



INFORME BREVE

Detección de *Brachyspira pilosicoli* y otras especies de *Brachyspira* en granjas avícolas argentinas



CrossMark

Natalia V. Illanes^{a,*}, Pablo J. Tamiozzo^{a,b}, Ana Cabral^a, Judith Bertone^a,
Silvia Romanini^a, Raúl Yaciuk^a, Mercedes Vázquez^a y Bibiana R. Pelliza^a

^a Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, República Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), República Argentina

Recibido el 17 de diciembre de 2014; aceptado el 21 de diciembre de 2015

Disponible en Internet el 5 de marzo de 2016

PALABRAS CLAVE

Gallinas ponedoras;
Brachyspira spp.;
Brachyspira pilosicoli;
Diagnóstico;
Aislamiento;
PCR

KEYWORDS

Laying hens;
Brachyspira spp.;
Brachyspira pilosicoli;

Resumen Algunas especies del género *Brachyspira*, como *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia* y *Brachyspira alvinipulli*, son especies patógenas capaces de producir enfermedad en gallinas ponedoras. En nuestro país, la presencia de *B. pilosicoli* y otras especies de *Brachyspira* ha sido informada en cerdos y en perros, pero no existen antecedentes de su presencia en aves de corral. En este estudio se analizaron muestras de materia fecal y de contenido de ciego de 34 gallinas ponedoras de 4, 12 y 24 meses provenientes de 2 establecimientos por medio del aislamiento, la realización de pruebas bioquímicas y reacción en cadena de la polimerasa. *B. pilosicoli* y *Brachyspira* spp. fueron identificadas en muestras tomadas de aves de 12 y 24 meses de edad.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Detection of *Brachyspira pilosicoli* and other *Brachyspira* species in Argentine poultry farms

Abstract Some species of the genus *Brachyspira* such as *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira alvinipulli* are pathogenic species capable of producing disease in laying hens. In our country, the presence of *B. pilosicoli* and other species of *Brachyspira* has been reported in pigs and dogs but there is no record of their presence in poultry.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: nillanes@ayv.unrc.edu.ar (N.V. Illanes).

Diagnosis;
Isolation;
PCR

Fecal and cecal content samples from 34 laying hens of 4, 12 and 24 months of age from two farms were analyzed by isolation, biochemical tests and PCR. *B. pilosicoli* and *Brachyspira* spp. were identified in samples taken from laying hens of 12 and 24 months of age.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La espiroquetosis intestinal aviar (EIA) es una enfermedad producida por bacterias pertenecientes al género *Brachyspira*. Esta enfermedad afecta al ciego y al colon de aves de corral y es reconocida como un problema productivo en ponedoras comerciales desde el año 1986¹⁵. El género *Brachyspira* comprende varias espiroquetas comensales y patógenas para muchas especies animales, incluyendo al hombre⁵.

En aves de corral se han informado aislamientos de varias especies; sin embargo, se reconocen a *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia* y *Brachyspira alvinipulli* como especies patógenas capaces de producir enfermedad en gallinas ponedoras¹⁵. En estas, la enfermedad se manifiesta con signos clínicos inespecíficos como diarrea pegajosa de color caramelo, huevos con restos de materia fecal y disminución de la producción de aquellos⁹.

B. pilosicoli merece una atención especial puesto que es considerada una especie zoonótica. Si bien existen pocos estudios acerca de la distribución y la transmisión de este patógeno a humanos, se lo ha detectado hasta el momento en pacientes con enfermedades autoinmunitarias o inmunodeprimidos y en habitantes de países en subdesarrollo³.

Se han identificado casos de EIA en granjas de ponedoras de Europa, América y Australia; *B. pilosicoli* y *B. intermedia* fueron las especies involucradas con mayor frecuencia^{4,7,11}. En Argentina, se ha informado la presencia de espiroquetas intestinales del género *Brachyspira* en cerdos⁶, pero no se ha encontrado en la literatura informes acerca de su presencia en aves.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de *B. pilosicoli* y otras especies de *Brachyspira* en gallinas ponedoras en Argentina.

Se tomaron muestras de materia fecal y de contenido de ciego de gallinas ponedoras de 2 granjas del centro-sur de la provincia de Córdoba. Las granjas A y B estaban situadas a 10 y 50 km de la ciudad de Río Cuarto, respectivamente. Las muestras se tomaron al azar. No se había informado en ninguna de las granjas la existencia de signos clínicos compatibles con EIA. De la granja A se tomaron 10 muestras de materia fecal de cada uno de los 3 galpones del establecimiento (n = 30). Las aves del primer galpón tenían 4 meses de edad y las de los 2 galpones restantes tenían 12 meses. Todas las gallinas tenían buena condición corporal y buen índice de postura. En la granja B se eligieron 4 gallinas de descarte de 24 meses aproximadamente, que fueron sacrificadas y sometidas a necropsia para la inspección de lesiones y para la toma de muestras de contenido de ciego. El procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Secretaría de Planificación de la

Universidad Nacional de Río Cuarto, expediente N.º 36/11. Las muestras se enviaron refrigeradas para su posterior procesamiento.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba, Argentina), de acuerdo con las normas internacionales del *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS).

Para el aislamiento bacteriano se utilizó un medio de cultivo selectivo compuesto por agar base sangre (Oxoid, Reino Unido) con 8% (v/v) de sangre equina desfibrinada y el agregado de vancomicina (1,25 mg/ml) (Northia, Argentina), colistina (1,25 mg/ml) (Northia, Argentina) y espectinomicina (0,4 mg/ml) (Sigma, Alemania); se incubó en anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid) a 40 °C durante 6-8 días. Las placas se consideraron positivas al aislamiento cuando se observó una pátina difusa con hemólisis débil.

Para confirmar la presencia de microorganismos compatibles con espiroquetas se realizó una tinción de Gram. Todos aquellos cultivos en los cuales se observaron espiroquetas fueron sembrados nuevamente en agar base-sangre sin antibióticos, con el fin de purificar las cepas. La identificación a nivel de especie se realizó considerando el resultado de pruebas bioquímicas y fisiológicas: la producción de indol, hidrólisis del hipurato y presencia de las enzimas α y β -glucosidasa y α -galactosidasa (Diatabs, Rosco, Dinamarca).

Con el fin de corroborar la presencia de espiroquetas del género *Brachyspira*, de todos aquellos cultivos en donde hubo crecimiento, se tomaron muestras para realizar una PCR específica de género que amplifica el gen *nox*, cuyo producto es la nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa (NADH-oxidasa), una enzima que la bacteria utiliza para consumir y protegerse del efecto letal del oxígeno. Para ello, el ADN fue recuperado a partir de un hisopo estéril previamente friccionado contra la superficie de la placa en donde se observaba la hemólisis débil, con el agregado de 1 ml de solución fisiológica estéril. El ADN fue extraído con un kit comercial (DNAzol, Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación del gen *nox*, se utilizaron los cebadores y las condiciones descritas por Rhode et al.¹³. Los amplicones fueron observados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 μ g/ml).

En la granja A, las aves de 4 meses resultaron negativas tanto al cultivo como a la PCR. Trece sobre 20 (13/20) muestras de aves de 12 meses fueron positivas al aislamiento y a la PCR. De las 13 muestras positivas, solo fue posible realizar las pruebas bioquímicas sobre 3 cultivos.

Tabla 1 Proporción de muestras de materia fecal o de contenido de ciego de gallinas ponedoras positivas a *Brachyspira* spp.

Granja	Edad de las aves (meses)	Positivas por aislamiento en cultivo	Positivas por PCR
A	4	0/10	0/10
A	12	13/20 ^a	13/20
B	24	2/4	2/4

^a Solo 3 de las 13 muestras positivas pudieron investigarse mediante pruebas bioquímicas, las que llevaron a su identificación como *B. pilosicoli*.

Estos cultivos resultaron positivos a las pruebas de hidrólisis del hipurato, α -galactosidasa y α -glucosidasa, y negativos a la reacción de indol y de β -glucosidasa, lo que permite concluir que estos correspondían a la especie *B. pilosicoli*.

En la granja B, 2 sobre 4 (2/4) muestras fueron positivas al cultivo y a la PCR. Las pruebas bioquímicas del cultivo de estas muestras fueron inespecíficas y no mostraron concordancia con ninguna especie de *Brachyspira* en particular. En todos los casos, las mismas muestras positivas al cultivo lo fueron a la detección por PCR para la identificación del género. Estos resultados se muestran resumidos en la [tabla 1](#).

El presente informe demuestra la presencia de *B. pilosicoli* y otras especies de *Brachyspira* en granjas avícolas de ponedoras comerciales ubicadas en la provincia de Córdoba. El aislamiento de *B. pilosicoli* en una de las granjas constituye un hallazgo trascendente para la salud pública, ya que este patógeno es considerado zoonótico³. El microorganismo se encontró en humanos con antecedentes de diarreas intermitentes, dolor abdominal y enfermedades gastrointestinales recurrentes y ha sido hallado en personas residentes en zonas de higiene deficiente, como también en pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia adquirida³.

La metodología utilizada para la identificación de estos microorganismos requiere de muchos pasajes en medios de cultivo y de varios días para la purificación de las cepas, y su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas. Además, se considera *Brachyspira* como una bacteria fastidiosa debido a su dificultad en el cultivo^{1,12}. Por esa razón, en este estudio no se pudo identificar este microorganismo en todas las muestras que resultaron positivas. Esto coincide con quienes informaron que, además de la utilización de diferentes técnicas de purificación de cepas, deben realizarse varios cultivos a partir del cultivo primario, sin poder llegar, en algunas ocasiones, al cultivo puro^{2-4,7}. Además, hay pocas diferencias fenotípicas entre las especies, lo que hace que la identificación resulte más compleja respecto de otras técnicas, como la PCR, cuando se trabaja a partir de muestras clínicas⁸.

Las cepas obtenidas de las muestras de aves de aproximadamente 24 meses de edad no pudieron ser identificadas por pruebas bioquímicas; sin embargo, las características de los aislamientos obtenidos y los resultados de PCR indican que se trata de bacterias del género *Brachyspira*. Estos resultados confirman la dificultad de llegar a una

identificación especie-específica y la necesidad de combinar varias técnicas para llegar a un diagnóstico adecuado^{4,7}.

En concordancia con lo informado por Stephens y Hampson¹⁴, no se encontraron muestras positivas en animales menores de 4 meses. En este sentido, hemos realizado cultivos de materia fecal de animales provenientes de granjas de pollos parrilleros de 50 días aproximadamente y no encontramos ninguna muestra positiva (datos no publicados).

Hay autores que indican que tanto la enfermedad (EIA) como la presencia del agente se presentan en aves criadas en sistemas semi-intensivos, con piso y pastoreo, y afirman que las muestras que procedían de granjas con sistemas de jaulas resultaron negativas². En el presente estudio se obtuvieron aislamientos positivos a partir de aves provenientes de sistemas productivos en jaulas, con gallinas que no realizaban ningún ciclo de su producción en pastoreo o en piso. Esto coincide con lo comunicado por Phillips et al.¹⁰, quienes informaron la presentación de EIA en aves alojadas en jaulas.

Debido a su carácter zoonótico, el hallazgo de *B. pilosicoli* en aves ponedoras de nuestro país debería comprometer a los profesionales vinculados con estos sistemas productivos a profundizar en el conocimiento de este microorganismo y de la enfermedad que produce, tanto en los animales como en el ser humano. Conscientes de esta necesidad, consideramos que este informe sienta un precedente para futuros estudios acerca de la enfermedad en las aves y su diagnóstico en gallinas ponedoras.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en el marco del programa «El muestreo en frigorífico como herramienta de detección de agentes etiológicos de presentación subclínica en aves», número de resolución: Res 852/11.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Achacha M, Messier S. Comparison of six different cultura media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J Clin Microbiol. 1992;30:249-51.

2. Álvarez Mira D. Valoración de la presencia de *Brachyspira intermedia* y *Brachyspira pilosicoli* en ponedoras comerciales de granjas avícolas colombianas. Tesis de Magister en Ciencias y Salud Animal. 2009. Universidad Nacional de Colombia.
3. Calderaro A, Bommezzadri S, Gorrini C, Piccolo G, Peruzzi S, Dettori G, Chezzi C. Comparative evaluation molecular assays for the identification of intestinal spirochaetes from diseased pigs. *Vet Microbiol.* 2006;118:91–100.
4. Feberwee A, Hampson D, Phillips N, La T, van der Heijden H, Wellenberg G, Dwars M, Landman W. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced production or both. *J Clin Microbiol.* 2008;46:593–600.
5. Hampson DJ, Trot D. Intestinal spirochetal infections of pigs: an overview with an Australian perspective. Proceedings of the Fifth Biennial Conference of the Australasian Pig Science Association (APSA). 1995:139–69. Canberra, Australia.
6. Illanes N. Detección de *Brachyspira* spp. en cerdos de granjas de cría intensiva confinada mediante el desarrollo de diferentes métodos diagnósticos. Tesis de Magister en Salud y Producción Porcina. 2010. Universidad Nacional de Río Cuarto.
7. Jansson D, Fellström C, Råsbäck T, Vågsholm I, Gunnarsson A, Ingermaa F, Johansson K. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens in different housing systems. *Vet Microbiol.* 2008;130:348–62.
8. La T, Phillips N, Hampson D. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig faeces. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3372–5.
9. Myers S, Dunn P, Phillips N, La T, Hampson D. *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* are commonly found in older laying flocks in Pennsylvania. *Avian Dis.* 2009;53:533–7.
10. Phillips N, La T, Hampson D. A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. *Vet Microbiol.* 2005;105:189–98.
11. Phillips N, La T, Hampson D. Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. *Vet Microbiol.* 2006;116:239–45.
12. Råsbäck T, Fellström C, Gunnarsson A, Aspán A. Comparison of culture and biochemical test with PCR detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J Microbiol Methods.* 2006;66:347–53.
13. Rhode J, Rothkamp A, Gerlach G. Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2598–600.
14. Stephens C, Hampson D. Prevalence and disease associations of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. *Avian Pathol.* 1999;28:447–545.
15. Stephens C, Hampson D. Intestinal spirochaete infection of chickens: A review of disease associations, epidemiology and control. *Anim Health Res Rev.* 2001;2:83–91.