Diseminación de Grupos Clonales Internacionales de *Brachyspira hyodysenteriae* en Granjas Porcinas Españolas

Modalidad: Sanidad Animal

Lema: Epidemiología Global de la Disentería Porcina

Abstract

Swine dysentery (SD) is a widespread diarrhoeal disease of pigs caused by infection of the large intestine with the anaerobic intestinal spirochaete *Brachyspira hyodysenteriae*. Understanding the dynamics of SD, and hence being able to more effectively develop measures to counter its spread, depends on the ability to characterise *B. hyodysenteriae* variants and to trace relationships of epidemic strains.

A collection of 51 Spanish and 1 Portuguese *B. hyodysenteriae* isolates was examined using a multilocus sequence typing (MLST) scheme based on the sequences of seven conserved genomic loci. The isolates were allocated to 10 sequence types (STs) in three major groups of descent. Isolates in four of the STs were widely distributed in farms around Spain. One farm was infected with isolates from more than one ST. Sequence data obtained from PubMLST for 111 other *B. hyodysenteriae* strains from other countries then were included in the analysis. Two of the predominant STs that were found in Spain also were present in other European countries. The 73 STs were arranged in eleven clonal complexes containing between 2 and 26 isolates. A population snapshot based on amino acid types (AATs) placed 75 % of the isolates from 32 of the 48 AATs into one major cluster. The founder type AAT9 included 22 isolates from 10 STs that were recovered in Spain, Australia, Sweden, Germany, Belgium, Canada, the UK and the USA.

This MLST scheme provided sufficient resolution power to unambiguously characterise *B. hyodysenteriae* isolates, and can be recommended as a routine typing tool that rapidly enables comparisons of isolates. Using this method it was shown that some of the main genetic lineages of *B. hyodysenteriae* that were present in Spain also occurred in other countries, providing further evidence for international transmission of strains. Finally,

analysis of AATs appeared to be useful for deducing putative ancestral relationships between strains.

Resumen

La disentería porcina (DP) es una enfermedad bastante extendida que afecta al ganado porcino y que se caracteriza por la presencia de diarrea como consecuencia de la infección del intestino grueso por *Brachyspira hyodysenteriae*, una espiroqueta intestinal anaeróbica. La comprensión de la dinámica poblacional de la DP y la capacidad para desarrollar medidas eficaces para contrarrestar su propagación dependen, en gran medida, de la capacidad para tipificar las cepas de *B. hyodysenteriae* presentes en las granjas así como de la capacidad para poder seguir la pista a las cepas epidémicas.

Un total de 51 aislados españoles y uno portugués de *B. hyodysenteriae* se analizaron mediante el análisis de secuencias multilocus (MLST), una técnica que se basa en la obtención de las secuencias nucleotídicas de siete *loci* genómicos conservados. Los aislados se agruparon en 10 secuencias tipo (STs) en tres grupos principales de descendencia. Los aislados pertenecientes a cuatro de los genotipos multilocus descritos se distribuyeron ampliamente en granjas porcinas de toda España. En una misma granja se detectó la presencia simultánea de dos genotipos multilocus (STs). La información de 111 cepas de *B. hyodysenteriae* de otros países fue obtenida de PubMLST e incluida en el análisis. Dos de las STs predominantes en España también estaban presentes en otros países europeos. Las 73 STs se organizaron en once complejos clonales que contienen entre 2 y 26 aislados. El análisis de la población mundial basado en la información aminoacídica detectó la presencia de 48 tipos aminoacídicos (AATs), 32 de ellos (75 %) situados en un grupo

principal. El tipo fundador AAT9 incluyó 22 aislados de 10 STs diferentes obtenidas de España, Australia, Suecia, Alemania, Bélgica, Canadá, Reino Unido y EE.UU.

Este esquema de MLST ha mostrado tener un elevado poder de resolución necesario para caracterizar de forma inequívoca los aislados de *B. hyodysenteriae* y puede ser recomendado como una herramienta rutinaria de tipificación que además permite la comparación rápida de los aislados. Con el empleo de este método se ha demostrado que algunos de los principales linajes genéticos de *B. hyodysenteriae* que están distribuidos por toda España también lo están en otros países de nuestro entorno, proporcionando evidencia manifiesta de la transmisión internacional de cepas porcinas. Finalmente, el análisis de los AATs resulta útil para inferir hipotéticas relaciones ancestrales entre cepas.

Introducción

Las bacterias del género *Brachyspira* son espiroquetas anaerobias intestinales que pueden causar diarrea e incluso mortalidad en cerdos y otras especies animales. Este género comprende actualmente siete especies reconocidas oficialmente y varias especies que han sido propuestas. Seis de esas especies se pueden encontrar en el intestino grueso del cerdo y, en la actualidad, tres de ellas se consideran patógenas [1]. Sin duda, la especie más importante del género es *Brachyspira hyodysenteriae*, el agente etiológico de la disentería porcina (DP), una patología caracterizada por la presencia de diarrea mucohemorrágica con lesiones que afectan al ciego y colon de los cerdos, especialmente durante el período de crecimiento y final de cebo [2]. No obstante, la severidad de la enfermedad en una granja puede variar dependiendo de la virulencia de la cepa y del nivel de inmunidad que los animales posean frente a *B. hyodysenteriae* [3].

La presencia de DP se ha descrito en todo la geografía mundial y tiene un gran impacto económico en la producción porcina de muchos países, debido principalmente a la disminución de la velocidad de crecimiento, al aumento del índice de conversión del pienso, al gasto en tratamientos y a las muertes que ocasiona [5]. La presencia de la enfermedad supone además una limitación potencial en el comercio y movimiento de cerdos con otras granjas. En España, la DP tiene una gran relevancia como lo demuestra el hecho de que más del 30 % de las explotaciones porcinas y el 12 % de las muestras de heces de cerdos de granjas con brotes de diarrea fueron positivas para *B. hyodysenteriae* mediante cultivo *in vitro* y PCR específica de especie [4].

Para comprender en detalle la epidemiología de la DP es necesario disponer de métodos eficaces de tipificación molecular de los aislados. Esta caracterización molecular de aislados de campo es necesaria para ayudar a entender las rutas de transmisión del patógeno

entre las distintas granjas de un país y entre los diferentes países. Varios métodos de caracterización molecular ya se han empleado para el análisis de *B. hyodysenteriae*, entre los que se incluyen el análisis del ADN con enzimas de restricción (REA) [6, 7], la amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD) [8, 9], el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción [10] y la electroforesis en campo pulsante (PFGE) [9, 11, 12]. Además, la electroforesis de isoenzimas multilocus (MLEE) y el análisis de repeticiones en tándem de número variable (MLVA) se han utilizado para investigar la estructura poblacional de *B. hyodysenteriae* [13-15]. Aunque la técnica de MLEE ha resultado ser útil para diferenciar y analizar la relación de cepas de *B. hyodysenteriae*, se trata de una técnica larga y engorrosa de llevar a cabo y, por lo tanto, no resulta adecuada para uso rutinario en el laboratorio. Además, aunque la técnica de MLVA es rápida, sencilla y resulta útil para estudios epidemiológicos locales, los resultados son difíciles de comparar entre laboratorios a menos que se utilice electroforesis capilar.

El análisis de secuencias multilocus o tipificación mediante secuenciación multilocus (MLST) se ha desarrollado recientemente como una técnica alternativa para el análisis de la estructura poblacional de muchas especies microbianas así como para discriminar entre cepas [16, 17]. Esta técnica se basa en la obtención y el análisis de las secuencias de varios *loci* de genes metabólicos implicados en rutas centrales y su uso ha contribuido sustancialmente a la comprensión de la epidemiología global de muchos agentes infecciosos. El propósito del presente estudio fue analizar aislados españoles de *B. hyodysenteriae* todos ellos obtenidos a partir de heces de cerdo, utilizando para ello un esquema de MLST para *B. hyodysenteriae* desarrollado recientemente [18], que se basa a su vez en las modificaciones del esquema de MLST descrito para el conjunto del género

Brachyspira [1]. Las secuencias de los aislados de *B. hyodysenteriae* obtenidas en este estudio y en estudios previos se encuentran almacenadas en PubMLST, una base de datos global localizada en un sitio web de libre acceso (http://pubmlst.org/brachyspira/). Este sitio web permite el intercambio rápido de los datos de tipificación molecular entre diferentes laboratorios y países por lo que se ha convertido en una poderosa herramienta al servicio de la epidemiología global de la DP [18]. La caracterización inequívoca de cepas de *B. hyodysenteriae* está resultando crucial para poder abordar aspectos relativos a su epidemiología, estructura poblacional y biología evolutiva.

Material y métodos

Aislados de *Brachyspira hyodysenteriae*

En total se analizaron 51 aislados de campo españoles y 1 aislado portugués de *B. hyodysenteriae* obtenidos de granjas porcinas con problemas de diarrea. Estos aislados se obtuvieron a partir de las heces de cerdos enfermos mediante cultivo en anaerobiosis a 39ºC y posteriormente fueron identificados como *B. hyodysenteriae* en función de su fenotipo fuertemente β-hemolítico y del resultado de una técnica de PCR específica de especie [19]. Se eligieron aislados que fuesen representativos de toda España y con tal fin se incluyeron aislados obtenidos a partir de 11 de las 15 comunidades autónomas de nuestro país (73 %) y de 21 de las 48 provincias (44 %) (Figura 1). Los aislamientos procedían de 47 granjas comerciales y se obtuvieron de cerdos afectados de disentería entre los años 2001 y 2007. Los nombres de los aislados, su origen y la fecha de aislamiento se recogen en la Tabla 1. La mayoría de los aislados procedían de cerdos híbridos blancos si bien siete de ellos fueron obtenidos de cerdo ibérico, una raza autóctona de la Península Ibérica caracterizada por su rusticidad y que tradicionalmente se mantiene en explotaciones extensivas. En

general, se pretendió que los aislados fuesen de granjas diferentes pero para cinco granjas se analizaron dos aislados de cada una de ellas (Tabla 1). Los aislados fueron cultivados *in vitro* en el laboratorio y a partir de los cultivos se obtuvo el ADN de cada uno de ellos como ya está descrito [18].

En un paso siguiente, los datos de 111 aislados de *B. hyodysenteriae* que habían sido previamente analizados [18] se obtuvieron de PubMLST (http://pubmlst.org/brachyspira/) y se incluyeron en el análisis final junto con los aislados españoles. En conjunto, se analizó una población mundial de 163 aislados obtenidos con hasta tres décadas de diferencia y procedentes de Australia (50,3 %), Europa (43,6 %) y América del Norte (6,1 %). En concreto, los aislados procedieron de Australia (n = 82), España (n = 51), Suecia (n = 10), EE.UU. (n = 7), Canadá (n = 3), el Reino Unido (n = 5), Alemania (n = 3), Portugal (n = 1) y Bélgica (n = 1). Además se incluyeron las cepas de referencia de *B. hyodysenteriae* $B204^R$ (ATCC 31212), $B234^R$ (ATCC 31287) y $WA1^R$ (ATCC 49526) y la cepa de tipo $B78^T$ (ATCC 27164) [18]. La mayoría de los aislados se obtuvieron de cerdos de granjas comerciales (n = 152; 93,3 %), pero seis procedían de jabalíes, dos de ánades reales, uno de ñandú y uno de ratón (Tabla 2).

Obtención de secuencias multilocus

Se utilizaron los mismos siete *loci* que anteriormente habían sido empleados para el análisis MLST de *B. hyodysenteriae* [18]. Se trata de los genes que codifican para las enzimas alcohol deshidrogenasa (*adh*), fosfatasa alcalina (*alp*), esterasa (*est*), glutamato deshidrogenasa (*gdh*), glucosa quinasa (*glp*K), fosfoglucomutasa (*pgm*), y acetil-CoA acetiltransferasa (*thi*). Para la amplificación se emplearon las condiciones de PCR y los cebadores previamente descritos [18].

Tabla 1 Secuencias tipo (STs) y tipos aminoacídicos (AATs) de 51 aislados españoles y 1 portugués de *B. hyodysenteriae*. Se indica el perfil alélico (nucleotídico/aminoacídico) y el número total de variantes obtenidas para cada *locus*

ST	AAT	Código[1]	Genes metabólicos[2]							CC.AA.	Aislamiento	Provincia	Origen
			pgm	*adh*	*alp*	*est*	*gdh*	*glp*K	*thi*				
8	**8**	**874**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Andalucía	may-01	Málaga	NC
8	**8**	**1117**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Aragón	sep-01	Zaragoza	Blanco
8	**8**	**E1217**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Galicia	oct-01	NC	Blanco
8	**8**	**E1231**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Cataluña	oct-01	Gerona	Blanco
8	**8**	**1502**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Andalucía	ene-02	Málaga	Blanco
8	**8**	**5300**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Cataluña	oct-03	Barcelona	Blanco
8	**8**	**E380(J)**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	NC	ene-01	NC	NC
8	**8**	**E636(H)**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	C-León	dic-04	Soria	NC
8	**8**	**E644(H)**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	C-León	dic-04	Soria	NC
8	**8**	**H5**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Extremadura	ene-07	Badajoz	Ibérico
8	**8**	**H12(B)**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	C-León	feb-07	Salamanca	Ibérico
8	**8**	**H13(A)**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Extremadura	feb-07	Badajoz	Ibérico
8	**8**	**H21(A)**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Extremadura	feb-07	Badajoz	Ibérico
8	**8**	**H24**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Cataluña	feb-07	Lérida	Blanco
8	**8**	**H42**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Cataluña	mar-07	Barcelona	NC
8	**8**	**H44**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	C-Mancha	abr-07	Toledo	NC
8	**8**	**H57**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Andalucía	may-07	Sevilla	NC
8	**8**	**H67**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	C-León	jun-07	Zamora	Blanco
8	**8**	**H75(B)**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	C-León	jun-07	Salamanca	Ibérico
8	**8**	**H79**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	C. Valenc.	jul-07	Castellón	NC
8	**8**	**H81**	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Andalucía	jul-07	Córdoba	Ibérico
52	**9**	**E838**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Cataluña	may-01	Barcelona	Blanco
52	**9**	**3140**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Navarra	oct-02	Navarra	Blanco
52	**9**	**3410**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Galicia	oct-02	Pontevedra	NC
52	**9**	**4722**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Aragón	jul-03	Huesca	Blanco
52	**9**	**H3**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Aragón	dic-06	Huesca	Blanco
52	**9**	**H4**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Cataluña	ene-07	Lérida	Blanco
52	**9**	**H9**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Cataluña	ene-07	Barcelona	Blanco
54	**9**	**H76**	**5**/1	**2**/1	**5**/2	**1**/1	**3**/2	**6**/1	**3**/1	C-León	jun-07	León	Blanco
67	**44**	**H32**	6/2	**1**/1	4/2	**1**/1	**7**/2	5/2	**1**/1	PORTUGAL	mar-07	Alentejo	NC
68	**9**	**5074**	**2**/1	**1**/1	**2**/2	**1**/1	4/2	**4**/1	**2**/1	Galicia	oct-03	NC	Blanco
69	**8**	**H73**	**5**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	**1**/1	Murcia	jun-07	Murcia	Blanco
70	**45**	**H52**	4/3	**1**/1	**3**/2	**2**/2	5/2	**3**/1	**1**/1	Murcia	may-07	Murcia	Blanco
70	**45**	**H69**	4/3	**1**/1	**3**/2	**2**/2	5/2	**3**/1	**1**/1	Murcia	jun-07	Murcia	Blanco
71	**46**	**H19**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	Cataluña	feb-07	Barcelona	Blanco
71	**46**	**H27**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	C-Mancha	feb-07	Toledo	NC
71	**46**	**H31**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	C-León	feb-07	Zamora	Ibérico
71	**46**	**H38**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	Andalucía	mar-07	Almería	NC
71	**46**	**H46**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	Aragón	abr-07	Zaragoza	Blanco
71	**46**	**H65**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	Cataluña	jun-07	Barcelona	Blanco
71	**46**	**Ex81**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	Cataluña	may-07	Barcelona	Blanco
71	**46**	**E377(J)**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	NC	ene-01	NC	NC
71	**46**	**E605(I)**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	La Rioja	feb-01	La Rioja	Blanco
71	**46**	**1002(I)**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	La Rioja	jul-01	La Rioja	Blanco
71	**46**	**4889**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	Andalucía	sep-03	Málaga	NC
71	**46**	**5861**	**5**/1	**1**/1	6/2	**2**/2	8/2	7/1	**1**/1	Andalucía	feb-04	Huelva	NC
72	**47**	**H15**	3/4	**1**/1	**2**/2	**1**/1	**6**/2	**4**/1	**2**/1	Cataluña	feb-07	Barcelona	Blanco
73	**48**	**H1**	6/2	**1**/1	**3**/2	**1**/1	**2**/1	**2**/1	**1**/1	Cataluña	dic-06	Lérida	Blanco
73	**48**	**H2**	6/2	**1**/1	**3**/2	**1**/1	**2**/1	**2**/1	**1**/1	Cataluña	dic-06	Lérida	Blanco
73	**48**	**H34**	6/2	**1**/1	**3**/2	**1**/1	**2**/1	**2**/1	**1**/1	Murcia	mar-07	Murcia	Blanco
73	**48**	**H40**	6/2	**1**/1	**3**/2	**1**/1	**2**/1	**2**/1	**1**/1	Murcia	mar-07	Murcia	Blanco
73	**48**	**H71**	6/2	**1**/1	**3**/2	**1**/1	**2**/1	**2**/1	**1**/1	Cataluña	jun-07	Lérida	Blanco
10	**7**	**Total**	**6/4**	**2/1**	**6/3**	**2/2**	**8/2**	**7/2**	**3/1**				

[1] Los aislados procedentes de la misma granja se indican con letras mayúsculas

[2] Los alelos indicados en negrita han sido previamente descritos para aislados de diferentes países y continentes [1, 18]

Las reacciones de PCR y de secuenciación se realizaron en la Universidad de Murdoch (Perth, Australia). La técnica de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 60 µl empleando la *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.). Cada reacción de PCR incluyó un control positivo representado por la cepa WA1^{R} de *B. hyodysenteriae* y un control negativo que consistió en agua ultrapura. Las condiciones de PCR fueron de 95°C durante 2 minutos, seguido de 33 ciclos de 95ºC durante 30 segundos, 50ºC durante 15 segundos y 72ºC durante 1 minuto, seguido de un período de elongación final de 5 minutos a 72ºC, antes de enfriar a 10ºC. Los productos de PCR fueron purificados con una columna comercial denominada *AxyPrepTM PCR Clean-Up Kit* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Axygen Scientific, Inc., Union City, CA, EE.UU.).

Los productos de PCR purificados se secuenciaron utilizando la mezcla *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando los mismos cebadores que para la amplificación. La secuenciación se realizó utilizando un secuenciador automático de ADN por electroforesis capilar 373A (Applied Biosystems). Las secuencias resultantes se analizaron y ensamblaron empleando *ContigExpress*, componente del programa *VectorNTI Advanced* 10 (Invitrogen).

Para asegurarse de que las secuencias empleadas eran todas del mismo sentido, las secuencias de cada *locus* se alinearon junto con la secuencia original de la cepa WA1^{R} de *B. hyodysenteriae* [18], usando el programa *ClustalW* (del EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute [http://www.ebi.ac.uk/clustalw/]). Las secuencias alineadas para

cada *locus* fueron cortadas a la misma longitud utilizando el programa *GeneDoc* [20] y la longitud de cada alelo fue a su vez ajustada a la longitud de las secuencias disponibles en Internet [18]. Las secuencias nuleotídicas fueron traducidas a secuencias aminoácidicas empleando la versión 7.0.9.0 del programa *BioEdit* [21].

Análisis de las secuencias

Se llevó a cabo el análisis para cada *locus* de las secuencias de los aislados españoles y portugués y, posteriormente, se combinaron estos datos con las secuencias de 111 aislados de *B. hyodysenteriae* disponibles en Internet [18]. El primer paso fue identificar las secuencias que eran idénticas empleando para ello los alineamientos para cada uno de los *loci*. A cada secuencia de nucleótidos única se le asignó un número alélico. El perfil alélico o genotipo multilocus de un aislado viene dado por la combinación de alelos obtenida para cada uno de los *loci* estudiados. A los distintos genotipos identificados en la población estudiada se les denomina secuencias tipo (STs). Dos aislados se consideran genéticamente idénticos y, por lo tanto, pertenecientes a la misma ST si poseen secuencias idénticas para cada uno de los siete *loci* considerados. En lo que respecta a las secuencias aminoacídicas se procedió de la misma manera que para las secuencias nucleotídicas. Para cada *locus* se asignaron arbitrariamente números enteros diferentes a las secuencias peptídicas distintas, aunque sólo difiriesen en un único aminoácido en toda la longitud estudiada. Cada cepa se identificó con una secuencia de 7 números enteros, cada uno de los cuales representa la numeración de la variante correspondiente a cada enzima analizada. A las distintas combinaciones de variantes aminoacídicas identificadas en la población estudiada se las denominó tipos aminoacídicos (AATs).

Tabla 2 Relación y principales características de los 111 aislados de *B. hyodysenteriae* cuyas secuencias fueron obtenidas de PubMLST (http://pubmlst.org/) [1, 18]. Las cepas que no se indica la especie de origen proceden de ganado porcino

ST	Cepa	Origen	ST	Cepa	Origen
13	AN174/92	Suecia, cerdo	22	Q9	Australia, 1980s
13	AN1082/90	Suecia, cerdo	23	SA1	Australia, 1980s
13	AN3379/98	Suecia, cerdo	24	B8044	USA, 1980s
60	AN383:2/00	Suecia, ánade	25	SA3	Australia, 1980s
52	T20	Alemania, cerdo	26	B6933	USA, 1980s
51	T4	Alemania, cerdo	27	Vic23	Australia, 1988
52	A5677/96	Alemania, cerdo	28	NSW9	Australia, 1991
52	Be45	Bélgica, cerdo	28	Q33a	Australia, 1991
56	**B78^{T}**	USA, cerdo	29	Vic35	Australia, 1980s
6	AN3730/96	Suecia, cerdo	30	Vic2	Australia, 1987
6	AN613/98	Suecia, cerdo	31	WA26	Australia, 1980s
6	AN2420/97	Suecia, cerdo	32	Q10	Australia, 1980s
9	AN360/03	Suecia, cerdo	32	Q11	Australia, 1980s
9	AN551/03	Suecia, ratón	32	Q14	Australia, 1988
7	P134/99	Reino Unido, cerdo	32	Vic31	Australia, 1980s
8	E2	Reino Unido, cerdo	33	NSW1	Australia, 1990s
66	AN1409:2/01	Suecia, ánade	34	NSW3	Australia, 1990s
54	**B204^{R}**	USA, cerdo	35	Q17	Australia, 1990s
1	WA46	Australia, 2007 (Granja A)	36	Q22	Australia, 1990s
2	WA41	Australia, 2007 (Granja A)	36	WA1	Australia, 1980s
2	WA52	Australia, 2007 (Granja A)	36	WA2	Australia, 1980s
2	WA53	Australia, 2007 (Granja A)	36	WA4	Australia, 1980s
2	WA56	Australia, 2007 (Granja A)	36	WA5	Australia, 1980s
2	WA57	Australia, 2007 (Granja A)	36	WA8	Australia, 1980s
2	WA42	Australia, 2007 (Granja A)	36	WA9	Australia, 1980s
3	SA12	Australia, 2007 (Granja C)	37	WA13	Australia, 1980
4	FMV89.3323	Canadá, 1989	38	FP2	Australia, 2006
5	ACK300/8	USA, 1970s	39	FP1	Australia, 2006
10	KF9	Reino Unido, 1970s	40	WA28	Australia, 1980s
11	Vic36	Australia, 1991	41	FP5	Australia, 2006
12	Vic30	Australia, 1980s	42	R301	USA (Rhea), 1996
12	Vic32	Australia, 1980s	43	WA27	Australia, 1980s
14	Vic38	Australia, 1990	44	WA14	Australia, 1980
15	NSW13	Australia, 1990s	44	WA34	Australia, 1990s
15	NSW14	Australia, 1990s (Granja D)	45	FP6	Australia, 2006
16	SA2	Australia, 1980s	46	FP3	Australia, 2006
17	Vic4	Australia, 1980s	47	Q18	Australia, 1990s
18	NSW2	Australia, 1990s	47	WA6	Australia, 1980s
19	NSW42	Australia, 2005 (Granja D)	48	FP4	Australia, 2006
19	NSW45	Australia, 2005 (Granja D)	49	SA11	Australia, 2007 (Granja C)
19	NSW46	Australia, 2005 (Granja D)	49	WA62	Australia, 2007 (Granja E)
19	NSW49	Australia, 2005 (Granja D)	50	Q20	Australia, 1990s
19	NSW27	Australia, 2004 (Granja D)	53	**B234^{R}**	USA, 1970s
19	NSW28	Australia, 2004 (Granja D)	55	FM88.90	Canadá, 1990
19	NSW32	Australia, 2005 (Granja D)	57	P18A	Reino Unido, 1970s
19	WA40	Australia, 2005 (Granja B)	58	VS1	Reino Unido, 1970s
20	Vic24	Australia, 1988	59	B169	Canadá, 1970s
20	Vic25	Australia, 1980s	61	WA73	Australia, 2007 (Granja B)
20	Vic33	Australia, 1980s	62	WA71	Australia, 2007 (Granja B)
21	NSW44	Australia, 2005 (Granja D)	63	WA75	Australia, 2007 (Granja B)
21	NSW30	Australia, 2005 (Granja D)	64	WA65	Australia, 2007 (Granja C)
21	NSW34	Australia, 2005 (Granja D)	64	WA69	Australia, 2007 (Granja C)
22	Q1	Australia, 1980s	64	WA48	Australia, 2007 (Granja B)
22	Q21	Australia, 1980s	64	WA49	Australia, 2007 (Granja A)
22	Q3	Australia, 1980s	65	WA47	Australia, 2007 (Granja A)
22	Q8	Australia, 1980s			

Las cepas tipo y de referencia se indican en negrita

Los 18 aislados analizados por Råsbäck *et al*. [1] se muestran separados por una línea de los 93 aislados analizados por La *et al*. [18]

A partir de las secuencias obtenidas para cada uno de los *loci* analizados se generaron representaciones gráficas con ayuda de varios programas informáticos. Las secuencias de los diferentes alelos que constituyeron las diferentes STs se concatenaron empleando con la versión 3.8.5 del programa *Geneious Pro* (http://www.geneious.com/) como ya estaba descrito [1, 26]. El mismo orden se empleó para concatenar tanto las secuencias nucleotídicas como las secuencias de aminoácidos. Una vez concatenadas, las secuencias fueron alineadas utilizando el programa *ClustalW2* [27] y se convirtieron a formato *MEGA* [28]. La relación existente entre las cepas con distintos perfiles alélicos se evidenció generando un dendrograma a partir de una matriz de no coincidencias alélicas entre parejas de STs, aplicando el método *UPGMA* ("Unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages"). Este dendrograma se construyó con el programa *MEGA4*, versión 4.0 ("Molecular Evolutionary Genetics Analysis"; http://www.megasoftware.net/) [28]. El análisis de la relación existente entre los aislados a nivel aminoacídico se llevó a cabo de la misma forma. En la construcción de los dendrogramas, el modelo de máxima probabilidad se utilizó para las secuencias de nucleótidos y el modelo de corrección de Poisson para las secuencias de aminoácidos, en ambos casos con 1000 réplicas.

Los aislados fueron agrupados en complejos clonales mediante el algoritmo BURST utilizando el programa *eBURST* versión 3 [23]. El objetivo es identificar los grupos de genotipos estrechamente relacionados en la población estudiada, denominados líneas o complejos clonales, así como el genotipo fundador de cada complejo clonal. Para que dos STs sean incluidas en el mismo complejo clonal se eligió una definición de grupo de 6/7, es decir, que deben de compartir al menos 6 alelos de los 7 *loci* en estudio con alguno de los

componentes del complejo clonal. El mismo análisis se utilizó para los AATs. El grado de desequilibrio de ligamiento en la población española y en el conjunto de la población mundial se estimó mediante el cálculo del índice de asociación (I_A) tanto de los aislados como de las STs [24], utilizando el programa *START2* [22]. El índice de diversidad (ID), basado en el índice de diversidad de Simpson, se calculó para las secuencias de este estudio como se ha descrito previamente [25].

Resultados

Aislados españoles y portugués

Para todos los genes se obtuvieron secuencias de excelente calidad sin la presencia de posiciones ambiguas. En ninguno de los fragmentos analizados se obtuvieron secuencias con inserciones/delecciones. Los 52 aislados de este estudio fueron agrupados en 10 STs y en 7 AATs (Tabla 1). El perfil alélico de cada una de las STs se muestran en la tabla 1 y estas secuencias se encuentran disponibles en el sitio web de PubMLST (http://pubmlst.org/brachyspira/). Todos los *loci* fueron polimórficos y el número de sitios nucleotídicos polimórficos en los fragmentos secuenciados osciló entre 1 (*est*) y 19 (*glp*K), con una media de 11. La frecuencia alélica por *locus* osciló entre 8 (*gdh*) y 2 (*adh* y *est*) con una media de 4,9. Siete de las 10 STs (ST67 - ST73) no habían sido descritos previamente e incluyeron un total de 23 aislados (44,2 %), mientras que cinco de los 7 AATs (AAT44 – AAT48) fueron de nueva descripción e incluyeron 21 aislados (40,4 %).

Ninguna de las STs 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 % (n = 21) en el total de la longitud considerada (4.071 nucleótidos). Los alelos de los genes *adh*, *est* y *thi* de todos los aislados españoles habían sido previamente depositados

en el sitio web de PubMLST. Un alelo del gen *alp*, dos del *glp*K y tres de *pgm* y *gdh* fueron de nueva descripción. A nivel aminoacídico, una variante para el gen *glp*K y tres para el gen *pgm* son de nueva descripción. Una de las siete STs recientemente descritas (ST69) se componía de siete alelos que todos ellos habían sido previamente descritos. El resto de las nuevas STs tenían al menos un alelo que no había sido descrito con anterioridad.

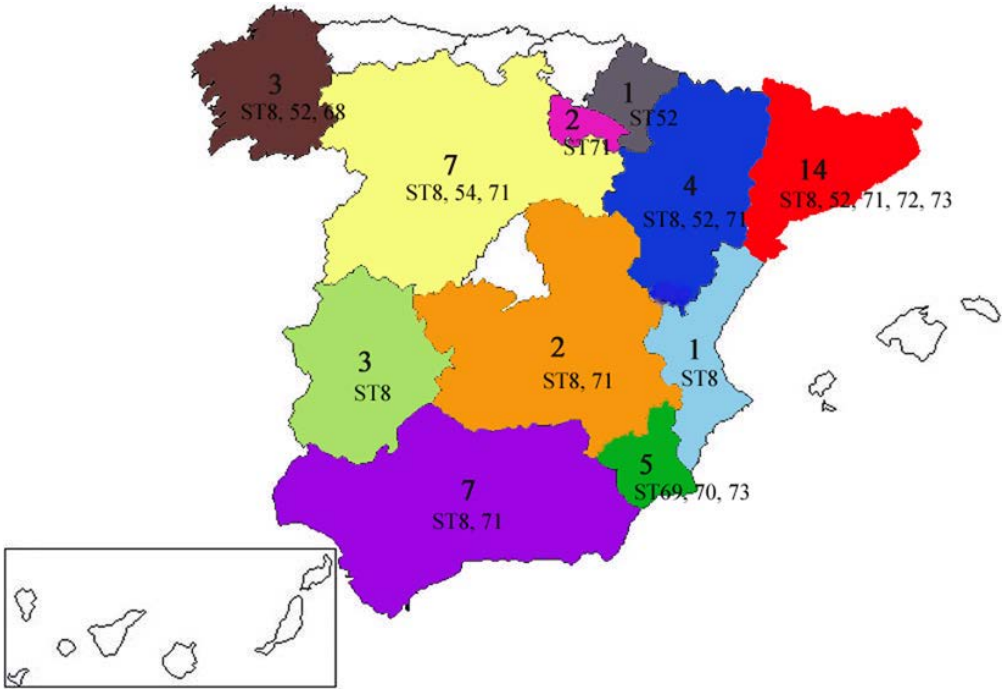

Figura 1 Distribución de las secuencias tipo (STs) identificadas en los 52 aislados de *B. hyodysenteriae* incluidos en el presente estudio en las diferentes CC.AA. de España. Las CC.AA. en blanco no aportaron ningún aislado. Se indica el número de aislados y debajo las STs a las que pertenecieron dichos aislados. El único aislado de origen portugués del estudio, incluido en la ST67, no está indicado en el mapa

Para evidenciar la estructura genética de la población bacteriana estudiada se calculó el índice de asociación (I_A). El I_A calculado para la población de *B. hyodysenteriae* del presente estudio tuvo un valor de 0,990 (cuando se consideraron las 10 STs) y de 0,786 (cuando se consideró el número total de aislados). En ambos casos, se detectó la presencia

de un claro desequilibrio de ligamiento, ya que los valores fueron significativamente diferentes de cero (p = 0,001).

El dendrograma de la figura 2 nos muestra la distancia genética entre las 10 STs descritas para los aislados de España y Portugal. Teniendo en cuenta valores de "bootstrap" superiores al 80 %, los aislados fueron agrupados en tres grupos principales de descendencia. Las ST67, 70 y 73 (que incluyeron 8 aislados) fueron incluidos en el grupo I, las ST8, 69 y 71 (34 aislados) se incluyeron en el grupo II y las ST52, 68 y 72 (nueve aislados) formaron el grupo III. La ST54 incluyó al aislado H76 que presentó la mayor distancia genética respecto al resto de los aislados, mientras que las STs menos distantes fueron la ST52 y 72 que se diferenciaron en un único nucleótido en toda la longitud considerada (localizado en el gen *pgm*). Se identificaron cinco STs que sólo incluyeron un aislado (ST54, 67, 68, 69 y 72), uno de ellos fue el aislado portugués H32. Las cepas fueron moderadamente heterogéneas (Índice de diversidad = 0,768). En general, el número de cepas en una ST varió entre 1 y 21 (ST8) y el número de aislados en un AAT varió de 1 a 22 (AAT8) (Tablas 1 y 3).

Los aislados de cuatro de las 10 STs (ST8, 52, 71 y 73, que incluyeron el 87 % de los aislados de la población) se obtuvieron de granjas porcinas distribuidas por todo el país (Figura 1). Dos cepas de la misma granja (J) presentaron diferentes perfiles alélicos, mientras que en las otras cuatro granjas en las que se analizaron más de un aislado éstos siempre fueron idénticos para todos los genes. En varios casos, aislados obtenidos de cerdo ibérico y de cerdo blanco mostraron el mismo genotipo multilocus (ST8 y 71). Otras tres STs incluyeron más de un aislado (ST52, 70 y 73) pero todos ellos obtenidos de cerdos blancos que padecían DP.

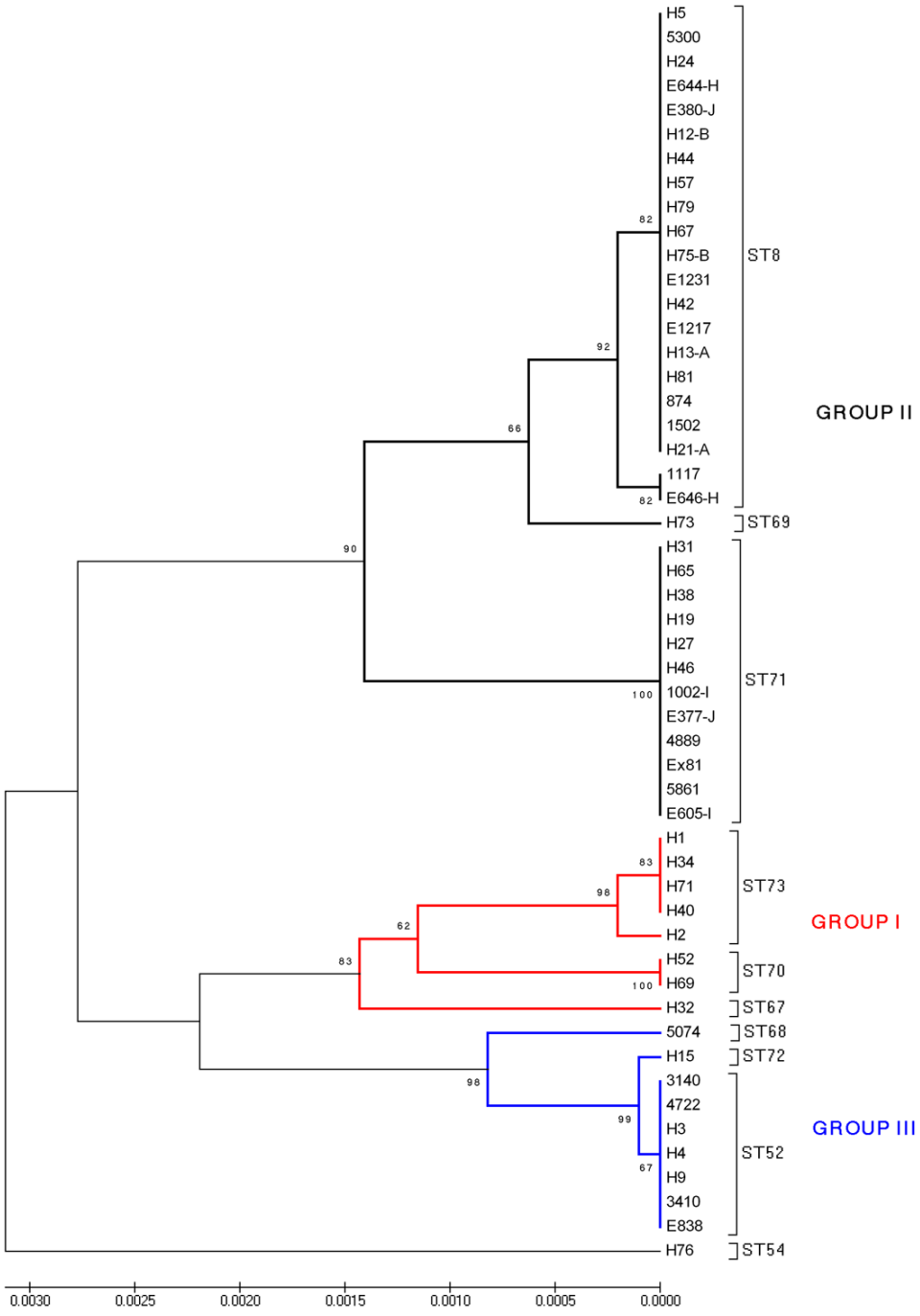

Figura 2 Dendrograma basado en las secuencias nucleotídicas concatenadas de 52 aislados de *B. hyodysenteriae* de los *loci pgm*, *adh*, *alp*, *est*, *glp*K, *gdh* y *thi* (5.265 nucleótidos). Los valores de "bootstrap" se muestran en los nodos de la figura. La longitud de dos espacios en la escala indica una distancia de 5 sustituciones en el total de la secuencia considerada. Los tres principales grupos de descendencia están marcados en diferentes colores. Las ST8, 52 y 54 se han descrito anteriormente [1, 18]

Tabla 3 Frecuencia y principales características de los distintos genotipos multilocus o STs obtenidos para los 52 aislados de *B. hyodysenteriae* incluidos en el presente estudio

	Aislados	% de población	Granjas	CC.AA.	Años	Provincias
ST8*	21	41,4	18	8	5	13
ST71	12	23,1	11	6	4	8
ST52*	7	13,4	7	4	5	5
ST73	5	9,6	5	2	2	2
ST70	2	3,8	2	1	1	1
ST54	1	1,9	1	1	1	1
ST67	1	1,9	1	1	1	1
ST68	1	1,9	1	1	1	1
ST69	1	1,9	1	1	1	1
ST72	1	1,9	1	1	1	1

* STs presentes en otros países

Análisis de la población global

Considerando la población mundial formada por 163 aislados y cepas de referencia, el número de alelos por *locus* osciló entre 9 (*adh*) y 21 (*gdh*), con una media de 16,9. Esto implica que el número máximo teórico de perfiles alélicos distintos posibles es muy alto [entre 9^7 y 21^7]. Por tanto, es improbable que dos cepas de *B. hyodysenteriae* no relacionadas entre sí pudieran exhibir el mismo perfil alélico sólo por azar. En total se describieron 73 STs y 48 AATs. El número de cepas que incluyó una ST varió de 1 a 22, mientras que en un mismo AAT se incluyeron de 1 a 23 aislados. Basándose en el número de aislados la población tenía un valor del índice de asociación (I_A) de 1,050, mientras que en base al número de STs el I_A fue de 0,175. En ambos análisis se detectó la presencia de un claro desequilibrio de ligamiento (p = 0,001). La diversidad genética de la población fue alta, con un valor del índice de diversidad de 0,965.

Las relaciones genéticas existentes entre las 73 STs descritas para la población mundial de *B. hyodysenteriae* se pueden apreciar en la figura 3. La información sobre los aislados y

STs/AATs a que pertenecen se resume en la tabla 2. La mayoría de las STs (n = 65, 89 %) y el 71,8 % de todos los aislados (n = 117) de la población estudiada fueron agrupados en un gran grupo que se muestra en la parte superior del dendrograma, con las otras ocho STs (de origen inglés y australiano) comprendiendo generalmente un único aislado (excepto la ST64), que fueron dispuestas por separado con un porcentaje de sustituciones nucleotídicas de más del 1 % en comparación con el resto de las STs. El grupo que incluyó las ST61 - ST65 estuvo formado por aislados recientes todos ellos originarios de Australia Occidental.

Los 82 aislados de origen australiano fueron divididos en 46 STs y representaron genotipos únicos en la población. Dos de las STs más prevalentes en España (la ST8 con 21 aislados y la ST52 con 7 aislados) ya habían sido previamente descritas para otros aislados de origen europeo. La ST54 (Que contiene el aislado H76) fue compartida con la cepa de referencia $B204^{R}$. El resto de las STs de aislados de este estudio no habían sido descritas previamente. La ST8 incluyó a 21 aislados españoles obtenidos de 18 granjas porcinas ubicadas en ocho comunidades autónomas diferentes y al aislado E2 del Reino Unido (Resistente a la tiamulina) [29]. Esta ST quedó englobada en el mismo complejo clonal (Cc1) que la cepa P134/99 del Reino Unido (ST7; con secuencia atípica del ADNr 23S) [3] y que el aislado H73 (ST69; España). La ST52 incluyó siete aislados españoles de siete granjas ubicadas en cuatro regiones diferentes junto con dos aislados alemanes A5677/96 y T20 (Indol negativos) y el aislado belga Be45 [12, 33]. Esta ST quedó englobada en el mismo complejo clonal que el aislado alemán T4 (Indol negativo) [1]. El resto de aislados europeos analizados pertenecieron a genotipos no identificados en España.

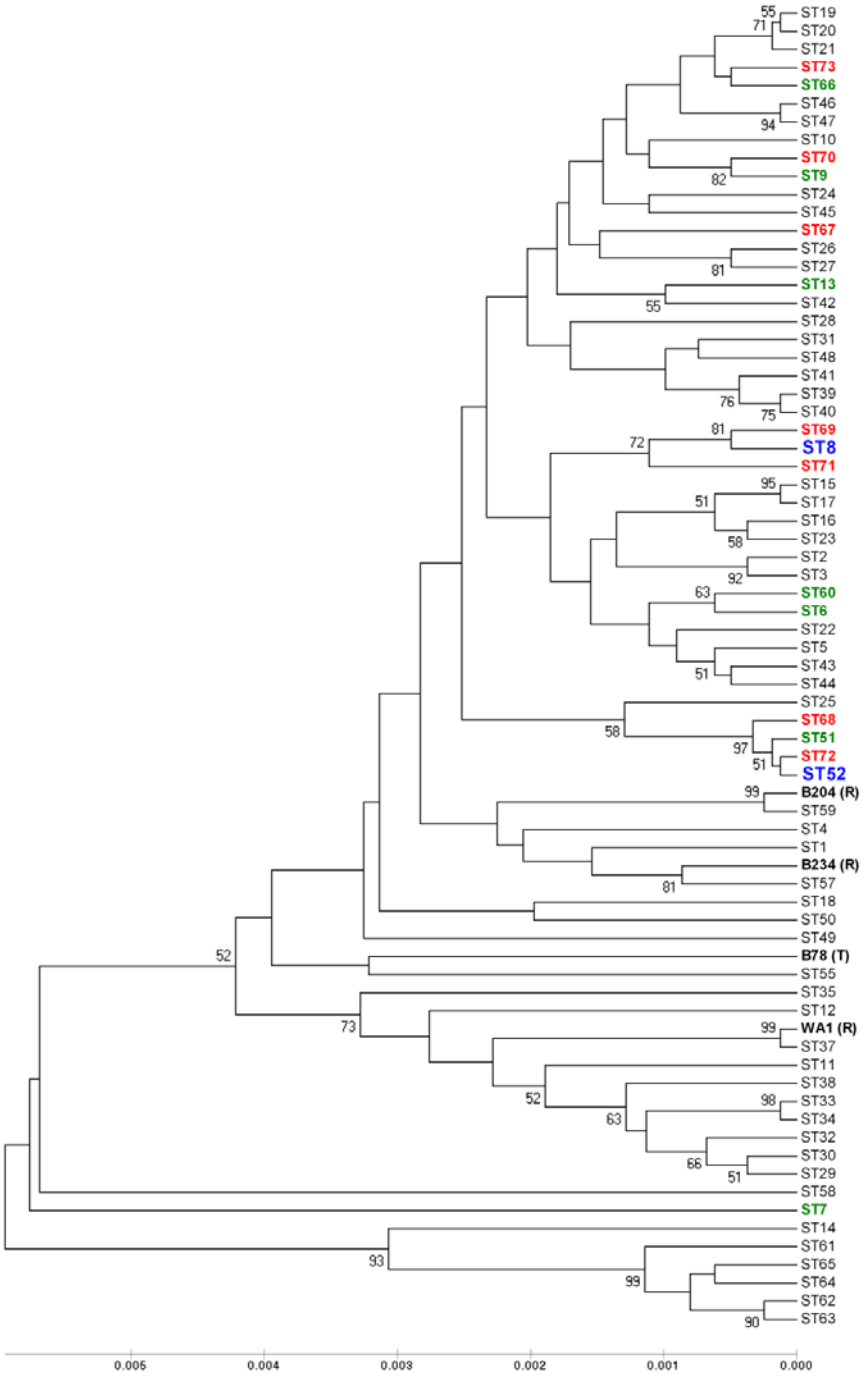

Figura 3 Dendrograma basado en las secuencias nucleotídicas concatenadas de una población de 163 aislados divididos en 73 STs de *B. hyodysenteriae* de los *loci pgm*, *adh*, *alp*, *est*, *glp*K, *gdh* y *thi* (4.071 nucleótidos). Los valores de "bootstrap" se muestran en los nodos de la figura. La longitud de un espacio en la escala indica una distancia de 4 sustituciones en el total de la secuencia considerada. Las STs del presente estudio están indicadas en color rojo, los clones internacionales en azul, las cepas tipo/referencia en negrita y los restantes aislados de origen europeo en verde

Las relaciones existentes entre los 48 AATs descritos para el total de la población de 163 aislados de *B. hyodysenteriae* pueden apreciarse en la figura 4. La mayoría de los AATs de la población (n = 33; 69 %) se agrupan en un grupo mayoritario que engloba 132 aislados (80,9 % de la población) y que aparece en la parte superior de la figura 4. Los 2 grupos más distantes de los aislados españoles están formados por 30 aislados de origen australiano y solo uno de origen europeo (ST58; Reino Unido).

Con el objetivo de identificación de linajes o complejos clonales se llevó a cabo el análisis BURST para un total de 73 STs obtenidas a partir de los 163 aislados de *B. hyodysenteriae* (Figura 5). Se identificaron once complejos clonales que incluyeron un total de 100 de los 163 aislados analizados (61,3 %). Los complejos clonales incluyeron entre 2 y 10 STs y entre 2 y 26 aislados. De los 11 grupos clonales, solamente 2, los grupos clonales 1 y 2, mostraron relación clonal entre nuestros aislados y aislados previamente analizados por MLST y han sido denominados como Cc1 y Cc2 en la figura 5. Los 9 complejos restantes estuvieron formados en su mayoría por aislados australianos. El Cc1 incluyó un total de 24 aislados de dos países, 22 de España y 2 del Reino Unido, mientras que el complejo clonal 2 incluyó un total de 11 aislados de 3 países (7 españoles, 3 alemanes y 1 belga) y, por lo tanto, muy probablemente relacionados desde el punto de vista epidemiológico. Estos aislados aparecen conectados epidemiológicamente aunque procedieron de granjas diferentes, de varios países y obtenidos con un intervalo de tiempo de hasta 20 años. El Cc2 contiene tres cepas procedentes de Alemania y una de Bélgica, todas ellas con la característica fenotípica poco común de ser indol negativas y que en un trabajo anterior fueron consideradas como aislados relacionados en base a los resultados de PFGE [12].

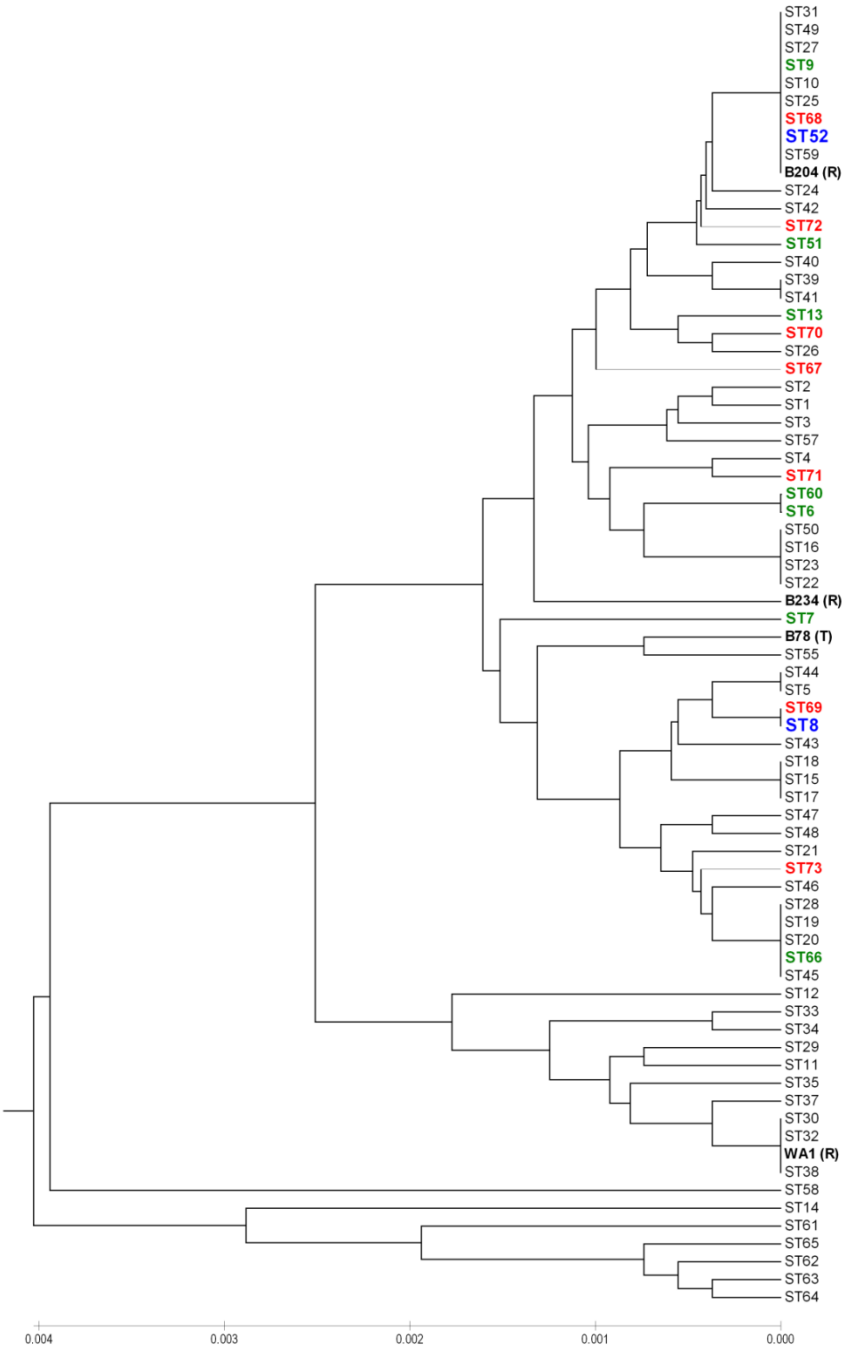

Figura 4 Dendrograma basado en las secuencias aminoacídicas concatenadas de una población de 163 aislados divididos en 48 AATs de *B. hyodysenteriae* de los *loci pgm*, *adh*, *alp*, *est*, *glp*K, *gdh* y *thi* (1.357 aminoácidos). Una longitud de un espacio en la escala indica una distancia de aproximadamente 1,3 sustituciones en el total de la secuencia peptídica considerada. Las STs del presente estudio están indicadas en color rojo, los clones internacionales en azul, las cepas tipo/referencia en negrita y los restantes aislados de origen europeo en verde

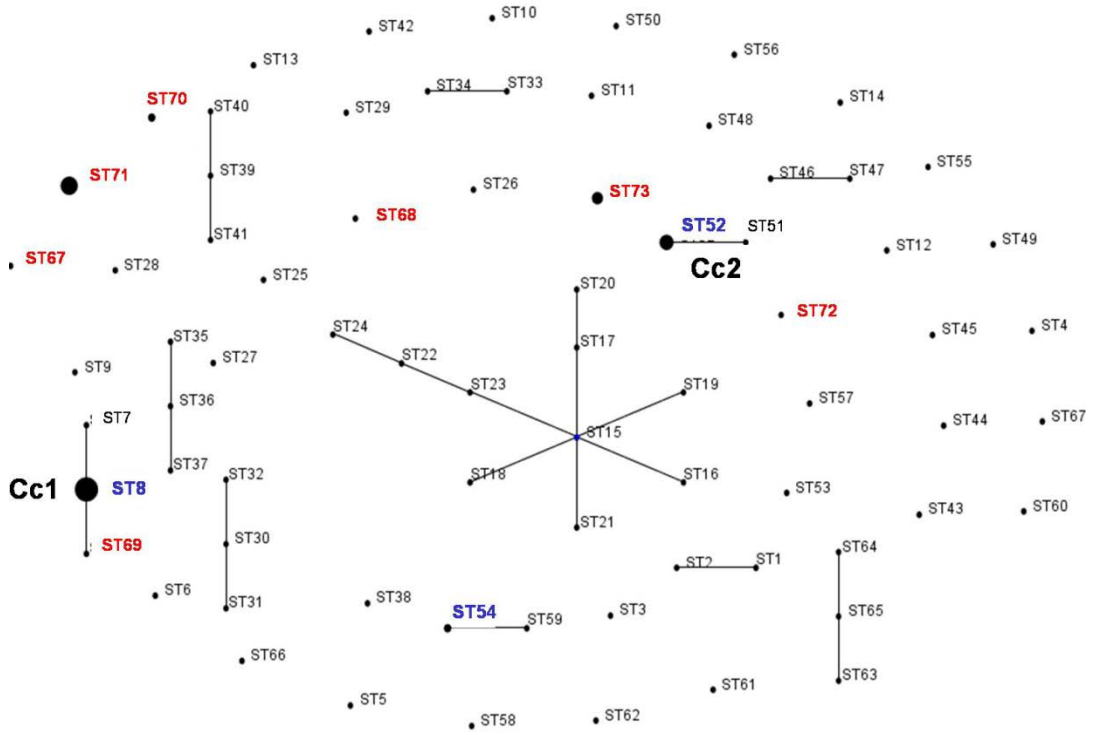

Figura 5 Diagrama obtenido mediante análisis BURST de una población de 163 aislados de *B. hyodysenteriae* divididos en 73 secuencias tipo (STs) empleando la información de las secuencias nucleotídicas de 7 *loci* (*pgm*, *adh*, *alp*, *est*, *glp*K, *gdh* y *thi*). Los aislados que fueron idénticos para al menos 6 de los 7 *loci* en estudio se incluyeron en el mismo grupo y se representa por una línea entre ellos. El diámetro del punto es proporcional a la cantidad de aislados incluidos en la ST. La posición y la distancia entre dos puntos son fortuitas y no aportan información adicional. Se indican los dos complejos clonales que incluyen cepas españolas, con las siete STs de nueva descripción marcadas en rojo y las otras tres en azul

En la representación empleando la información aminoacídica en vez de nucleotídica se observó un aumento claro en el número de aislados emparentados (Figura 6). Se observaron un total de 6 grupos clonales que incluyeron un total de 147 de los 162 aislados analizados (90,7 %). De los 6 grupos de aislados detectados mediante BURST, cabe destacar un grupo principal, formados por 2 subgrupos relacionados.

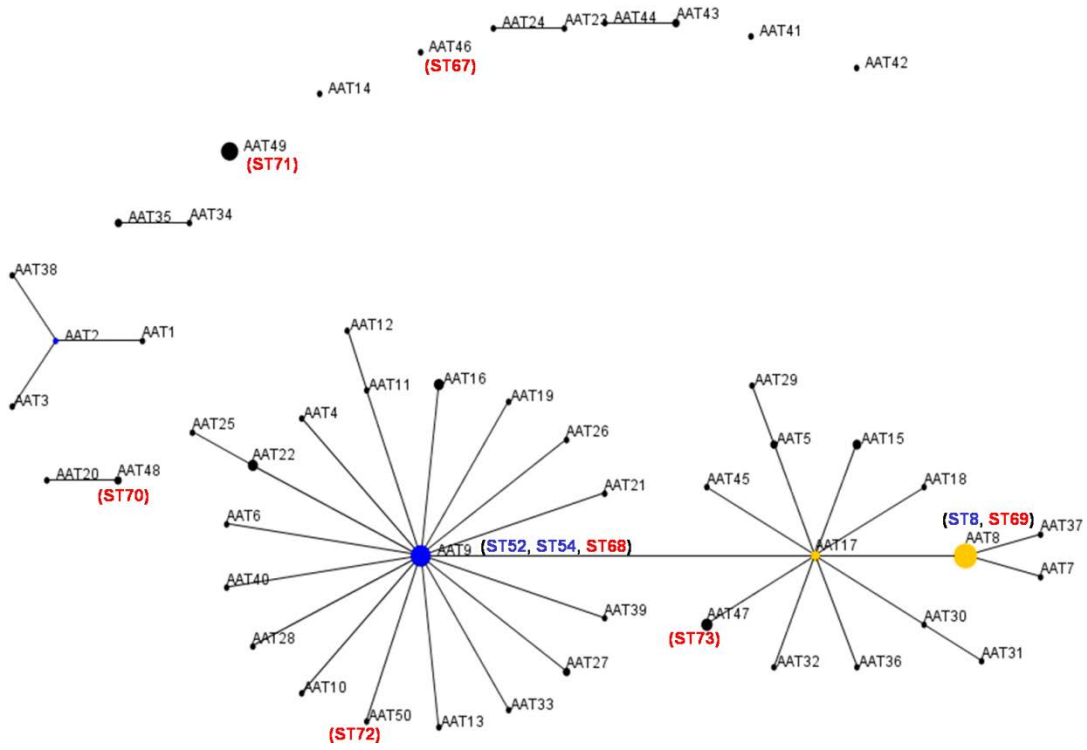

Figura 6 Diagrama obtenido mediante análisis BURST de una población de 163 aislados de *B. hyodysenteriae* divididos en 48 tipos aminoacídicos (AATs) empleando la información de la traducción de las secuencias nucleotídicas de 7 *loci* (*pgm*, *adh*, *alp*, *est*, *glp*K, *gdh* y *thi*). Los aislados que fueron idénticos para al menos 6 de los 7 *loci* en estudio se incluyeron en el mismo grupo y se representa por una línea entre ellos. Se indica entre paréntesis la posición de las secuencias tipo (STs) de este estudio. El diámetro del punto es proporcional a la cantidad de aislados incluidos en el AAT. La posición y la distancia entre dos puntos son fortuitas y no aportan información adicional

Este grupo principal englobó a 32 de los 48 AATs de la población (66,7 %) y a 122 de los 162 aislados (75,3 %). El subgrupo mayoritario, cuyo miembro fundador fue el AAT9, englobó a 62 aislados de 19 AATs, mientras que el subgrupo minoritario, cuyo miembro fundador fue el AAT17, englobó a 60 aislados de 13 AATs. Hubo otros cuatro grupos que contienen dos AATs, uno que contiene 4 AATs mientras que solo 5 AATs quedaron sin emparentar (uno de ello incluyó sólo aislados españoles y otro incluyó al aislado portugués). Treinta y seis de los aislados españoles (69,2 %) se agruparon en el grupo

mayoritario, incluyendo aislados de 10 de las 15 comunidades autónomas (66,6 %) y de 18 de las 48 provincias (37,5 %). El fenotipo fundador AAT9 fue compartido por 22 aislados de 10 STs, de los cuales 9 aislados fueron españoles (ST52, 54 y 68), 5 fueron aislados australianos, 2 suecos (incluido uno obtenido de un ratón), 2 alemanes, uno belga, uno británico, uno canadiense y la cepa B204^{R}.

Discusión

Este estudio se realizó con el objetivo de utilizar la técnica de MLST para analizar la diversidad genética y las relaciones existentes entre una población representativa de aislados españoles de *B. hyodysenteriae* de origen porcino. Con el objetivo de tener una visión más global se incluyeron también en el estudio los datos de MLST de aislados de otros países y continentes previamente analizados y disponibles de modo gratuito en Internet. Al disponer de los datos de un elevado número de aislados y llevando a cabo una comparación de las diferencias alélicas en cada *locus*, hemos podido desarrollar un análisis detallado de la población mundial.

Los resultados de un estudio anterior que empleó la técnica de MLEE señalan que *B. hyodysenteriae* es una especie recombinante, con una estructura poblacional epidémica [14]. Por otro lado, un trabajo previo que empleó la técnica de MLST [18] sugiere que la población de *B. hyodysenteriare* (mayoritariamente formada por aislados australianos) es de tipo clonal. En el presente trabajo, los valores obtenidos del índice de asociación de los aislados españoles y de la población global fueron significativamente diferentes de cero independientemente de si calculó sobre el número de cepas o sobre el número de STs, lo cual es indicador de que la población de *B. hyodysenteriae* es clonal. Los datos de MLST analizados en este estudio corresponden a una población formada por aislados de origen

australiano (50,3 %), de origen europeo (43,6 %) y de origen americano (6,1 %). Además, los aislados analizados se obtuvieron de un intervalo de tiempo de hasta 30 años de diferencia.

El análisis de una colección representativa de aislados españoles de *B. hyodysenteriae* ha puesto de manifiesto la existencia de una ST predominante y con una amplia difusión en nuestro país (ST8). Este grupo clonal estable incluyó a 21 aislados obtenidos de granjas porcinas con problemas de disentería de 8 comunidades autónomas diferentes y muestreadas entre el año 2001 y 2007. La población analizada de aislados de *B. hyodysenteriae* fue moderadamente diversa, con los 52 aislados divididos en 10 STs, en tres grupos principales de descendencia. El hecho de que no haya cepas españolas que difieran entre sí en todos los *loci* demuestra que no existe una gran divergencia entre los grupos principales de cepas. Las diferencias nucleotídicas detectadas entre las cepas españolas expresadas en porcentaje no fueron mayores del 0,5 %, lo que implica un total de 21 cambios sobre un total de 4.071 nucleótidos. 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 las 10 STs de este estudio no divergieron hace mucho tiempo.

Aparte del aislado español H76 (ST54) que fue idéntico a la cepa de referencia $B204^{R}$ de los EE.UU., ninguno de los aislados españoles fue idéntico a ninguno del gran número de cepas de Australia y América del Norte analizadas. Por otro lado, dos de las tres STs predominantes en España habían sido descritas con anterioridad en otros países europeos [1, 18] y, probablemente, se han extendido por diferentes países como resultado del comercio regular de cerdos dentro de Europa (Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). Esta ST8 resultó ser idéntica mediante el protocolo de MLST

empleado a un aislado procedente de granjas del sudeste de Inglaterra con problemas de DP denominado E2. Se trata de un aislado de *B. hyodysenteriae* que había sido previamente analizado mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) debido a que presentó una sensibilidad reducida a la tiamulina empleada comúnmente en Inglaterra para el tratamiento de la DP [29]. E2 y 6 aislados más obtenidos entre 1997 - 1998 de granjas de Inglaterra, pertenecieron al mismo patrón de PFGE (patrón G) lo que indica que pertenecían a un único clon. En un estudio previo de estos aislados se pudo comprobar que al menos entre 4 de las granjas de origen de dichos aislados había habido intercambio de cerdos [30] y cinco de las cepas fueron resistentes a tiamulina. ST8 también estaba muy extendida en España (Figura 1) y varias de las 18 granjas españolas donde se identificó tenían conexiones. La mayoría de estos aislamientos fueron recuperados de cerdos blancos comerciales, pero cinco lo fueron de cerdo ibérico. Algunas de las cepas españolas de la ST8 se han testado para la susceptibilidad a la tiamulina y se ha comprobado que tres de ellas fueron resistentes y tres susceptibles. También se ha comprobado que la resistencia que presenta este clon frente a la tiamulina es estable y no se ha perdido desde 1998 pese a la congelación-descongelación repetida y los continuados subcultivos en el laboratorio. El grado real de propagación que ha podido tener este clon desde 1998 es desconocido y debería ser evaluado. Considerando que la tiamulina es uno de los pocos antimicrobianos que se emplean tanto en España como en Inglaterra y otros muchos otros países para el tratamiento de la DP, este clon encontraría una situación ambiental favorable para su diseminación y es preocupante que este clon (y otros clones resistentes a la tiamulina) puedan ser seleccionados por el uso de este antimicrobiano y, por tanto, con mayor capacidad para ser transmitidos.

Otra de las STs de mayor prevalencia en España fue la ST52 (Figura 2) que incluyó un total de 7 aislados y fue detectada en granjas de 4 comunidades autónomas del norte de España (Figura 1) entre 2001 y 2007. Hemos detectado mediante MLST que estos aislados son clones de aislados procedentes de granjas porcinas del nordeste de Alemania (T4 y T20, ambos indol negativos) y Bélgica (Be45) con problemas de disentería [1, 12]. Los aislados T4 y T20 habían sido previamente analizados con PFGE e incluidos en el patrón C, que a su vez incluyó otros 5 aislados más, todos ellos procedentes de granjas porcinas alemanas con problemas de disentería entre los años 1998 - 2001 y con sensibilidad reducida a la tiamulina. Al menos 3 de los aislados españoles de la ST52 fueron indol negativos [9]. Este genotipo en cambio no fue detectado en aislados procedentes de granjas porcinas de cerdo ibérico.

No se detectó en este estudio la presencia en España de más aislados que previamente hayan sido descritos en otros países europeos, ahora bien, el número de aislados analizados hasta ahora es escaso y se obtendrá mucha más información a medida que se vayan añadiendo los datos de más aislados de diferentes países a la base de datos de MLST.

Para las cinco granjas españolas en que se examinaron dos aislados de cada una de ellas se vio que sólo las dos cepas de la granja J, obtenidas en un muestreo simultáneo, pertenecían a diferentes STs (ST8 y 68, tabla 1). El análisis BURST indicó que estas dos STs no pertenecen al mismo complejo clonal, lo que confirma que cepas genéticamente distintas estaban presentes en la misma granja. Esto es un hecho importante dado que las diferentes cepas pueden variar en sus propiedades como, por ejemplo, en cuanto a la resistencia a los antimicrobianos y esto podría influir en el éxito de los programas de control. Del mismo modo, cuando diferentes cepas coexisten en una misma granja aumenta,

al menos en teoría, la posibilidad de intercambio de información genética entre ellas a través del profago VSH-1 [31, 32].

Un dato interesante fue observar que los aislados de las ST8 y ST71 fueron obtenidos tanto de cerdos de raza blanca como de cerdos ibéricos. Es sabido que el movimiento de animales entre estos tipos de explotaciones porcinas es raro lo que implica que ha debido de haber trasmisión de la espiroqueta por otras vías que no sea a través del intercambio de ganado. De hecho, ha sido descrito que las espiroquetas intestinales pueden ser transmitidas por otros medios, tales como el transporte mecánico por medio de las aves migratorias, los roedores, los camiones de trasporte de alimento o de animales, el personal de las granjas o los visitantes [5].

A nivel mundial, el dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre los 163 aislados (Figura 3) confirmó las observaciones previas de que la especie es muy diversa [13, 14, 18]. Había un grupo mayoritario que englobó a 65 STs, con el resto de las STs en la periferia del dendrograma y conteniendo aislados principalmente de origen australiano que están bastante alejados de los aislados europeos. Es de suponer que estas cepas australianas hayan evolucionado en aislamiento en aquel país y no se hayan transmitido a otros países. El grupo principal incluyó aislados obtenidos en las últimas décadas y en países diferentes, incluyendo la mayoría de los aislados europeos.

El análisis de los AATs reveló que la mayoría de los aislados (75,3 %) pertenecían a un grupo principal, con el AAT9 en el centro (Figura 5). La mayoría de los aislados españoles (69,2 %) también pertenecía a ese grupo mayoritario. El fenotipo AAT9 fue compartido por cepas de diferentes países, entre ellos nueve aislados de España, e incluso incluye un aislado obtenido de un pato y otro de un ratón. Como se ha descrito anteriormente [18], parece probable que el AAT9 represente un tipo ancestral del que habrían surgido en la

evolución de la especie los otros AATs (y STs) mediante mutaciones puntuales o cambios genéticos de otra índole (ej.: deriva génica).

El empleo de la información aminoacídica en vez de nucleotídica ha permitido una identificación más clara de las cepas que estaban estrechamente relacionadas, independientemente de su lugar de aislamiento. Ello ha dado lugar a un mayor agrupamiento de los aislados cuando se emplea la información aminoacídica lo que sugiere que hay una selección negativa sobre los cambios nucleótidos que dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos que puedan interferir con la función enzimática de rutas metabólicas que son claves para la bacteria. En general, el uso de las secuencias de aminoácidos ha ayudado a definir más claramente la especie y sus límites, a la vez que la organización de los aislados en complejos clonales hace que los datos de MLST sean más adecuados para el análisis epidemiológico.

Repercusiones

Este estudio ha sido capaz de demostrar que el análisis MLST es un método robusto e ideal para caracterizar y comparar cepas de *B. hyodysenteriae* de diferentes países. Mediante el empleo de MLST se ha podido evidenciar que cepas estrechamente relacionadas o grupos clonales de la espiroqueta estaban presentes en granjas de cerdos distribuidas por toda la geografía de nuestro país, así como en algunos otros países europeos. Es por ello que la técnica de MLST puede ser recomendada como una herramienta de tipificación molecular rutinaria de aislados de *B. hyodysenteriae* que permite llevar a cabo comparaciones internacionales de los aislados de modo rápido y sencillo. Esta técnica además permite el análisis de los tipos aminoacídicos lo que parece ser útil como un medio de inferir hipotéticas relaciones ancestrales entre cepas. En términos

generales, este estudio ha contribuido a una mayor comprensión de la dinámica poblacional de *B. hyodysenteriae*, lo que a su vez puede se de ayuda para llevar a cabo intervenciones adecuadas tales como la vigilancia epidemiológica de este patógeno e incluso ser de ayuda en la terapeútica de la enfermedad o para el desarrollo de vacunas eficaces.

Agradecimientos

El autor de este trabajo poseía una beca de investigación FPU (Ministerio de Ciencia e Innovación) lo que le permitió llevar a cabo el análisis MLST durante una estancia en la Universidad de Murdoch. Parte del trabajo realizado en Australia fue subvencionado por fondos del *Pork CRC* (Australian Cooperative Research Centre for an Internationally Competitive Pork Industry).

Referencias bibliográficas

1. Råsbäck T, Johansson K-E, Jansson DS, Fellström C, Alikhani Y et al. (2007) Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes of the genus *Brachyspira*. Microbiology 153: 4074-4087.

2. Hampson .DJ, Atyeo RF, Combs BG (1997) Swine dysentery. *In*: Hampson DJ, Stanton TB. eds. Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans. Wallingford: CAB International. pp 175-209.

3. Thomson JR, Smith WJ, Murray BP, Murray D, Dick JE, Sumption KJ (2001) Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. Anim Health Res Rev 2: 31-36.

4. Carvajal A, de Arriba ML, Rodríguez, Vidal AB, Duhamel GE, Rubio P (2006) Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. Vet Rec 158: 700-701.

5. Hampson DJ (2012) Brachyspiral colitis. *In*: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. eds. Diseases of Swine. Oxford: Wiley-Blackwell pp 680-696.

6. Combs BG, Hampson DJ, Harders SJ (1992) Typing of Australian isolates of *Treponema hyodysenteriae* by serology and by DNA restriction endonuclease analysis. Vet Microbiol 31: 273-285.

7. Harel J, Belanger M, Forget C, Jacques M (1994) Characterisation of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotype 8 and 9 from Quebec by restriction endonuclease fingerprinting and ribotyping. Can J Vet Res 58: 302-305.

8. Dugourd D, Jacques M, Bigras-Poulin M, Harel J (1996) Characterisation of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serogroups 8 and 9 by random amplification of polymorphic DNA analysis. Vet Microbiol 48: 305-314.

9. Hidalgo Á, Carvajal A, Pringle M, Rubio P, Fellström C (2010) Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. Epidemiol Infect 138: 76-85.

10. Fisher LN, Mathiesen MR, Duhamel GE (1997) Restriction fragment length polymorphism of the periplasmic flagellar flaA1 gene of *Serpulina* species. Clin Diagn Lab Immunol 4: 681-686.

11. Atyeo RF, Oxberry SL, Hampson DJ (1999) Analysis of *Serpulina hyodysenteriae* strain variation and its molecular epidemiology using pulsed-field gel electrophoresis. Epidemiol Infect 123: 133-138.

12. Fellström C, Karlsson M, Pettersson B, Zimmerman U, Gunnarsson A, Aspan A (1999) Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*. Vet Microbiol 70: 225-238.

13. Lee JI, Hampson DJ, Combs BG, Lymbery AJ (1993) Genetic relationships between isolates of *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*, and comparison of methods for their subspecific differentiation. Vet Microbiol 34: 35-46.

14. Trott DJ, Oxberry SL, Hampson DJ (1997) Evidence for *Serpulina hyodysenteriae* being recombinant, with an epidemic population structure. Microbiology 143: 3357-3365.

15. Hidalgo Á, Carvajal A, La T, Naharro G, Rubio P, et al. (2010) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of the swine dysentery pathogen, *Brachyspira hyodysenteriae*. J Clin Microbiol 48: 2859-2865.

16. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE et al. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3140-3145.

17. Urwin R, Maiden MC (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 11: 479-487.

18. La T, Phillips ND, Harland BL, Wanchanthuek P, Bellgard MI, Hampson DJ (2009) Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet Microbiol 138: 330-338.

19. Leser TD, Möller K, Jensen TK, Jorsal SE (1997) Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. Mol Cell Probes 11: 363-372.

20. Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. EMBNEW NEWS 4: 14.

21. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 41: 95-98.

22. Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC (2001) Sequence type analysis and recombinational tests (START). Bioinformatics 17: 1230-1231.

23. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol 186: 1518-30.

24. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG (1993) How clonal are bacteria? Proc Natl Acad Sci USA 90: 4384-4388.

25. Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 26: 2465-2466.

26. Phillips ND, La T, Amin MM, Hampson DJ (2010) *Brachyspira intermedia* strain diversity and relationships to the other indole-positive *Brachyspira* species. Vet Microbiol 143: 246-254.

27. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948.

28. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596-1599.

29. Karlsson M, Aspán A, Landén A, Franklin A (2004) Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. J Med Microbiol 53: 281-285.

30. Gresham AC, Hunt BW, Dalziel RW (1998) Treatment of swine dysentery: problems of antibiotic resistance and concurrent salmonellosis. Vet Rec 143: 619.

31. Matson EG, Thompson MG, Humphrey SB, Zuerner RL, Stanton TB (2005) Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae*. J Bacteriol 187: 5885-5892.

32. Stanton TB, Humphrey SB, Sharma VK, Zuerner RL (2008) Collateral effects of antibiotics - carbadox and metronidazole induce VSH-1 and facilitate gene transfer among *Brachyspira hyodysenteriae* strains. Appl Environ Microbiol 74: 2950-2956.

33. Fellström C, Holmgren N (2005) Mice as reservoirs for swine dysentery in a fattening herd. Sv VetTidn 13, 19-21.