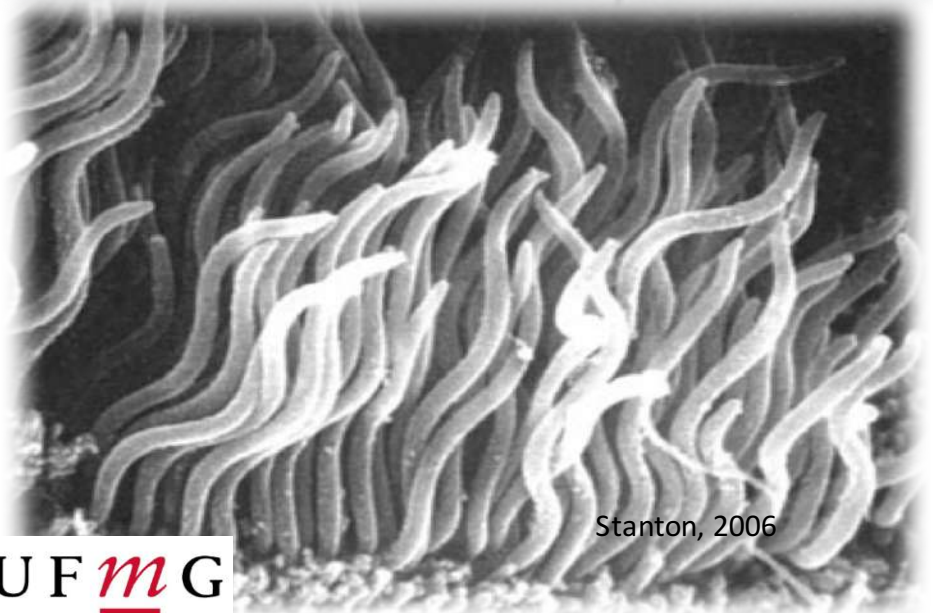




Brachyspiras



Stanton, 2006



Stanton, 2006





Disentería Porcina



Agente etiológico:

- *Brachyspira hyodysenteriae*,
- *B. suanatina* (Rasback et al, 2007),
- *B. hampsonii* grupos I, II y III (Mirakjar et al, 2016).

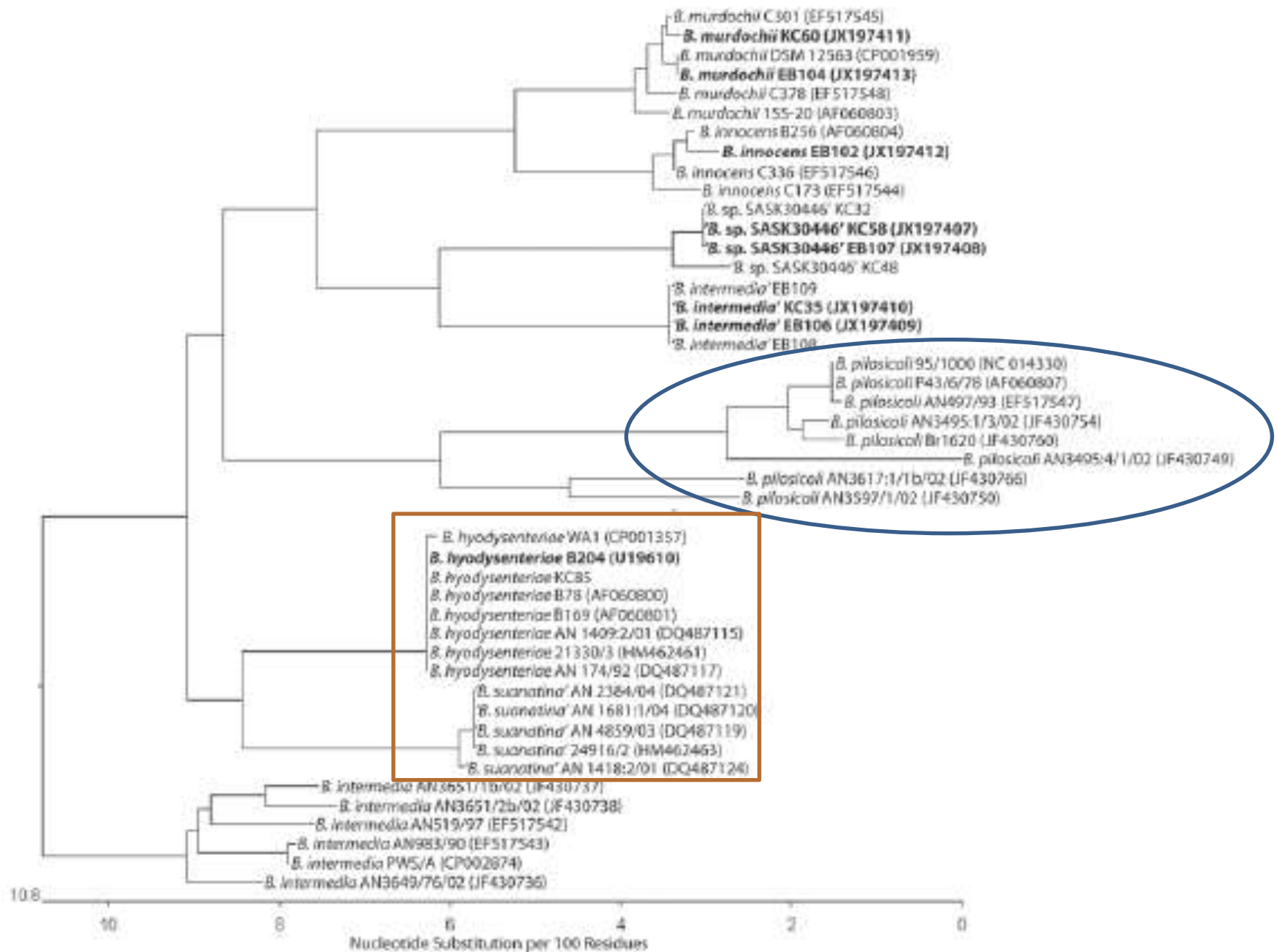


Espiroqueta Gram negativa, anaerobia, oxígeno tolerante (gene NOX), móvil (flagelada).
Produce **fuerte hemólisis** en agar sangre.



Clasificación fenotípica de espiroquetas

Grupo	Espécies	Hemólisis	Indol	Hippurato	Alpha gal	Alpha glu	Beta glu
I	<i>B. hyodysenteriae</i>	Fuerte	+	-	-	+	+
	<i>B. suanatina</i>						
I/II (?)	<i>B. hampsonii</i> <i>genomovars I, II, III</i>	Fuerte	-	-	-	-	+(-)
II	<i>B. intermedia</i> *	Débil	+	-	-	+	+
IIIa	<i>B. murdochii</i>	Débil	-	-	-	-	+
IIIb	<i>B. innocens</i>	Débil	-	-	-	-	+
IIIc	<i>B. innocens</i>	Débil	-	-	+	+	+
IV	<i>B. pilosicoli</i>	Débil	-	+	+	-	-





Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates

Epidemiol. Infect. (2010), **138**, 76–85. © Cambridge University Press 2009
doi:10.1017/S0950268809002817 Printed in the United Kingdom

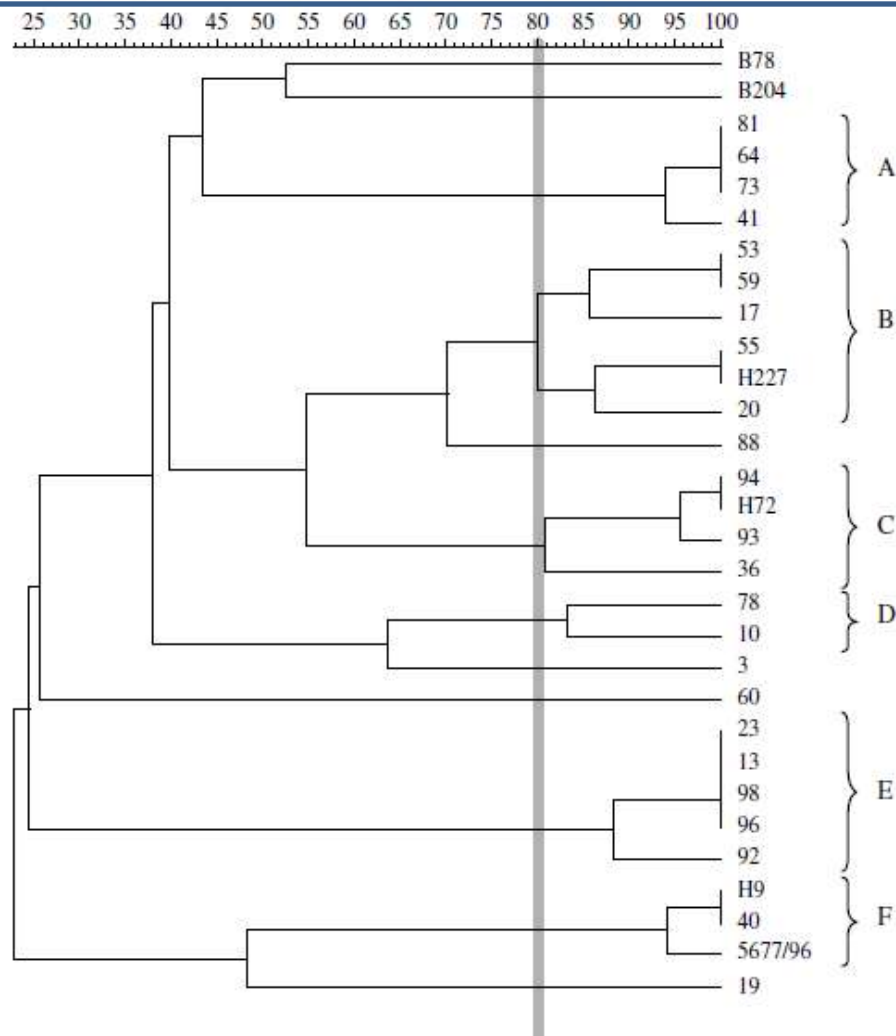


Fig. 2. Dendrogram based on PFGE patterns for *Mlu*I clustered by UPGMA strategy and depicting genetic similarity for 31 *B. hyodysenteriae* isolates, including 28 Spanish field isolates, the reference and type strains of *B. hyodysenteriae* (B204 and B78^T), and one German indole-negative isolate (5677/96). An 80% cut-off value (thick vertical grey line) has been used for establishing groups of related isolates (A–F).



Disentería Porcina Epidemiología



Las pérdidas económicas están relacionadas con la mortalidad, conversión alimenticia y tratamientos.

La Morbilidad en los animales en crecimiento y finalización alcanza el 90% y mortalidad de 30%.

La erradicación es la única solución

Polson et al, 1992



Disentería Porcina

Epidemiología



La enfermedad generalmente afecta a los cerdos entre 15-70 kg, pero puede afectar a las hembras lactantes o lechones.

Supervivencia en medio ambiente:

112 días en las heces porcinas

78 días en el suelo con las heces porcinas 10%

10 días en el suelo a 10°C

48 días en agua entre 0-10°C, 7 días a 25°C y 1 día a 37°C

NOTA ... Muerte rápida en las heces duras.

El hipoclorito de sodio y fenólicos son los desinfectantes más eficaces.



Disentería Porcina

Epidemiología



Transmisión fecal-oral:

1. Los cerdos (los animales de reemplazo o lechones de engorde) - eliminan las bacterias hasta 70 días después de la desaparición de los síntomas.
2. Vectores mecánicos (camiones, botas, ropa, personas, moscas (4 horas), aves ...)
3. Los ratones eliminan durante 180 días (Joens, 1980) y ratas durante 2 días (Chia, 1977)
4. Perros (8 días), gatos, aves (24 horas), emúes, pollos, patos, gansos

El período de incubación:

- 2 días a 3 meses (días 10-14). Ha recurrencia de la enfermedad.
- Eliminación de bacterias en las heces de 1 a 4 días antes de la aparición de los signos clínicos.



Disentería Porcina Epidemiología



Bioseguridad:

- Fuente segura de animales de reemplazo o lechones de engorde
- Cuarentena de 40 a 60 días fuera del recinto de la unidad y personal específico. Observación de los animales.
- El uso de camiones limpios y desinfectados
- Vallas perimetrales para evitar la entrada de personas, perros, gatos y aves de corral
- Cambiarse de ropa y botas (ideal es asociar con el baño)
- Registro de visitas anteriores, con fecha y lugar de la última visita en granja porcina
- El control eficaz y continuo de roedores
- Corrales y galpones con protección contra pájaros
- El control de moscas

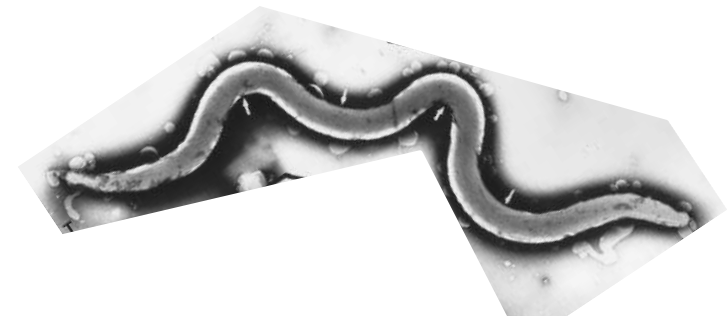


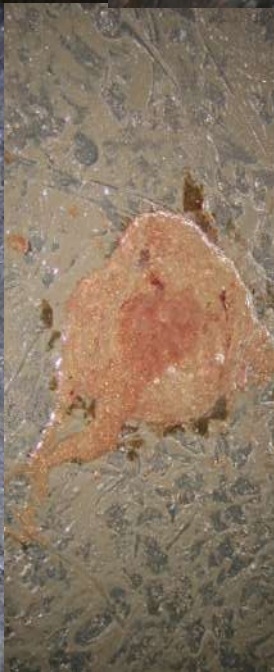
Disentería Porcina

Patogénesis

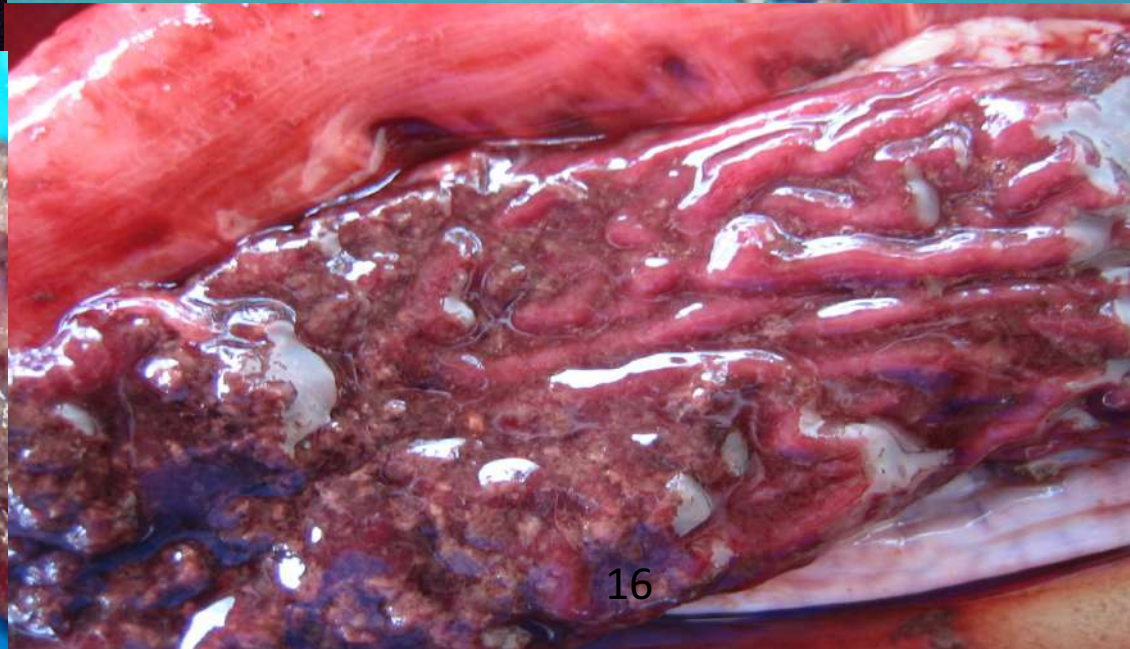
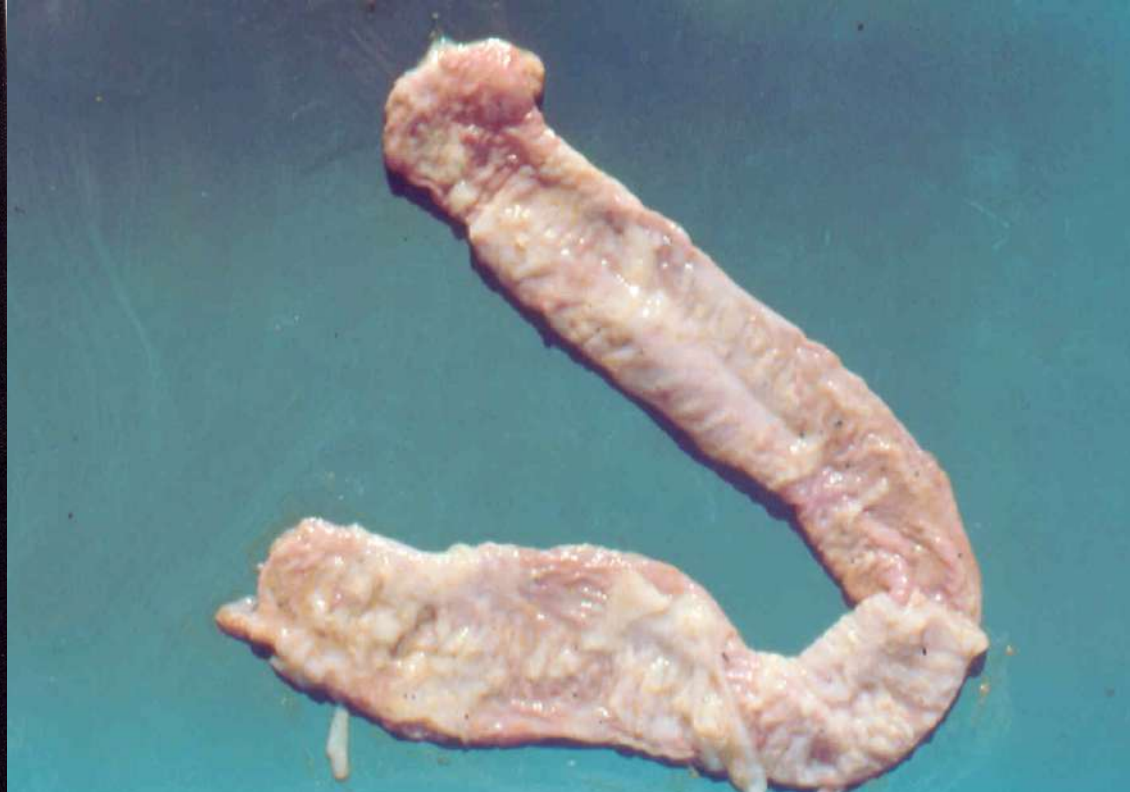


- Las bacterias tiene tropismo por las células caliciformes.
- El mecanismo de destrucción del tejido no se ha aclarado completamente, pero dos toxinas parecen jugar un papel importante (hemolisina y lipooligosacaridase)
- La bacteria no invade más allá de la lámina propia.
- La diarrea es causada por un fallo en la absorción de líquidos y aumento de la permeabilidad.











Disentería Porcina

Diagnóstico



Diagnóstico clínico:

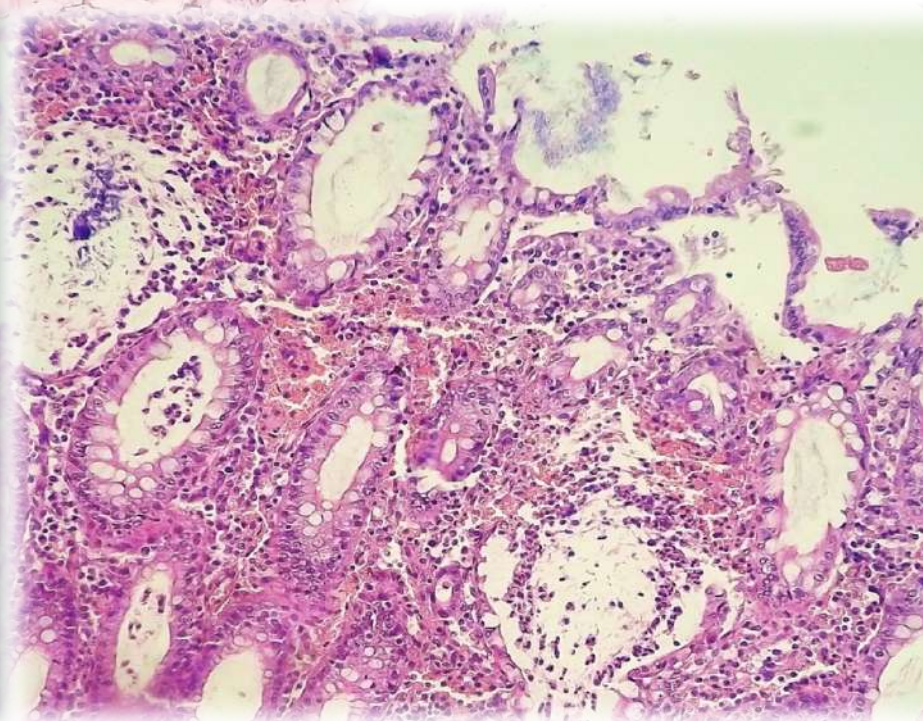
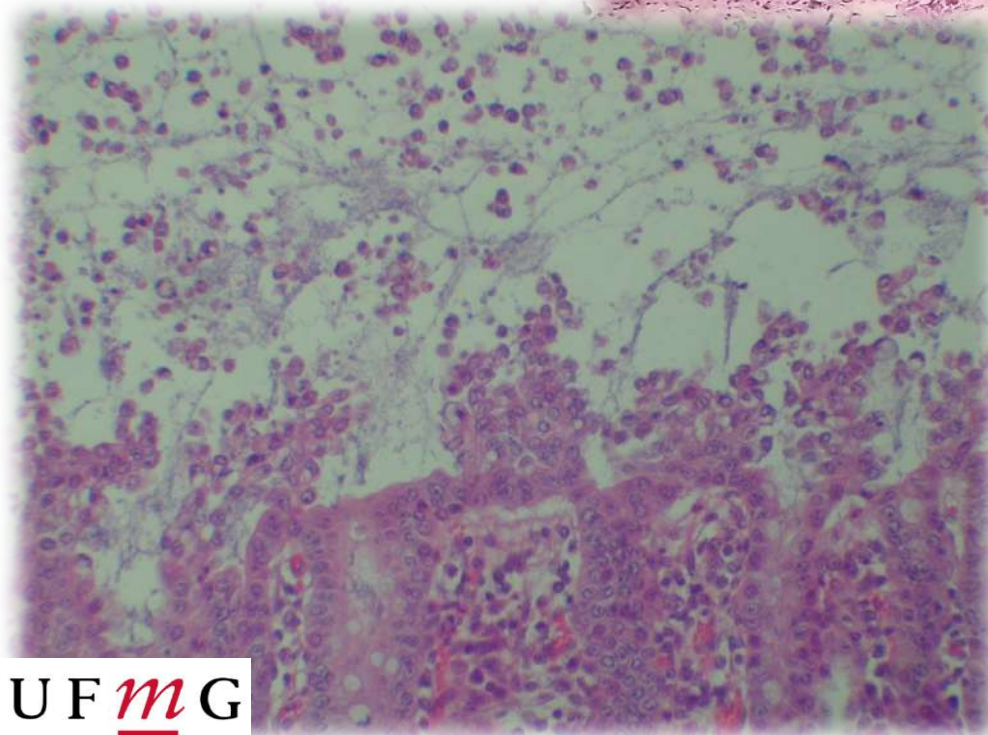
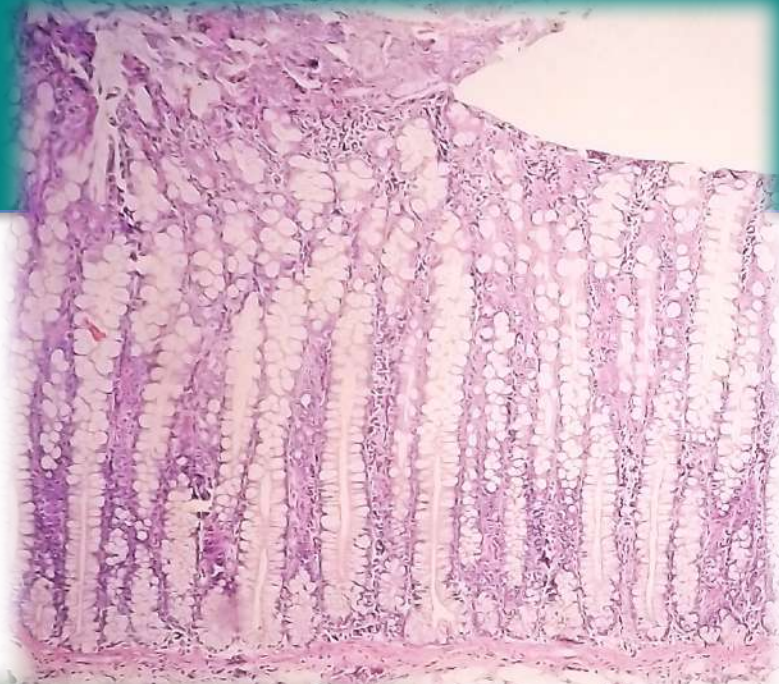
Presentación clínica

Tipo y distribución de las lesiones

Confirmación definitiva de laboratorio:

- 1) Lesiones histológicas indicativas - erosión, infiltración neutrofílica intensa, hiperplasia de células caliciformes
- 2) Identificación de espiroquetas en lesiones mediante tinción de hematoxilina y eosina, plata o por inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales, FISH
- 3) Aislamiento de espiroquetas que causan fuerte hemólisis (fenómeno anillo positivo)
- 4) Identificación molecular de espiroquetas por nox-PCR, nox-PCR / RFLP, MLST, PFGE, 16S y lo gene Nox

NOTA ... concentración mínima inhibitoria (MIC)





Disentería Porcina

Diagnóstico



Diagnóstico clínico:

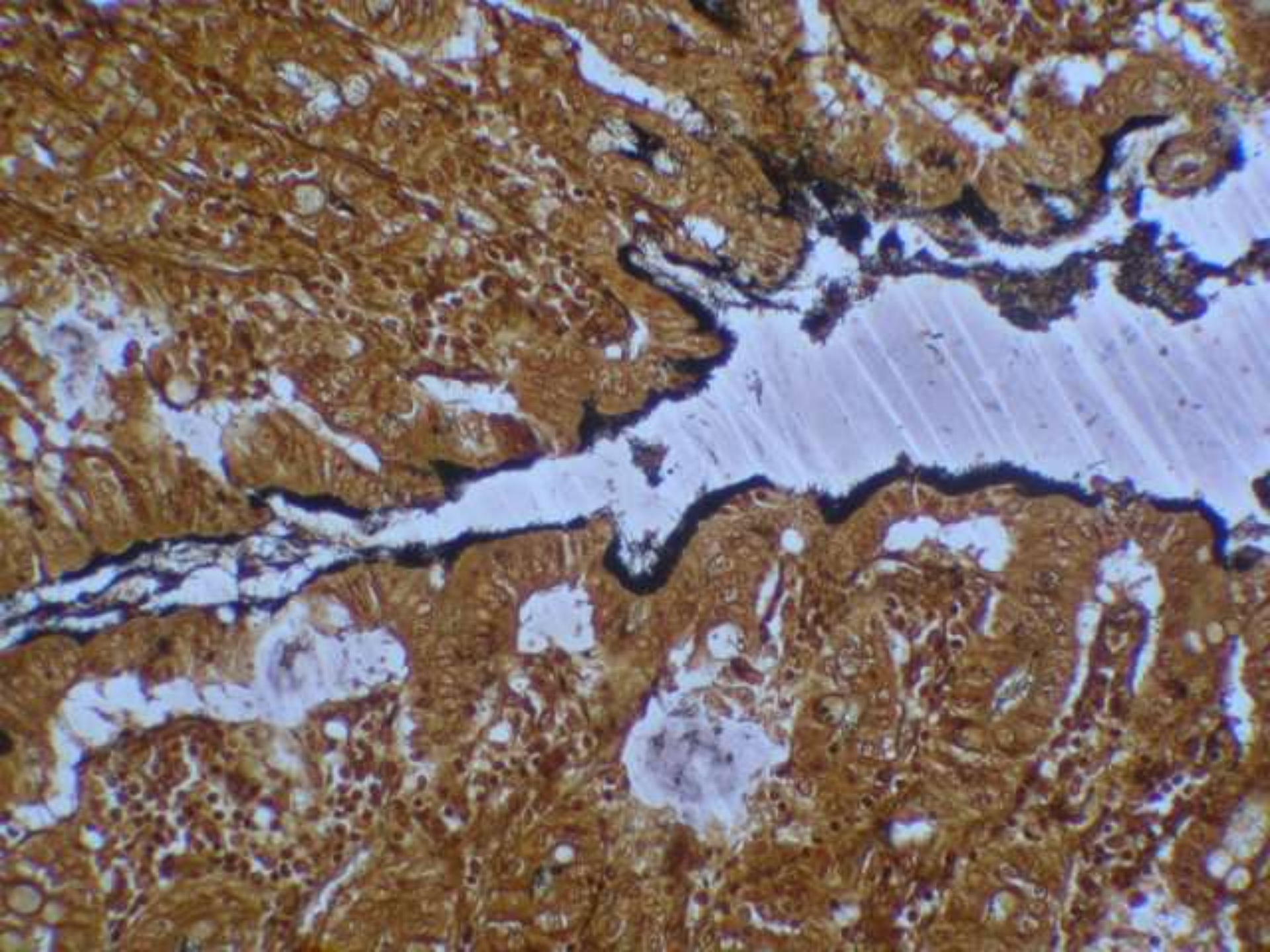
Presentación clínica

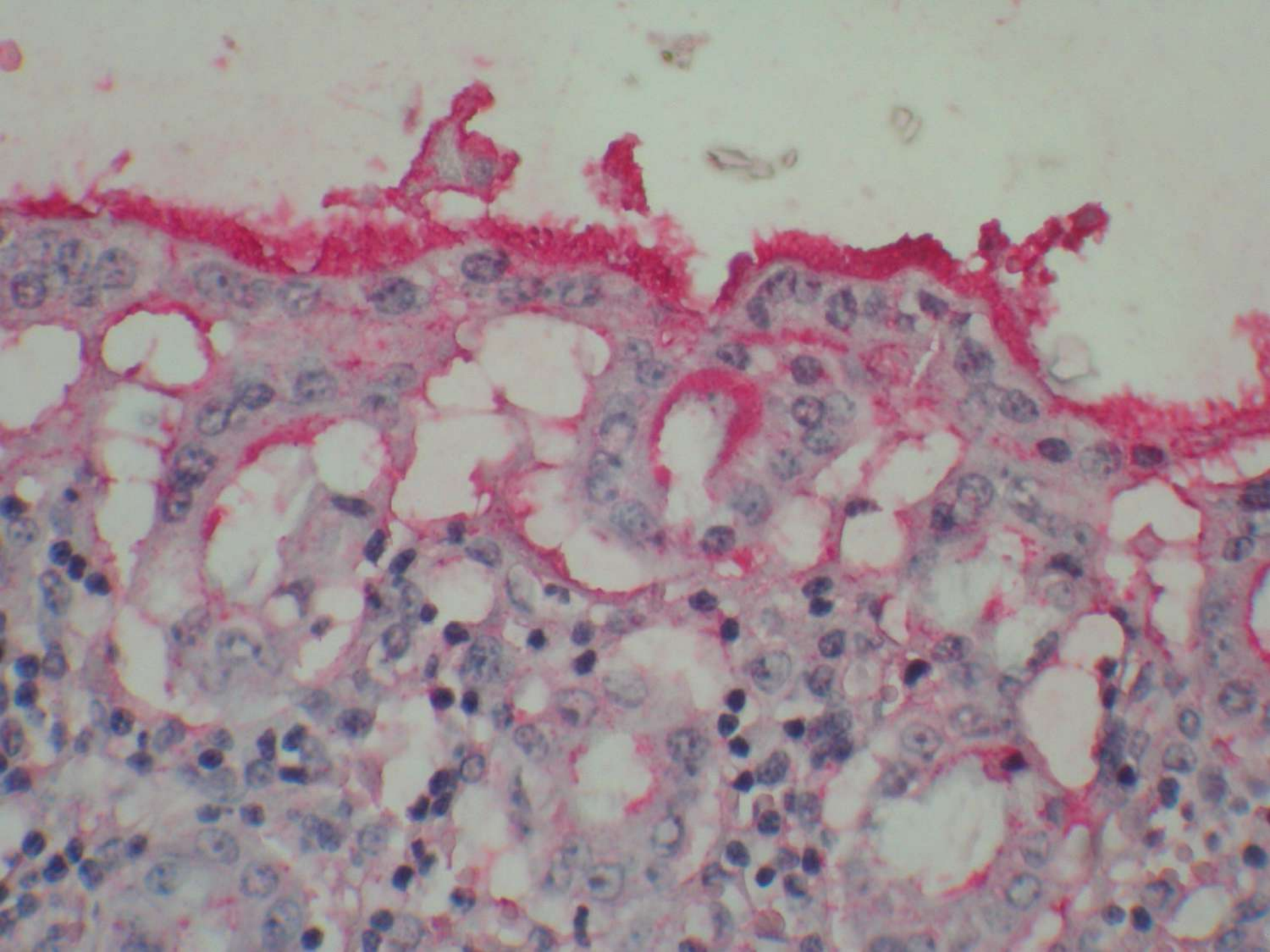
Tipo y distribución de las lesiones

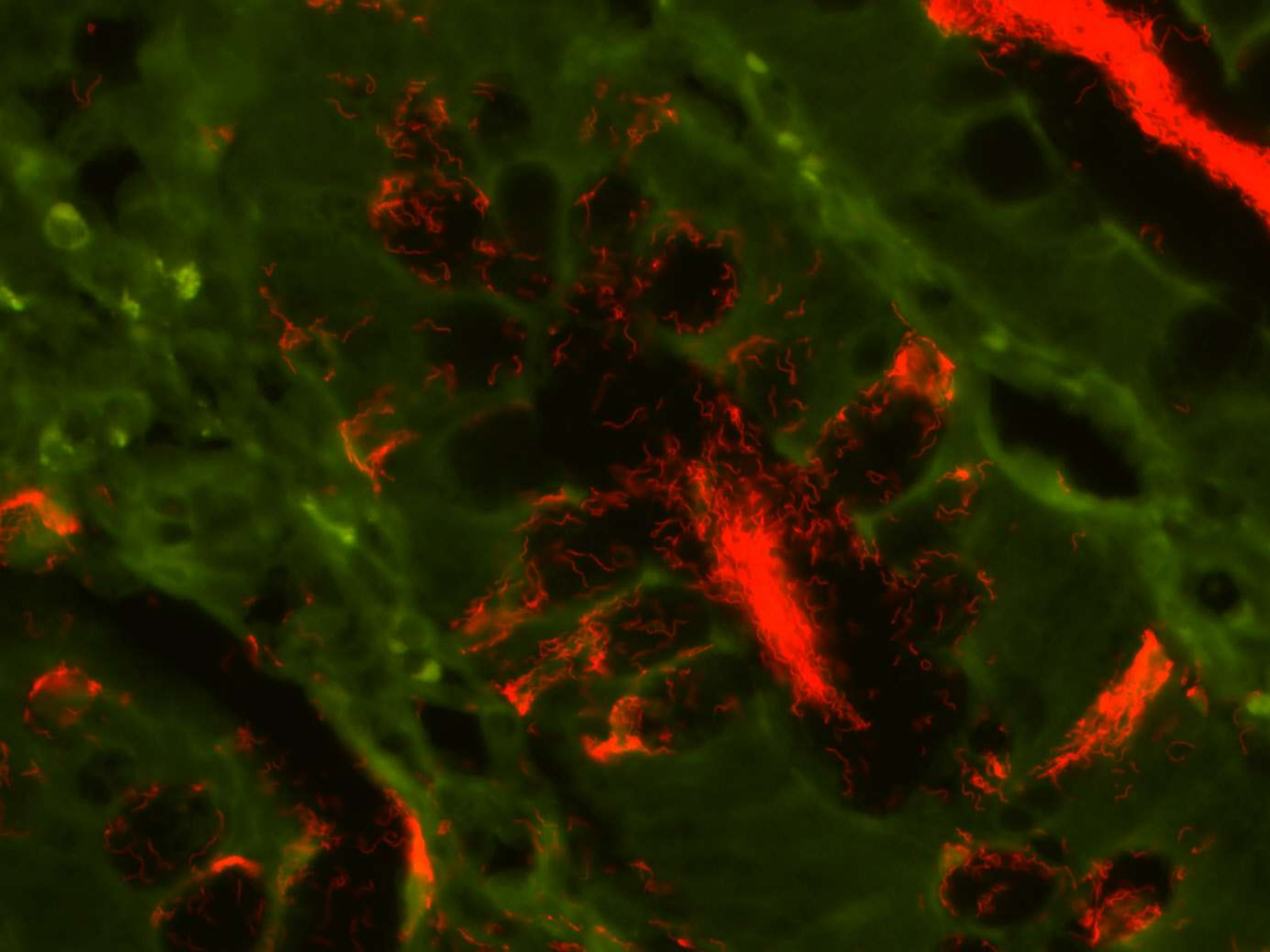
Confirmación definitiva de laboratorio:

- 1) Lesiones histológicas indicativas - erosión, infiltración neutrofílica intensa, hiperplasia de células caliciformes
- 2) **Identificación de espiroquetas en lesiones mediante tinción de hematoxilina y eosina, plata o por inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales, FISH**
- 3) Aislamiento de espiroquetas que causan fuerte hemólisis (fenómeno anillo positivo)
- 4) Identificación molecular de espiroquetas por nox-PCR, nox-PCR / RFLP, MLST, PFGE, 16S y lo gene Nox

NOTA ... concentración mínima inhibitoria (MIC)









Disentería Porcina

Diagnóstico



Diagnóstico clínico:

Presentación clínica

Tipo y distribución de las lesiones

Confirmación definitiva de laboratorio:

- 1) Lesiones histológicas indicativas - erosión, infiltración neutrofílica intensa, hiperplasia de células caliciformes
- 2) Identificación de espiroquetas en lesiones mediante tinción de hematoxilina y eosina, plata o por inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales, FISH
- 3) **Aislamiento de espiroquetas que causan fuerte hemólisis (fenómeno anillo positivo)**
- 4) Identificación molecular de espiroquetas por nox-PCR, nox-PCR / RFLP, MLST, PFGE, 16S y lo gene Nox

NOTA ... concentración mínima inhibitoria (MIC)



Aislamiento de espiroquetas



Anaerobiosis (Gaspak ou 10/10/80 – 37/42°C)

Medios selectivos:

**TSYF (TSA/Yeast extract/agarerode +
Rinfampicina/spectinomicina/vancomicina/colistina)**

CVS + colistina/vancomicina/spectinomicina

BJ + extracto de heces de
cerdo/spiramicina/rinfampicina/vancomicina/colistina/
spectinomicina.

Propagación:

Aislamiento en agar anaeróbico

Agar sangre

Antibiograma y MIC





Disentería Porcina

Diagnóstico



Diagnóstico clínico:

Presentación clínica

Tipo y distribución de las lesiones

Confirmación definitiva de laboratorio:

- 1) Lesiones histológicas indicativas - erosión, infiltración neutrofílica intensa, hiperplasia de células caliciformes
- 2) Identificación de espiroquetas en lesiones mediante tinción de hematoxilina y eosina, plata o por inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales, FISH
- 3) Aislamiento de espiroquetas que causan fuerte hemólisis (fenómeno anillo positivo)
- 4) Identificación molecular de espiroquetas por nox-PCR, nox-PCR / RFLP, MLST, PFGE, 16S y lo gene Nox

NOTA ... concentración mínima inhibitoria (MIC)



Confirmación definitiva de laboratorio:

- Identificación molecular de espiroquetas:

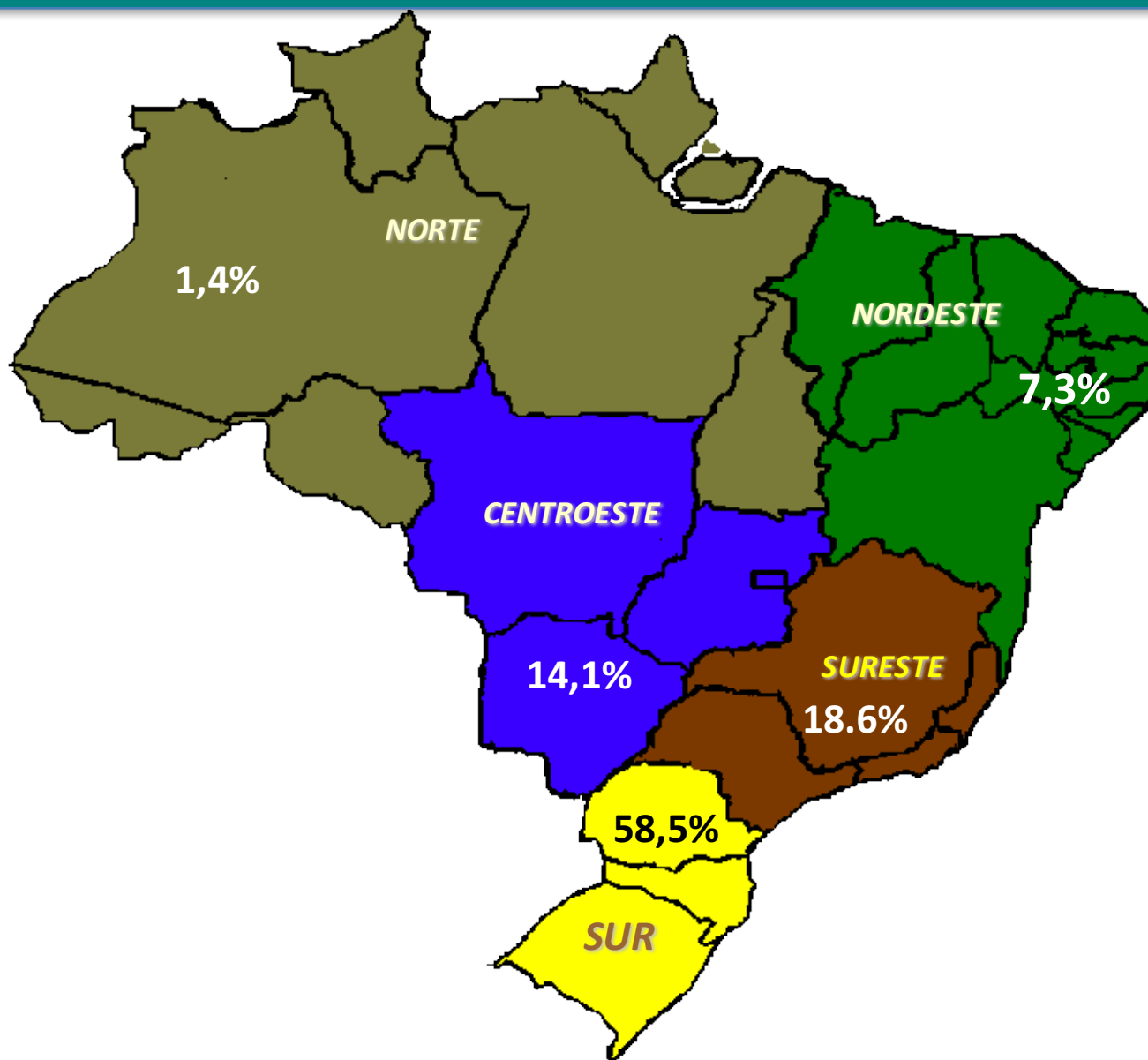
- . PCR – NADH oxidase (nox) gene – Atyeo et al, 1999 (Australia – D. Hampson)
- . Dualplex-PCR (*B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*) – La et al, 2003 (Australia – D. Hampson)
- . Multiplex-PCR (*B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *L. intracellularis*) – La et al, 2006.

Tipificación

- . Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) – Ateyo et al, 1996, 1999; Fellstrom et al, 2008
- . NADH oxidase gene (nox) sequence – Atyeo et al, 1999 (Australia)
- . Nox-PCR/RFLP – Rohde et al, 2002 (Hannover, Germany)
- . Multilocus sequence typing (MLST) – Rasback et al, 2007
- . Variable number of tandem repeats (VNTR)
- . Whole genome sequence

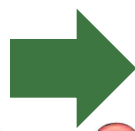


Distribución de la producción porcina en Brasil





Historia de la disentería porcina en Brasil



Décadas de 1980 y 1990

- Barcellos, 1978, Mores & Sobestiansky, 1984; Warth, 1985;
- Barcellos *et al.*, 1995; Baccaro *et al.*, 1999





Historia de la disentería porcina en Brasil



Décadas de 1980 y 1990

Barcellos, 1978, Mores & Sobestiansky, 1984; Warth, 1985;
Barcellos *et al.*, 1995; Baccaro *et al.*, 1999



2000 – 2009:

- Barcellos *et al.*, 2000, 2002, 2003 – 35,3%;
- Baccaro *et al.*, 2003 – 1,4%;
- Menin *et al.*, 2008 – 6,0%;
- Viott *et al.*, 2009 – 2+ (*B. pilosicoli*).



Historia de la disentería porcina en Brasil



2010 →

- ***Nuevos brotes***

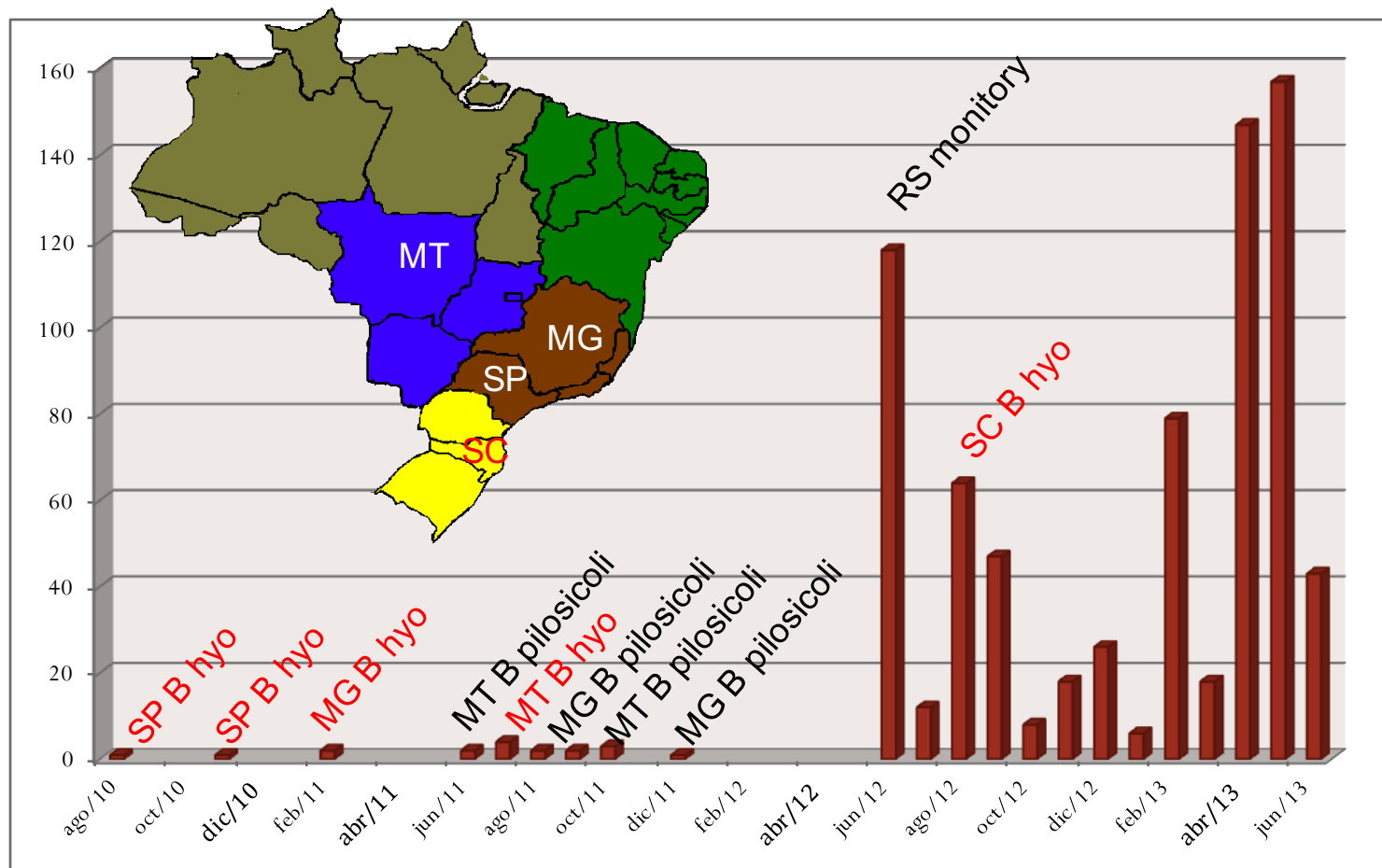
- ***2010 – Julio 2012***

- ***Agosto, 2012***
Granja multiplicadora

Daniel *et al.*, 2013a; Daniel *et al.*, 2013b; Guedes & Daniel, 2013



Casos sospechosos de disentería porcina enviados para diagnóstico – Laboratorio de diagnóstico de la UFMG



Sensibilidad antimicrobiana



**Brotes de DP
desde 2010**



55 aislados de *B. hyodysenteriae*

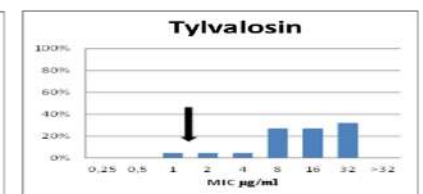
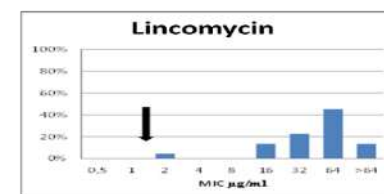
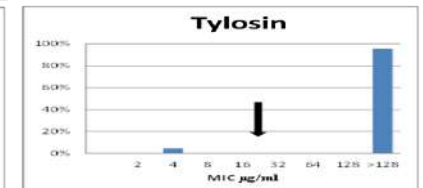
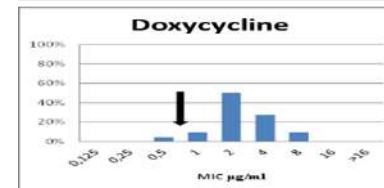
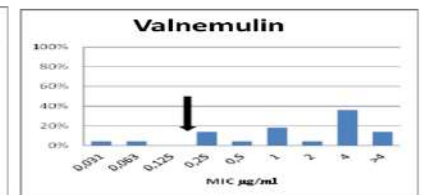
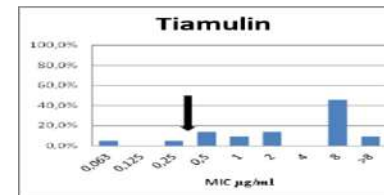


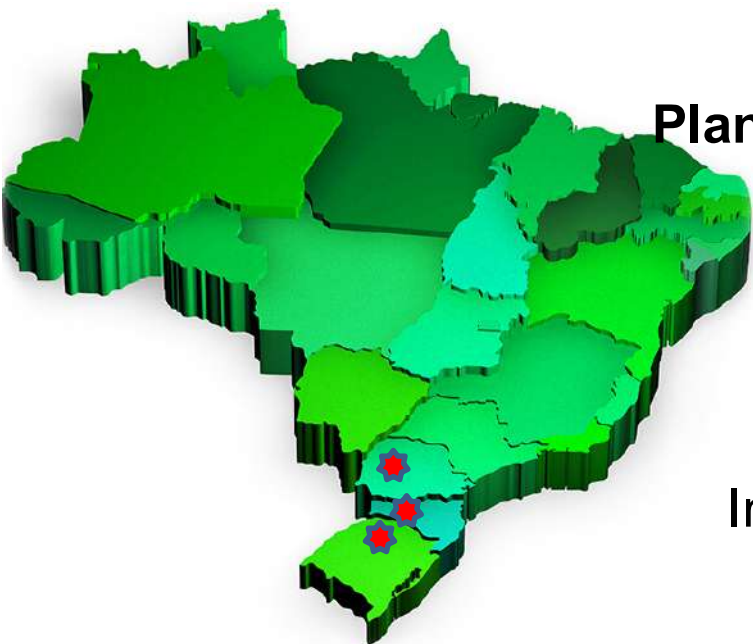
Perfil de MIC



Daniel et al, 2014

Moléculas	Min-Max µg/ml	MIC 50	MIC 90
Tiamulina	0.063->8	8	8
Valnemulina	0.031->4	2	>4
Doxiciclina	1-8	2	8
Tilvalosina	1-32	16	32
Lincomicina	2->64	64	>64
Tilosina	4->128	>128	>128





Planos de contingencia en granjas contaminadas



Implementación de programas de erradicación



Despoblación parcial con medicación

Investigaciones actuales



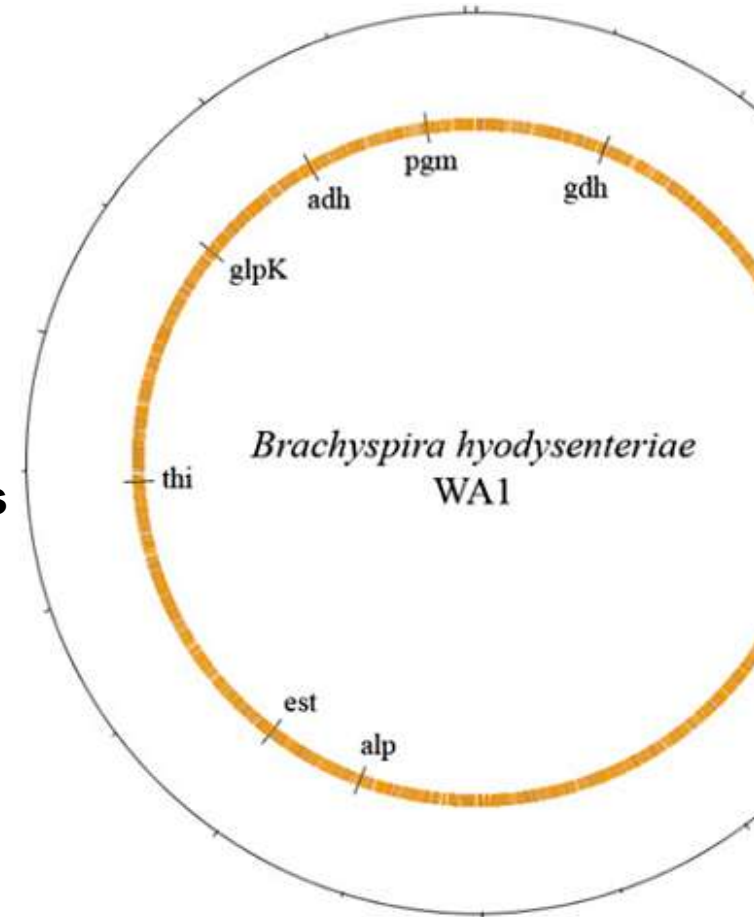
DIVERSIDAD GENETICA, EPIDEMIOLOGÍA Y PERFIL FILOGENETICO



Brotes en 1990s y desde 2010 hasta 2015



Multilocus sequence typing (MLST) analysis





Distribución de aislados de *Brachyspira hyodysenteriae* obtenida

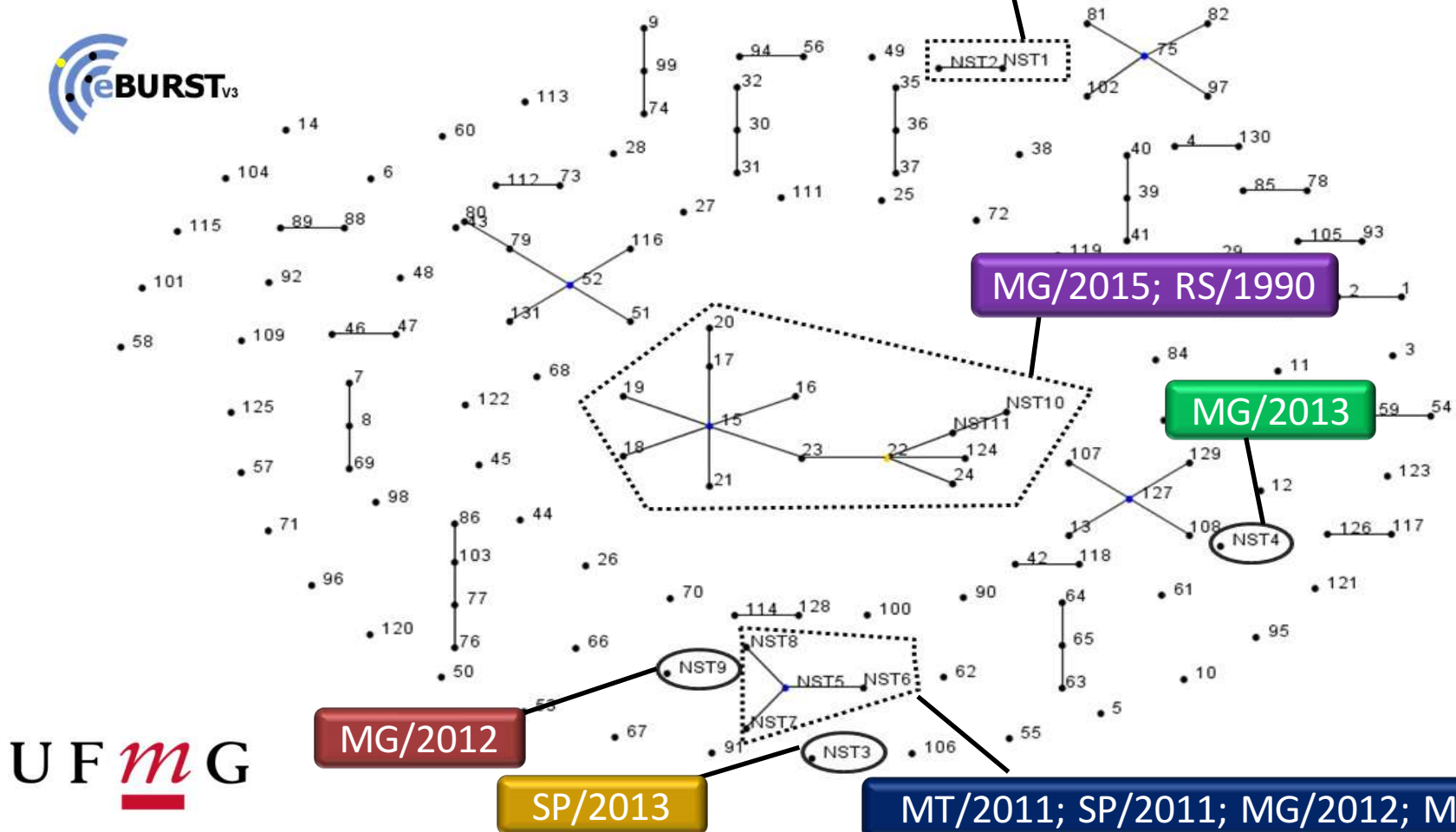


Estados	Número de granjas	Número de aislados	Porcentaje de muestras
SC	7	10	22,73%
SP	2	6	13,64%
MT	1	1	2,27%
MG	5	26	59,09%
RS	1	1	2,27%
Total	16	44	100%

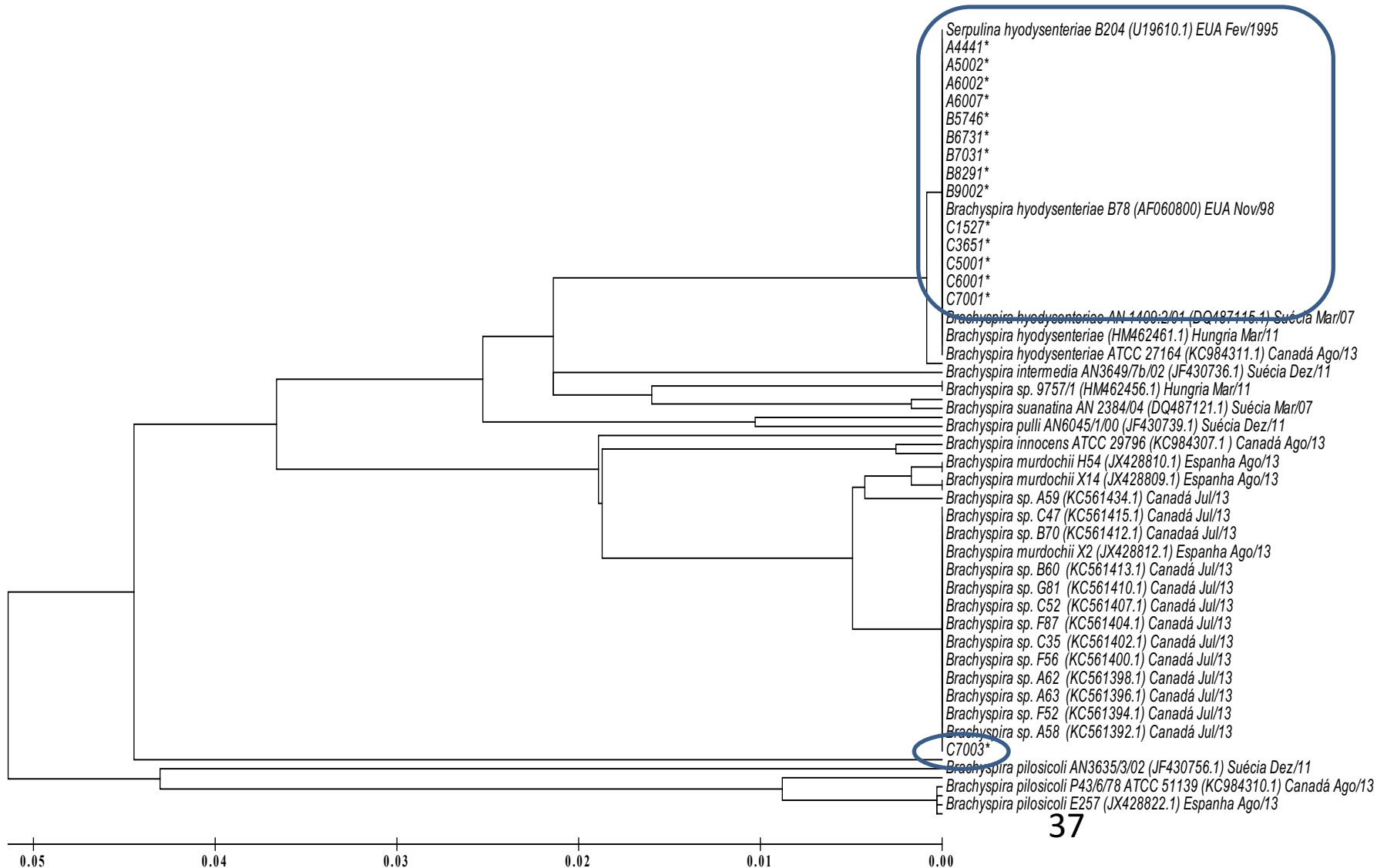
Investigaciones actuales

Clusters

Resultados preliminares



Árbol filogenético de 30 muestras brasileñas basado en la secuencia del gen Nox



Development of an Experimental Model Allowing Discrimination Between Virulent and Avirulent Isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*

Can J Vet Res 1996; 60: 45-49

M. Achacha, S. Messier, and K.R. Mittal

ABSTRACT

Variation in virulence among different strains of *Serpulina hyodysenteriae* was studied by oral inoculation of specific pathogen free piglets and CD-1 mice. Piglets infected with serotype 2 reference strain B204 and an untypable field strain LHV-90-9-1 had severe diarrhea tainted intermittently with mucus and fresh blood. The piglets inoculated with B169, B8044, B6933, and ACK300-8 reference strains representing serotypes 3, 5, 6, and 7 respectively developed moderate diarrhea. However, reference strains B234 and A-1 of serotypes 1 and 4, respectively, failed to cause any diarrhea. None of the *S. hyodysenteriae* strains caused diarrhea in mice. The results indicate a great variation in virulence among strains of different serotypes of *S. hyodysenteriae*. Mice were less susceptible to infection with *S. hyodysenteriae*.

B8044, B6933, et ACK300-8 représentant respectivement les sérotypes 3, 5, 6, et 7. Par contre, les souches de référence B234 et A-1, représentant respectivement les sérotypes 1 et 4, n'ont pas induit de diarrhée chez les porcelets. Aucune des souches de *S. hyodysenteriae* n'a causé de diarrhée chez les souris. Les résultats démontrent qu'une grande variation existe dans la virulence des souches des différents sérotypes de *S. hyodysenteriae*. De plus, les souris étaient moins susceptibles que les porcs à l'infection par *S. hyodysenteriae*.

(Traduit par docteur Serge Messier)

INTRODUCTION

Serpulina hyodysenteriae is recognized as the causative agent of swine dysentery, a mucohemorrhagic enteritis confined to the large intestine (10). The enteropathogenicity of *S. hyodysenteriae* has been demonstrated by

of *S. hyodysenteriae* (16,28), but inconsistency of the disease in the mouse model often makes interpretation of results difficult. It is not known whether strains belonging to different serotypes are equally virulent. The present studies were designed to find out if there are variations in virulence among strains of *S. hyodysenteriae* in pigs and mice.

MATERIALS AND METHODS

BACTERIAL STRAINS

Serpulina hyodysenteriae reference strains serotype 1 (B234), 2 (B204), 3 (B169), 4 (A-1), 5 (B8044), 6 (B6933), and 7 (ACK300/8), were provided by Lynn Joens (University of Arizona) and an untypable local field strain (LHV 90-9-1) was isolated from a natural case of swine dysentery. All strains were subcultured on blood agar plates, collected and stored at -70°C, as described by Joens et al

Pathogenicity of a Brazilian atypical *Brachyspira hyodysenteriae* isolate

▪ STUDY DESIGN

Forty-eight 5-week-old crossbred pigs

Negative control

Virulent Strain

Atypical Strain

▪ STUDY TIMELINE

Inoculation:

Virulent and Atypical Strain: 50ml of culture broth containing 10^8 *B. hyodysenteriae* / ml on three successive days. Both were beta-hemolytic.

Negative control: only culture broth



Monitored daily for the presence of mucohaemorrhagic diarrhea



Eighteen days post-inoculation: all pigs were euthanized and necropsied

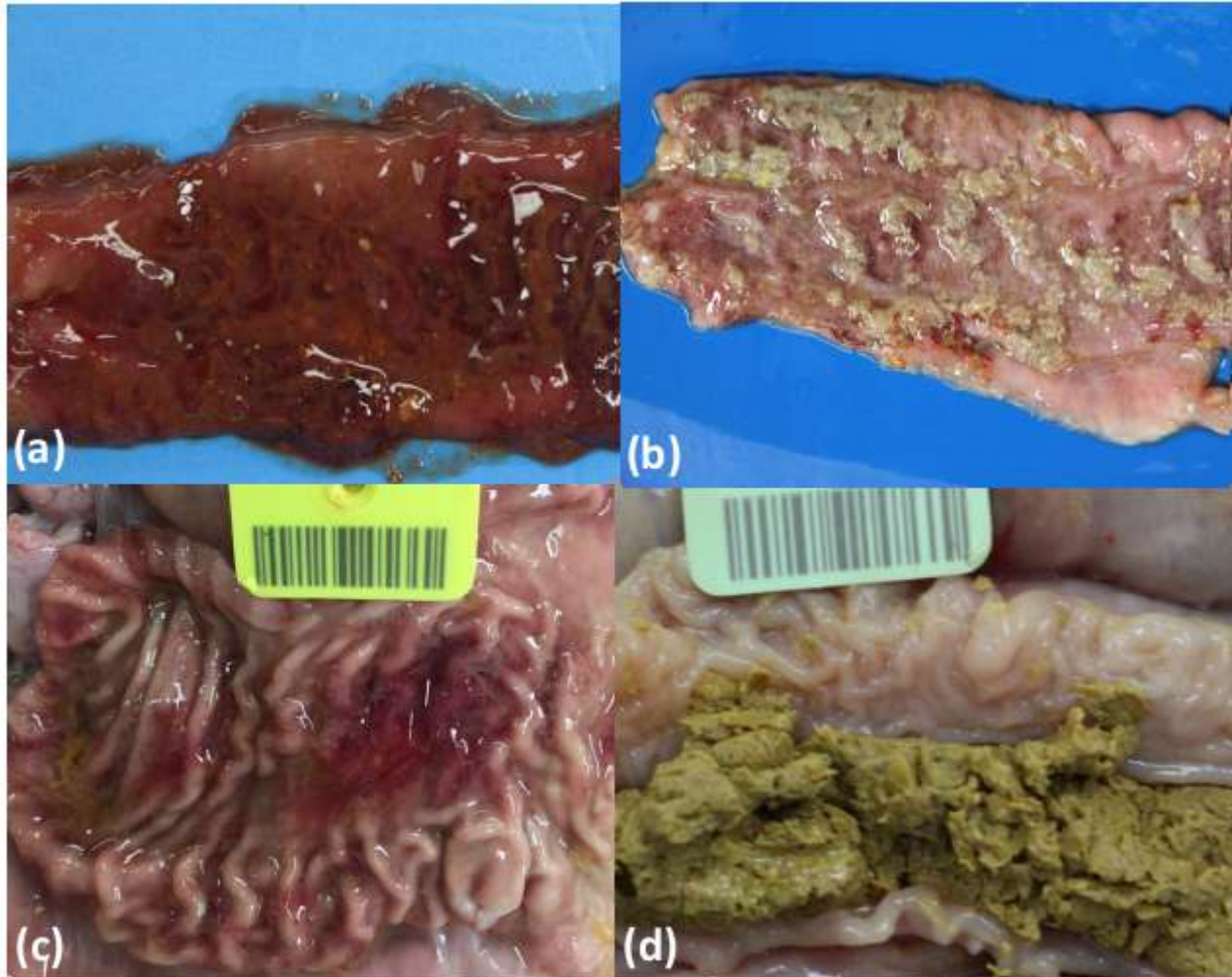
▪ NECROPSY EVALUATION

Presence and distribution of lesions in the mucosa:

Excessive luminal mucus; Mucosal hemorrhage and Fibrinonecrotic exudate

Resultados preliminares

Lesiones macroscópicas en colon



(a,b) cepa virulenta; (c) cepa atípica; (d) controle negativo

Resultados preliminares

Número de cerdos por grupo que presentan signos clínicos y lesiones de disentería porcina después de la inoculación de *Brachyspira hyodysenteriae*

GRUPOS	Signos clínicos*		Hallazgos de necropsia*		
	Feces con sangre y/o moco	Primera observación	Moco excesivo en lumen	Hemorragia de mucosa	Exudado fibrinonecrotico
CONTROLE	0/16 ^a		0/16 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a
ATIPICA	1/15 ^a	15 DPI	3/15 ^a	1/15 ^a	1/15 ^a
VIRULENTA	8/16 ^b	7 DPI	9/16 ^b	9/16 ^b	8/16 ^b

Agradecimientos

Agencias de fomento:

Fapemig, Capes, CNPq

Colaboradores:

University of Edinburgh (Dr. Jill Thomson),

University of Minnesota (Dr. Connie Gebhart),

University of Saskatchewan (Dr. John Harding, Dr. Janet Hill)

Danish Technical University (Dr. Tim Jensen, Dra. Mette Boye)

UFRGS (Prof. David Barcellos)

Docentes de la Facultad de Veterinaria:

Profs. Zélia Lobato, Francisco Lobato, Henrique Figueiredo, Carlos Gomes Leal (UFMG)



Estudiantes:

Master (**Amanda Daniel**, Talita Resende, **Saira Neves**, Javier Barrera)

PhD (**Amanda Daniel**, Michelle Gabardo, Carlos Eduardo Pereira, Mariana Andrade, **José Paulo Sato**)

Iniciación científica (Gabriella Borba Netto, Luísa Arantes Otoni, Amanda Vasconcellos, Mariane Wagatsuma, Lucas Avelino, Camila Mota, Paula Correia)

Post Doc (Nubia Macedo, Michelle Gabardo)

Apoio Técnico (Patrícia Auler, Rafaela Andrade)





Gracias!