

STUDIO TRASVERSALE SULL'ELIMINAZIONE FECALE DI *B. HYODYSENTERIAE* IN UN ALLEVAMENTO DI SCROFE ENDEMICAMENTE INFETTO

B. HYODYSENTERIAE SHEDDING BY SOWS FROM AN ENDEMICALLY INFECTED HERD: A TRANSVERSAL STUDY

CUCCO L.¹, CHIANCONE F.M.¹, DETTORI A.¹, BORIOSI G.², SEBASTIANI C.¹,
PEZZOTTI G.¹, MAGISTRALI C.F.¹

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia;

2 Veterinario, Martini S.p.A.

Parole chiave: *B. hyodysenteriae*, scrofa, PCR real time, eliminazione fecale

Key words: *B. hyodysenteriae*, sow, real time PCR, faecal shedding

Riassunto: la dissenteria suina è una malattia ri-emergente causata da *B. hyodysenteriae*. I riproduttori costituiscono una fonte di infezione per i suinetti e una delle più importanti modalità di persistenza di *B. hyodysenteriae* negli allevamenti a ciclo chiuso; tuttavia le informazioni disponibili in letteratura sulla escrezione di questo patogeno nelle scrofe sono scarse.

Scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere le modalità di escrezione fecale di *B. hyodysenteriae* in un allevamento di 1800 scrofe infetto in modo endemico, valutando in parallelo il test in real time, il colturale tradizionale e la quantità di sostanza secca fecale e distinguendo gli animali in pluripare e primipare. All'esame colturale, il dato di prevalenza di *Brachyspira* spp. nelle primipare è risultato pari al 9% (I.C. 95% 4,46-16,83), mentre nelle pluripare si è collocato al 3,23% (I.C. 95% 1,04-8,55), tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa. Solo un isolato è risultato appartenere alla specie *B. hyodysenteriae*; questo proveniva da una primipara sintomatica. La prevalenza rilevata dal colturale è stata pari allo 0,45% (I.C. 95% 0,02-2,85). Sette scrofe, di cui 3 primipare, sono risultate positive in PCR real time per *B. hyodysenteriae*, con una prevalenza del 3,13% (I.C. 95% 1,38-6,60). La quantità di patogeno escreto variava da $6,73 \cdot 10^3$ /g di feci, dato rilevato in una pluripara, a $1,78 \cdot 10^8$ /g di feci, in una scrofa primipara. Il 90% circa dei campioni prelevati ricadeva in una categoria di sostanza secca nelle feci 1, corrispondente alla normalità. Tre delle pluripare infette rilevate in PCR real time presentavano una categoria di sostanza secca pari a 1, confermando la presenza di eliminatori asintomatici. In conclusione, la prevalenza di escrezione di *B. hyodysenteriae* nell'allevamento considerato è apparsa molto contenuta, così come la presenza di animali con diarrea. La real time PCR ha consentito di individuare un numero di soggetti escretori più elevato e di eliminatori asintomatici di *B. hyodysenteriae*, questo test appare quindi più adatto rispetto al colturale ad essere applicato in studi epidemiologici.

Abstract: swine dysentery is a reemerging disease caused by *B. hyodysenteriae*. Breeders are a source of infection for piglets and they can maintain and spread *B. hyodysenteriae* in farrow to finish herds. However, the information available in literature on *B. hyodysenteriae* shedding by sows is scarce. The aim of this work was to describe *B. hyodysenteriae* shedding in faeces in an endemically infected herd, hosting 1800 animals. The samples were tested for *B. hyodysenteriae* in parallel by real time PCR, and culture, dry matter content; sampling was calculated to estimate prevalence in both primiparous and pluriparous sows. The prevalence

of *Brachyspira* spp. infection by culture was estimated as 9% (I.C. 95% 4,46-16,83) in primiparous sows and 3,23% (I.C. 95% 1,04-8,55) in pluriparous sows: this difference was not statistically significant. Only one sample, from a symptomatic primiparous sow, was positive for *B. hyodysenteriae* by culture. Seven animals, of which three primiparous sows, tested positive for *B. hyodysenteriae* by real time PCR; the *B. hyodysenteriae* prevalence estimated by culture was 0,45% (I.C. 95% 0,02-2,85) and 3,13% (I.C. 95% 1,38-6,60) by real time PCR. The amount of bacteria excreted by faeces varied from $6,73 \cdot 10^3/g$, in a pluriparous sow, to $1,78 \cdot 10^8 /g$, in a primiparous sow. Approx. 90% of the samples fell within Category 1 for dry matter content, therefore they were categorized as normal faeces. *B. hyodysenteriae* was detected by real time PCR in three samples belonging to dry matter content Category 1; these three samples were from pluriparous sows, thus confirming the presence of asymptomatic shedders. In conclusion, the prevalence of *B. hyodysenteriae* shedding in the herd was low, as was the presence of diarrheic animals. Real time PCR detected a higher number of shedders and asymptomatic *B. hyodysenteriae* excreting sows. This test is therefore more suitable than culture for application in epidemiologic studies.

INTRODUZIONE

Il batterio anaerobio *Brachyspira hyodysenteriae* è l'agente eziologico della dissenteria emorragica suina, patologia che provoca importanti perdite economiche negli allevamenti. La morbilità e la mortalità negli animali in accrescimento possono raggiungere rispettivamente il 90% e il 30% (Hampson et al. 2006). Il contagio tra individui avviene con facilità mediante le feci infette; la malattia si manifesta di norma dopo 10-14 giorni dal contatto. Nella fase acuta i suini eliminano fino a 10^7 - 10^{10} cellule batteriche per ogni grammo di feci; il patogeno può essere individuato nel materiale fecale per un periodo anche di 70 giorni dopo la scomparsa dei sintomi (Rasback et al. 2005).

L'individuazione dell'infezione nei suini riproduttori è particolarmente problematica, anche perché in corso di forme subacute o croniche, la sintomatologia si può facilmente confondere con quella derivante da altre patologie (Merialdi 2013). La diagnosi di dissenteria suina si basa tradizionalmente su esame colturale e conferma mediante PCR: un iter che ha tempi di esecuzione piuttosto lunghi, di circa una settimana. L'esame batteriologico, inoltre, presenta una sensibilità contenuta, dovuta anche al fatto che il rilevamento di *B. hyodysenteriae* può essere mascherato dalla presenza di altri microrganismi (Rasback et al. 2005). Questo giustifica la scarsità in letteratura di dati sull'escrezione batterica da parte delle scrofe, dati che tuttavia sono necessari per comprendere le modalità di trasmissione del patogeno ed impostare corretti piani di controllo della dissenteria suina negli allevamenti (Patterson et al. 2013). Negli ultimi anni si è proposto il ricorso a tecniche di PCR real-time, che presentano il vantaggio di poter quantificare il DNA batterico del campione fornendo una stima del livello di contaminazione presente (Akase et al. 2009).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare sulla presenza di *B. hyodysenteriae* all'interno di un allevamento di suini riproduttori in cui erano stati evidenziati casi di dissenteria suina, per evidenziare le modalità di escrezione del patogeno attraverso le feci. La ricerca del patogeno è stata effettuata in parallelo mediante esame colturale e in real-time PCR, per individuare la tecnica più idonea in questo tipo di indagini.

MATERIALI E METODI

Campionamento

I campioni sono stati prelevati da un allevamento di riproduttori localizzato in Italia

centrale in cui erano stati riscontrati casi di dissenteria suina, seguita da isolamento di *B. hyodysenteriae*, nel corso del semestre precedente. Nell'azienda erano presenti 1700 scrofe, suddivise in 320 primipare e 1380 pluripare. L'allevamento era composto da 5 strutture distinte, due delle quali ospitavano sale parto, mentre in altre due erano presenti i box gestazione, in un caso con le gabbie di fecondazione. L'ultimo capannone invece era destinato alle rimonte, distinte in diverse fasce di età: dai 28 ai 100 giorni gli animali erano collocati prima in gabbia e successivamente a terra; infine dai 101 ai 180 giorni, erano trasferite in un'altra stanza e poste in box. In quest'ultimo capannone erano inoltre ospitate alcune sale parto. La pavimentazione era in grigliato di cemento, con fosse comunicanti nello stesso capannone.

Considerando che la prevalenza attesa è pari al 7% per la prima categoria e al 9% per la seconda (Patterson, 2013), si è ipotizzato un campionamento con un errore standard del 5% ed un intervallo di confidenza del 95%. In complesso sono state analizzate feci di 100 scrofe primipare e 124 pluripare.

Le feci sono state prelevate individualmente dalla ampolla rettale, mantenute a temperatura di refrigerazione e l'esame colturale allestito nell'arco di 24 ore dal momento del prelievo. I campioni sono stati esaminati utilizzando in parallelo esame colturale selettivo e real time PCR per *B. hyodysenteriae* e infine ne è stata determinata la sostanza secca. In allevamento sono stati anche prelevati 29 campioni di sangue dalle primipare e 21 dalle pluripare.

Determinazione della sostanza secca

La percentuale di sostanza secca è stata misurata applicando il protocollo descritto da Pedersen et al. (2011). In breve, circa 5 g di feci sono stati pesati e introdotti in un contenitore di plastica sterile, di cui è stato annotato il peso totale. Il campione è stato riscaldato in forno a microonde a 120 W per 30 minuti e poi a 385 W per 10 minuti. A questo punto il contenitore con le feci è stato riscaldato di nuovo a 385 W e pesato ogni 5 minuti finché non si è osservato che il peso rimaneva costante. La percentuale di sostanza secca è stata quindi calcolata con la formula seguente: $SS\% = (\text{peso finale dell'essiccato col barattolo} - \text{peso del barattolo}) / \text{peso iniziale fresco} \times 100$.

Esame colturale per la ricerca di *B. hyodysenteriae*

L'esame colturale è stato condotto come già descritto (Sebastiani et al. 2013). In breve, il materiale fecale è stato seminato in TSA-BJ medium e posto ad incubare a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per almeno 5 giorni. Al termine del periodo di incubazione, eventuali colonie sospette per *Brachyospira* spp. sono state esaminate mediante microscopia ottica e successivamente isolate e confermate tramite PCR end-point secondo il protocollo descritto da La, et al. (2006), specifico per le due sole specie *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*.

RFLP

L'identificazione dei ceppi di *Brachyospira* non riconducibili a *B. hyodysenteriae* è stata effettuata con il metodo basato su polimorfismo dei frammenti di restrizione descritto in Rhode et al. 2012. Questo protocollo permette di discriminare tra loro le specie *B. murdochii*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*. In breve, il DNA, estratto da colonia per bollitura, è stato sottoposto a PCR usando primer specifici per l'amplificazione del gene *nox* (Bnox_f 5'-TAG C(CT)T GCG GTA T(CT)G C(AT)C TTT GG-3' e Bnox_r 5'-CTT CAG ACC A(CT)C CAG TAG AAG CC-3'). Gli amplificati sono stati digeriti con gli enzimi DpnII e SfcI per 15 minuti a 37°C. I frammenti sono stati separati in gel di agarosio al 2%, ottenendo profili caratteristici per ogni specie batterica.

Real-time PCR

PCR Real-time multiplex: i DNA estratti dalle feci sono stati analizzati tramite PCR real-time multiplex come descritto da Willems H. et al (2010). I primers e le sonde utilizzate sono dirette all'amplificazione del gene *nox* per *Brachyspira* e del gene *aspA* per *L.intracellularis*. La reazione, condotta in un volume finale di 25µl, era costituita da 12,5µl di Quantitect Multiplex Mastermix (Qiagen), primers e sonde (0,18-0,3 µM) e 2,5µl di DNA target. Per l'analisi quantitativa, gli standard per le curve di taratura sono stati ottenuti, per ciascun patogeno, attraverso l'amplificazione delle regioni genomiche target della PCR real-time; gli amplificati sono stati poi purificati con il kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen), quantizzati spettrofotometricamente ed è stato successivamente calcolato il numero di copie di DNA corrispondente. Per ognuno dei tre patogeni in esame le curve di taratura erano costituite da diluizioni scalari in base 10 (da 1×10^6 a 1×10^2 copie di DNA). Le reazioni sono state eseguite utilizzando la piattaforma 7900 HT SequenceDetection System (Life Technologies).

Elaborazione statistica:

Sono state calcolate le prevalenze ed i relativi intervalli di confidenza al 95% di *B. hyodysenteriae* ottenute con l'esame colturale e con la PCR real-time e le prevalenze di *Brachyspira* spp. nelle primipare e nelle pluripare. Con il test esatto di Fischer è stata calcolata la differenza tra i due gruppi di animali. E' stata valutata la concordanza tra PCR in real time e colturale per *B. hyodysenteriae* utilizzando il test K di Cohen.

RISULTATI

I dati relativi alla sostanza secca sono stati organizzati in quattro categorie sulla base dei valori di cut-off forniti da Pedersen et al. (2011). Cat. 1: percentuale di sostanza secca >19,5. Cat. 2: sostanza secca tra 18 e 19,5. Cat. 3: sostanza secca tra 11,3 e 18. Cat. 4: sostanza secca <11,3. I dati sono mostrati in Tab. 1.

Tabella 1: distribuzione dei campioni di feci in base alla categoria di sostanza secca
Table 1: faecal samples, divided into different categories according to their dry matter content

Categorie	Primipare	Pluripare	Totale
1	84 (84,0%)	121 (97,6%)	205 (91,5%)
2	2 (2,0%)	2 (1,6%)	4 (1,8%)
3	8 (8,0%)	1 (0,8)	9 (4,0%)
4	0	0	0
Non eseguiti	6 (6,0%)	0	6 (2,7%)
Totale	100 (100%)	124 (100%)	224 (100%)

Un solo campione tra i 224 analizzati è risultato positivo all'esame colturale per la ricerca di *B. hyodysenteriae*. Si tratta di feci prelevate da una scrofa primipara del gruppo 28-100 giorni, stabulata in gabbia, che presentava diarrea emorragica. I campioni derivanti da primipare di età superiore ai 100 giorni hanno mostrato un'elevata contaminazione da specie fungine, che potrebbe aver impedito il rilievo di eventuali *B. hyodysenteriae* presenti. In 12 campioni l'esame batteriologico ha messo in evidenza la presenza di ceppi di *Brachyspira* non appartenenti alla specie *B. hyodysenteriae*. Questi ceppi sono stati isolati e poi identificati mediante RFLP (Tabella 2).

Tabella 2: distribuzione degli stipiti appartenenti al genere <i>Brachyspira</i> rilevate mediante esame colturale e RFLP Table 2: <i>Brachyspira</i> spp isolates, detected by culture followed by RFLP			
Specie	Numero isolati da primipare	Numero isolati da pluripare	Totale
<i>B. murdochii</i>	1	1	2
<i>B. innocens</i>	4	0	4
<i>B. intermedia</i>	2	2	4
<i>B. hyodysenteriae</i>	1	0	1
Non identificato	1	1	2
Totale	9	4	13

Il dato di prevalenza di *Brachyspira* spp. nelle primipare è risultato pari al 9% (I.C. 95% 4,46-16,83), mentre nelle pluripare si è collocato al 3,23% (I.C. 95% 1,04-8,55). La differenza tra i due gruppi, calcolata con il test esatto di Fischer, non è risultata statisticamente significativa ad un livello di significatività del 95%

La PCR real time ha invece evidenziato la presenza di 7 feci positive per *B. hyodysenteriae*, di cui tre primipare e quattro pluripare. Non si sono invece riscontrati campioni positivi per *B. pilosicoli* e *Lawsonia intracellularis*. Tra le feci positive per *B. hyodysenteriae*, è compreso il campione risultato positivo all'esame colturale. In Tabella 3 è indicata l'entità della contaminazione, espressa come numero di copie di DNA per grammo di feci.

Le prevalenze di *B. hyodysenteriae* ottenute con il metodo batteriologico e con quello molecolare risultano rispettivamente pari allo 0,45% (I.C. 95% 0,02-2,85) e al 3,13% (I.C. 95% 1,38-6,60). Il valore di concordanza (K di Cohen) tra PCR in real time e colturale per *B. hyodysenteriae* è di 0,244, che è considerato nella scala di Altman un lieve accordo.

Tabella 3: campioni positivi per <i>B. hyodysenteriae</i> in real time PCR e coltura Table 3: <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> positive samples, by real time and culture		
Identificativo campione	n. copie di DNA/ g di feci	Colturale
<i>Primipara 82</i>	9,13*10 ⁶	neg
<i>Primipara 97</i>	2,54*10 ⁷	pos
<i>Primipara 98</i>	1,78*10 ⁸	neg
<i>Pluripara 12</i>	2,16*10 ⁵	neg
<i>Pluripara 13</i>	1,87*10 ⁵	neg
<i>Pluripara 42</i>	6,73*10 ³	neg
<i>Pluripara 46</i>	9,05*10 ³	neg

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio dell'escrezione di *B. hyodysenteriae* nei riproduttori è stato ostacolato dall'assenza di un metodo diagnostico sufficientemente sensibile per l'identificazione dell'infezione in questa categoria di animali. L'esame colturale si è infatti rivelato inadatto per rilevare l'eliminazione di questo patogeno in soggetti asintomatici. Questo ha limitato la disponibilità di studi su prevalenza e trasmissione di *B. hyodysenteriae* nei riproduttori, in grado di fornire dati utili per impostare piani di contenimento della malattia. Inoltre, un metodo dotato di una sensibilità superiore rispetto al colturale potrebbe essere impiegato per l'identificazione degli allevamenti indenni, che potrebbero fungere da fonte di animali in corso di ripopolamento.

I dati raccolti nel corso di questo lavoro hanno confermato come il test colturale presenti una bassa sensibilità: infatti, un solo campione, proveniente da una primipara con sintomatologia riconducibile a dissenteria emorragica, è risultato positivo con questa metodica, che risente della presenza di contaminanti nel materiale fecale. Inoltre, altre specie appartenenti al genere *Brachyspira* possono mascherare la presenza di *B. hyodysenteriae*: nel corso di questa indagine ad esempio, una scrofa è risultata positiva solo in PCR real time, ma l'esame colturale ha permesso di isolare una *B. murdochii*. L'interferenza di altre specie del genere *Brachyspira* sulla sensibilità dell'esame batteriologico per *B. hyodysenteriae* è nota in letteratura: ad esempio, viene riportato come, in casi di infezioni miste, sia necessario che il numero di cellule di *B. hyodysenteriae* sia di 10 volte più elevato di quello di *B. pilosicoli* per consentire il rilievo della prima (Rasback, 2005). Nonostante l'allevamento fosse infetto in modo endemico e al momento del prelievo si fossero rilevati animali con sintomatologia riferibile a SD, la prevalenza stimata attraverso esame colturale è stata molto contenuta, inferiore all'1%. La sensibilità dell'esame batteriologico è molto variabile, Stege (2000) ad esempio, ha riportato come sia necessaria una concentrazione di 10^6 cellule/g di feci perché *B. hyodysenteriae* sia rilevata, : dato che è in accordo con quanto osservato nel corso del presente lavoro. Il test in PCR real time ha permesso di individuare un numero di scrofe eliminatrici più elevato, pari al 3% circa, consentendo inoltre di quantificare la presenza di *B. hyodysenteriae* nelle feci. D'altra parte l'esame batteriologico ha evidenziato la presenza di altre specie appartenenti al genere *Brachyspira*; dal momento che sono recentemente emerse nuove specie patogene questa caratteristica non appare trascurabile (Mahu et al., 2014). L'escrezione di *B. hyodysenteriae* avviene in modo intermittente e con bassi livelli, soprattutto nelle scrofe pluripare, come sembrano indicare i dati raccolti nella presente indagine. E' importante rilevare come, nonostante la presenza di animali sintomatici, la categoria di sostanza secca delle feci ricadeva nella normalità in più del 90% dei casi, testimoniando un andamento strisciante della malattia. Inoltre, tre delle pluripare identificate mediante PCR real-time presentavano una percentuale di sostanza secca nelle feci all'interno degli intervalli di normalità, confermando la presenza di soggetti eliminatori asintomatici. Attualmente, tuttavia, il test in PCR real time non sembra offrire un incremento in sensibilità sufficiente per un suo impiego in piani di eradicazione, al fine di categorizzare gli allevamenti di riproduttori in infetti e non infetti, anche in considerazione del suo costo elevato. L'esame periodico da parte del veterinario in allevamento appare ancora un passaggio cruciale per la corretta identificazione della azienda, mentre i test di laboratorio risultano adeguati solo per sostenere la diagnosi eziologica formulata in sede clinica.

Lo studio dell'escrezione di *B. hyodysenteriae* attraverso metodi diretti appare invece utile per valutare le modalità di circolazione di questo patogeno negli allevamenti infetti: questi dati infatti, sono scarsi in letteratura, nonostante la dissenteria suina sia una malattia conosciuta da quasi un secolo. Nel corso di questo lavoro non abbiamo osservato differenze significative nell'escrezione di *Brachyspira* spp. o *B. hyodysenteriae* tra primipare e pluripare, anche se è possibile che le basse prevalenze riscontrate abbiano ostacolato il rilievo di questo dato in allevamento. Ci pare tuttavia importante sottolineare come nella azienda in esame, non si realizzasse una separazione completa tra i diversi gruppi di animali, in particolare nel capannone destinato alle rimonte, dove convivevano animali di età diversa ed erano presenti fosse comuni per il liquame. Questo può avere favorito la circolazione del patogeno in settori e categorie diverse di scrofe. Le infezioni enteriche, trasmettendosi per via oro-fecale tendono a circolare in cluster associati alla collocazione degli animali: come dimostrato per *Salmonella* (Pires et al. 2013); anche in questo lavoro i campioni positivi per *B. hyodysenteriae* tendevano a raggrupparsi in alcuni box o gruppi di animali, ad esempio le pluripare positive erano tutte collocate nelle gabbie di fecondazione.

In conclusione, in questo lavoro l'eliminazione fecale di *B. hyodysenteriae* nelle scrofe in un allevamento endemicamente infetto è risultata essere associata a livelli di prevalenza molto contenuti. Inoltre, la PCR real time ha permesso di identificare un numero di animali eliminatori più consistente, comprendendo anche soggetti asintomatici.

BIBLIOGRAFIA

Akase S., Uchitani Y., Sohmura Y., Tatsuta K., Sadamasu K., Adachi Y. (2009) "Application of real time PCR for diagnosis of Swine Dysentery." *J Vet Med Sci.* 71, 359-62.

Hampson D.J., Fellstrom C., Thomson J.R. (2006) "Swine dysentery." In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., editors. "Diseases of Swine." Blackwell Publishing Professional; Ames, IA, USA: 2006. pp. 785-805.

La T., Collins A.M., Phillips N.D., Oksa A., Hampson D.J. (2006) "Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira apilolicoli* in porcine faeces". *Lett appl microbiol* 42, 284-288.

Meriardi G. (2013) Coliti da *Brachyspira*. In: Martelli P. et al. *Le patologie del maiale*. 1° ed., Milano, Le Point Veterinarie Italie Srl. 441-452.

Mahu M, de Jong E, De Pauw N, Vande Maele L, Vandenbroucke V, Vandersmissen T, Miry C, Pasmans F, Haesebrouck F, Martel A, Boyen F. First isolation of "Brachyspira hamptonii" from pigs in Europe. *Vet Rec.* 2014 Jan 11;174(2):47.

Patterson A.H., Rubin J.E., Fernando C., Costa M.O., Harding J.C., Hill J.E. (2013) "Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of "Brachyspira hamptonii"-associated colitis." *BMC Vet Res.* 11, 9-137. doi: 10.1186/1746-6148-9-137.

Pedersen K.S., Stege H., Nielsen J.P. (2011) "Evaluation of a microwave method for dry matter determination in faecal samples from weaned pigs with or without clinical diarrhoea." *Prev Vet Med.*100, 163-170. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.014. Epub2011 May 14.

Pires AF, Funk JA, Lim A, Bolin SR. Enumeration of salmonella in feces of naturally infected pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 2013 Nov;10(11):933-7

Råsbäck T., Fellström C., Gunnarsson A., Aspán A.(2006) "Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*." *J Microbiol Methods.* 66, 347-53.

Rohde J., Habighorst-Blome K. (2012) "An up-date on the differentiation of *Brachyspira* species from pigs with nox-PCR-based restriction fragment length polymorphism." *Vet Microbiol.* 158, 211-215.

Sebastiani C.; Cucco, L.; Ciullo M.; Maresca, C.; Scoccia, E.; Tartaglia M.; Magistrali C.F. (2013) Valutazione di un test di PCR real-time per la diagnosi delle enteriti batteriche del magronaggio ed ingrasso. *Atti della Società Italiana di Patologia ed allevamento del suino*, 2013: 203-211.

Stege H, Jensen TK, Møller K, Baekbo P, Jorsal SE. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med.*2000 Sep 1;46(4):279-92.

Willems H., Reiner G. (2010) "A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123, 205-209.