

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Brachyspira pilosicoli* AISLADAS A PARTIR DE PONEDORAS COMERCIALES EN COLOMBIA

Álvarez DM¹, Pulido M², Figueroa J³

Posgrado en Salud Animal, línea microbiología y eppidemiología enfermedades aviarias,
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

Las espiroquetas intestinales del género *Brachyspira* ocasionan enfermedades importantes en porcinos y aves. Se ha evidenciado un problema de incremento en la presentación de cepas resistentes a los antimicrobianos utilizados normalmente para tratar las espiroquetosis intestinales en porcinos, y esto podría ser aplicable a los aislamientos de aves. Hay muy pocos reportes de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Brachyspira* spp. aisladas en aves. En este estudio se evaluó la sensibilidad de doce aislamientos de *Brachyspira pilosicoli* obtenidos de granjas de ponedoras comerciales a los agentes antimicrobianos tiamulina, tilosina y lincomicina, y se estableció la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de dilución en agar. Todas las bacterias analizadas fueron sensibles a tiamulina (CMI $\leq 0,1$ $\mu\text{g/ml}$) y lincomicina (CMI 1 $\mu\text{g/ml}$) y resistentes a tilosina (CMI 5 $\mu\text{g/ml}$).

Palabras clave: *Brachyspira*, ponedoras comerciales, CMI, dilución en agar, tiamulina, tilosina, lincomicina.

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST IN *Brachyspira pilosicoli* STRAINS ISOLATED FROM COMMERCIAL LAYERS FARMS IN COLOMBIA

ABSTRACT

Intestinal Spirochaetes of the genus *Brachyspira* cause important diseases in swine and poultry. An increasing problem in the presentation of resistant strains to the antimicrobial drugs usually used to treat the intestinal spirochaetosis in swine has been evidenced and this could be applicable to the isolations from poultry. There are very few reports of *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* spp. isolated from birds. In this study the antimicrobial susceptibility of twelve *Brachyspira pilosicoli* isolates obtain from commercial layers was evaluated against tiamulin, tylosin and lincomycin establishing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by agar dilution technique. All bacteria analyzed were sensitive to tiamulin (MIC $\leq 0,1$ $\mu\text{g/ml}$), and lincomycin (MIC 1 $\mu\text{g/ml}$) and resistant to tylosin (MIC 5 $\mu\text{g/ml}$).

Key words: *Brachyspira*, commercial layers, MIC, agar dilution, tiamulin, tylosin, lincomycin.

1 dmalvarezm@unal.edu.co

2 mpulidola@unal.edu.co

3 jfigueroaa@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Las espiroquetas intestinales anaerobias del género *Brachyspira* incluyen una gran variedad de especies patógenas importantes, particularmente las que infectan a porcinos y aves. En porcinos las dos enfermedades más comunes asociadas con estas espiroquetas son la disentería porcina causada por *Brachyspira hyodysenteriae* (1) y la espiroquetosis intestinal porcina causada por *Brachyspira pilosicoli* (2). En aves de corral, la espiroquetosis intestinal aviar (EIA) se caracteriza por signos como disminución en la producción de huevos, y diarrea o heces húmedas (3, 4, 5) y es ocasionada por una o más *Brachyspira* spp., pero se destacan *Brachyspira intermedia* y *Brachyspira pilosicoli* (6). Estos agentes ocasionan grandes pérdidas económicas en las industrias porcina y avícola (7-9).

El diagnóstico microbiológico de EIA requiere el aislamiento de la espiroqueta y su identificación a través de pruebas bioquímicas. Este microorganismo tiene requerimientos de cultivo exigentes, es de crecimiento lento y de difícil identificación ya que las diferencias fenotípicas entre varias especies de espiroquetas intestinales aviares son inconsistentes y por lo tanto no brindan la posibilidad de realizar un diagnóstico específico (10, 11, 12). Por consiguiente se han desarrollado diferentes técnicas de reacción en cadena por la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) y de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP - PCR, por su sigla en inglés) para identificar estas espiroquetas de una manera rápida, sensible y específica. Los genes utilizados comúnmente como blanco de amplificación en estas pruebas son 16S ARNr, 23S ARNr y NADH oxidasa *nox* (10, 13, 14).

Debido a la ausencia de vacunas comerciales, el control y tratamiento de estas enfermedades involucra el uso de antimicrobianos. Los medicamentos usados más comúnmente para el tratamiento de las espiroquetosis intestinales en porcinos son las pleuromutilinas (tiamulina, valnemulina), el macrólido tilosina y la lincosamida lincomicina (9, 15, 16, 17). Sin embargo, recientemente en Alemania, Australia, Finlandia, Hungría, Reino Unido, República Checa, Suecia y otros países se ha reportado una disminución a través del tiempo en la sensibilidad de *B. hyodysenteriae* y en algunas ocasiones de *B. pilosicoli* a tiamulina (18-21). De igual forma, altos niveles de resistencia (89-100%) a tilosina y lincomicina se han reportado en muchos países (15). La alta resistencia a tilosina no es sorprendente en vista de la alta presión selectiva que se realiza con el uso frecuente de este medicamento como agente terapéutico y como promotor de crecimiento en la producción porcina (15, 19). Además la resistencia a tilosina puede desarrollarse *in vitro* en 2 semanas (16). La resistencia antimicrobiana a macrólidos y lincosamidas en *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* se debe principalmente a mutaciones puntuales en el gen 23S ARNr (18, 22).

En contraste con esta información, hay muy pocos datos de sensibilidad antimicrobiana de *B. pilosicoli* en aves. En escasas ocasiones se llevan a cabo estudios de este tipo ya que el tratamiento en gallinas ponedoras infectadas es problemático debido a los residuos de agentes antimicrobianos en los huevos (15).

Hasta la fecha se han publicado solo dos estudios que evalúan la sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Brachyspira* spp. aisladas de aves, uno en Estados Unidos (23) y otro en Australia (24). En el primer estudio se demostró una alta sensibilidad a

tiamulina, lincomicina y carbadox y resultados altamente variables para clortetraciclina, oxitetraciclina, tilosina, bacitracina, eritromicina, neomicina y penicilina. En el segundo se evaluó un total de 42 aislamientos y se encontró sensibilidad a tiamulina, lincomicina, metronidazol y tetraciclina; sin embargo, a pesar de no ser clasificados como resistentes, algunos de los aislamientos presentaron concentraciones mínimas inhibitorias elevadas para tiamulina (10%), lincomicina (38%), tetraciclina (2%) y ampicilina (14%). También se encontró resistencia del 26% de las cepas a tilosina y 5% a ampicilina. Estos datos sugieren que puede existir resistencia a antimicrobianos comunes por las espiroquetas intestinales obtenidas de ponedoras comerciales, y soportan la necesidad de hacer análisis de sensibilidad a los aislamientos clínicos antes de considerar cualquier tratamiento.

En Colombia la EIA era considerada una enfermedad exótica; sin embargo recientemente se obtuvieron 19 aislamientos de *Brachyspira* spp. de 306 muestras (6,2%) de raspados de mucosa cecal obtenidas de ponedoras comerciales; estas espiroquetas se identificaron en 7 de 34 granjas (20,6%), con signos de disminución de la postura y/o diarrea o gallinaza húmeda, que remitieron aves con fines diagnósticos al Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Nacional de Colombia en el período comprendido entre mayo de 2007 a junio de 2008 (25). A través de la realización de cultivos microbiológicos selectivos, pruebas bioquímicas y de PCR se identificaron 12 aislamientos como *B. pilosicoli* (25).

El objeto del presente estudio fue evaluar la sensibilidad frente a los agentes antimicrobianos usados más comúnmente en el tratamiento de espiroquetosis intestinales de 12 aislamientos de *B. pilosicoli* obtenidos en granjas de ponedoras comerciales en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron 12 cepas de *B. pilosicoli* aisladas en el período de mayo de 2007 a junio de 2008 de 4 granjas de ponedoras comerciales con historia de disminución en la producción de huevos y/o diarrea que manejaban sistemas de encasamiento en piso y semipastoreo, aves de diferentes estirpes marrón y con edades entre 23 y 32 semanas. Todas las cepas se identificaron por pruebas de PCR especie-específica según lo descrito por Phillips *et al.* (12).

Las placas utilizadas en la técnica de dilución en agar se probaron con dos cepas control recomendadas por el Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos (CLSI, por su sigla en inglés) para *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Este último también se incluyó en el análisis como un control con CMI publicadas para pleuromutilinas (21, 26).

PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se realizó el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) por dilución en agar, descrito previamente (24). Las soluciones *stock* se realizaron mezclando los agentes antimicrobianos: tiamulina fumarato hidrogenada (80%) (Novartis Animal Health), clorhidrato de lincomicina (856 u/mg) (Sigma Chemical Company) y tartrato de tilosina (906 mg/g) (Sigma Chemical Company); con agua estéril destilada. De acuerdo con la potencia demostrada, todos los antibióticos se manejaron en un ciento por ciento de base. Estos medicamentos se escogieron debido a que son los agentes antimicrobianos utilizados más comúnmente en el tratamiento de espiroquetosis intestinales en animales de producción.

Las placas de sensibilidad antimicrobiana se realizaron con agar tripticasa de soya

(TSA) suplementado con 5% de sangre de ovino desfibrinada y las concentraciones de agentes antimicrobianos descritos en la tabla 1; como control de crecimiento se utilizó TSA sin agregar antibiótico. Las placas se prepararon el día anterior a su uso y se almacenaron a 4 °C. Antes de ser inoculadas se secaron por 15 minutos a 37 °C para remover la condensación.

Tabla 1. Concentraciones de agentes antimicrobianos utilizadas en el estudio.

| Antimicrobiano | Concentración (µg/ml) | | | | | |
|----------------|-----------------------|-----|----|----|-----|-----|
| | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 | 5 | 10 |
| Tiamulina | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 | 5 | 10 |
| Lincomicina | 1 | 4 | 20 | 36 | 80 | 150 |
| Tilosina | 4 | 5 | 25 | 50 | 100 | 200 |

Se suspendieron bacterias recolectadas de cultivos en agar selectivo TSA durante 5 días en 1 ml de PBS y se contaron en cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fase. Se llevaron a una concentración estándar de 10^5 células por ml y se inocularon 10 µl de esta suspensión en una posición de cada placa incluyendo la placa control. Se permitió que el inóculo se secase antes de incubarlo a 37 °C durante 5 días en una atmósfera anaerobia generada por sobres AnaeroGen (Oxoid®). Se observaron las zonas de hemólisis alrededor del inóculo. Cada aislamiento se sometió a la prueba por duplicado. La CMI fue reportada como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibió crecimiento evidenciado con la presentación de hemólisis. Toda superficie

de crecimiento se examinó en el microscopio de contraste de fase para confirmar la pureza del cultivo y el punto de terminación de la inhibición.

Los datos de puntos de corte utilizados para la interpretación de estas pruebas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Puntos de corte clínicos de CMI para la interpretación de pruebas de sensibilidad antimicrobiana in vitro de *B. hyodysenteriae*.

| Agente antimicrobiano | Sensible | Intermedio | Resistente |
|-----------------------|----------|------------|------------|
| Tiamulina | ≤1 | >1≤4 | >4 |
| Lincomicina | ≤4 | >4≤36 | >36 |
| Tilosina | ≤1 | >1≤4 | >4 |

Fuente: (24).

RESULTADOS

Los valores de CMI de *S. aureus* ATCC 29213 en dilución en agar fueron de 1 a 2 µg/ml para tiamulina, <4 µg/ml para tilosina y 1 µg/ml para lincomicina. Los valores de CMI para *E. coli* ATCC 25922 fueron de 10 µg/ml para tiamulina, 200 µg/ml para tilosina y 150 µg/ml para lincomicina (tabla 3).

El 100% de los aislamientos de *B. pilosicoli* fueron sensibles a tiamulina y lincomicina y resistentes a tilosina. El 67% de los aislamientos presentaron un valor de CMI de 0,1 µg/ml para tiamulina y el 33% restante un valor <0,1 µg/ml. Todos los aislamientos presentaron un valor de CMI para lincomicina de 1 µg/ml y para tilosina de 5 µg/ml (tabla 3).

Tabla 3. Sensibilidad frente a agentes antimicrobianos.

| Granja | Procedencia departamento (municipio) | Edad semanas | Aislamiento | CMI µg/ml | | |
|----------------------|--------------------------------------|--------------|-------------|-----------|----------|-------------|
| | | | | Tiamulina | Tilosina | Lincomicina |
| 1 | Magdalena (Santa Marta) | 28 | 1 | 0,1 | 5 | 1 |
| | | | 2 | 0,1 | 5 | 1 |
| | | | 3 | 0,1 | 5 | 1 |
| | | | 4 | 0,1 | 5 | 1 |
| 2 | Magdalena (Santa Marta) | 23 | 5 | 0,1 | 5 | 1 |
| | | | 6 | 0,1 | 5 | 1 |
| 3 | Santander (Lebrija) | 42 | 7 | 0,1 | 5 | 1 |
| | | | 8 | 0,1 | 5 | 1 |
| | | | 9 | <0,1 | 5 | 1 |
| 4 | Cundinamarca (Tabio) | 32 | 10 | <0,1 | 5 | 1 |
| | | | 11 | <0,1 | 5 | 1 |
| | | | 12 | <0,1 | 5 | 1 |
| Cepas de referencia | | | | | | |
| S. aureus ATCC 29213 | | | | 2(0,5-2) | <4(1-2) | 1 |
| E. coli ATCC 25922 | | | | 10(>2) | 200(>64) | 150 |

() Rangos de referencia.

Fuente: (16).

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la sensibilidad in vitro de aislamientos de *B. pilosicoli* provenientes de ponedoras comerciales frente a los tres agentes antimicrobianos más utilizados para combatir las infecciones ocasionadas por espiroquetas intestinales en animales de producción. Se encontró sensibilidad de la totalidad de los aislamientos evaluados a tiamulina y lincomicina y resistencia a tilosina.

Los datos de puntos de corte utilizados para la interpretación de estas pruebas de sensibilidad fueron los reportados para *B. hyodysenteriae* ya que no hay datos disponibles aceptados en otras especies de *B. brachyspira* (24). Por otra parte, con el método de dilución en agar se obtuvieron datos de sensibilidad de las cepas de referencia *S.*

aureus ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922 que concuerdan con lo reportado por otros autores (19, 26).

Las cepas evaluadas en este estudio demuestran sensibilidad a tiamulina y lincomicina, resultados que concuerdan con lo reportado por Hampson *et al.* (24) en espiroquetas intestinales de aves. Sin embargo, estos autores mencionan que, a pesar de ser catalogados como sensibles, algunos de los microorganismos evaluados presentaron valores de CMI elevados para tiamulina (1-4 µg/ml) y lincomicina (10-50 µg/ml), lo cual no se evidenció en este estudio donde se obtuvieron valores de CMI de 0,1 µg/ml para tiamulina y 1 µg/ml para lincomicina.

Los hallazgos de resistencia a tilosina concuerdan con lo reportado anteriormente por Hampson *et al.* (24) quienes encontraron un 26% de los aislamientos de *B. pilosicoli*

y *B. intermedia* resistentes a este macrólido. Este hallazgo podría estar relacionado con la utilización de este producto para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *Mycoplasma*. Este es un problema de gran ocurrencia en granjas avícolas de ponedoras comerciales y de difícil control, dado el manejo de diferentes edades que se presenta en este tipo de explotaciones. Es posible que la exposición continua a este medicamento permita el desarrollo de resistencia.

En Colombia en algunas ocasiones se da un manejo inadecuado en los programas de prevención y control de la micoplasmosis aviar en las explotaciones de ponedoras comerciales, ya que en algunos casos se administran medicamentos indicados para el tratamiento de *Mycoplasma* en presentación premix cada 6 semanas; medida que solo se recomienda para reproductoras pesadas, debido a que estos productos no se deben usar en aves que produzcan huevos para consumo humano.

Sin embargo, a pesar de que los tres productos evaluados están indicados para uso en el tratamiento de *Mycoplasma*, solamente se encontró resistencia a tilosina, lo que podría sugerir una mayor utilización de este producto en las granjas evaluadas, información no disponible para este trabajo.

De acuerdo con la clasificación de los puntos de corte para tilosina, los aislamientos se clasificaron como resistentes. No obstante, presentaron valores de CMI inferiores a los reportados para cepas resistentes (rango CMI entre 4 y 100 µg/ml) en otros estudios en aves (24) y en porcinos (CMI > 16 µg/ml) (18).

Los valores de CMI obtenidos en los aislamientos analizados para tiamulina y lincomicina sugieren que estos agentes antimicrobianos son efectivos para el tratamiento. Otros estudios han demostrado que estos medicamentos se han usado con éxito para

el control de espiroquetosis intestinal aviar en lotes infectados naturalmente (24, 27).

Es muy importante destacar que esta medicación debe realizarse posteriormente a un análisis detallado de la relación costo-beneficio en el tratamiento de los lotes afectados, ya que durante el mismo no se pueden comercializar los huevos de estos animales para consumo humano. Por tanto es de vital importancia buscar alternativas para combatir esta y otras entidades patógenas de tal modo que no se generen residuos de antimicrobianos en los huevos; sin embargo, todavía hace falta mucha investigación en esta área.

En el mundo se evidencia un fenómeno de emergencia de cepas de *B. hyodysenteriae* resistentes a lincomicina, tilosina y tiamulina (26). Esta situación no se ha reportado en aislamientos en aves debido a que son muy pocos los estudios realizados. De igual forma, hay pocos trabajos en que se evalúe la sensibilidad in vitro en *B. pilosicoli* (18). Es necesario realizar más investigaciones con el fin de tener una mejor aproximación a la situación de sensibilidad a antimicrobianos para *Brachyspira* spp. diferentes a *B. hyodysenteriae* y de espiroquetas aisladas en otras especies animales.

CONCLUSIONES

Todos los aislamientos de *B. pilosicoli* que se sometieron a pruebas de sensibilidad antimicrobiana fueron sensibles a tiamulina y lincomicina y resistentes a tilosina. Esto sugiere los dos primeros medicamentos como posibles candidatos para combatir la entidad en lotes afectados naturalmente. No obstante, es necesario un análisis detallado de la situación de cada granja antes de tomar una decisión de tratamiento.

Este trabajo permitió evaluar la sensibilidad antimicrobiana de *B. pilosicoli* en aves y por tanto servirá como referente para la realización de estas pruebas de manera ruti-

na en casos de espiroquetosis intestinales en diferentes especies animales. De igual forma, es el inicio de un trabajo constante de estimación de los valores de CMI para diferentes agentes antimicrobianos de *Brachyspira* spp. a través del tiempo, con el fin de seleccionar los medicamentos adecuados para el tratamiento de esta entidad.

REFERENCIAS

1. Taylor DJ, Alexander TJL. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J* 1971; 127:58-61.
2. Trott DJ, Stanton TB, Jensen NS, Duhamel GE, Johnson JL, Hampson DJ. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:206-15.
3. Davelaar FG, Hovind-Hougen K, Dwars RM, van der Valk PC. Infectious typhlitis in chickens caused by spirochetes. *Avian Pathol* 1986; 15:247-58.
4. Trampel DW, Jensen NS, Hoffman LJ. Cecal spirochetosis in commercial laying hens. *Avian Dis* 1994; 38:895-8.
5. Stephens CP, Hampson DJ. Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* causes reduced egg production. *Avian Pathol* 2002; 31:169-75.
6. Stephens CP, Hampson DJ. Intestinal spirochete infections of chickens: A review of disease associations, epidemiology and control. *Anim Health Res Rev* 2001; 2:83-91.
7. Hampson DJ, Stephens CP, Phillips ND, La T, Pluske JR. Control of intestinal spirochaeta infections in chickens. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation Australia Government; 2004 Dic. RIRDC Publication No. 04/141.
8. Burch DGS. Layers and intestinal spirochaetosis. *International Poultry Production* 2008; 15:27-9.
9. Hidalgo Á, Carvajal A, García-Feliz C, Osorio J, Rubio P. Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res Vet Sci* 2008. Artículo en prensa.
10. Calderaro A, Bommezzadri S, Gorrini C, Piccolo G, Peruzzi S, Dettori G, *et al.* Comparative evaluation of molecular assays for the identification of intestinal spirochaetes from diseased pigs. *Vet Microbiol* 2006; 118:91-100.
11. Jansson DS, Fellström C, Råsbäck T, Vågsholm I, Gunnarsson A, *et al.* Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens in different housing systems. *Vet Microbiol* 2008; 130:348-62.
12. Phillips ND, La T, Hampson DJ. 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.
13. Feberwee A, Hampson DJ, Phillips ND, La T, van der Heijden HMJF, Wellenberg GJ, *et al.* 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.
14. Fellström C, Råsbäck T, Johansson K-E, Olofsson T, Aspán A. Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. *J Microbiol Methods* 2008; 72:133-40.
15. Franklin A, Pringle M, Hampson DJ. Antimicrobial resistance in *Clostridium* and *Brachyspira* spp. and other Anaerobes. In: Aarestrup FM, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington: ASM Press; 2006. p. 132-36.
16. Karlsson M, Fellström C, Gunnarsson A, Landén A, Franklin A. Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2596-604.
17. Rasbäck T, Fellström C, Bergsjø B, Cizek A, Collin K, Gunnarsson A, *et al.* Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibi-

- lity testing of *Brachyspira* species using a ring test. *Vet Microbiol* 2005; 109:229-43.
18. Pringle M, Landén A, Franklin A. Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates. *Res Vet Sci* 2006; 80:1-4.
 19. Karlsson M, Gunnarsson A, Franklin A. Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev* 2001; 2:59-65.
 20. Lobová D, Smola J, Cizek A. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Med Microbiol* 2004; 53:287-91.
 21. Rohde J, Kessler M, Baums CG, Amtsberg G. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet Microbiol* 2004; 102:25-32.
 22. Karlsson M, Fellström C, Heldtander UK, Johansson KE, Franklin A. Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 172:255-60.
 23. Trampel DW, Kinyon JM, Jensen NS. Minimum inhibitory concentration of selected antimicrobial agents for *Serpulina* isolated from chickens and rheas. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11:379-82.
 24. Hampson DJ, Stephens CP, Oxberry SL. Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens. *Avian Pathol* 2006; 35:12-6.
 25. Álvarez DM. Valoración de la presencia de *Brachyspira intermedia* y *Brachyspira pilosicoli* en ponedoras comerciales de granjas avícolas colombianas [tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2009.
 26. Karlsson M. Antibiotic resistance in *Brachyspira hyodysenteriae* [tesis doctoral]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences; 2001.
 27. Burch DGS, Harding C, Álvarez R, Valks M. Treatment of a field case of avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* with tiamulin. *Avian Pathol* 2006; 35:211-6.