



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**USO DE UNA VACUNA FRENTE A LA
COLIBACILOSIS PORCINA EN CONDICIONES DE
CAMPO**

Lívia Mendonça Pascoal

2016



D. GUILLERMO RAMIS VIDAL, Profesor Contratado Doctor del Área de PRODUCCIÓN ANIMAL y Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado Porcinocultura Profesional y Científica,

INFORMA:

Que vista la solicitud de autorización de presentación de D^a. LÍVIA MENDONÇA PASCOAL, titulada "USO DE UNA VACUNA FRENTE A LA COLIBACILOSIS PORCINA EN CONDICIONES DE CAMPO", realizada bajo la inmediata dirección y supervisión de los Dres. Guillermo Ramis Vidal, Francisco José Pallarés Martínez y Juan José Quereda Torres y evaluado el expediente completo, la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en sesión celebrada el día 30 de noviembre de 2015, y de conformidad con lo establecido en el artículo 21 del "Reglamento por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado de la Universidad de Murcia", resolvió la autorización de presentación de la tesis doctoral.

Asimismo, le envía el informa de la Comisión de Rama de Conocimiento de Ciencias de la Salud sobre la propuesta de expertos que pueden formar parte del tribunal que ha de juzgarla junto con los preceptivos informes de idoneidad.

Murcia, a 30 de noviembre de 2015

Fdo:

Prof. Dr. Guillermo Ramis Vidal



D. GUILLERMO RAMIS VIDAL, Profesor Contratado Doctor del Área de PRODUCCIÓN ANIMAL AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “USO DE UNA VACUNA FRENTE A LA COLIBACILOSIS PORCINA EN CONDICIONES DE CAMPO”, realizada por D^a LÍVIA MENDONÇA PASCOAL, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de noviembre de 2015

Fdo:

Prof. Dr. Guillermo Ramis Vidal



D. FRANCISCO JOSÉ PALLARÉS MARTÍNEZ, Profesor Titular de Universidad del Área de ANATOPIA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “USO DE UNA VACUNA FRENTE A LA COLIBACILOSIS PORCINA EN CONDICIONES DE CAMPO”, realizada por D^a LÍVIA MENDONÇA PASCOAL, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de NOVIEMBRE de 2015

Fdo:

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. Dr. Francisco José Pallarés Martínez



D. JUAN JOSÉ QUEREDA TORRES, Investigador del Institute Pasteur en París, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “USO DE UNA VACUNA FRENTE A LA COLIBACILOSIS PORCINA EN CONDICIONES DE CAMPO”, realizada por D^a LÍVIA MENDONÇA PASCOAL, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de noviembre de 2015

Fdo:

Dr. Juan José Quereda Torres

Índice

ÍNDICE

Agradecimientos	11
1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo principal.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Complejo Entérico Porcino.....	23
3.2. Importancia de la colibacilosis dentro del Complejo Entérico Porcino	23
3.3. Importancia de otros patógenos del Complejo Entérico Porcino.....	25
3.3.1. Lawsonia Intracellularis.....	25
3.3.2. Brachyspira hyodysenteriae.....	27
3.3.3. Salmonela spp	28
3.4. Diarreas posdestete por <i>E. coli</i>	29
3.4.1. Etiología.....	29
3.4.2. Epidemiología.....	30
3.4.3. Patogénesis.....	31
3.4.4. Factores de virulencia.....	32
3.4.5. Lesiones.....	34
3.4.6. Sistema inmunológico intestinal y la inmunoglobulina A	35
3.4.7. Citocinas	38
3.4.8. Diagnóstico.....	39
3.4.9. Prevención.....	40
4. MATERIAL Y MÉTODOS	49
4.1. Diseño experimental	49

4.2. Granja y animales.....	51
4.3. Vacuna.....	53
4.4. Toma de datos clínicos y productivos.....	53
4.5. Aislamiento de <i>E. coli</i> en animales con diarrea durante transición y cebo.....	55
4.5.1 Toma de muestras.....	55
4.5.2. Cultivo de <i>E. coli</i>	55
4.5.3. Determinación de los serogrupos.....	55
4.5.4. Detección de los factores de virulencia.....	56
4.5.5. Antibiograma.....	57
4.6. Aislamiento de <i>E. coli</i> al sacrificio.....	57
4.6.1. Toma de muestras.....	57
4.7. Determinación de presencia de factores de virulencia de <i>E. coli</i> al sacrificio.....	58
4.7.1. Toma de muestras.....	58
4.7.2. Extracción de ADN.....	58
4.7.3. Determinación mediante qPCR de la presencia de factores de virulencia de <i>E. coli</i> (ensayo plus/minus).....	60
4.8. Determinación de la presencia y cuantificación de <i>L. intracellularis</i> , <i>B. hyodisenteriae</i> , <i>Salmonella</i> spp. y PCV2 al sacrificio.....	62
4.8.1. Protocolo de PCR clásica.....	63
4.8.2. Protocolo de PCR a tiempo real.....	65
4.9. Estudio histopatológico al sacrificio.....	68
4.9.1. Toma de muestras para el estudio histopatológico.....	68
4.9.2 Estudio de las lesiones histopatológicas.....	69
4.10 Detección de células productoras de IgA mediante inmunohistoquímica.....	72
4.11. Determinación de niveles de transcrito de citocinas.....	74
4.11.1. Toma de muestras.....	74
4.11.2. Extracción de ARN.....	74
4.11.3 Destrucción del ADN genómico.....	76

4.11.4 Retrotranscripción.....	77
4.11.5. PCR cuantitativa (q-PCR)	78
4.11.6 Cálculo de la expresión génica	80
4.12. Análisis estadísticos.....	82
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
5.1. Datos clínicos y productivos.....	87
5.1.1. Datos en transición.....	87
5.1.2. Datos en cebo.....	90
5.2. Aislamientos bacterianos obtenidos de los brotes sospechosos de colibacilosis	96
5.2.1. Frecuencia de aislamientos	97
5.2.2. Determinación de presencia de genes para factores de virulencia	98
5.3. Antibiogramas y resistencia a antibióticos de los aislamientos en animales sospechosos	102
5.3.1. Número de resistencias a antibióticos	102
5.3.2. Resistencias específicas a los antibióticos testados.....	103
5.4. Aislamientos de <i>E. coli</i> al sacrificio.....	106
5.5. Determinación de la presencia de factores de virulencia de <i>E. coli</i> mediante PCR ensayo plus-minus.....	107
5.6. Determinación de la presencia de otros agentes patógenos incluidos en el complejo entérico porcino	111
5.6.1. Resultados de la PCR clásica para la detección de <i>L. intracellularis</i> , <i>B. hyodysenteriae</i> y <i>Salmonella</i> spp.	111
5.6.2. Resultados de la PCR a tiempo real para la detección de <i>L. intracellularis</i>	113
5.6.3. Comparación PCR clásica y PCR a tiempo real para <i>L. intracellularis</i>	116
5.6.4. Relación entre la carga de <i>L. intracellularis</i> y los factores de virulencia de <i>E. coli</i>	117
5.6.5. Resultados de la PCR a tiempo real para la detección de PCV2.....	120
5.7. Estudio histopatológico al sacrificio.....	126
5.8. Detección de células productoras de IgA en intestino mediante inmunocitoquímica. 131	

5.8.1. Relación entre la cantidad de células productoras de IgA y presencia de factores de virulencia de <i>E. coli</i>	135
5.9. Detección de PCV2 mediante inmunocitoquímica	137
5.10. Expresión de citocinas.....	138
5.10.1. Citocinas y células productoras de IgA.....	140
5.10.2. Citocinas e infiltrado inflamatorio.....	140
5.10.3 Citocinas y factores de virulencia de <i>E. coli</i>	142
6. CONCLUSIONES	149
7. RESUMEN	153
8. SUMMARY.....	161
9. ANEXO.....	169
10. BIBLIOGRAFÍA.....	177

Agradecimientos

Agradecimientos

En especial, al Profesor Guillermo Ramis, por toda la orientación y ayuda sin las cuales no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Gracias por la amistad.

A Juan José Quereda Torres por todo lo que me enseñaste, por las correcciones y por estar siempre dispuesto a ayudarme.

Al Profesor Francisco José Pallarés, por todas las enseñanzas.

Al Profesor Antonio Muñoz Luna, por abrirme las puertas de España, donde viví una de las mejores fases de mi vida.

A Juanma y Juani por la amistad, compañerismo y por todos los momentos que pasamos juntos, siempre muy divertidos.

A Aida, Lidiane y Obdulio, por toda la ayuda y colaboración durante la ejecución de este trabajo.

A Laura, por todo el cariño y preocupación conmigo.

A la Universidad de Murcia, por recibirme tan bien y proporcionarme tanto conocimiento.

A la Secretaria de Educación y Cultura de la Región de Murcia, por financiar este proyecto.

A las empresas FARCOVET, S.A. y Juan Jiménez García S.A.U., por su colaboración en esta tesis.

De Brasil:

Al Profesor Jurij Sobestiansky, por conducirme a la porcino cultura y por orientarme siempre.

A los Profesores Marcos Barcellos Café, Adilson Damasceno y Moema Matos, por la comprensión y amistad.

A mi familia, por el amor incondicional y porque son ejemplo a seguir.

A Dios, por colocar personas especiales en mi vida como las que conocí en España y por guiarme cada día.

Gracias a todos.

Introducción y Objetivos

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones entéricas porcinas tienen una importancia creciente y son frecuentemente observadas en diferentes edades, provocando un gran impacto a la industria porcina de todo el mundo. Estas infecciones entéricas pueden llevar a altas tasas de mortalidad y morbilidad y secuelas en el tracto gastrointestinal. Éstas pueden ser permanentes o transitorias, produciendo retraso del crecimiento, reducción de la eficiencia alimentaria y en el coste con tratamientos y alimentaciones adicionales, suponiendo aproximadamente el 60% de los gastos con antimicrobianos en la porcinocultura.

En un brote de enfermedad entérica suelen estar involucrados más de un agente patógeno. De hecho, actualmente hablamos de un Complejo Entérico Porcino (CEP) en el que están involucrados diversos patógenos bacterianos, víricos, y parasitarios que interaccionan entre sí, agravando la presentación clínica y patológica de las enfermedades clásicas. Entre estos patógenos cabe destacar algunos como *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Salmonella sp.*, coronavirus, circovirus porcino tipo 2, rotavirus e *Isospora suis*.

Las enfermedades producidas por *E. coli* siempre han representado un reto para la producción porcina, especialmente desde la intensificación a que se ha sometido al ganado porcino en las últimas décadas. La presentación clásica de esta enfermedad se centraba en la fase de lactación y transición, debido tanto a la transmisión vertical de la madre como a la contaminación ambiental presente en las instalaciones. Sin embargo, en los últimos años se ha observado en el campo como la

expresión clínica de estas diarreas colibacilares se ha desplazado a un periodo aproximado de unas 6 semanas a la entrada a cebo (sobre las 12-18 semanas de edad). Posiblemente este cambio se ha debido a factores como la intensificación en la prevención frente al patógeno en la fase de transición, el estrés del transporte al cebo, la mezcla con otros animales, el cambio de alimentación, la calidad del agua, etc.

Hasta ahora la vía clásica de prevención se ha centrado en la inmunización de las madres con el objeto de reducir la presión de infección a la que se someten los lechones en paridera, transmisión de inmunidad pasiva a los lechones y la antibioprevención durante la fase de transición junto con el uso de elementos astringentes añadidos al pienso como el óxido de cinc. Posiblemente el éxito de estos programas, cuando existe, es otro de los factores que ha hecho que la patocronia del proceso se haya alterado, retrasándose hasta el inicio de cebo.

La aparición en el mercado de una vacuna frente a *E.coli-Clostridium* registrada para su uso directo en lechones nos llevó al presente estudio. El fin de esta vacuna es evitar la expresión de diarreas colibacilares durante el periodo inicial de cebo, tratando asimismo de reducir o minimizar el uso de antibióticos dirigidos a prevenir o tratar procesos entéricos durante las fases de transición y cebo. El objetivo de esta tesis doctoral es evaluar la eficacia de esta vacuna utilizando criterios anatomopatológicos, inmunológicos, clínicos, productivos y económicos, así como estudiar la incidencia y gravedad de otras enfermedades entéricas, cuyos agentes etiológicos podrían interaccionar con *E. coli*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la eficacia de una vacuna frente a *E. coli* para la prevención de problemas colibacilares en lechones en las fases de transición y cebo.

2.2. Objetivos específicos

Para conseguir el objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de tres protocolos diferentes de vacunación de lechones frente a *E. coli*, evaluando parámetros clínicos en la transición, así como productivos y económicos en el cebo.
2. Estudiar la presencia de lesiones entéricas al sacrificio en animales vacunados y animales control.
3. Analizar el grado de infiltrado inflamatorio en íleon y colon al sacrificio de animales vacunados y animales control.
4. Determinar la presencia de cepas patógenas de *E. coli* en muestras de heces tomadas durante los episodios diarreicos acontecidos en transición y cebo.

5. Determinar la presencia de cepas patógenas de *E. coli* en muestras de heces tomadas al sacrificio.

6. Estudiar la presencia de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* y *Salmonella spp* en muestras de íleon y colon mediante PCR clásica y PCR cuantitativa.

7. Cuantificar la expresión de las citocinas IFN- γ , IFN- α , TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-12p35, IL12-p40 en las muestras de íleon mediante PCR cuantitativa.

8. Cuantificar las células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A mediante inmunohistoquímica en íleon y colon.

Revisión

Bibliográfica

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Complejo Entérico Porcino

En los últimos diez años se ha producido un agravamiento y aumento en la prevalencia de las enfermedades entéricas, sobre todo en fase de transición y cebo. Factores como el aumento generalizado de la densidad animal en las granjas de producción o la falta de vacunas eficaces contra la mayoría de patógenos entéricos, sin olvidar la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento, han propiciado un cambio en la expresión clínica de enfermedades como la disentería porcina, la ileítis proliferativa porcina y la colibacilosis. Actualmente, éstas y otras enfermedades entéricas porcinas son difíciles de diagnosticar de forma individual, ya que son muy frecuentes las infecciones conjuntas por varios patógenos entéricos. Por ello, algunos autores prefieren usar el término de Complejo Entérico Porcino (CEP) para referirse al conjunto de patógenos que interactúan provocando enfermedades digestivas.

3.2. Importancia de la colibacilosis dentro del Complejo Entérico Porcino

La colibacilosis es una importante causa de diarrea en lechones recién nacidos y recién destetados, siendo considerada como responsable de pérdidas significativas en granjas de todo el mundo (Fairbrother *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006). La colibacilosis posdestete es de gran importancia económica, debido a pérdidas por mortalidad (que pueden llegar al 10%), incremento en el número de

animales retrasados y aumento de los gastos de medicamentos para su control (Mores y Moreno, 2012).

La aparición clínica de diarreas colibacilares en ganado porcino ha cambiado su patocronia, convirtiéndose en un problema cada vez más frecuente en el inicio del periodo de cebo (Stege *et al.*, 2000; Ramis *et al.*, 2011). Algunas de las razones que explican estos cambios, así como sus consecuencias se resumen en la Tabla 1.

La importancia de esta enfermedad no se limita a las pérdidas productivas y económicas que por sí misma ocasiona, ya que hay que tener en cuenta que la adhesión y producción de toxinas por cepas patógenas de *E. coli*, pueden crear unas condiciones favorables para que otros patógenos digestivos, implicados en el CEP, puedan ejercer su acción patógena (Fairbrother *et al.*, 2005).

El incremento de procesos diarreicos asociados a *E. coli* ha sido asociado a factores como la aparición de cepas altamente virulentas, cambios en el manejo de los cerdos (Tabla 1) y mayor resistencia bacteriana a los antibióticos más utilizados (Fairbrother *et al.*, 2005). Todos estos factores hacen necesario el desarrollo de nuevas estrategias de lucha contra este patógeno.

Tabla 1. Causas y consecuencias del cambio de la expresión clínica de la colibacilosis porcina.

	CAUSAS	CONSECUENCIAS
Factores que influyen directamente en la aparición de problemas colibacilares	<p>Mayor esfuerzo en la prevención de enfermedades en la fase de transición</p> <p>Estrés del transporte al cebo</p> <p>Mezclado de animales de diferentes camadas</p> <p>Cambio de alimentación</p>	<p>Mayor uso de antibióticos</p> <p>Empeoramiento de los parámetros productivos</p>
Factores generales que influyen en la aparición del Complejo Entérico Porcino	<p>Aumento generalizado de la densidad animal</p> <p>Falta de vacunas eficaces frente a patógenos entéricos</p> <p>Prohibición de los antibióticos promotores de crecimiento</p>	<p>Pérdida de bienestar animal</p> <p>Pérdidas económicas</p>

3.3. Importancia de otros patógenos del Complejo Entérico Porcino

3.3.1. *Lawsonia Intracellularis*

La enteropatía proliferativa o ileítis es una importante enfermedad que afecta a la especie porcina, producida por la bacteria *Lawsonia Intracellularis* (McOrist *et al.*, 1993; Lawson y Gebhart, 2000). Actualmente, es una enfermedad de carácter universal, cuya importancia ha aumentado desde el año 1999 coincidiendo con la prohibición de los antibióticos promotores de crecimiento. Ya ha sido descrita en todos

los países productores de ganado porcino. La enteropatía proliferativa presenta dos formas clínicas distintas: la forma aguda o hemorrágica, que afecta animales de reposición y en la fase de cebo y es caracterizada por diarrea con sangre o muerte súbita; y la forma crónica, que afecta lechones en crecimiento siendo caracterizada por reducción de la ganancia de peso y, a veces, diarrea transitoria (Guedes, 2012).

Esta enfermedad provoca grandes pérdidas económicas debidas a la diarrea que ocasiona, la disminución del consumo de alimento y, consecuentemente, reducción de la ganancia de peso de los animales y/o aumento de la mortalidad (hasta el 6%) próximo a la edad de sacrificio (Jacobson *et al.*, 2010). En la necropsia se puede observar la pared intestinal engrosada y la mucosa con pliegues evidentes. En la forma aguda, el íleon es el tramo más frecuentemente afectado, pero pueden encontrarse lesiones en otras porciones intestinales. En casos más leves de la forma crónica, las lesiones son pequeñas, con 5 a 10 cm de extensión, y pueden pasar desapercibidas. Las dos formas clínicas tienen básicamente las mismas características histopatológicas. Se observa una proliferación de las células epiteliales de las criptas de Lieberkühn en el intestino delgado y glándulas mucosas del intestino grueso con presencia de un microorganismo intracelular curvo en la porción apical del enterocito. Estas criptas están alargadas y extendidas con un número aumentado de células epiteliales inmaduras. Hay atrofia de las vellosidades en las porciones afectadas del intestino delgado y una reducción marcada del número de células caliciformes en las criptas afectadas. La infiltración de células inflamatorias no es una característica significativa de la enfermedad. Estas lesiones intestinales que produce la bacteria responsable de la enfermedad producen malabsorción de nutrientes, influenciando negativamente la

ganancia media diaria, el índice de transformación y la reducción en la ganancia de carne magra (Guedes, 2012).

3.3.2. *Brachyspira hyodysenteriae*

Es el agente causal de la disentería porcina. Su capacidad de persistir en las heces y la existencia de vectores biológicos (roedores) permiten a esta bacteria persistir en las explotaciones largos periodos de tiempo. La bacteria coloniza el intestino grueso del cerdo dando lugar a una colitis mucohemorrágica grave (Hampson *et al.*, 2006; Pallarés *et al.*, 2006).

La morbilidad media es del 30-40%, pudiendo llegar al 90%. La mortalidad varía del 5 al 15%, pudiendo llegar al 30% dependiendo de la eficacia del tratamiento. Los animales afectados son cerdos de cebo los cuales presentan un retraso en el crecimiento (aproximadamente 374 g de pérdida diaria) y aumento del índice de conversión (350 g de media) y por ende, importantes pérdidas económicas tanto directas como indirectas (Hans, 2001; Guedes y Barcellos, 2012).

La presencia de esta enfermedad en la granja exige gastos elevados de control y que repercuten durante años en el rendimiento económico. La disentería porcina origina un aumento del coste de producción que puede llegar a superar el 20% (Carvajal *et al.*, 2006).

3.3.3. *Salmonella spp*

La salmonelosis afecta principalmente a lechones destetados hasta los tres o cuatro meses de edad (Kich, 2012). La salmonelosis porcina presenta dos formas diferenciadas según la especie infectante: formas septicémicas, causadas por *S. choleraesuis* y formas entéricas causadas por *S. typhimurium* y *S. enteritidis* principalmente. Su hábitat natural es el tracto intestinal de personas y animales. La importancia de la salmonelosis radica en ser un problema sanitario-económico de las explotaciones porcinas y además un problema de salud pública. Es considerada como una de las principales zoonosis de origen alimentario (McEwen y Fedorka-Cray, 2002; Teale, 2002; Carlson *et al.*, 2003). La forma septicémica suele cursar con la muerte del animal. Son más comunes las formas entéricas, en las que la diarrea amarillenta y maloliente es característica. Los datos de morbilidad y mortalidad varían mucho, por ejemplo en registros americanos la participación de *Salmonella* en cuadros clínicos entéricos es menor que en las septicemias (9% y 58%, respectivamente). El número de lechones que enferman en una explotación es variable, en general, menos del 15%. La mortalidad, en estos casos, queda registrada entre el 4-6%. Los lechones que sobreviven casi siempre presentan un crecimiento retrasado y la mortalidad, en estos casos, varía del 20 al 40% (Kich, 2012). En algunos casos las pérdidas económicas pueden ser muy importantes ya que la infección puede aumentar el coste de producción, debido, principalmente, a la reducción en la ganancia de peso y aumento del índice de conversión, aumento del uso de antibióticos y de la mortalidad (Gorton *et al.*, 1996).

3.4. Diarreas posdestete por *E. coli*

3.4.1. Etiología

Las especies de *E. coli* se clasifican dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Muchos de estos microorganismos son flora habitual del tracto gastrointestinal mientras que otros son responsables de una amplia variedad de enfermedades en el ganado porcino, entre las que se encuentra la diarrea posdestete (DP) (Goswami *et al.*, 2008). *Escherichia coli* es considerada como una de las causas más importantes de dicha enfermedad en lechones (Hampson, 1994; Khac *et al.*, 2006) y las cepas involucradas tienen factores de adhesión que les permiten colonizar las vellosidades intestinales y producir una o varias enterotoxinas (Wilson y Francis, 1986; Moon y Bunn, 1993).

La patogenicidad de una cepa de *E. coli* está determinada por los factores de virulencia que posea. En base a esos factores de virulencia, las cepas de *E. coli* se agrupan en patotipos. Los principales patotipos implicados en las colibacilosis posdestete son:

- Cepas *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), asociadas a la diarrea posdestete.
- Cepas *E. coli* enterotoxémicas (ETEEC), asociadas a la enfermedad de los edemas (Gyles, 1994; Francis, 2002; Frydendahl, 2002).

Las cepas aisladas con más frecuencia en procesos de DP pertenecen a un reducido grupo de serogrupos (Garabal *et al.*, 1996) que combinan antígenos O (LPS), K (capsular) y/o F (fimbrial) (Holland, 1990; Fairbrother, 1992; Bertschinger y

Fairbrother, 1999) además de ser normalmente hemolíticos (Smith y Linggood, 1971) (Tabla 2).

3.4.2. Epidemiología

Los lechones suelen infectarse con cepas patógenas de *E. coli* durante la lactación, vehiculando el patógeno a la nave de transición y cebo donde se produce una transmisión horizontal. Una vez se ha producido la infección, el hábitat primario de *E. coli* es el tracto gastrointestinal (Bertschinger y Gyles, 1994). La proliferación bacteriana se produce principalmente en el intestino delgado, si bien también se puede aislar en ciego y colon (Wada *et al.*, 1996). La eliminación fecal es la principal vía de diseminación de *E. coli* en el medio ambiente, dando lugar a la contaminación del suelo, agua y alimento. El contacto directo entre los animales de una misma cuadra, e incluso otros animales que vehiculan el patógeno, posibilita también la diseminación de la enfermedad (Mores y Moreno, 2012).

La morbilidad de la enfermedad es muy variable entre explotaciones afectadas, pudiendo aparecer y desaparecer de forma repentina (Bertschinger y Fairbrother, 1999), siendo frecuente la reaparición del proceso (Kurtz *et al.*, 1969). La mortalidad de la DP tiende a ser baja (Bertschinger y Fairbrother, 1999; Mores y Moreno, 2012). Las DP asociadas a *E. coli* se han observado típicamente en el periodo comprendido entre final de destete y a lo largo de la transición, pero en los últimos años diversos factores (Tabla 1) han hecho que sea posible la aparición de esta enfermedad durante las 4-6 primeras semanas de cebo (Ramis *et al.*, 2011). Trabajos como el de Kaufmann *et al.* (2006) en el que se observó una gran prevalencia de cepas virulentas de *E. coli* en

muestras fecales obtenidas en matadero son muestra de que cepas patógenas pueden persistir a lo largo de todo el ciclo productivo.

3.4.3. Patogénesis

Para que exista sintomatología clínica en las infecciones por *E. coli* son necesarias una serie de condiciones, esquematizadas por Felder *et al.* (2001) en los siguientes puntos:

- Contacto de *E. coli* con la mucosa del hospedador.
- Fijación a la mucosa y resistencia a las fuerzas de arrastre.
- Adquisición de los nutrientes necesarios para el crecimiento.
- Tasa de crecimiento suficientemente elevada para mantener o aumentar la población bacteriana.
- Resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador.

Son dos los principales atributos que confieren a las cepas ETEC su capacidad patógena: su habilidad para colonizar el intestino y su capacidad para producir toxinas que estimulan la secreción de electrolitos y agua a nivel de intestino delgado. La efectividad con la que *E. coli* realiza ambos procesos de forma conjunta, va a depender del conjunto de factores de virulencia que posea la cepa implicada en la infección (Gaastra y De Graaf, 1982).

3.4.4. Factores de virulencia

Las cepas patógenas de *E. coli* se caracterizan por la producción de una amplia gama de factores de virulencia (Tabla 2) que se pueden agrupar en fimbrias y toxinas.

Tabla 2. Factores de virulencia y serotipos más frecuentes en ETEC porcinas.

SEROGRUPOS, FIMBRIAS Y ENTEROTOXINAS AISLADAS CON MAYOR FRECUENCIA EN ETEC		
Serogrupos	O8, O64, O138, O139, O141, O147, O149, O157.	Hampson (1994); Blanco <i>et al.</i> (1997); Frydendahl (2002); Noamani <i>et al.</i> (2003)
Fimbrias [†]	F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, F41	Ojeniyi <i>et al.</i> (1994)
Enterotoxinas	LT* STa STb**	Gyles (1992); Ojeniyi <i>et al.</i> (1994)

*LT: enterotoxina termolábil; **STa, STb: enterotoxinas termoestable. [†] Entre paréntesis el nombre dado anteriormente a las fimbrias.

Una cepa patógena dispondrá normalmente de un grupo completo de una o varias toxinas y fimbrias. Las **fimbrias** o pili, son apéndices extracelulares altamente específicos de hospedador y que permiten a la bacteria colonizar la superficie epitelial del intestino delgado (Blanco *et al.*, 1997; Garabal *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1999). F4 (K88) y F18 son las fimbrias más aisladas en las DP asociadas a *E. coli* en todo el mundo (Cheng *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Fairbrother *et al.*, 2005). Las cepas F4+ causan diarrea y muertes en neonatos y en los primeros días posdestete (Bertschinger y Fairbrother, 1999; Verdonck *et al.*, 2004). Las cepas F18+ están ampliamente

distribuidas (Verdonck *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005) y son las principales responsables de la aparición de la enfermedad a partir de los 5 días postdestete (Svendsen *et al.*, 1974) y en los animales al inicio de cebo (Bertschinger y Fairbrother, 1999). La aparición más tardía de enfermedad por cepas F18+ se explica porque el receptor para F18 no se expresa en el intestino de lechones neonatos (Nagy *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2007b). En cambio, los lechones sólo expresan receptores para F5 y F6 en los primeros días de vida (Brown *et al.*, 2007a).

Las **toxinas** producidas por ETEC son enterotoxinas excretadas en el lumen intestinal. Existen 2 tipos principales: la toxina LT, sensible al calor y la toxina ST, resistente al calor. La toxina LT activa la adenilatociclasa de los enterocitos, lo que incrementa la producción de AMPc y por tanto, el incremento de la secreción de iones Cl^- , Na^+ y HCO_3^- (Rubio y Carvajal, 2009; Brown *et al.*, 2007b). Estos fenómenos explican la diarrea por hipersecreción, síntoma primario de la DP. La capacidad inmunógena de esta toxina hace que sea un componente importante en las vacunas (Rubio y Carvajal, 2009). Existen dos tipos de toxina ST, la STa y STb, que dan lugar a la aparición de diarreas al estimular la producción de GMPc vía guanilatociclasa, lo que inhibe el cotransporte de Na^+/Cl^- a nivel intestinal que conduce a la menor absorción intestinal de electrolitos y agua. Las toxinas ST están implicadas principalmente en las diarreas neonatales reduciéndose su efecto conforme aumenta la edad del animal (Brown *et al.*, 2007b; Rubio y Carvajal, 2009).

La Shiga Toxina, también llamada verotoxina, producida por algunas cepas ETEEC poseedoras de F18, puede llegar al sistema circulatorio donde produce un daño

vascular que es el responsable del posterior edema generalizado característico de la enfermedad de los edemas (Bertschinger y Fairbrother, 1999; Brown *et al.*, 2007b).

Algunas cepas de *E. coli* tienen la capacidad de producir tanto enterotoxinas como verotoxinas dando lugar a un cuadro clínico de diarrea y edemas (Blanco *et al.*, 1997; Noamani *et al.*, 2003) aunque no es frecuente que animales afectados por la enfermedad de los edemas presenten diarrea (Brown *et al.*, 2007b).

3.4.5. Lesiones

a. Procesos agudos

Los animales que mueren como consecuencia de DP asociada a *E. coli* presentan en general una buena condición corporal, aunque con signos de deshidratación y cianosis. Es frecuente ver el intestino delgado dilatado, edematoso e hiperémico con contenido que puede variar entre acuoso y mucoso (Bertschinger y Fairbrother, 1999). En el intestino grueso generalmente no se encuentran lesiones, aunque en algunas ocasiones hay contenido acuoso-mucoso y ligera congestión. A veces se observa coloración amarillenta de las heces (Bertschinger y Fairbrother, 1999; Brown *et al.*, 2007b). En muchos casos las venas del estómago están infartadas (Brown *et al.*, 2007b).

En cuanto a las lesiones microscópicas, la diarrea por cepas ETEC da lugar a ligeros signos de inflamación (Goswami *et al.*, 2008), mientras que la mucosa y el

epitelio aparecen intactos o con alteraciones mínimas (Bertschinger y Fairbrother, 1999; Brown *et al.*, 2007b). Es muy característico en los animales fallecidos a causa de la enfermedad, observar bacterias adheridas a la superficie del íleon (Wada *et al.*, 1996). Algunos autores han descrito un incremento del número de neutrófilos en la lámina propia y atrofia de las vellosidades (Vijtiuk *et al.*, 1995).

b. Procesos crónicos

La atrofia o acortamiento de las vellosidades intestinales es un cambio patológico que puede ser resultado de un amplio número de causas entre las que se incluyen agentes patógenos intestinales (virus, bacterias y parásitos), alimentarias (tanto nivel de ingestión como la composición de la dieta) e idiopáticos (Brown *et al.*, 2007a). La lesión microscópica característica de la DP es un acortamiento de las vellosidades intestinales, que suele ir acompañado de una proliferación de las criptas (Cox *et al.*, 1988; Vijtiuk *et al.*, 1995; Opapeju *et al.*, 2009). Todo ello se traduce en una pérdida significativa en la superficie de absorción del intestino que da lugar a malabsorción y diarrea. En la lámina propia suele aparecer un infiltrado celular neutrofílico que desaparece en pocos días si cesa la infección, mientras que en procesos más prolongados se observa un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas (Valpotic *et al.*, 1994; Vijtiuk *et al.*, 1995; Lackovic *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2007a).

3.4.6. Sistema inmunológico intestinal y la inmunoglobulina A

El epitelio intestinal forma una barrera física que impide a los compuestos

tóxicos y agentes patógenos entrar en el intestino y en la circulación sistémica. Además de sus propiedades de barrera, dicho epitelio desempeña un papel activo en la integridad de los órganos y de defensa del organismo a nivel local. El sistema inmunológico de la mucosa proporciona la primera línea de defensa contra la colonización de los patógenos microbianos (Shikina *et al.*, 2004).

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmune. Recibe diariamente una enorme carga antigénica y es capaz de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de bacterias comensales. El intestino posee mecanismos de defensa que limitan el acceso de los patógenos y sustancias nocivas al organismo. Estos mecanismos están integrados por diversos elementos como enzimas digestivas pancreáticas, el epitelio intestinal y las bacterias que constituyen la flora intestinal. Sin embargo, la barrera más efectiva está constituida por el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal - GALT (del inglés Gut-Associated Lymphoid Tissue) (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

El GALT representa la mayor masa de tejido linfoide en el organismo y, por lo tanto, constituye un elemento de gran importancia en la capacidad inmunológica total del huésped. Las funciones reguladoras de la respuesta inmunitaria intestinal ocurren en dos tipos de compartimentos: los tejidos linfoides organizados en forma de agregados, como los folículos asociados a las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos, o los tejidos linfoides difusos distribuidos en la lámina propia de la mucosa o en el epitelio intestinal (linfocitos intraepiteliales). El intestino delgado del cerdo contiene alrededor de 250 placas de Peyer (agregados de 5 o más folículos) y miles de folículos solitarios, que en el colon se encuentran aún en mayor cantidad.

Cada folículo se asocia a un epitelio especializado (células M) encargado de transportar los antígenos hasta contactar con el tejido linfoide. En todas las zonas del intestino, el sistema inmunológico está continuamente procesando antígenos de la luz intestinal, por lo que los folículos linfoides de la mucosa presentan un alto grado de activación (McDonald, 2001). Una vez activados por el contacto con los antígenos, los linfocitos T y B de las placas de Peyer adyacentes a las células M proliferan en forma de un clon antígeno-específico, pasan a la sangre y, desde allí, migran nuevamente a la lámina propia. La lámina propia aloja a los linfocitos TCD4+ y es el lugar donde los linfocitos B se transforman en células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A (IgA) específica contra los diferentes antígenos (McDonald, 2001).

En la superficie mucosa existe una gran producción de IgA que, a diferencia de la IgA circulante, es resistente a la proteólisis intraluminal y no activa la vía del complemento, por lo que no induce inflamación. Estas características, basadas en su estructura dimérica o polimérica, hacen a la IgA ideal como mecanismo de protección en las superficies mucosas en contacto continuo con estímulos antigénicos (Borrueal, 2003). Esta IgA juega un papel importante en la respuesta inmune gastrointestinal, ya que está presente en las secreciones mucosas en concentraciones muy por encima de otras clases de inmunoglobulinas. La mayoría de estas IgA se producen localmente por células plasmáticas en la lámina propia (Vaerman y Heremans, 1970).

3.4.7. Citocinas

Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que envían diversas señales estimuladoras, moduladoras o inhibitorias para células del sistema inmunológico o del resto del organismo (Lin *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 2010). Estas citocinas actúan como importantes mediadores en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria y son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana (Pié *et al.*, 2004). Sus funciones pueden ser autocrina, actuando en la propia célula productora; paracrina, actuando en células próximas; y endocrina cuando su acción es a distancia (Lin *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 2010). A pesar de que son en su mayoría secretadas por células del sistema inmune como los linfocitos y macrófagos, las citocinas también son producidas por células que tradicionalmente no se consideran como parte del sistema inmunológico. Estas incluyen las células epiteliales intestinales (CEI), células endoteliales y fibroblastos (Pié *et al.*, 2004).

Las CEI actúan como “vigilantes” del sistema inmune pues son fundamentales para la activación de inmunidad innata y, posteriormente, para la inducción de la respuesta inmune adquirida (Eckmann *et al.*, 1995; Sansonetti, 2004). Las CEI pueden iniciar las respuestas inmunes a través de la producción de citocinas que son cruciales para el reclutamiento y activación de neutrófilos, macrófagos, células T y B y células dendríticas (Pié *et al.*, 2004). Las CEI funcionan como sensores detectando patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP del inglés pathogen-associated molecular patterns) a través de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR del inglés pathogen-recognition receptors), como los receptores Toll-like (TLR). De esta manera, cuando un TLR reconoce a su PAMP específico se produce una rápida activación que

conlleva cambios a nivel celular que establecerán la activación de la respuesta inflamatoria. A partir del reconocimiento de los PAMP, las CEI secretan varias citocinas, alertando así a las células del sistema inmune, para activar defensas inmunitarias innatas y promover la respuesta inmune adquirida o adaptativa (Kagnoff y Eckmann, 1997; Neutra y Kozlowski, 2006).

La inmunidad adquirida es específica contra el antígeno y genera memoria inmunológica, por lo que induce una defensa duradera. Este tipo de inmunidad se basa fundamentalmente en la inmunoexclusión de antígenos por anticuerpos, mayoritariamente del tipo IgA. Ante un nuevo contacto con el antígeno, los linfocitos T proliferan, y se desencadena una respuesta inmunológica celular y un estímulo para que los linfocitos B se transformen en células plasmáticas productoras de IgA secretora antígeno-específica (Fagarasan *et al.*, 2001).

3.4.8. Diagnóstico

La DP en cerdos es una enfermedad compleja por los múltiples microorganismos capaces de producir una sintomatología similar, sin olvidar la posibilidad de infecciones mixtas por varios patógenos (Bertschinger y Fairbrother, 1999). La aparición de diarrea en los primeros días postdestete, con marcada deshidratación pueden ayudar al diagnóstico, pero el diagnóstico definitivo de DP asociada a *E. coli* requiere de pruebas laboratoriales como son las técnicas de cultivo bacteriano, ELISA, inmunofluorescencia indirecta (Francis 1983; Mullaney *et al.*, 1991) y PCR (Blanco *et al.*, 1992, 1997, 2004). Actualmente se hacen PCR para la

identificación de genes de factores de virulencia al objeto de tratar de establecer la capacidad patogénica (al menos potencial) de la cepa de *E. coli* que está afectando a los animales (West *et al.*, 2007).

3.4.9. Prevención

a. Antibioterapia

Existe una tendencia mundial de restringir el uso de antibióticos en los animales de producción, en especial en la Unión Europea que desde 2006 prohibió la utilización de promotores de crecimiento permitiendo solamente el uso de antimicrobianos como terapia. Hasta este momento, la aparición de diarreas colibacilares al inicio de cebo requiere como solución el uso de antibióticos, bien sea administrados mediante el agua de bebida, el pienso o con tratamientos parenterales. El tratamiento de la colibacilosis se basa en la administración de antimicrobianos vía oral o parenteral, siendo ampicilina, apramicina, ceftiofur, gentamicina, neomicina, espectinomina, furazolidona y sulfamidas, las moléculas que más se utilizan. Finalmente cabe señalar que el uso masivo de antibióticos genera preocupación en el consumidor, que cada vez más rechaza el uso de antibióticos en ganadería.

Esta tendencia en la UE de reducir o incluso eliminar el uso de antibióticos en producción porcina, es una de las causas del agravamiento actual de las enfermedades entéricas porcinas.

Sin embargo, muchos aislados de *E. coli* se están volviendo cada vez más resistentes a determinados antibióticos, por lo que antes de emplear la antibioterapia

es recomendable determinar la sensibilidad de las cepas involucradas. El tratamiento debe complementarse, en los casos de animales con diarrea, con fluidoterapia vía oral para reducir la acidosis metabólica y la deshidratación. En los casos de septicemia, el tratamiento sólo es efectivo en los cursos subagudos, siendo la ceftriaxona la molécula de elección, ya que puede atravesar la barrera hematoencefálica (Ramis *et al.*, 2011).

b. Vacunación contra la colibacilosis

Los anticuerpos formados frente a los antígenos F4 (K88) y F5 (K99) de la vacuna de *E. coli* bloquean la unión de *E. coli* a la pared intestinal, contribuyendo de manera importante a la protección del animal (Hampson, 1994). Además, los anticuerpos producidos contra cepas de *E. coli* que presentan los antígenos de los *pili* F4 o F5 interfieren con la expresión de estos. Una vez que los *pilis* de adherencia son eliminados, estas cepas de *E. coli* no se pueden unir a la pared intestinal y, por lo tanto, no son patógenas (Tizard, 2009).

Los objetivos de vacunar a los animales frente a *E. coli* son los de reducir las pérdidas ocasionadas por DP (Fairbrother *et al.*, 2005) y reducir la necesidad de costosos tratamientos profilácticos y terapéuticos (Bertschinger y Gyles, 1994). Además, la vacunación en cerdos puede servir de referencia en estudios de vacunación humana al ser los cerdos destetados, el único modelo natural para los estudios de inmunidad frente a la infección por cepas ETEC en el hombre (Felder *et al.*, 2001).

Diversos autores han dirigido sus trabajos de investigación a la creación de vacunas contra los antígenos de las fimbrias F4 y F18. La unión de las fimbrias F4 y F18 a sus respectivos receptores en los enterocitos es un paso esencial en la patogénesis

de esta bacteria, de manera que los lechones que no expresan dichos receptores van a ser resistentes a esas cepas F4+ y F18+ (Rutter *et al.*, 1975; Frydendahl *et al.*, 2003). En cambio animales con receptores F4/F18 en la superficie de los enterocitos si serán susceptibles, por lo que una respuesta inmunitaria en la que se generen anticuerpos que impidan la unión de las fimbrias con el receptor, podría reducir o incluso imposibilitar la colonización bacteriana.

La vacunación de las madres frente a *E. coli* se ha mostrado como un método económico y muy eficaz en la prevención de procesos colibacilares en las primeras semanas de vida de los lechones. La inmunidad adquirida en el calostro protege a los lechones al inicio del periodo neonatal, periodo en el que se producen la mayoría de muertes por ETEC (Moon y Bunn, 1993). La vacunación genera mejorías en la presentación clínica de la enfermedad como ausencia de diarrea en comparación con animales control (Hur y Lee, 2013). Sin embargo, la inmunidad que la cerda otorga a los lechones es poco duradera, quedando los animales expuestos a la enfermedad durante el final de la transición y el principio de cebo (Hampson, 1994). Con el fin de proporcionar a los lechones una inmunidad más duradera, diversos autores han dirigido sus trabajos de investigación a la creación de vacunas de aplicación directa en lechones con escasos resultados (Tabla 3).

Tabla 3. Vacunas probadas en lechones para inmunizar lechones contra ETEC.

VACUNA UTILIZADA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	EFFECTIVIDAD	AUTOR
Cepas <i>E. coli</i> F4+ inactivadas con formaldehido	Intramuscular	No efectiva	Bianchi <i>et al.</i> (1996)
Fimbria F18 encapsulada en microesferas de poly(lactide-co-glycolide)	Oral	No efectiva	Felder <i>et al.</i> (2001)
Fimbria F18 purificada vehiculada con adyuvante mucoso	Oral y nasal	No efectiva	Verdonck <i>et al.</i> (2007)
Conjugación de FedF de y fimbria F4	Oral	Reducción de excreción de <i>E. coli</i> F18 en animales infectados	Tiels <i>et al.</i> (2008)
Administración de fimbria F4 purificada	Oral	Estimulación del sistema inmune de la mucosa: producción de IgA e IgG	Van den Broeck (1999)
Subunidad FaeG recombinante de Fimbria F4.	Oral	Producción de Ac sistémicos y en mucosa contra F4. Reducción de la excreción de <i>E. coli</i> F4	Verdonck <i>et al.</i> (2004)
Vacuna ADN para la subunidad FaeG de F4.	Intradérmica	Producción de Ac sistémicos IgG sistémicos. Ligera reducción de excreción de <i>E. coli</i> F4	Melkebeek <i>et al.</i> (2007a;2007b)

En los trabajos expuestos en la Tabla 3 se observa que:

1. La vía de administración de la vacuna es principalmente oral para conseguir inmunidad activa a nivel de mucosas; y se sabe que cualquier intento de inducir inmunidad frente a *E. coli* debería producir una estimulación de la mucosa que produzca una generación de IgA o IgM (Fairbrother *et al.*, 2005). Sin embargo, la vía parenteral estimula el sistema inmune sistémico más que el específico de mucosa intestinal lo que limita la eficiencia de la vacunación por esta vía (Van den Broeck *et al.*, 1999). La ruta oral parecería más lógica para obtener una respuesta de IgA en el intestino delgado (Melkebeek *et al.*, 2013). Esto podría explicar la falta de eficacia de algunos de los estudios de la Tabla 3.

2. La inmunidad adquirida, en los trabajos con mejores resultados, reduce la gravedad del proceso pero no evita la infección.

3. Las vacunas de ADN pueden potenciar la respuesta inmune sin interferir con anticuerpos maternos (Bot y Bona, 2002).

c. Otras estrategias

Para la prevención de la colibacilosis se han intentado otras vías. Sin duda, la más utilizada es la inclusión de óxido de cinc en el pienso a niveles de hasta 2500 ppm durante hasta dos semanas durante la primera parte de la transición. La eficacia de esta medida es evidente para el conjunto de los veterinarios clínicos de porcino, pero tiene varios inconvenientes como el riesgo de contaminación ambiental a través de las deyecciones de los animales y que además puede favorecer la aparición de multiresistencias a antibióticos (Bednorz *et al.*, 2013). Una de las alternativas que ha

aparecido recientemente es la del óxido de cinc recubierto, que permitiría reducir la dosis hasta 100 ppm de cinc activo, con una capacidad de protección similar a la alternativa anterior y con un riesgo ambiental significativamente menor (Kwon *et al.*, 2014)

Otra medida de prevención es el uso de plasma porcino deshidratado (SDPP por sus siglas en inglés; spray dried porcine plasma) en el pienso, observándose en algunos casos la reducción de la aparición clínica de diarrea y mejoras en los rendimientos productivos (Van Dijk *et al.*, 2002; Niewold *et al.*, 2007; Bhandari *et al.*, 2008). Aunque no se ha definido completamente el mecanismo de acción, se supone que se debe a la presencia de anticuerpos específicos frente a *E. coli* o sus toxinas en el suero deshidratado, lo que supondría una transferencia de inmunidad pasiva a los lechones (Niewold *et al.*, 2007).

También se han utilizado anticuerpos de yema de huevo, obtenidos de gallinas ponedoras hiperinmunizadas con antígenos de *E. coli* como las fimbrias de adhesión, obteniéndose en este caso resultados variables; en algunos experimentos se observa una disminución de la enfermedad (Marquardt *et al.*, 1999), mientras que en otros no se observa ningún efecto (Chernysheva *et al.*, 2003). Se ha sugerido que la actividad de estas inmunoglobulinas podría verse afectada por las condiciones de acidez gástrica (Li *et al.*, 2009).

Material y métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales se criaron en condiciones que cumplían en todo momento la legislación española con respecto a la ordenación de granjas de porcino (R. D. 324/2000, de 3 de marzo, por el que se establecen normas básicas de ordenación de las explotaciones porcinas) y en cuanto a las normas de bienestar (R. D. 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos; trasposición literal de la Directiva 2001/88/CE, de 23 de octubre de 2001, relativa a las normas mínimas para la protección de cerdos).

4.1. Diseño experimental

En la Tabla 4 aparecen detallados los protocolos experimentales y la cantidad de muestras analizadas en cada una de las pruebas realizadas.

La pauta de vacunación registrada para este producto consiste en la primovacunación a los 10 días de vida y revacunación a los 20 días de vida. Sin embargo, se decidió testar dos pautas vacunales más: vacunados y revacunados a los 10 y 30 días de vida (V10-30), y vacunados y revacunados a los 20 y 30 días de vida (V20-30). Para cada grupo vacunado se dejó un grupo contemporáneo sin vacunación para servir de control en cada protocolo experimental (C10-20, C10-30 y C20-30). Las dos últimas pautas vacunales fueron incluidas en el estudio para comprobar si alguno de estos protocolos mostraba la misma eficacia, en lo que a datos clínicos y productivos se refiere.

Tabla 4. Muestras analizadas en cada prueba según el grupo experimental.

Protocolos experimentales	Estudio productivo (transición y cebo)	Estudio clínico (transición y cebo)	Aislamiento de <i>E. coli</i> durante el experimento	Determinación genes de virulencia de <i>E. coli</i> durante el experimento	Antibiograma	Aislamiento de <i>E. coli</i> al sacrificio	Determinación genes de virulencia de <i>E. coli</i> al sacrificio	Determinación de otros patógenos entéricos	Estudio histopatológico al sacrificio	Determinación de células productoras de IgA	Determinación del perfil de citocinas
V10-20	1893	1893	0	0	0	20	20	20	20	20	20
C10-20	1869	1869	12	12	8	20	20	20	20	20	18
V10-30	1200	1200	24	24	5						
C10-30	1200	1200	15	15	7						
V20-30	851	851	0	0	0						
C20-30	1286	1286	0	0	0						
Total	8299	8299	51	51	20	40	40	40	40	40	38

50

4.2. Granja y animales

Se utilizaron un total de 8299 cerdos cruce comercial de Duroc x (Landrace x Large White). Los animales procedían de cerdas que habían sido vacunadas con la misma vacuna que la prueba a los 80 días de gestación en las dos gestaciones previas. Se configuraron distintos grupos dependiendo del protocolo de vacunación: V10–20 y C10-20, V10-30 y C10-30, V20-30 y C20-30. En la Tabla 5 aparecen detallados los grupos experimentales y las fechas en que se realizaron las pruebas de campo.

Tabla 5. Grupos experimentales de la prueba Colidex-C®.

GRUPO	PROTOCOLO	N° ANIMALES	FECHA ENTRADA TRANSICIÓN	FECHA ENTRADA CEBO
Vacunado	V10-20	1893	Octubre 2008	Diciembre 2008
Control	C10-20	1869	Noviembre 2008	Enero 2009
Vacunado	V10-30	1200	Enero 2009	Marzo 2009
Control	C10-30	1200	Febrero 2009	Abril 2009
Vacunado	V20-30	851	Marzo 2009	Mayo 2009
Control	C20-30	1286	Abril 2009	Junio 2009

Las transiciones se desarrollaron entre los meses de octubre de 2008 a junio de 2009 y la fase de cebo se llevó a cabo entre abril y noviembre de 2009.

Los animales fueron castrados quirúrgicamente dentro de la primera semana de vida, de acuerdo con el R.D. 1135/2002 que establece las medidas de protecciones mínimas para los cerdos. Los animales permanecieron durante el periodo experimental sin medicación rutinaria frente a patógenos entéricos.

Todos los grupos experimentales se criaron bajo las mismas condiciones, usando los mismos piensos para cada fase, en las mismas granjas y con el mismo personal. El sistema productivo donde se desarrolló el experimento es un sistema de producción en múltiples fases. La granja de las cerdas, la transición y el cebo estaban en tres localizaciones geográficas distintas, situadas todas en la provincia de Toledo (España).

En la transición, los cerdos se ubicaron en tres naves con 1000 animales en cada nave, estando divididas en tres módulos cada una. El tamaño de las cuadras era de 2,7 m², en cada una de las cuales se alojaban 12 lechones. Cada cuadra estaba dotada con un bebedero tipo chupeta con cazoleta metálica y agua a libre disposición, y con un comedero tipo tolva metálica con 3 huecos de comedero para ofrecer el pienso en harina *ad libitum*.

En el cebo, se usaron 11 naves de 600 animales cada una, con cuadras con una superficie libre de 8,4 m² donde se alojaban 12 animales. Cada cuadra estaba dotada con dos bebederos tipo chupeta con cazoleta de hormigón y agua a libre disposición, y una tolva de hormigón con dos huecos de comedero para ofrecer pienso granulado *ad libitum*.

Las instalaciones se gestionaron mediante el sistema todo dentro-todo fuera, por sala en transición y por edificio en cebo.

Una vez alcanzado el peso comercial, los cerdos fueron sacrificados en el matadero de Incarlopsa (Tarancón, Cuenca) según los métodos rutinarios establecidos por la legislación. La toma de muestras se realizó en dicho matadero.

4.3. Vacuna

La vacuna utilizada, Colidex-C® (Farco Veterinaria, S.A., España), se compone de una suspensión de siete cepas de *E. coli* inactivadas con formaldehído y con calor de forma que se asegure la presencia en la mezcla final de los antígenos fimbriales F4 (K88) , F5 (K99), F41 (K41), F18 (K18) y F6 (P987), así como los toxoides de la toxina termolábil (LT), termoestable (STa), verotoxina (VT) y hemolisina (Hly), combinada con toxoide de *C. perfringens* Tipo C. Concretamente, cada dosis de 2 mL contiene 2×10^9 microorganismos de cada una de las cepas bacterianas inactivadas con calor, 1.5×10^9 microorganismos de cada una de las cepas inactivadas con formaldehído y 300 UI de toxoide β de *C. perfringens*. La vacuna se presenta como una emulsión múltiple, usando aceite mineral como adyuvante y tiomersal como agente conservante.

Los animales incluidos en el grupo vacunado fueron vacunados y revacunados mediante inyección intramuscular cervical, siendo la dosis de 0.5 cc de Colidex-C® para primovacunación y 1 cc para revacunación. Los animales control recibieron una inyección del mismo volumen de solución salina fisiológica como placebo.

4.4. Toma de datos clínicos y productivos

El estudio clínico y productivo se llevó a cabo tanto durante el período de transición como durante el de cebo en los seis grupos experimentales (V10-20, C10-20, V10-30, C10-30, V20-30, C20-30).

Durante la transición se registró para cada grupo experimental la mortalidad, los brotes de enfermedades entéricas y respiratorias, la morbilidad en cada brote de enfermedad, las medicaciones colectivas realizadas, así como los animales que no alcanzaron el peso necesario para la salida a cebo en el tiempo que sus contemporáneos. Se consideró un brote de enfermedad entérica aquel en el que los síntomas generalizados fueron diarreas, cualquiera que fuera la supuesta causa, que afectara a más del 20% de los lechones y requiriera una medicación colectiva. Se consideró un brote de enfermedad respiratoria aquel donde la sintomatología predominante fueran toses y estornudos acompañados de disnea, independientemente de la causa, que afectara a más del 20% de los animales y requiriera una medicación colectiva. A todas las bajas durante la transición se les realizó la necropsia para establecer un diagnóstico presuntivo, clasificando las bajas como “causa respiratoria” (lesiones compatibles con un proceso inflamatorio en el pulmón), “causa entérica” (lesiones compatibles con procesos inflamatorios gastroentéricos) y “enfermos crónicos” (animales con pérdida de condición corporal que indicara un proceso prologado en el tiempo independientemente de la causa).

Durante el cebo se registraron la mortalidad, el peso de los lechones al inicio del cebo, los Kg de pienso consumidos durante el cebo, el coste de medicaciones, los Kg de peso al sacrificio, la duración del cebo, los animales invendibles a final de cebo, así como los costes directos e indirectos. Con estos datos se calcularon la ganancia media diaria (GMD), el índice de transformación del pienso (IT) y el coste por cada Kg repuesto durante el cebo por lechón (CKR).

4.5. Aislamiento de *E. coli* en animales con diarrea durante transición y cebo

4.5.1 Toma de muestras

Se tomaron muestras de heces en caso de aparecer algún tipo de diarrea, bien que afectara a todo el grupo o bien que apareciera de forma individual. En el primer caso se tomaron como mínimo 12 muestras, mientras que en los casos individuales se tomaron aquellos animales más claramente afectados. Para la recogida de las heces se introdujo el hisopo en la ampolla rectal y seguidamente en medio CARY-BLAIR AGAR GEL (COPAN Diagnostics, Inc. Italia) para su transporte al Laboratorio de Referencia en *E. coli* (LREC) en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, España. El transporte se hizo inmediatamente después de la toma de muestras en refrigeración y contenedor aislante.

En el LREC se realizaron las siguientes pruebas:

4.5.2. Cultivo de *E. coli*

Las muestras fueron cultivadas durante toda la noche en caldo Luria-Bertani a 37°C con agitación.

4.5.3. Determinación de los serogrupos

Los antígenos O fueron determinados por la técnica de microaglutinación descrita por Guineé *et al.* (1981) y modificada por Blanco *et al.* (1992) usando los antisueros O disponibles.

4.5.4. Detección de los factores de virulencia

La detección de las toxinas LT, STa, STb, VT1 y VT2 y de las fimbrias F4, F5, F6, F18, F41 se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers descritos en la Tabla 6.

Tabla 6. Primers utilizados para la detección de factores de virulencia de *E. coli*.

FACTOR DE VIRULENCIA	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (5'→3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN	AUTOR
LT-I	F: GGCGACAGATTATACCGTGC R: CCGAATTCTGTTATATATGTC	708	Blanco <i>et al.</i> (1997)
LT-II	F: AGATATAATGATGGATATGTATC R: TAACCCTCGAAATAAATCTC	300	Penteado <i>et al.</i> (2002)
STa	F: ATTTTTATTTCTGTATTGTCTTT R: GGATTACAACACAGTTCACAGCAGT	176	Penteado <i>et al.</i> (2002)
STb	F: ATCGCATTTCTTCTTGCATC R: GGGCGCCAAAGCATGCTCC	175	Blanco <i>et al.</i> (1997)
VT1	F: CGCTGAATGTCATTGCTCTGC R: CGTGGTATAGCTACTGTCAAC	302	Blanco <i>et al.</i> (2004)
VT2	F: CTCGGTATCTATTCCCGG R: CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC	516	Blanco <i>et al.</i> (2004)
F4	F: GGTGATTTCAATGGTTCGGTC R: ATTGCTACGTTACGCGGAGCGC	773	Franklin <i>et al.</i> (1996)
F5	F: CCAGCGCCCGGCAGTAATGACTGC R: CCACCATTAGACGGAGCGCGG	278	Blanco <i>et al.</i> (2006)
F6	F: GCGCCCGCTGAAAAACAACACCAGC R: GTACCGGCCGTAACCTCCACCG	467	Blanco <i>et al.</i> (2006)
F18	F: GGTAAGTTGCACCAAGCGG R: CGACGCCTTAACCTCCTGCCCC	225	Blanco <i>et al.</i> (2006)
F41	F: GGCTATGGAAGACTGGAGAGGG R: GGGGTGACTGAGGTCATCCC	551	Blanco <i>et al.</i> (2006)

4.5.5. Antibiograma

Con las cepas de *E. coli* aisladas y cultivadas a partir de las muestras recogidas durante el periodo experimental se realizaron antibiogramas con 6 antibióticos: amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, gentamicina, neomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, marbofloxacina y ciprofloxacina a través de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar realizadas e interpretadas de acuerdo con las normas recomendadas por el Clinical and Laboratory Standard Institute (2008).

4.6. Aislamiento de *E. coli* al sacrificio

4.6.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de cinco animales elegidos al azar de cada grupo experimental (V10-20 = 5 y C10-20 = 5). En este caso se tomaron solo muestras de los grupos correspondientes a la pauta vacunal registrada para la vacuna. Para la recogida de dicha muestra se realizó una pequeña incisión con bisturí a nivel de yeyuno, por la que se introdujo un hisopo con el que se frotó ligeramente la mucosa, evitando en todo momento tocar la serosa del órgano. Una vez tomada la muestra se introdujo en medio CARY-BLAIR AGAR GEL (COPAN Diagnostics, Inc. Italia) para su transporte al LREC en refrigeración y contenedor aislante. En el laboratorio se realizaron las mismas pruebas indicadas en el punto 4.4.

4.7. Determinación de presencia de factores de virulencia de *E. coli* al sacrificio

4.7.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de íleon de 20 animales del grupo V10-20 y de 20 animales del grupo C10-20, y se transportaron en refrigeración hasta el Laboratorio de genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia donde se congelaron a -20°C hasta su posterior procesamiento. Con estas muestras se realizaron los protocolos que se describen a continuación.

4.7.2. Extracción de ADN

El ADN de las muestras de íleon de cada cerdo objeto del estudio se extrajo utilizando un kit comercial para la extracción de ADN (*DanaPure Spin Kit*. Genedan S.L., España).

El protocolo que se empleó fue el siguiente:

- Las muestras fueron sacadas del congelador de -20° C y se dejaron a 4°C hasta la descongelación. Se cortaron y pesaron en báscula de alta precisión. 25 mg de tejido de cada muestra fueron empleados.
- La muestra fue colocada en un tubo de 1,5 ml, se añadieron 180 µl de buffer de lisis de tejido + 20 µl de proteinasa K, se mezcló bien y se incubó a 55°C durante una hora.

- Tras la lisis de las muestras de intestino, se procedió a la realización de los siguientes pasos:
 - ✓ Adición de 200 μ l de tampón de lisis unión. Agitación con vortex. Incubación a 70° C durante 10 minutos.
 - ✓ Centrifugación durante 5 minutos a velocidad máxima. Pipeteo del sobrenadante en un microtubo nuevo.
 - ✓ Adición de 100 μ l de isopropanol. Se mezcló bien, y se transfirieron los lisados a las columnas MicroSpin insertadas en tubos de recolección de 2 ml. Se centrifugaron las columnas a 8000 g durante 60 segundos eliminándose el tubo de recolección.
 - ✓ Colocación de la columna MicroSpin en un nuevo tubo de recolección. Adición de 500 μ l de tampón de desinhibición. Centrifugación a 12.000 g durante 60 segundos y eliminación del líquido que atravesó la membrana.
 - ✓ Adición de 500 μ l de tampón de lavado. Centrifugación a 12.000 g durante 60 segundos y eliminación del líquido que atravesó la membrana.
 - ✓ Repetición del paso anterior (2º lavado).
 - ✓ Centrifugación a máxima velocidad durante 90 segundos para eliminar el etanol residual.

- ✓ Se insertó la columna MicroSpin en un nuevo microtubo de 1,5 ml. Se adiciono 100 µl de tampón de elución (precalentado a 70 ° C) en la columna MicroSpin. Incubación por 1 minuto a temperatura ambiente.

- ✓ Por último, se centrifugo a máxima velocidad durante 60 segundos.

4.7.3. Determinación mediante qPCR de la presencia de factores de virulencia de *E. coli* mediante q-PCR

El ensayo *plus/minus* es un ensayo de punto final que determina si una secuencia de ADN diana específica está presente (*plus*) o ausente (*minus*) en una muestra, utilizando un termociclador en tiempo real. En un ensayo *plus/minus*, los datos son recogidos al final del proceso de PCR, comparando la fluorescencia inicial con la fluorescencia final captada en cada muestra. Se realizó la PCR para los factores de virulencia F4 (K88), F5 (K99), F6 (987), F18, F41, LT y STa.

a. Primers

La secuencia de los primers utilizados, así como el tamaño del amplicón obtenido aparecen detallados en la Tabla 7.

Tabla 7. Primers utilizados para el diagnóstico de *E. coli*.

FACTOR DE VIRULENCIA	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (5' → 3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN	AUTOR
F4 (K88)	F: GGTTCAGTGAAAGTCAATGCATCT R: CCCCGTCCGAGAAGTAAC	70	West <i>et al.</i> (2007)
F5 (K99)	F: GCTATTAGTGGTCATGGCACTGTAG R: TTTGTTTTCGCTAGGCAGTCATTA	80	West <i>et al.</i> (2007)
F6 (987p)	F: CCAAAGTATTCCACTGCAAGCA R: GCCGTAACCTCACCGTTTGT	72	West <i>et al.</i> (2007)
F18	F: TTGTGCTTCCTTGCCAATAAAAC R: CTCCCCCTTGATTAGCAAAACC	82	West <i>et al.</i> (2007)
F41	F: CTGCTGATTGGACGGAAGGT R: CCAGTCTTCATAGCCATTTAACAG	88	West <i>et al.</i> (2007)
LT	F: CCGGCAGAGGATGGTTACAG R: GAATCCAGGGTTCTTCTCTCCAA	73	West <i>et al.</i> (2007)
Sta	F: GCAAAATCCGTTTAACTAATCTCAAA R: ACAGAAATAAAAATTGCCAACATTAGC	91	Frydendahl <i>et al.</i> (2001)

b. Protocolo del ensayo plus/minus

La reacción PCR se hizo para un volumen final de 25µl, conteniendo Power SYBR[®] green Mastermix (Applied Biosystems, Estados Unidos); Primer forward 10mM; Primer Reverse 10mM y 2µl de muestra de ADN, completando con agua libre de nucleasas. La amplificación PCR se realizó en un termociclador en tiempo real ABI 7300

(Applied Biosystems, Estados Unidos). La mezcla inicial se calentó a 95° C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos, consistiendo cada ciclo de dos etapas, primero desnaturalización a 95° C durante 15 segundos, hibridación y polimerización a 62° C 1 minuto. La lectura de fluorescencia se realizó al final de la fase de polimerización de cada ciclo. Se incluyeron controles positivos (ADN extraído de un cultivo de *E. coli*) y negativos (agua).

Se realizó un paso de disociación final al objeto de determinar la temperatura de melting (T_m) del amplicón en cada caso. Además, tras la realización de dicho paso, se confirmó la presencia del amplicón del tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en un sistema de migración CONSORT (Consort, Bélgica). La visualización se realizó en un transiluminador ultravioleta ETX 20-M (Vilber Lourmat, Alemania), en ambiente oscuro y la documentación del resultado de la electroforesis fue efectuada en equipamiento fotodocumentador de geles (Vilber Lourmat, Alemania).

4.8. Determinación de la presencia y cuantificación de *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae*, *Salmonella* spp. y PCV2 al sacrificio

Utilizando los mismos extraídos de ADN obtenidos para el punto 4.6 se determinó la presencia de tres bacterias incluidas en el CEP: *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y *Salmonella* spp. La elección de dichas bacterias y del PCV2 se debió a su importancia en los procesos patológicos que aparecen en los sistemas de producción porcina actuales y a su influencia a la hora de evaluar las citocinas del

intestino. La técnica de diagnóstico utilizada fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) clásica. Las muestras utilizadas fueron las de íleon y colon por ser regiones donde típicamente se localizan *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* y *Salmonella spp.* Además, ante el elevado número de animales positivos a *L. intracellularis*, y dada la gran importancia de dicha bacteria dentro del CEP, se completó el estudio con la cuantificación mediante qPCR de esta bacteria. Una vez que se realizó la qPCR para *L. intracellularis*, se optó por realizar el mismo protocolo para *B. hyodysenteriae*. Finalmente, la cuantificación de PCV2 se realizó mediante qPCR.

4.8.1. Protocolo de PCR clásica

La PCR clásica se realizó utilizando la técnica descrita por Suh y Song (2005) con una modificación. Suh y Song (2005) describieron una PCR multiplex para el diagnóstico simultáneo de las 3 bacterias mencionadas pero, con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica, se realizaron tres PCR simples para el diagnóstico de cada una de las bacterias, tal y como se detalla a continuación.

a. Primers

La secuencia de *primers* utilizados, así como el tamaño del amplicón obtenido aparecen detallados en la Tabla 8.

Tabla 8. Primers utilizados para la detección de *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y *Salmonella* spp.

AGENTE PATÓGENO	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (5'→3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)	AUTOR
<i>L. intracellularis</i>	F: GCAGCACTTGCAAACAATAAACT R: TTCTCCTTTCTCATGTCCATAA	210	Suh y Song (2005)
<i>B. hyodisenteriae</i>	F: GCTGGAGATGATGCTTCTGG R: GTCCAAGAGCTTGGCTGTTC	403	Suh y Song (2005)
<i>Salmonella</i> spp.	F: TTGGTGTTTATGGGGTCGTT R: GGGCATACCATCCAGAGAAA	298	Suh y Song (2005)

Todos los primers fueron fabricados por TIB MOLBIOL Syntheselabor GMBH (Berlín, Alemania).

b. Reacción de PCR

La reacción PCR se hizo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 9,875 µl de agua, 2,5 µl de buffer PCR 10x, 1,5 µl de MgCl₂ 25mM, 2µl de desoxinucleótidos trifosfato (dntp's) 2mM, 2µl de Primer forward 10mM, 2µl de Primer Reverse 10mM, 0,125µl de Taq Polimerasa (5u/µl) (Roche, Suiza) y 5µl de muestras de ADN. La amplificación PCR se realizó en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems,

Estados Unidos). La mezcla inicial se calentó a 94° C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos, consistiendo cada ciclo de 3 etapas, primero desnaturalización a 95° C 30 segundos, hibridación a 56° C 30 segundos y polimerización a 72° C un minuto, seguido por una polimerización final durante 5 minutos.

c. Electroforesis

El análisis del producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en un sistema de migración CONSORT (Consort, Bélgica). La visualización se realizó en un transiluminador ultravioleta ETX 20-M (Vilber Lourmat, Alemania), en ambiente oscuro y la documentación del resultado de la electroforesis fue efectuada en equipamiento fotodocumentador de geles (Vilber Lourmat, Alemania). Las imágenes se obtuvieron con un equipo de fotodocumentación y analizaron con el software Photocapt v. 12.4 (Vilbert Lourmat, Alemania).

4.8.2. Protocolo de PCR a tiempo real

a. Síntesis del plásmido con el fragmento de *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* y PCV2 y construcción de la curva estándar

Se decidió investigar la presencia de PCV2, además de los patógenos entéricos, para descartar que las lesiones histopatológicas o el grado de infiltrado se debieran a la acción de dicho patógeno.

Con el fin de crear las muestras estándar necesarias para la cuantificación absoluta en la qPCR se sintetizó un plásmido que contenía el fragmento de ADN de *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y PCV2 a amplificar. Dichos fragmentos, de 98, 142 Y 220 pares de bases, respectivamente, se insertaron dentro del plásmido pGEM®-T Easy empleando el kit pGEM®-T Easy vector System (Promega, Estados Unidos). Este plásmido fue clonado en células altamente competentes JM109 y posteriormente extraído con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Estados Unidos). Finalmente se cuantificó la concentración del plásmido del extraído mediante la medición de la absorbancia de ADN con el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos).

Tras conocerse la concentración de plásmido extraído, se calculó el número de copias del mismo para, posteriormente, realizar diluciones seriadas con un número de copias de plásmido por microlitro (μl) conocido. Concretamente se usaron las diluciones decimales desde 10^7 copias/ μl , hasta 10^1 copias/ μl

b. Primers

La secuencia de los *primers* utilizados, así como el tamaño del amplicón obtenido aparecen detallados en la Tabla 9.

Tabla 9. Primers utilizados para la detección de *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y PCV2 en la PCR a tiempo real.

AGENTE PATÓGENO	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (5' → 3')	TAMAÑO DEL AMPLICIÓN (pb)	AUTOR
<i>L. intracellularis</i>	F: GCGCGCGTAGGTGGTTATAT R: GCCACCCTCTCCGATACTCA	98	Lindecrona <i>et al.</i> (2002)
<i>B. hyodisenteriae</i>	F: ATGAAGAAGGCAGCAGACGTTTAT R: GTAGGAAGAAGAAATCTGACAATGCA	142	Akase <i>et al.</i> (2009)
PCV2	F: GCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGG R: TCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCA	220	Fenaux <i>et al.</i> (2004)

c. Reacciones de PCR a tiempo real

Se hicieron distintas reacciones de PCR para estos tres patógenos (*L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y PCV2) en un volumen final de 25µl cada una, utilizando Power SYBR[®] green Mastermix (Applied Biosystems, Estados Unidos) y conteniendo Primer Forward 10mM; Primer Reverse 10mM y 2µl de muestra de ADN de cada patógeno, completando con agua libre de nucleasas. La amplificación PCR se realizó en un termociclador en tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems, Estados Unidos). La mezcla inicial se calentó a 95° C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos, consistiendo cada ciclo de dos etapas, primero desnaturalización a 95° C 15 segundos, y después hibridación y polimerización a 62° C 1 minuto. La lectura de fluorescencia se realizó al final de la fase de polimerización de cada ciclo.

Al finalizar el procedimiento se realizó un paso de disociación final al objeto de determinar la temperatura de melting (T_m) del amplicón obtenido en cada caso.

El análisis del producto de PCR se completó con una electroforesis de muestras positivas tomadas aleatoriamente, usando un gel de agarosa al 2% y usando un transiluminador ultravioleta ETX 20-M (Vilber Lourmat, Alemania) para comprobar que los amplicones tenían el tamaño esperado. Las imágenes se obtuvieron con un equipo de fotodocumentación y analizaron con el software Photocapt v. 12.4 (Vilbert Lourmat, Alemania).

Los primers fueron fabricados por TIB MOLBIOL Syntheselabor GMBH (Berlín, Alemania).

4.9. Estudio histopatológico al sacrificio

4.9.1. Toma de muestras para el estudio histopatológico

Se tomaron muestras de yeyuno, íleon, ciego, colon y nódulos linfáticos mesentéricos de los grupos V10-20 y C10-20 (Tabla 10). De cada tramo se tomaron segmentos de 3-5 cm de longitud, abiertos longitudinalmente para la correcta fijación del tejido mediante formol tamponado al 10%.

Tabla 10. Esquema de los grupos experimentales usados en el estudio y muestras recogidas.

GRUPO EXPERIMENTAL	Nº DE INDIVIDUOS MUESTREADOS	TIPO DE MUESTRAS
V10-20	20	Yeyuno, íleon, ciego, colon y nódulos linfáticos mesentéricos
C10-20	20	Yeyuno, íleon, ciego, colon y nódulos linfáticos mesentéricos

4.9.2 Estudio de las lesiones histopatológicas

El estudio histopatológico se realizó en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia. Las muestras de tejido se procesaron mediante un procesador de tejidos automático Leica TP 1050 (Leica, Alemania). Tras la obtención del bloque de parafina, se realizaron cortes seriados de 4 μm de grosor con un micrótopo Leica RM 2155 (Leica, Alemania) para su posterior tinción mediante la técnica de hematoxilina-eosina, deshidratación y montaje con Eukitt® (O. Kindler GmgH & Co., Alemania). Su estudio se realizó mediante un microscopio óptico Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Alemania).

Se estudió la presencia de lesiones histopatológicas en íleon y colon. Se utilizó el infiltrado celular a nivel de la mucosa como parámetro para la valoración de lesiones intestinales. Con el fin de poder realizar un estudio comparativo entre los animales vacunados y controles, se valoró el infiltrado celular siguiendo el criterio descrito en la Tabla 11. La valoración categórica empleada es similar a la utilizada por Vijiuk *et al.*

(1995). La valoración de la cantidad de infiltrado celular fue realizada a ciegas siempre por la misma persona, la cual desconocía si los animales pertenecían al grupo vacunado o control.

Tabla 11. Valoración del infiltrado celular utilizada.

PUNTUACIÓN	DESCRIPCIÓN
0	Ausencia de infiltrado celular en mucosa
1	Escaso infiltrado celular en mucosa
2	Moderado infiltrado celular en mucosa
3	Abundante infiltrado celular en mucosa

Las figuras 1, 2 y 3 muestran a modo de ejemplo cómo se realizó la puntuación del infiltrado celular.

Figura 1. Puntuación 1 de infiltrado celular.

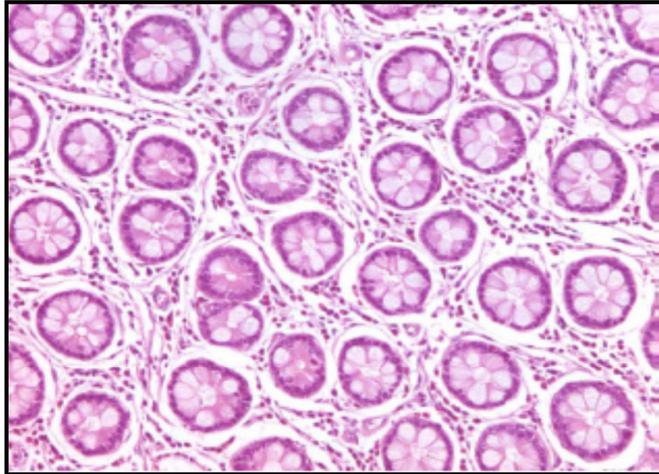


Figura 2. Puntuación 2 de infiltrado celular.

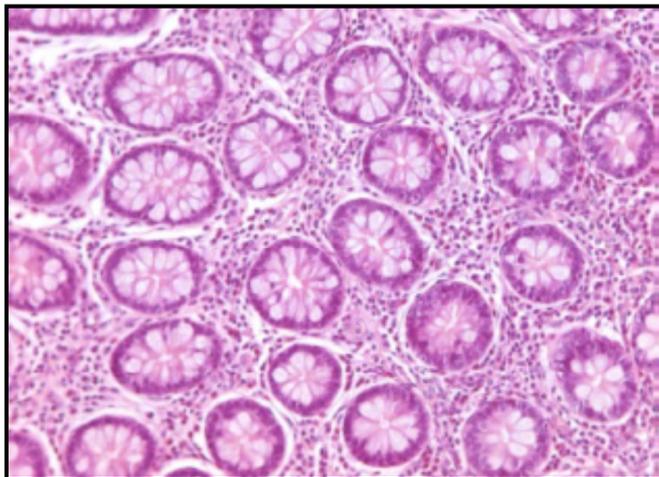
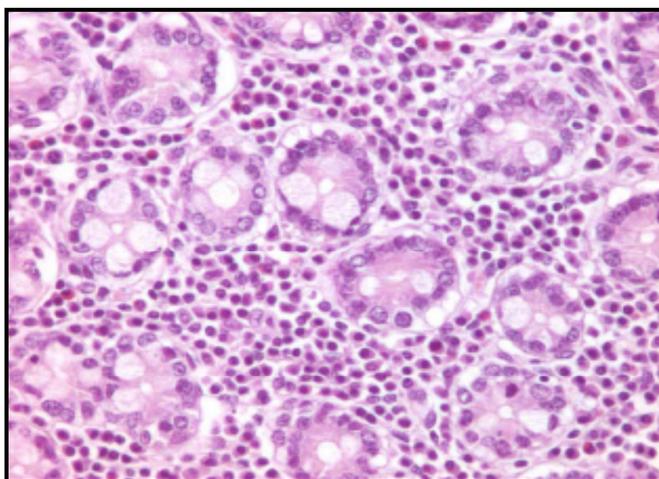


Figura 3. Puntuación 3 de infiltrado celular.



4.10 Detección de células productoras de IgA mediante inmunohistoquímica

De las muestras procesadas e incluidas para el estudio histopatológico (4.9) se obtuvieron cortes de 4 µm de grosor de intestino (íleon y colon) para realizar una técnica inmunohistoquímica (IHQ) para la evaluación del número de células plasmáticas productoras de IgA. La inmunohistoquímica se realizó en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

Tras la obtención de los cortes, se incubaron en una estufa a 56°C durante un periodo de 24 horas. A continuación se realizó la técnica de IHQ siguiendo los siguientes pasos:

- Desparafinado y rehidratación
- Para inhibición de la peroxidasa endógena los cortes se incubaron en una solución de H₂O₂ en metanol al 1,5% durante 30 minutos
- Lavado en PBS y montaje en cámara húmeda
- Para el desenmascaramiento antigénico se realizó el tratamiento enzimático con pronasa, dilución 1:10 durante 12 minutos
- Enjuague y lavado en PBS
- Para el bloqueo de reacciones inespecíficas los cortes fueron incubados con suero normal de conejo al 1% en PBS a temperatura ambiente, durante 30 minutos
- Incubación con el anticuerpo primario frente a IgA (Goat anti-Pig IgA Antibody Affinity Purified, Bethyl Laboratories, Inc., Estados Unidos) a una dilución

1:3000 a temperatura de 37° durante 1 hora

- Lavado en PBS
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado conejo-anticabra (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated, Dako, Dinamarca) a una dilución (1:200) a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Lavado en PBS
- Incubación con el complejo avidina biotina-peroxidasa - 30 µl de avidina + 30 µl de biotina + 1000 µl de PBS (VECTASTAIN Elite ABC Kit – Standard, Vector Laboratories, California, Estados Unidos) a temperatura ambiente durante 1 hora
- Lavado en PBS
- Revelado con solución de diaminobenzidina-peroxidase (Liquid DAB Substrate Chromogen System®, Dako, California, USA) durante 5 minutos.
- Lavado en agua corriente.
- Contraste con hematoxilina de Mayer durante 2 minutos
- Lavado en agua corriente
- Deshidratación y montaje con Eukitt® (O. Kindler GmgH & Co., Alemania).

Se utilizó solución tamponada de PBS (pH 7,4) para los lavados entre las etapas.

Se dejó una muestra como control negativo para identificar coloración inespecífica, incubando solamente con PBS en el momento correspondiente al anticuerpo primario.

El conteo de las células marcadas se realizó obteniendo una imagen digital a 40 aumentos mediante un microscopio óptico Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Alemania). Con el fin de poder realizar un estudio comparativo entre los animales vacunados y

controles. De cada muestra se contaron las células marcadas en 12 campos no superpuestos de 10.000 μm^2 .

4.11. Determinación de niveles de transcrito de citocinas

Se determinaron los niveles de transcrito de IFN- γ , IFN- α , TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-12p35, IL12-p40 en muestras de tejido intestinal.

4.11.1. Toma de muestras

Se tomaron de cada animal muestras de íleon de 1 cm de longitud. Dichas muestras se ultracongelaron inmediatamente tras el sacrificio mediante inmersión del tejido en nitrógeno líquido. Seguidamente se transportaron al Laboratorio de genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia donde se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Finalmente, se analizaron 20 muestras del grupo V10-20 y 18 del grupo C10-20.

4.11.2. Extracción de ARNm

Para el análisis de los niveles de transcrito de las citocinas se extrajo ARN mediante el kit RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen, Estados Unidos). Este sistema está basado en columnas con membranas de sílica para extraer de ARN mayores a 200 nucleótidos. De esta manera se purifica el ARN, excluyendo la mayoría de los ARN menores a 200

nucleótidos que engloban a los ARN ribosómico (ARNr) 5.8S, ARNr 5S y a los ARN de transferencia, que suponen un 15-20% del total del ARN.

Los tampones empleados contienen alta concentración de sales, lo cual permite que el ARN mayor de 200 nucleótidos se adhiera a la membrana de sílica. El tampón *RLT* utilizado contiene guanidina-tiocianato que facilita la lisis de la muestra, su homogeneización y la inactivación de las RNasas. La temperatura a la que se realizó la extracción fue de 25°C.

El protocolo que se empleó fue el siguiente:

- Las muestras fueron sacadas del congelador de -80° C y se dejaron a 4°C hasta la descongelación. Se cortaron y pesaron en báscula de alta precisión 20 mg de cada muestra.
- La muestra fue colocada en un tubo de 2 ml de fondo plano, se añadieron 350µl del tampón *RLT* suplementado con 1% de β-Mercaptoetanol como inhibidor de RNasas.
- El tejido fue sometido a una homogeneización durante 30 segundos mediante TissueRuptor (Qiagen, Estados Unidos), para la optimización de la extracción del ARN.
- Tras la homogeneización de las muestras de intestino se procedió a la realización de los siguientes pasos:
 - ✓ Adición de 350 µl de etanol 70%, que fueron mezclados con la muestra por pipeteo y se transfirieron a las columnas *RNeasy* insertadas en tubos

de recolección de 2 ml. Se centrifugaron las columnas a 8000 g durante 15 segundos eliminándose el líquido que atravesó la membrana.

- ✓ Adición de 700 μ l de tampón *RW1*, centrifugación a 8000 g durante 15 segundos y eliminación del líquido que atravesó la membrana.
- ✓ Adición de 500 μ l de tampón *RPE*. Centrifugación a 8000 g durante 15 segundos y eliminación del líquido que atravesó la membrana.
- ✓ Adición de 500 μ l de tampón *RPE*, centrifugación a 8000 g durante 2 minutos y eliminación del líquido que atravesó la membrana.
- ✓ La columna *RNeasy* se colocó en un nuevo tubo de recolección y se centrifugó durante un minuto a la velocidad máxima para eliminar el etanol restante que pudiera quedar.
- ✓ Por último, la columna *RNeasy* se insertó en un nuevo microtubo de 1,5 ml al que se adicionó 50 μ l de agua de grado biología molecular libre de RNasas, y se centrifugó durante 1 minuto a 16000 g.

4.11.3 Destrucción del ADN genómico

Para eliminar todo el ADN genómico presente en la muestra de ARN extraído se utilizó el kit Turbo DNA free (Ambion, Estados Unidos). Este tratamiento elimina el ADN presente y los cationes divalentes como calcio y magnesio que pueden catalizar la degradación del ARN cuando la muestra es calentada. El protocolo empleado fue:

- Adición de 5 μ l de tampón de la Turbo ADNasa
- Homogeneización mediante vórtice y centrifugado
- Adición de 1 μ l de ADNasa

- Homogeneización mediante vórtice y centrifugado
- Incubación a 37°C durante 30 minutos
- Adición de 5 µl de reactivo de inactivación de ADNasa. Incubación durante 2 minutos homogeneizando mediante vórtice cada 20 segundos.
- Centrifugación a 10000g durante 2 minutos
- Recolección de 40 µl del ARN libre de ADN genómico sin tocar el pellet formado en el fondo.

4.11.4 Retrotranscripción

La retrotranscripción para obtener el ADN complementario (cADN) al ARNm extraído de las muestras, se realizó utilizando el GenExpression Core Kit (Applied Biosystems Inc., Estados Unidos), utilizando hexámeros aleatorios como cebador.

La reacción de retrotranscripción se hizo para un volumen final de 20µl, conteniendo MgCl₂ Solution 25mM; Buffer GeneAmp (10x Applied Biosystems); 2 µl de cada nucleótido (dGTP, dATP, dTTP, dCTP); Hexámeros aleatorios 10µM; Retrotranscriptasa (5U/µl, Applied Biosystems); Inhibidor de RNasas (20U/µl, Applied Biosystems) y 3 µl de muestra de ARN.

La retrotranscripción se realizó en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, Estados Unidos). Las condiciones de retrotranscripción fueron: 42° C durante 15 minutos, 99 ° C durante 5 minutos, 5° C durante 5 minutos.

El cADN obtenido fue preservado a - 80°C hasta el momento de los análisis.

4.11.5. PCR cuantitativa (q-PCR)

a. Primers de las citocinas

La secuencia de los primers utilizados, así como el tamaño del amplicón obtenido aparecen detallados en la Tabla 12.

Tabla 12. Primers utilizados para la detección de citocinas en PCR a tiempo real.

CITOCINAS	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (5' → 3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (PB)	AUTOR
IFN-γ	F: TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG R: GGCTTTGCGCTGGATCTG	78	Royae et al. (2004)
IFN-α	F: CCCCTGTGCCTGGGAGAT R: AGGTTTCTGGAGGAAGAGAAGGA	108	Moue et al. (2007)
TNF-α	F: ACTCGGAACCTCATGGACAG R: AGGGGTGAGTCAGTGTGACC	68	Gabler et al. (2008)
TGF-β	F: CACGTGGAGCTATACCAGAA R: TCCGGTGACATCAAAGGACA	101	Moue et al. (2007)
IL-10	F: TGAGAACAGCTGCATCCACTTC R: TCTGGTCCTTCGTTTAAAAGAAA	104	Royae et al. (2004)
IL-12p35	F: AGTTCCAGGCCATGAATGCA R: TGGCACAGTCTCACTGTTGA	84	Moue et al. (2007)
IL12-p40	F: TTTCAGACCCGACGAACTCT R: CATTGGGGTACCAGTCCAAC	160	Kim et al. (2010)

Todos los primers estaban diseñados en la región de unión de dos exones para amplificar así sólo el ARNm y no el ADN genómico. Se probaron diferentes concentraciones de *primers* para optimizar las eficiencias de las distintas qPCR. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Tib-molbiol (Alemania).

b. Primers de los controles endógenos

Como controles endógenos se utilizaron los genes β -actina, ciclofilina y GAPDH porcinos, que ya han sido previamente utilizados para tal fin (Marten *et al.*, 1994). Los primers y amplicones para dichos genes aparecen en la Tabla 13.

Tabla 13. Primers utilizados para la detección de citocinas en PCR a tiempo real.

gen	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (5'→3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)	AUTOR
β-Actina	F: CTACGTCGCCCTGGACTTC R: GATGCCGCAGGATTCCAT	172	Marten <i>et al.</i> , 1994
Ciclofilina	F: TGCTTTCACAGAATAATTCCAGGATTTA R: GACTTGCCACCAAGTCCATTA	77	Marten <i>et al.</i> , 1994
GAPDH	F: ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA R: GATCGAGTTGGGGCTGTGACT	106	Marten <i>et al.</i> , 1994

c. Reacción de PCR

Para la realización de la qPCR se utilizó Power SYBR[®] GREEN Mastermix (2X, Applied Biosystems, Estados Unidos). EL volumen final fue de 25 μ l, conteniendo Primer forward 10mM; Primer Reverse 10mM y 2 μ l de muestra de ADN, completando

con agua libre de nucleasas. La amplificación PCR se realizó en un termociclador en tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Las condiciones de termociclado de todas las PCR fueron: 95° C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos, consistiendo cada ciclo de dos etapas, primero desnaturalización a 95° C 20 segundos, hibridación a 60° C 30 segundos y polimerización a 72° C 30 segundos. La lectura de fluorescencia se realizó al final de la fase de polimerización de cada ciclo.

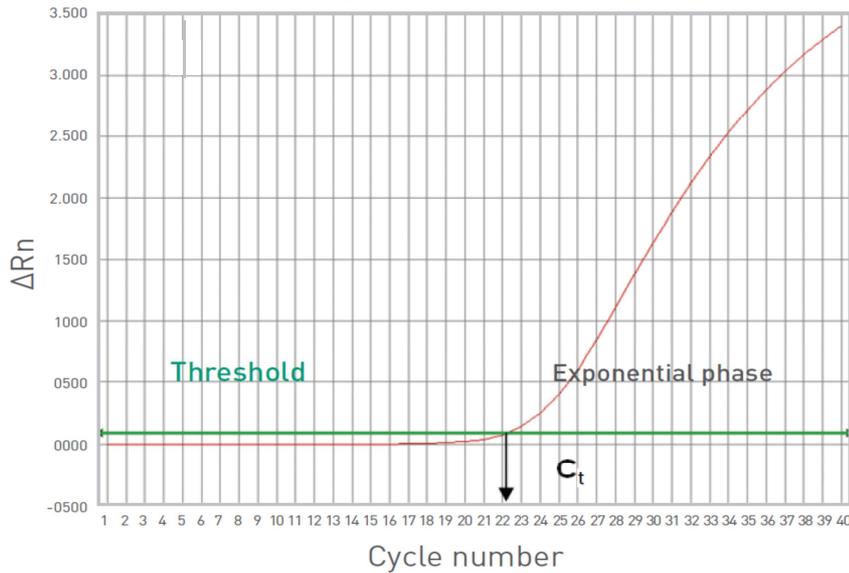
Al final de se realizó un paso de disociación final al objeto de determinar la temperatura de melting (Tm) del amplicón en cada caso.

4.11.6 Cálculo de la expresión génica

Cada muestra se analizó por duplicado para después calcular la media de los dos Ct obtenidos y hacer el cálculo de la expresión génica normalizada con un control endógeno.

El Ct (ciclo umbral del inglés threshold cycle) es la intersección entre una curva de amplificación y la línea de umbral. Es una medida relativa de la concentración diana en la reacción de PCR. La Figura 4 ejemplifica un Ct.

Figura 4. Ejemplo de Ct.



Fuente: Applied Biosystems.

Los resultados de cuantificación obtenidos para cada muestra, se relativizaron a la media de los tres genes endógenos. Se calculó la expresión génica mediante el método ΔC_t , relativizando tanto genes endógenos como genes de interés al de mayor expresión, tomando por tanto la muestra con menor C_t el valor de 1. Para ello, inicialmente, se calculó la C_t media de los replicados de cada muestra y se obtuvo la desviación standard (SD_{C_t}) de la C_t . La C_t de cada muestra se restó a la C_t de la muestra que mayor expresión mostró y para calcular una cantidad relativa se elevó la eficiencia de la PCR para cada gen al resultado de dicha resta ($Q = E^{(\min C_t - \text{muestra } C_t)}$), donde E es la eficiencia de la curva estándar de cuantificación. Por tanto, a la muestra de mayor expresión se le asignó un valor de 1. La SD de dicha cantidad relativa (SD_Q) se calculó mediante la fórmula: $SD_Q = Q \times \ln E \times SD_{C_t}$. A continuación se calculó el factor de normalización (F_{norm}) calculando la media geométrica de Q obtenida para cada uno de los genes endógenos en cada muestra y la SD de dicho factor (SD_{norm}), mediante la fórmula: $SD_{norm} = F_{norm} \cdot \sqrt{((SD_{HK1}/n \cdot Q_{HK1})^2 + (SD_{HK2}/n \cdot Q_{HK2})^2 + \dots + (SD_{HKn}/n \cdot Q_{HKn})^2)}$. El

valor de expresión normalizado se obtuvo mediante la fórmula: $EXP_{norm} = Q_{muestra}/F_{norm}$ y la SD de dicho valor: $SD_{EXPnorm} = EXP_{norm} \cdot \sqrt{((SD_{norm}/F_{norm})^2 + SD_{Expnorm\ muestra}/SD_{Qmuestra}/Q_{muestra})^2}$. Finalmente se utilizó un valor reescalado, multiplicando todos los valores de EXP_{norm} y $SD_{EXPnorm}$ por el factor de reescalado ($F_{reesc} = 1/EXP_{norm\ minimo}$). De esta manera, la muestra con menor expresión quedó con un valor 1. Todos estos cálculos fueron obtenidos de Vandesompele *et al.* (2002).

4.12. Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Estados Unidos).

Para las comparaciones de los datos clínicos y productivos, y dado que no se pudieron realizar replicados al usarse muestras muy numerosas, se ha utilizado como estimador de la dispersión de los datos la desviación estándar. Para ello se recopilaron los datos productivos obtenidos para el mismo grupo de animales en la misma granja de transición y cebo durante los 12 meses precedentes al estudio y se calcularon los estadísticos básicos. Así, diferencias mayores que la desviación estándar obtenida para los datos productivos del periodo 2008-2010 se consideraron significativas como ya se ha descrito en otros estudios (Pallarés *et al.*, 2015).

Se aplicó el test de *chi cuadrado* (χ^2) en tablas de contingencia para determinar las relaciones entre los parámetros categóricos estudiados, siendo la variable independiente el grupo experimental, y las variables dependientes la valoración del infiltrado celular y positividad-negatividad obtenida tras la realización de la PCR clásica

y a tiempo real, utilizando los residuos tipificados corregidos para determinar las diferencias entre grupos. En el caso de los aislamientos, la determinación de genes de virulencia y los antibiogramas, los análisis estadísticos se realizaron tanto para los grupos vacunado y control independientemente de los protocolos vacunados utilizados, como para cada uno de los protocolos vacunales comparados de forma pareada.

Para estudiar si el número de copias de ADN, detectado mediante la PCR a tiempo real, seguían o no una distribución normal se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov.

Las diferencias entre grupos con respecto al nivel de infiltrado inflamatorio en mucosa intestinal, el número de copias de *L. intracellularis* y el nivel de transcrito de las distintas citocinas se analizaron, mediante la prueba no paramétrica de comparación de mediana de Kruskal-Wallis entre todos los grupos y el test U de Mann-Whitney para discriminar diferencias entre grupos pareados.

La correlación entre los niveles de expresión de las distintas citocinas y los distintos parámetros se analizó mediante la correlación Rho de Spearman.

En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Resultados y discusión

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Datos clínicos y productivos

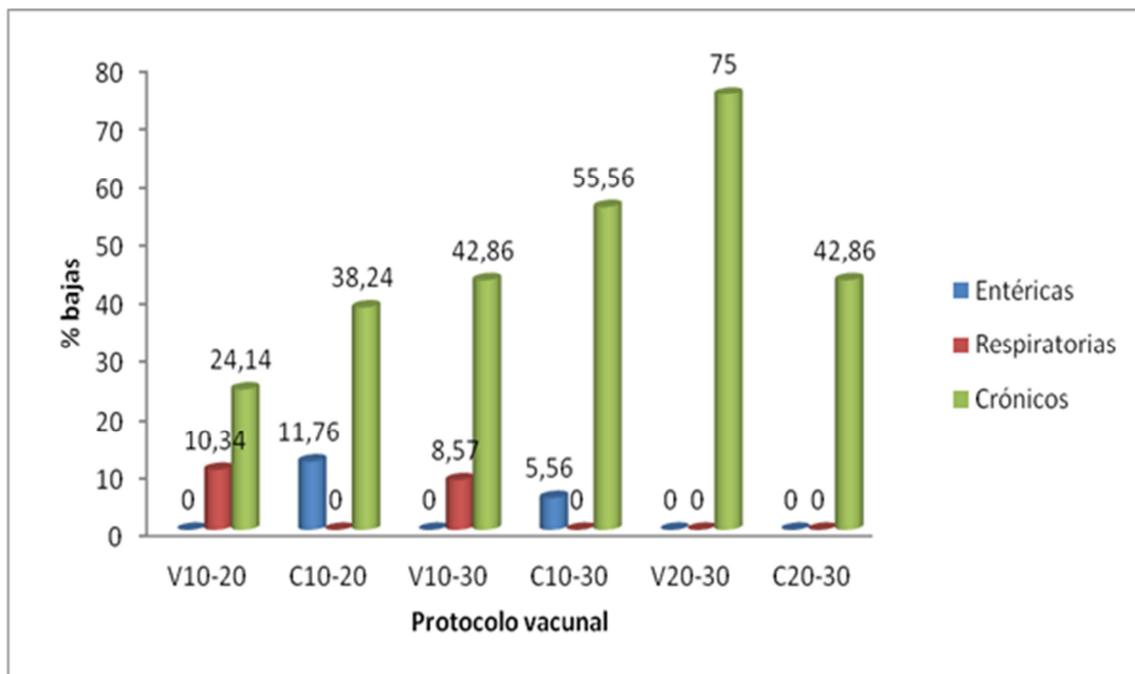
5.1.1. Datos en transición

Las transiciones tuvieron una duración media de 44 ± 2 días, sin que hubiera diferencias significativas entre los distintos protocolos de vacunación ni entre los grupos vacunado y control de cada protocolo de vacunación. En los grupos V10-20 y V10-30 se produjo menor mortalidad que en los controles respectivos. En el caso del grupo V20-30 la mortalidad del grupo vacunado superó a la del grupo control. Con respecto al porcentaje de bajas, se observó que ninguno de los grupos vacunados tuvo mortalidad registrada por causas entéricas durante la transición. Sin embargo, los grupos control C10-20 y C10-30 presentaron mortalidad por causas entéricas, suponiendo el 11,76% y el 5,56% sobre el total de bajas, respectivamente (Figura 5). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de animales enfermos crónicos al comparar los grupos V10-20 y C10-20 ($P < 0,001$) y al comparar los grupos V20-30 y C20-30 ($p < 0,001$). Los datos referentes a mortalidad se muestran en la Tabla 14 y las causas de mortalidad aparecen reflejadas en la Figura 5.

Tabla 14. Mortalidad total de lechones en todos los grupos vacunados y control en la fase de transición.

PROTOCOLO	GRUPO	LECHONES (Nº)	MUERTES (Nº)	MORTALIDAD (%)	ΔMORTALIDAD (%)
V10-20	vacunado	1893	29	1,53	-2,11
C10-20	control	1869	68	3,64	
V10-30	vacunado	1200	35	2,92	-0,08
C10-30	control	1200	36	3,00	
V20-30	vacunado	851	24	2,82	+1,65
C20-30	control	1286	14	1,17	

Figura 5. Mortalidad de lechones clasificada por causas en los grupos vacunado y control en la fase de transición.



* Porcentaje calculado sobre el total de las bajas

Los animales del grupo C10-20 y C10-30 mostraron signos de enfermedad entérica que afectaba a más del 20% de la población, mientras que en los demás

grupos no se observaron signos generalizados que requirieran una medicación colectiva.

Con respecto a los brotes de enfermedades respiratorias, los grupos V10-20 y C10-20 fueron los que mayor número de brotes sufrieron, seguidos del grupo C10-30. Los brotes de enfermedad entérica y respiratoria con la morbilidad estimada aparecen en las Tablas 15 y 16, respectivamente.

Tabla 15. Número de brotes de enfermedad entérica, morbilidad y días de medicación en cada uno de ellos durante el experimento en los grupos vacunados y control en la fase de transición.

PROTOCOLO	BROTOS ENTÉRICOS (Nº)	MORB 1 (%)	MORB 2 (%)	DÍAS MEDICADOS
V10-20	0	0	0	0
C10-20	2	30	25	10
V10-30	0	0	0	0
C10-30	1	35	0	5
V20-30	0	0	0	0
C20-30	0	0	0	0

Tabla 16. Número de brotes de enfermedad respiratoria, morbilidad y días de medicación en cada uno de ellos durante el experimento en los grupos vacunados y control en la fase de transición.

PROTOCOLO	BROTOS RESPIRATORIOS (Nº)	MORB 1 (%)	MORB 2 (%)	MORB 3 (%)	MORB 4 (%)	MORB 5 (%)	DÍAS MEDICADOS
V10-20	4	50	35	60	60	0	14
C10-20	5	40	60	50	60	40	23
V10-30	3	60	30	40	0	0	14
C10-30	0	0	0	0	0	0	0
V20-30	1	50	0	0	0	0	10
C20-30	0	0	0	0	0	0	15

Las principales diferencias entre el lote V10-20 y su control en la fase de transición fue la disminución de la mortalidad total (reducción de 2,11%), la ausencia de brotes de enfermedad entérica (el grupo C10-20 tuvo dos brotes) y la disminución de bajas por enfermedades crónicas (reducción de 14,10%). Todos estos beneficios produjeron una diferencia en el coste del lechón de 0,5 € en las condiciones de mercado analizadas contemporáneamente a la realización de este estudio.

5.1.2. Datos en cebo

Utilizando como comparación la desviación estándar de los parámetros productivos del periodo 2008 -2010, se ha encontrado una diferencia significativa en el IC del pienso comparando V10-20 con C10-20 (0,185 Kg corresponde a -5,58%). La GMD fue mayor en los animales vacunados, sin embargo la diferencia no fue significativa. Para el resto de parámetros evaluados no se encontraron diferencias significativas entre los grupos comparados. El protocolo V10-30 presentó mayor número de colas que su control (+2,62%). Sin embargo el protocolo vacunal V20-30 presentó menor número de colas que su control (-2,27%).

El grupo V10-20 presentó reducción en la mortalidad (-18,65%), índice de conversión (-4,84%) y animales invendibles (-14,6%) respecto a su grupo control, lo que produjo una reducción en el coste de kilo repuesto del 2,06%. La mejora de estos parámetros en el grupo V10-20 supuso un ahorro de cerca de 1,90 € por cerdo cebado comparados con el grupo C10-20.

El CKR no se calculó para los datos medios porque dicho parámetro está sometido a fuertes variaciones a lo largo del tiempo, lo que hace imposible su comparación a largo plazo.

Los resultados productivos obtenidos para cada grupo experimental aparecen en la Tabla 17. La media y la desviación estándar de los parámetros productivos analizados en estas mismas granjas de los años anteriores aparecen en la Tabla 18.

Tabla 17. Resultados productivos en cebo para cada grupo experimental.

PROTOCOLO	PME	PMS	IC	KR	GMD	CMC	CKR	BAJAS	DET	DEM	COLAS
V10-20	21,0	108,1	2,845	87,1	0,740	3,10	1,044	6,67	136	118	5,36
C10-20	20,2	107,55	3,013	87,35	0,726	2,76	1,066	8,2	134	121	6,28
V10-30	22,1	102,55	2,848	80,45	0,660	4,06	1,068	8,51	135	118	4,39
C10-30	23,2	107,78	2,887	84,58	0,630	3,08	1,036	10,33	150	135	1,77
V20-30	20,7	106,56	3,032	85,86	0,630	5,21	1,080	7,92	146	136	1,90
C20-30	24,1	113,18	2,915	89,08	0,650	4,43	1,081	7,08	150	137	4,17

Dónde: PME: peso medio de entrada a cebo (Kg); PMS: peso medio sacrificio (Kg), IC: índice de conversión del pienso (Kg/Kg), KR: kilos repuestos en cebo (Kg), GMD: ganancia media diaria (Kg), CMC: coste en medicamentos por cerdo (€), CKR: coste kilo repuesto en cebo (€), DET: días estancia total en cebo, DEM: días medios de estancia cebo, COLAS: porcentaje de animales invendibles al final del cebo.

Tabla 18. Media y desviación estándar de los parámetros productivos en la fase de cebo en el periodo 2008 -2010 en la misma granja.

	PME	PMS	IC	KR	GMD	CMC	CKR	BAJAS	DET	DEM	COLAS
Media	21,54	111,35	3,02	89,81	0,69	1,55		7,49	127,42	127,42	2,50
SD	2,29	4,52	0,156	4,43	0,059	0,678		1,71	7,74	7,74	1,53

Dónde: PME: peso medio de entrada a cebo (Kg); PMS: peso medio sacrificio (Kg), IC: índice de conversión del pienso (Kg/Kg), KR: kilos repuestos en cebo (Kg), GMD: ganancia media diaria (Kg), CMC: coste en medicamentos por cerdo (€), CKR: coste kilo repuesto en cebo (€), DET: días estancia total en cebo, DEM: días medios de estancia cebo, COLAS: porcentaje de animales invendibles al final del cebo.

La infección de *E. coli* es de gran importancia económica en el ganado porcino, debido a las pérdidas por mortalidad, el empeoramiento del IT y de la GMD, la generación de animales invendibles o retrasados con respecto a sus contemporáneos y

por los gastos derivados del control de la enfermedad (Morés y Moreno, 2007; Trevisi *et al.*, 2009). En otras especies como las aves, también se ha documentado este efecto negativo (Boratto *et al.*, 2004), dado que en aves inoculadas con la bacteria se observó un consumo de pienso significativamente menor, una ganancia de peso menor y un índice de transformación peor que en aves no inoculadas.

Bajo nuestro conocimiento, este es el primer trabajo sobre vacunación parenteral en cerdos frente *E. coli* realizado en condiciones de campo. La vacunación directa de lechones con Colidex® permitió evaluar parámetros clínicos, productivos y económicos de los animales que participaron del experimento, comparando tres protocolos vacunales diferentes, pero desafortunadamente no existe mucha literatura disponible sobre el uso de vacunas frente *E. coli* en lechones destetados. La mayoría de los trabajos publicados con vacunas frente a *E. coli* son estudios experimentales que utilizan un número reducido de animales (Bianchi *et al.*, 1996; Felder *et al.*, 2001; Verdonck *et al.*, 2007), situación distinta de las condiciones encontradas en las granjas de producción. Además, en estos estudios, los animales fueron vacunados, desafiados y sacrificados pocos días o semanas después del desafío, sin que hubiera tiempo suficiente para evaluar los índices productivos. En el presente estudio, fue realizado un estudio caso-control en condiciones de campo, lo que en muchos aspectos dificulta la comparación con los resultados obtenidos de forma experimental.

Contando con que en las pruebas de campo se puede producir una cierta heterogeneidad entre grupos que dificulte la comparación, los grupos de cerdos utilizados en este estudio caso-control fueron homogéneos, evitando factores que pudiesen provocar diferencias entre grupos. Cabe destacar que no hubo diferencias

significativas en el peso de entrada a la fase de cebo lo que podría haber influenciado parámetros como el índice de transformación, el peso al sacrificio o la duración de la fase de cebo. Por tanto, las diferencias observadas entre grupos se deberían mayormente al efecto de la vacunación frente a *E. coli*.

La mortalidad en la fase de transición, independiente del grupo (vacunado o control) y del protocolo, no superó el 3,64%. Este dato está de acuerdo con el citado por Morés y Moreno (2012) que afirman que la mortalidad es muy variable en función de los factores de riesgo encontrados en la granja, aunque suele ser menor del 10%. El hecho de que los animales vacunados, independiente del protocolo de vacunación, no presentasen mortalidad por causas entéricas ni brotes entéricos cuando se compararon con los grupos control, sugiere la protección efectiva de la vacuna en los animales vacunados.

Los resultados de mortalidad o ausencia de enfermedad entérica del presente trabajo difieren del estudio previo de Bianchi *et al.* (1996) que también trabajaron con vacuna intramuscular, aunque utilizaron cepas de *E. coli* F4+ inactivadas con formaldehído en lechones criados en condiciones de aislamiento y desafiados con *E. coli* 14 días tras la vacunación. Desafortunadamente, estos autores concluyeron que la vacuna no fue efectiva ante el desafío con *E. coli*. De la misma manera, el presente estudio difiere de los datos presentados por Felder *et al.* (2001) y Verdonck *et al.* (2007) que trabajaron con vacunas elaboradas con fimbrias F18 y de aplicación oral y oral/nasal respectivamente, no obteniendo tampoco resultados positivos de protección. Otros autores concluyeron que después del desafío con *E. coli* enterotoxigénica, en general, los lechones pueden presentar un crecimiento reducido,

sin embargo también demostraron que el uso de algunos elementos protectores pueden actuar reduciendo el impacto de la infección sobre los parámetros productivos. Este hecho fue observado cuando se utilizó triptofano para intentar disminuir el impacto de la *E. coli* sobre lechones (Trevisi *et al.*, 2008). Morés y Moreno (2012) afirman que existe una reducción en la ganancia de peso de los lechones aunque la diarrea sea transitoria. Estas experiencias aportan evidencias de que la infección por *E. coli* potencialmente altera los parámetros de crecimiento y eficiencia, y que el uso de elementos protectores pueden evitar o disminuir el impacto de *E. coli* sobre los animales, como se ha observado en el presente estudio.

Yan *et al.* (2009), comparando características de producción entre cerdos con y sin receptor F4, encontraron que los animales con receptor F4ab, F4ac o con ambos mostraron mayor GMD, peso de la canal y longitud de canal que cerdos que no tenían estos receptores. Los autores atribuyeron estos resultados al hecho de que la microbiota intestinal normal (lactobacilos y bifidobacterias) podría reconocer y unirse a estos receptores para ejercer una barrera contra la adherencia y colonización de bacterias patógenas al mismo tiempo que promoverían la digestión y absorción de los alimentos (Meng *et al.*, 1998). De manera similar, una reducción en la carga de *E. coli* derivada de un procedimiento inmunoproláctico como el estudiado, podría dejar disponibles más receptores a la flora saprófita, apoyando el paradigma anteriormente esbozado.

Para analizar adecuadamente los datos se debe considerar que los experimentos fueron realizados en lotes sucesivos durante el año de 2009, lo que podría generar variaciones estacionales entre grupos. Sin embargo, cada grupo

vacunado tuvo un grupo control contemporáneo, que permitió realizar las comparaciones deseadas. También, se debe considerar las diferencias estacionales que pueden ocurrir entre protocolos (V10-20, V10-30 e V20-30), por esto las comparaciones sólo son posibles entre los grupos vacunados y sus controles.

La diferencia que hay en el índice de transformación comparando el lote V10-20 con su control es mayor que la observada en los demás protocolos. Sin embargo, de nuevo hay que tener en cuenta que estos grupos fueron criados en invierno, lo que podría justificar este mayor IT, ya que en algunas partes de España hay una fuerte correlación entre la temperatura ambiental y este parámetro ($r^2=0,9147$, $p<0,001$, Ramis comunicación personal; datos inéditos), siendo los meses de invierno los que presentan una mayor índice de transformación del pienso por el consumo de energía en los mecanismos de termorregulación (Nienaber *et al.*, 1989).

En la fase de cebo, la reducción de un 2% en el coste de producción por kilo repuesto observada en el protocolo V10-20 comparada al C10-20, supone un ahorro de 2€ por cada animal producido. Sumando estos beneficios con los beneficios obtenidos durante la transición, finalmente hay un ahorro de 2,5€ por cada animal cebado, lo que cubriría el coste de la vacuna y dejaría un beneficio marginal elevado al productor.

De acuerdo con los resultados de este estudio, la vacunación de lechones a los 10 días y la revacunación a los 20 días de edad, vía intramuscular, demostró ser eficiente para mejorar el rendimiento productivo y el coste de producción en un sistema de producción en sitios con histórico de problemas causados por *E. coli*. Por lo

tanto, el resto de pruebas realizadas en laboratorio se centrarán en estos grupos experimentales (V10-20 y C10-20).

El grupo V10-20 presentó menor número de colas que su control, sin embargo, cuando se compararon con los demás protocolos de vacunación (V10-30 e V20-30), este grupo junto con su control (C10-20) presentaron un mayor porcentaje de animales retrasados en la fase de cebo. Este resultado probablemente se debe al hecho de que la fase de cebo de los grupos V10-20 y C10-20 se desarrollaron durante el invierno, lo que podría producir un incremento en el número de colas por otras causas como las enfermedades respiratorias o las multisistémicas víricas (Ramis *et al.*, 2011).

5.2. Aislamientos bacterianos obtenidos de los brotes de diarrea sospechosos de colibacilosis

La Tabla 19 muestra la distribución por fase y por protocolo vacunal de las muestras tomadas de animales con diarrea y enviadas al LREC.

Tabla 19. Muestras de animales con diarrea enviadas al LREC para aislamiento de *E. coli*.

	V10-20	C10-20	V10-30	C10-30	V20-30	C20-30
Transición	0	12	24	3	0	0
Cebo	0	0	0	12	0	0

5.2.1. Frecuencia de aislamientos

Se aisló *E. coli* en el 74,5% de las muestras sospechosas frente al 25,5% que resultó negativo. De las muestras positivas, el 68,4% correspondía a animales de grupos control y el 31,6% a animales de grupos vacunados. Esto significa que el 96,3% de las muestras tomadas de animales control fueron positivas mientras que sólo lo fueron el 50% de las muestras de animales vacunados. La diferencia en la frecuencia de aislamiento fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Al comparar los protocolos vacunales, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aislamiento en el grupo V10-30 comparado con los protocolos C10-20 y C10-30 ($p < 0,001$), con un 50%, 91,7% y 100% de las muestras positivas, respectivamente. Entre ambos protocolos control no hubo diferencias.

Los resultados de los aislamientos de las 51 muestras enviadas al laboratorio, aparecen en el Anexo como Material Adicional.

Se han documentado diversas prevalencias dependiendo del estudio. Así, Møller *et al.* (1998), en Dinamarca, encuentran *E. coli* mediante PCR en el 27% de granjas estudiadas con problemas de diarrea. Sin embargo, en otro estudio Danés de prevalencia de *E. coli* sin relación con enfermedad, se ha encontrado la bacteria en el 24,1% de las granjas estudiadas (Stege *et al.*, 2000).

5.2.2. Determinación de presencia de genes para factores de virulencia

El 29,6% de las muestras procedentes de animales controles presentaban el gen para la hemolisina (*hly*), mientras que sólo el 4,2% de las muestras procedentes de animales vacunados tenía dicho gen ($p=0,017$).

Comparando los distintos protocolos de vacunación, se encontró el gen para la hemolisina en distintas frecuencias, siendo significativamente mayor la frecuencia de detección en el protocolo C10-30 que en los demás ($p=0,002$).

No se detectó el gen para la toxina LT en ninguna de las muestras de animales vacunados y sí en el 40,7% de las muestras de animales controles ($p=0,002$). No hubo diferencias entre los protocolos control, con un 41,7% y 40% para C10-20 y C10-30, respectivamente.

No se detectó el gen para la toxina STa en ninguno de los aislados procedentes de animales vacunados y sí en el 33,3% de los animales controles ($p=0,002$). Al comparar los protocolos, se encontró con una frecuencia significativamente mayor en el protocolo C10-30 comparado con el C10-20 ($p=0,005$).

En el 33,3% de los aislamientos procedentes de los controles se encontró el gen para la toxina STb mientras que también se determinó en el 12,5% de las muestras de los animales vacunados. Las diferencias no fueron significativas aunque existía una tendencia ($p=0,08$).

No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de hallazgo del gen del factor *eae* al comparar los aislados procedentes de animales vacunados y controles ni entre cada uno de los protocolos, con frecuencias de aislamiento del 33,3%, 41,7% y

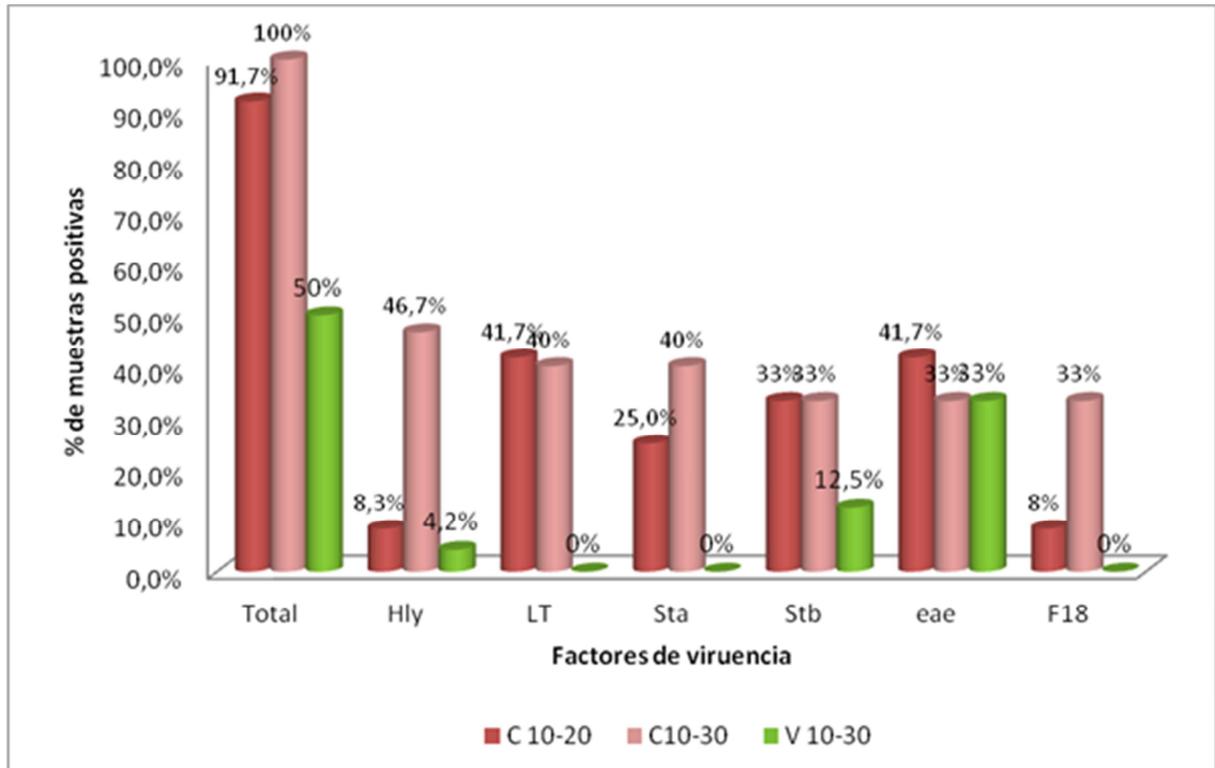
33% para V10-30, C10-20 y C10-30, respectivamente.

Se encontró el gen que codifica para la fimbria F18 en el 22,2% de los aislamientos procedentes de animales controles mientras que no se encontró en ninguno de los aislados de animales vacunados ($p=0,014$). Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,007$) del gen de la fimbria F18 al comparar el protocolo C10-30 con los demás protocolos vacunales.

No se encontró el gen de la toxina VT1 en ninguna de las muestras analizadas. Respecto a VT2, sólo una de las muestras, procedente de un animal de los controles presentó dicho gen. De manera similar, no se halló el gen para la fimbria F4, F5 (k99), F6 (P987), F41 y F17 en ninguna de las muestras analizadas.

La comparación de frecuencias de determinación de la presencia de genes para virulencia en cada uno de los protocolos de vacunación aparece en la Figura 6.

Figura 6. Frecuencia de hallazgo de los genes de los factores de virulencia de *E. coli* en los protocolos donde se aislaron.



Fairborther *et al.* (2005) afirman que las cepas con la fimbria de adhesión F4 serían más propias de lechones al destete y las que tiene la fimbria F18 son más propias de lechones de mayor edad. Esta diferencia radica en el momento en que se expresa el receptor para cada una de estas fimbrias en el intestino de los animales. Puesto que las muestras se tomaron en mitad de la transición en adelante, esta podría ser la causa de que no se haya encontrado la fimbria F4 en ninguna de las muestras mientras que el 22,2% de las cepas tuvieran la fimbria de adhesión F18.

Para comparar los datos de presencia de los genes de virulencia respecto a otros estudios se ha configurado la Tabla 20, resumiendo los hallazgos de otros autores.

Tabla 20. Hallazgo de distintos factores de virulencia en diversos países.

PAÍS	F4	F5	F6	F41	F18	LT	Sta	STb	V	Condiciones	Autor
España	10,1	11,6	31,9	8,7						Lechones en transición con diarrea.	Garabal <i>et al.</i> , 1997
Dinamarca	44,7				39,3	61,6	26,5		16,4	Lechones en transición con diarrea.	Frydendhal, 2002
China	10,23	5,6	12,1	4,61	8,37				6	Lechones en transición con diarrea.	Chen <i>et al.</i> , 2004
USA	63,88	0,7	1,4	0,7	9,7	55,6	35,4	98		Lechones diversas edades con diarrea.	Moon <i>et al.</i> , 2005
Cuba	0	0	8	0	61	5,5	61,1	69,4	0	Lechones diversas edades con diarrea.	Blanco <i>et al.</i> , 2006
Eslovaquia	19	0,9	5	0,9		20	46	26			Khac <i>et al.</i> , 2006
Brasil	44	30	25	32	38	71	40	47		Lechones al destete con diarrea.	Vidotto <i>et al.</i> , 2009
España	0	0	0	0	12	22	18	28	2	Lechones en transición y cebo con diarrea	Estudio actual
Méjico	2,8	6,2	8,6	54	4,6	4,7	37,5	15,6		Lechones en lactación y transición. Con y sin diarrea.	Toledo <i>et al.</i> , 2012
Argentina	8		16		4	8		28		Lechones 7-15 días edad. No enfermos.	Alustiza <i>et al.</i> , 2012
China	3,9	1			2,4	11,2	3,4	19,9		Lechones en lactación con diarrea	Liu <i>et al.</i> , 2013

Lo más destacable es la diversidad de resultados obtenidos en los distintos estudios reflejados en la Tabla 20. Mientras que los hallazgos de factores de adhesión del presente estudio difieren notablemente de la mayoría de los estudios, coinciden con los de Cuba en la ausencia de cepas con fimbrias F4 y F5. Estos datos son completamente comparables puesto que los resultados de Blanco *et al.* (2006) se obtuvieron en el LREC como los de este estudio.

No se pueden establecer comparaciones con los resultados publicados en España anteriormente con respecto a las fimbrias, dado que en el artículo de Garabal

et al. (1997) no se testó el gen para la fimbria F18 y la ausencia de las otras fimbrias podría deberse a la distinta edad de los animales investigados.

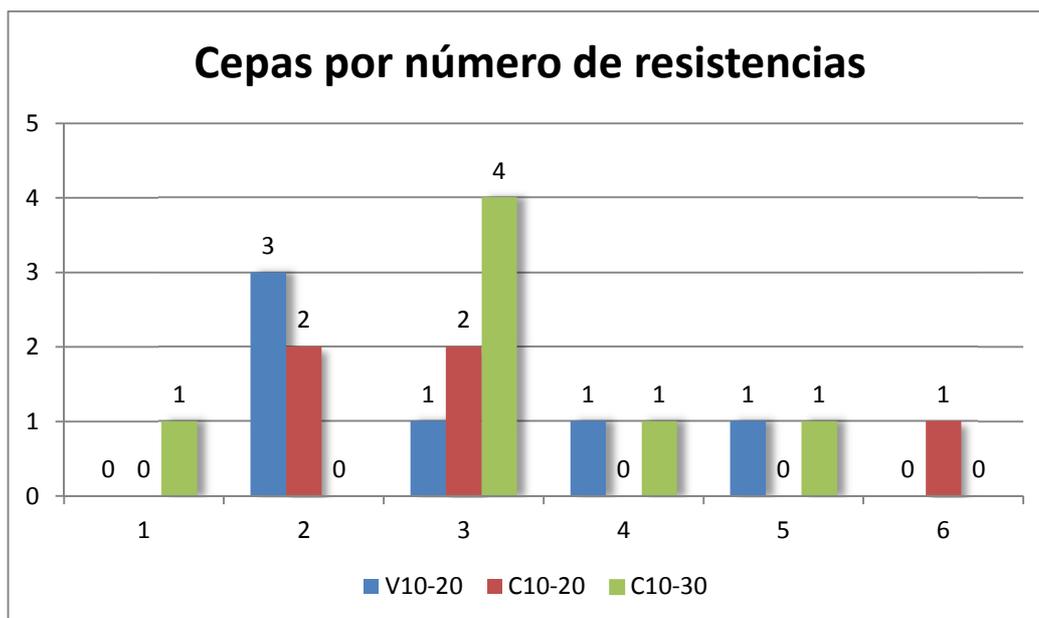
5.3. Antibiogramas y resistencia a antibióticos de los aislamientos en animales sospechosos

Del total de muestras en las que se aisló *E. coli* en el LREC (n=50), se seleccionaron 20 de ellas aleatoriamente, sobre las que realizó antibiograma. De estas, 5 pertenecían al protocolo V10-30, 8 al protocolo C10-20 y 7 al protocolo C10-30.

5.3.1. Número de resistencias a antibióticos

Los resultados de los antibiogramas aparecen en la Tabla 21. Sólo se ha encontrado una cepa de las 20 sometidas a antibiograma que no presentó resistencia a ninguno de los antibióticos testados. Se han encontrado cepas con hasta seis resistencias a distintos antibióticos (Figura 7).

Figura 7. Frecuencia de resistencias múltiples en cada uno de los protocolos



No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de resistencias al comparar los animales vacunados y controles, ni al comparar los diferentes protocolos vacunales. La mayor frecuencia de número de resistencias fue a tres antibióticos (40% de las cepas).

El número medio de resistencias fue de $3,16 \pm 0,38$ para los animales control y $3 \pm 0,51$ para los vacunados, sin que hubiera diferencias significativas.

5.3.2. Resistencias específicas a los antibióticos testados

Las resistencias de las cepas procedentes de cada uno de los grupos experimentales concretos aparecen en la Tabla 21.

Tabla 21: Antibiograma de las 20 cepas de *E. coli* aisladas en muestras de heces.

	PROTOCOLO								
	V10-30			C10-20			C10-30		
	R	I	s	R	I	s	R	I	s
AM	5/5 (100%)	0	0	7/8 (87,5%)	1/8 (12,5%)	0	5/7 (71,43%)	1/7 (14,28%)	1/7 (14,28%)
AMC	2/5 (40%)	3/5 (60%)	0	3/8 (37,5%)	4/8 (50%)	1/8 (12,5%)	1/7 (14,28%)	0	6/7 (85,71%)
GM	1/5 (20%)	0	4/5 (80%)	1/8 (12,5%)	0	7/8 (87,5%)	-	-	1/7 (14,28%)
N	1/5 (20%)	3/5 (60%)	1/5 (20%)	1/8 (12,5%)	4/8 (50%)	3/8 (37,5%)	2/7 (28,57%)		5/7 (71,43%)
SXT	5/5 (100%)	0	0	6/8 (75%)	1/8 (12,5%)	1/8 (12,5%)	2/7 (28,57%)	0	5/7 (71,43%)
MAR	0	0	5/5 (100%)	1/8 (12,5%)	0	7/8 (87,5%)	5/7 (71,43%)	0	2/7 (28,57%)
CIP	0	0	5/5 (100%)	1/8 (12,5%)	0	7/8 (87,5%)	5/7 (71,43%)		1/7 (14,28%)

AM: Amoxicilina, AMC: Amoxicilina+Clavulánico, GM: Gentamicina, N: Neomicina, SXT: sulfametoxazol-trometopim, MAR: Marbofloxacin, CIP: Ciprofloxacina. R, resistentes; S, sensibles; I, insensibles

No hubo diferencia en la frecuencia de cepas resistentes, sensibles o insensibles para ningún antibiótico excepto marbofloxacin ($p=0,023$) al comparar animales vacunados y control, observándose una frecuencia de cepas sensibles mayor de la

esperada en el grupo vacunado. La amoxicilina-clavulánico mostró una tendencia ($p=0,054$).

Al comparar por grupos específicos, se observó diferencia en la frecuencia de amoxicilina-clavulánico ($p=0,023$), marbofloxacina ($p=0,019$) y en sulfametoxazol-trimetropim ($p= 0,004$) encontrándose más cepas sensibles en el grupo C10-30. Las diferencias en cuanto a frecuencia de resistencias a gentamicina, neomicina, ciprofloxacin y sulfametoxazol-trimetropim no fueron significativas comparando los animales controles y vacunados.

El incremento del consumo de antibióticos es una de las principales causas reconocidas del aumento de las resistencias bacterianas a los mismos. Además, las cepas patógenas de *E. coli* tienen una considerable capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos (Karlowsky *et al.*, 2002) . De las 20 cepas aisladas en este estudio solamente una era sensible a todos los antibióticos testados, encontrando cepas con 6 resistencias a distintos antibióticos. Hasta este momento, la aparición de diarreas colibacilares al inicio de cebo tiene como única solución el uso de antibióticos. Sin embargo, los antibióticos están cada vez menos a disposición de la producción animal debido al aumento registrado de resistencias antibióticas y a las preocupaciones de los consumidores. Smith *et al.* (2010), testando la resistencia a múltiples fármacos de cepas de *E. coli* enterotoxigénica aisladas de cerdos con diarrea posdestete, encontraron resistencia a 10 de los 12 antibióticos testados. Entre los antibióticos testados por los autores se encontraban gentamicina, neomicina, sulfametoxazol-trimetropim, los cuales también fueron testados en el presente

estudio. Interesantemente, se identificaron aislados resistentes a los tres antibióticos en ambos trabajos.

El sulfametoxazol y el trimetoprim son antibióticos comúnmente utilizados en casos de diarrea y enteritis (Sköld, 2010; Raz et. al., 2002). Mazurek *et al.* (2015), evaluando la resistencia de *E. coli* en muestras provenientes de lechones destetados y cerdas frente al sulfametoxazol y al trimetoprim, encontraron 100% y 92% de muestras resistentes, respectivamente. En el presente estudio, también fue observado resistencia al antibiótico sulfametoxazol-trimetoprim, aunque fue en el 65% de las muestras, proporción menor que la encontrada por los citados autores. Estas diferencias con el estudio de Mazurek *et al.* (2015) pueden ser debidas al hecho de que las muestras se recogieron en etapas sucesivas de tratamiento metafiláctico con los dichos antibióticos. Otros autores también encontraron frecuencias altas de cepas resistentes a los antibióticos, como Luppi *et al.* (2012) en aislados italianos de cepas F4+. Los autores describen un aumento del número de resistencias en cepas comparando aquella aisladas en un periodo entre 2002 y 2012 y así, encuentran un aumento significativo en las cepas con 6-8 ó 9-12 resistencias simultáneas, junto con una disminución de las cepas con 2-5 resistencias. Estos resultados están en concordancia con los encontrados en este estudio, aunque en el presente estudio la mayor frecuencia fue de 3 resistencias simultáneamente.

5.4. Aislamientos de *E. coli* al sacrificio

Conforme consta en Material y Métodos (Tabla 3), para las pruebas realizadas al sacrificio de los animales en el matadero solamente se estudiaron los protocolos V10-20 y C10-20.

Los resultados de los aislamientos al sacrificio aparecen en el Anexo como Material Adicional. Los cinco animales del protocolo vacunal (V10-20) resultaron negativos al aislamiento de la bacteria, mientras que los cinco animales del protocolo control (C10-20) resultaron positivos. De estos aislados, dos fueron positivos a STb, aunque no se encontró ningún gen para fimbrias. Dos fueron positivos a *eae* (factor de adhesión y borrado) y finalmente, un animal fue positivo para la hemolisina.

En varios trabajos se ha detectado presencia de cepas patógenas de *E. coli* en cerdos a partir de muestras tomadas en matadero (Heuvelink *et al.*, 1999; Paiba, 2000; Bonardi *et al.*, 2003). A pesar de que las cepas de *E. coli* detectadas en el LREC eran de una patogenicidad baja, el hecho de que todos los animales controles fueran portadores de algún factor de virulencia y que ningún animal vacunado presentara factores de virulencia de este patógeno, parece indicar que la vacuna frente a *E. coli*, administrada en lechones, habría generado una protección inmunológica eficaz.

5.5. Determinación de la presencia de factores de virulencia de *E. coli* al sacrificio

En la PCR plus/minus para *E. coli* se encontraron 24 muestras positivas de las 40 analizadas (V10-20=20 y C 10-20=20), perteneciendo 17 de ellas al protocolo C10-20 y siete al protocolo V10-20 ($p=0,035$). La distribución de muestras por factor de virulencia se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Muestras positivas para *E. coli* mediante PCR en tiempo real – ensayo plus/minus.

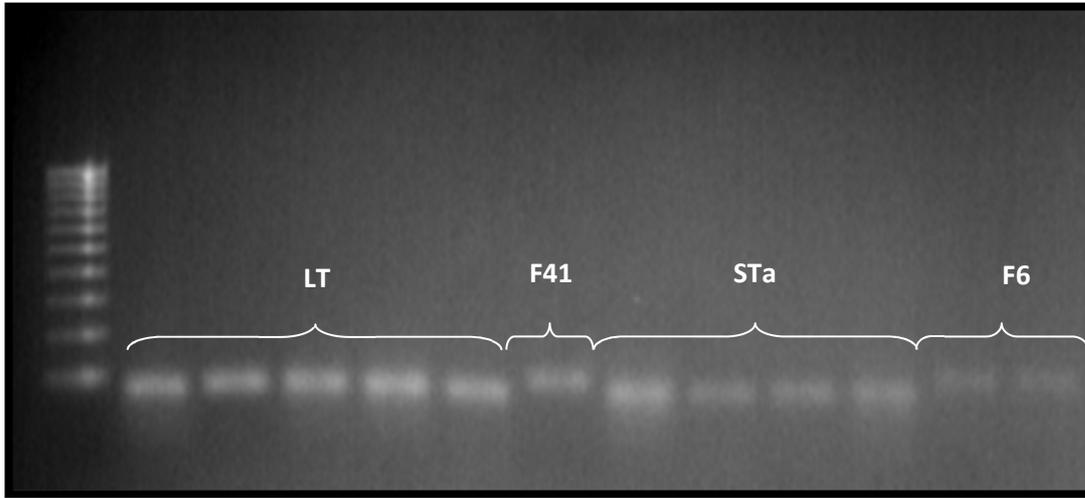
FACTOR DE VIRULENCIA	V10-20	C10-20	SIGNIFICANCIA
F18	0	5	
LT	1	9	$p<0,001$
F41	0	2	NS
Sta	6	2	NS
F6	0	4	$p = 0,013$
Total	7	17	$p = 0,035$

De los 17 animales positivos para *E. coli*, las muestras de 11 animales fueron positivas para un factor de virulencia, cinco fueron positivas para dos factores de virulencia y la muestra de un animal fue positiva para tres factores de virulencia.

De los animales positivos para más de un factor de virulencia, cinco pertenecían al protocolo C10-20 y uno al protocolo V10-20, y entre estos, el que tenía tres factores de virulencia pertenecía al protocolo C10-20.

En todos los casos positivos se confirmó la presencia de un amplicón del tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa. Un ejemplo aparece en la Figura 7.

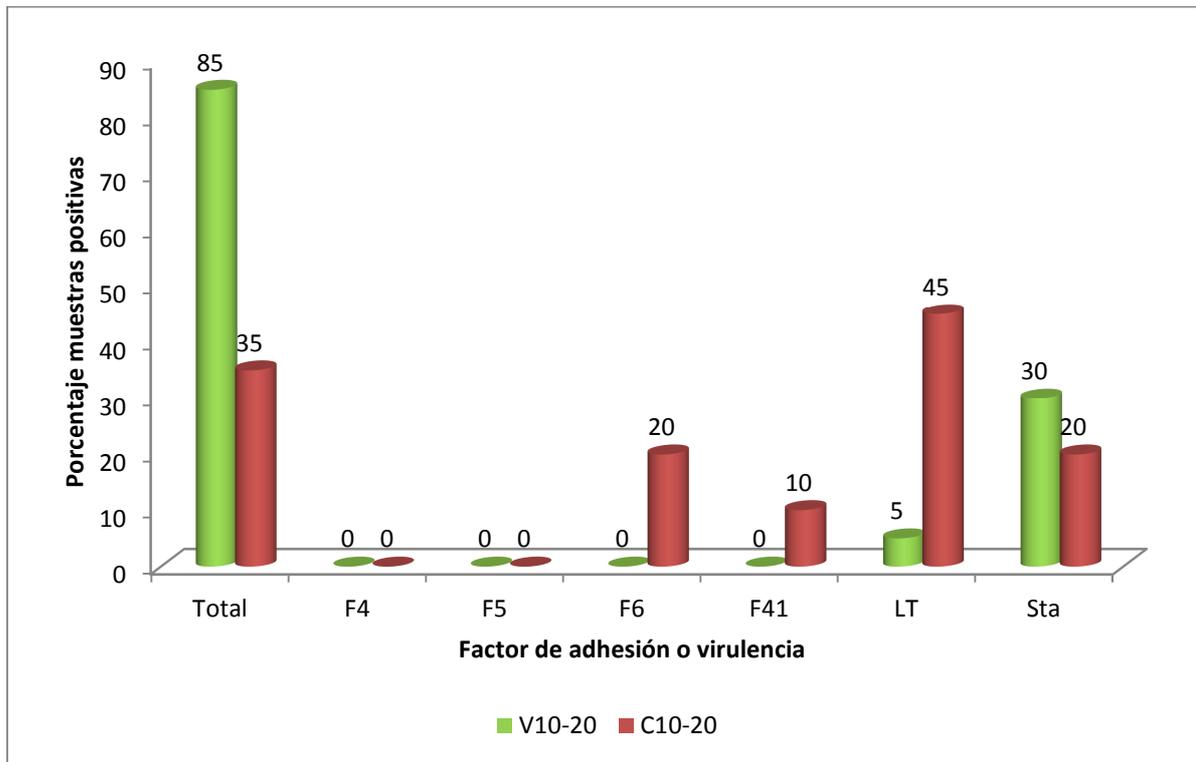
Figura 7. Electroforesis para confirmación de la presencia de amplicones para los factores de virulencia de *E. coli* LT, F41, STa y F6 como ejemplos.



*El marcador de peso molecular (MPM) abarca de 100 a 1000 pdb.

Por tanto, un 35% de las muestras procedentes de animales del protocolo V10-20 fue positiva para alguno de los genes de virulencia, mientras que un 85% de las muestras procedentes de los animales del protocolo C10-20 dieron resultado positivo en alguna de las PCR a dichos genes, siendo la diferencia significativa ($p=0,035$) (Figura 8).

Figura 8. Frecuencia de hallazgo de genes de los factores de virulencia en los protocolos C10-20 y V10-20 al sacrificio.



Se detectó el gen para la toxina LT en el 4% de las muestras de animales del protocolo V10-20 y en el 50% de las muestras de animales del protocolo C10-20, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

En el caso del gen para la fimbria F41, se encontró en el 11% de las muestras del protocolo C10-20 y no se detectó en ninguna de las muestras del protocolo V10-20, no existiendo diferencias significativas ($p = 0,088$).

El gen para la toxina STa se encontró en el 24% de las muestras procedentes de animales del protocolo V10-20 y en el 11% de las muestras del protocolo C10-20, sin que la diferencia en la frecuencia de hallazgo fuera significativa ($P = 0,135$).

No se encontró el gen para la fimbria F6 (987P) en ninguna muestra procedente de animales del protocolo V10-20. En los animales del protocolo C10-20, la frecuencia de dicho gen fue de 22% ($p=0,013$).

En ninguna de las muestras se encontraron cepas con genes para la producción de fimbrias F4 (K88), F18 y F5 (K99). Según Fairbrother *et al.* (2005) y Brown *et al.* (2007) las cepas productoras de *E. coli* con factores de adhesión F4, F5 o F18 generalmente son más comunes en lechones jóvenes, ya que los animales expresan los receptores para esta fimbria en los primeros días de vida. Por tanto, la recogida de las muestras al final del cebo, puede ser la causa de no detectar cepas productoras de estas fimbrias, debido a la edad de los animales.

No hay mucha información en la literatura científica sobre el hallazgo de factores de virulencia en muestras de contenido intestinal de cerdos al sacrificio sin enfermedad clínica relacionada con *E. coli*. Sin embargo, si hay caracterizaciones de la presencia de la bacteria y sus genes de virulencia en animales clínicamente sanos en Alemania por Schierack *et al.* (2006). Estos autores, buscando mediante PCR los genes para F4, F5, F6, F18, F41, Sta y Stb, encontraron un 73,5% de las muestras positivas para alguno de los genes. En el presente estudio, testando los mismos factores excepto Stb, se ha encontrado algún gen de virulencia en el 60% del total de las muestras, lo que es inferior en comparación con el estudio alemán. Sin embargo, si tomamos sólo las muestras de animales sin vacunar, que serían las comparables a las muestras estudiadas por los investigadores alemanes, hasta el 85% de las muestras fueron positivas, lo que se aproxima a los datos obtenidos por estos autores. De nuevo, la ausencia de cepas con factores como las fimbrias F4 o F18 podría deberse a que los

animales testados estaban en edad de sacrificio y pueden haber desaparecidos las cepas por cambios en los receptores de los enterocitos. Si comparamos de nuevo con los datos del estudio alemán, se observa que en las cerdas, como animales de más edad, sólo se encuentran factores de virulencia en el 59,5% de las muestras, que está en concordancia con nuestro dato tomando todas las muestras en conjunto.

5.6. Determinación de la presencia de otros agentes patógenos incluidos en el complejo entérico porcino

5.6.1. Resultados de la PCR clásica para la detección de *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y *Salmonella* spp.

Las PCR realizadas para detectar *Salmonella* spp. y *B. hyodisenteriae* resultaron negativas para todas las muestras analizadas.

Con respecto a *L. intracellularis*, en el protocolo V10-20 se detectó la bacteria en cinco muestras de íleon (25%) y una de colon (5%). En el protocolo C10-20, ocho muestras de íleon (40%) y cuatro de colon (20%) fueron positivas. En este caso, tres animales fueron positivos simultáneamente en ambas muestras. También se encontró un animal positivo en colon y negativo en íleon.

En términos de frecuencia de positivos, la diferencia entre el grupo control y el vacunado no fue estadísticamente significativa. Los resultados de las diferentes PCR realizadas para la detección de *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y *Salmonella* spp. están reflejados en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados de la PCR para determinación de *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y *Salmonella* spp.

GRUPO	ANIMAL	<i>L. intracellularis</i>		<i>B. hyodisenteriae</i>		<i>Salmonella</i> spp.	
		ÍLEON	COLON	ÍLEON	COLON	ÍLEON	COLON
PROTOCOLO V 10-20	1	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-
	19	+	+	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
PROTOCOLO C 10-20	26	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-
	28	-	+	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-	-
	30	+	+	-	-	-	-
	31	+	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-	-
	33	+	+	-	-	-	-
	34	+	+	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-	-
	36	+	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	-
	39	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	41	+	-	-	-	-	-
	42	+	-	-	-	-	-
	43	-	-	-	-	-	-
	44	-	-	-	-	-	-
	45	-	-	-	-	-	-

5.6.2. Resultados de la PCR a tiempo real para la detección de *L. intracellularis*

En la detección de *L. intracellularis* mediante la técnica de PCR a tiempo real, la eficiencia de la amplificación fue del 100%. La gráfica de la curva estándar, aparece en la Figura 9. El producto de la PCR generado fue específico, como se puede observar en la curva de disociación obtenida (Figura 10).

Figura 9. Gráfica de amplificación de las distintas diluciones ($10^7 - 10^1$) del fragmento de ADN de *L. intracellularis*.

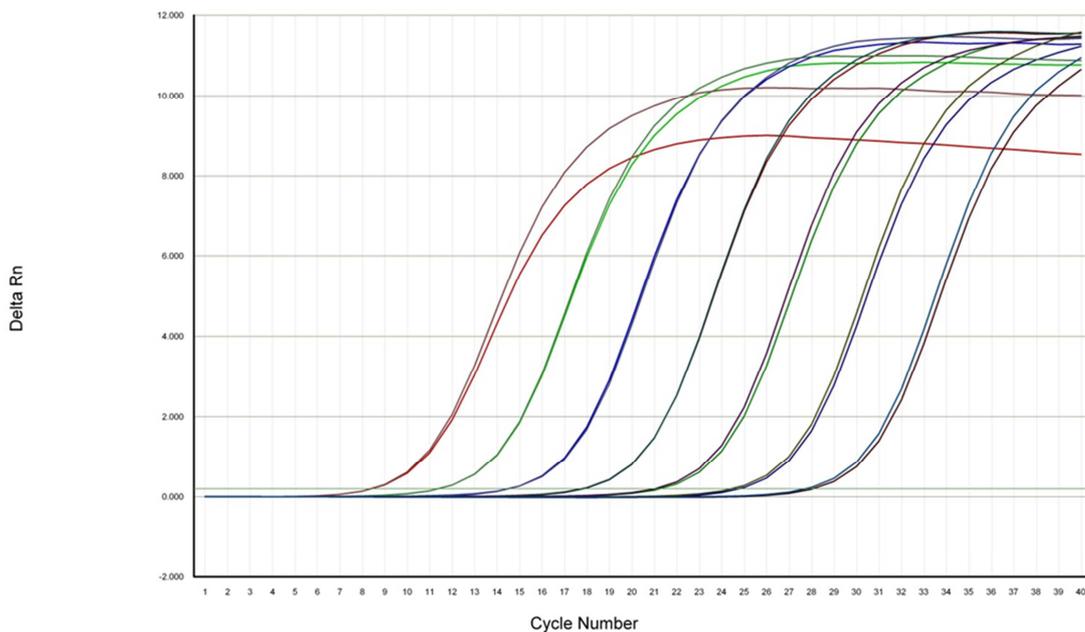
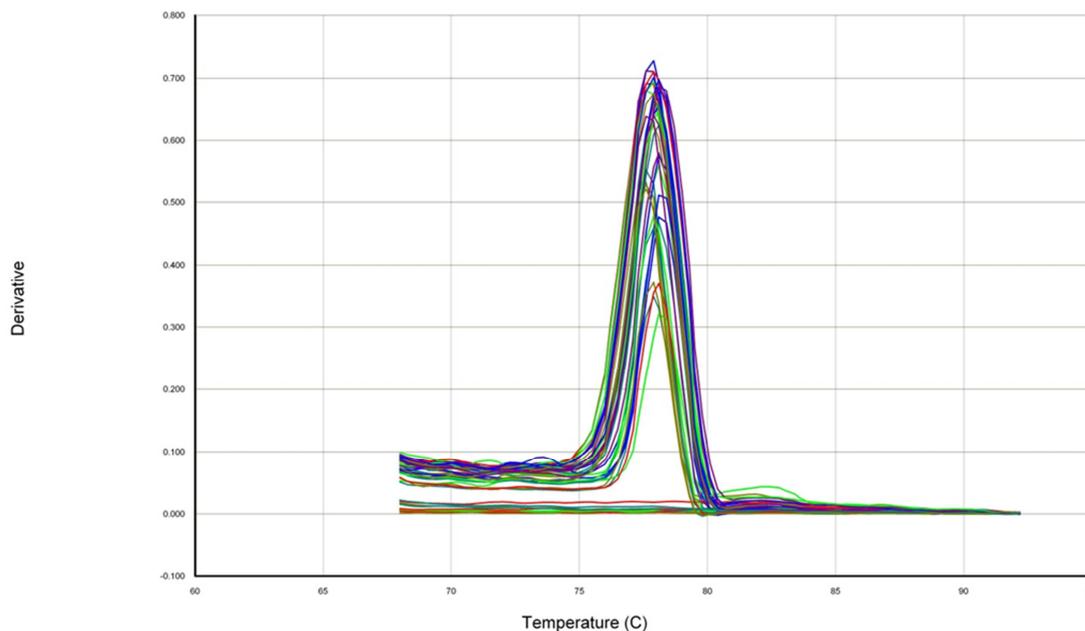


Figura 10. Curva de disociación obtenida tras la PCR a tiempo real de *L. intracellularis*.



En los resultados obtenidos en la cuantificación realizada mediante PCR a tiempo real (Tabla 24) se observó que fueron positivas el 40% y el 100% de las muestras de íleon analizadas procedentes de los protocolos V10-20 y C10-20, respectivamente ($p < 0,001$). En el colon se determinó presencia de la bacteria en el 20% de los animales del protocolo vacunado, mientras que el 70% de las muestras procedentes de animales del protocolo control fueron positivas ($p = 0,001$).

En tres animales del protocolo vacunado se detectó simultáneamente la bacteria en íleon y colon, mientras que el mismo hallazgo se produjo en 14 animales del protocolo control.

Con respecto a la cantidad de bacterias, en las muestras de íleon del protocolo V10-20 se observaron 70 ± 43 copias de ADN por gramo de tejido y en el colon $12,4 \pm 6,1$ copias por gramo de tejido. En el protocolo C10-20 se obtuvieron valores de $1.447.781 \pm 1.193.306$ y $3.288,3 \pm 27.883,3$ copias por gramo de tejido para íleon y colon, respectivamente. Las diferencias entre protocolos fueron significativas en ambos tejidos ($p < 0,001$).

Se observó una correlación positiva alta entre la carga bacteriana detectada en el íleon y la detectada en el colon ($r^2 = 0,725$, $p < 0,001$).

Tabla 24. Resultados de la PCR a tiempo real para la detección de *L. intracellularis*.

GRUPO EXPERIMENTAL	ANIMAL	<i>L. INTRACELLULARIS</i> (N° COPIAS/g DE TEJIDO)	
		ÍLEON	COLON
PROTOCOLO V 10-20	1	857	0
	2	0	0
	3	14	0
	4	38	32
	5	81	0
	6	0	0
	7	0	0
	8	37	81
	9	0	0
	10	37	51
	11	0	0
	12	0	0
	13	0	0
	14	0	0
	15	173	0
	16	0	0
	17	0	0
	18	0	83
	19	161	0
	20	0	0
PROTOCOLO C 10-20	26	1953	228
	27	110173	32490
	28	1429	95
	29	42	311
	30	239462400	558735
	31	570751	13152
	32	10686	222
	33	23503120	63406
	34	2335	5547
	35	296	88
	36	10898	478
	37	1430	0
	38	122	0
	39	93	0
	40	140	0
41	3840	93	
42	19363920	1065	
43	181	0	
44	810	1090	
45	7490	0	

5.6.3. Comparación PCR clásica y PCR a tiempo real para *L. intracellularis*

La PCR a tiempo real detectó un mayor número de muestras positivas que la PCR clásica en los animales vacunados y control, siendo por tanto una técnica más sensible. Mientras que mediante PCR clásica se detectaron cinco muestras positivas en íleon y una en colon de los animales vacunados, la qPCR detectó ocho y cuatro muestras, respectivamente. En los animales control, se pasó de detectar con la PCR clásica siete y cinco muestras positivas en íleon y colon a encontrar mediante qPCR 20 y 14 muestras positivas, respectivamente.

L. intracellularis fue detectada en ambos grupos de animales (V10-20 y C10-20), pero con diferencias entre los dos grupos experimentales, tanto al utilizar la técnica de PCR clásica como la PCR a tiempo real. Ambas técnicas detectaron un número más elevado de animales positivos en el grupo C10-20 que en el grupo V 10-20. Sin embargo, sólo se encontró diferencia significativa en los resultados de la PCR en tiempo real. La razón por la que esta diferencia entre grupos sólo fue estadísticamente significativa en los resultados derivados de la PCR a tiempo real sería la mayor sensibilidad de la PCR a tiempo real en comparación con la PCR clásica (Nathues *et al.*, 2009). Además de la mayor sensibilidad, la técnica de la PCR en tiempo real disminuye el tiempo de análisis y permite la cuantificación de los resultados. Debido a todos estos factores, la PCR a tiempo real es ampliamente utilizada en la actualidad en detrimento de la PCR clásica para la realización de diagnóstico (Bustin, 2010) y también para análisis de expresión génica (Bustin, 2000).

5.6.4. Relación entre la carga de *L. intracellularis* y los factores de virulencia de *E. coli*

Analizando los resultados de *L. intracellularis* en base a los obtenidos para los factores de virulencia de *E. coli*, independientemente del protocolo experimental al que perteneciesen, se observó una carga de *L. intracellularis* significativamente mayor ($p=0,028$ y $p=0,033$ para íleon y colon, respectivamente) en aquellas muestras que resultaron positivas para algún factor de virulencia de *E. coli* al sacrificio ($2,2 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ y 52.404 ± 46.326 copias/gr de tejido en íleon y colon, respectivamente) frente a las muestras de animales que fueron negativas para factores de virulencia al sacrificio (100.920 ± 76.688 y 695 ± 515 copias/gr de tejido en íleon y colon, respectivamente). La asociación entre estos dos patógenos, o al menos la presencia concomitante en casos de diarrea en cerdos de cebo ha sido descrita con anterioridad (Møller *et al.*, 1998), encontrándose ambas bacterias mediante PCR hasta en el 39% de las granjas estudiadas en Dinamarca por los citados autores.

De los animales positivos para *L. intracellularis* en el presente trabajo, la bacteria fue detectada por la PCR tiempo real en el 32% de las muestras de íleon, en el 56% de los animales en íleon y colon simultáneamente y en el 12% de los animales solamente en colon. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jensen *et al.* (2006) que encontraron el 31% de los animales positivos para *L. intracellularis* solamente en íleon, el 66% de los animales positivos tanto en íleon cuanto en colon y el 2% de los animales positivos solamente en colon. El número de animales positivos

simultáneamente, en íleon y colon fue mayor en el grupo control y el número de copias de ADN por mg de tejido fue estadísticamente superior en dicho grupo. Estos hallazgos indican que existió una infección más extensa y de mayor intensidad en los animales del grupo control que en los del grupo vacunado.

Algunos autores suponen que no hay una relación directa entre infecciones entéricas con más de un agente patógeno, y mayores prevalencias de *L. intracellularis* (Stege *et al.*, 2000). Otros autores en cambio concluyeron que la infección por *L. intracellularis* no se produce en ausencia de ciertas bacterias de la microbiota intestinal (McOrist *et al.*, 1994). Aunque exista una discordancia entre los autores sobre la interacción de *L. intracellularis* con la microbiota intestinal, la mayoría de ellos parece estar de acuerdo que cambios en la flora bacteriana intestinal influyen sobre la intensidad de la infección de *L. intracellularis* (McOrist *et al.*, 1994; Mølbak *et al.*, 2008). Hay que tener en cuenta que la excreción de *L. intracellularis* es intermitente (Ramis *et al.*, 2011), pero en este caso se tomaron muestras de tejido directamente, lo que elimina la posibilidad de este fenómeno.

Weber *et al.* (2015), tratando de determinar la prevalencia de *E. coli* F4 y F18, *L. intracellularis* y *B. pilosicoli*, detectaron su presencia en el 13, 11, 20 y 17%, respectivamente, de las 256 muestras de heces sometidas a PCR cuantitativa. De los animales positivos, en el 26% se detectaron dos o más agentes patógenos. De estos, el 37% presentaron positividad para *E. coli* y *L. intracellularis* simultáneamente. La prevalencia más baja del agente de la ileítis descrita por Weber *et al.* (2015) comparada al presente estudio, podría ser justificada por el tipo de muestras utilizadas. Sin embargo, de manera similar a lo observado en el presente estudio, los

autores detectaron la asociación de *E. coli* y *L. intracellularis* en un número considerable de animales.

La mayor carga de *L. intracellularis* detectada en el grupo control del presente estudio podría ser debido a la mayor proliferación de *E. coli* en este grupo, lo que podría alterar la flora intestinal, estableciendo condiciones favorables para la proliferación de *L. intracellularis*. Por lo tanto, la diferencia significativa entre los grupos sugiere que la vacuna frente a *E. coli* aplicada en los lechones puede tener alguna influencia en la diseminación o proliferación de *L. intracellularis* en el grupo vacunado.

Todas las muestras analizadas resultaron negativas a *Salmonella spp* y *B. hyodysenteriae*, independientemente del tejido analizado (íleon o colon) y del grupo experimental (V10-20 o C10-20). Estos resultados están en concordancia con las prevalencias no muy elevadas de estos agentes patogénicos en España. La prevalencia descrita de *B. hyodysenteriae* es del 30-40% en granjas de producción porcina en España (Carvajal *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2009). Igualmente para *Salmonella spp.* se detecta en el 43% de cebaderos de la península (García-Feliz *et al.*, 2007). De hecho, la granja de origen y el cebo en los que se desarrolló la prueba no han tenido histórico de disentería hemorrágica en los últimos años.

5.6.5. Resultados de la PCR a tiempo real para la detección de PCV2

En la detección de PCV2 mediante la técnica de PCR a tiempo real, la eficiencia de la amplificación fue del 102%. La gráfica de la curva estándar aparece en la figura 11. El producto de la PCR generado fue específico, como se puede observar en la curva de disociación obtenida (Figura 12).

Figura 11. Gráfica de amplificación de las distintas diluciones del fragmento de ADN de PCV2.

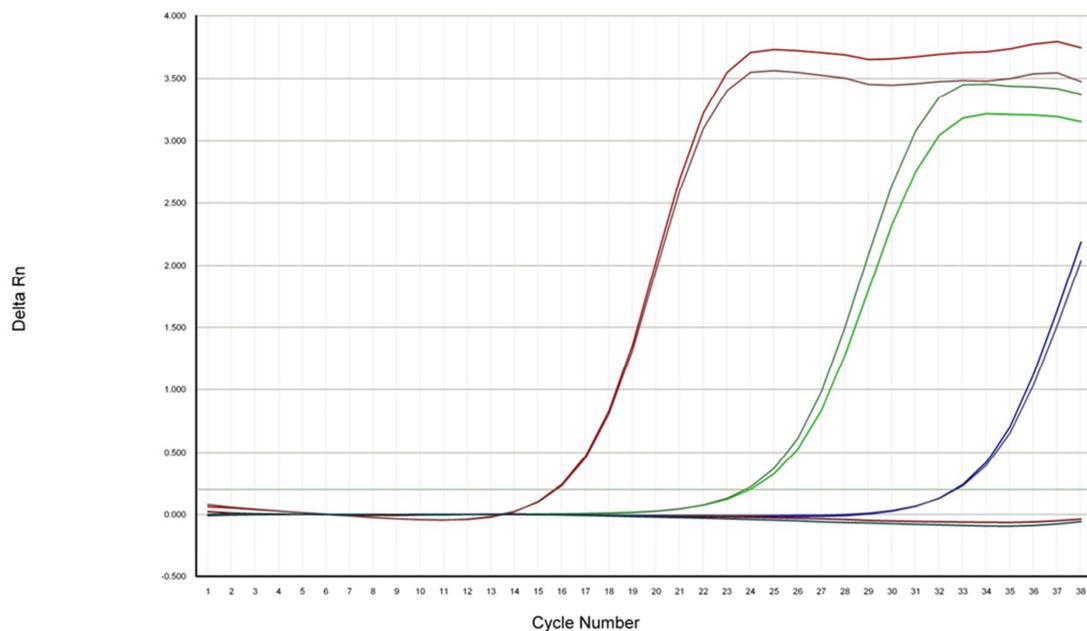
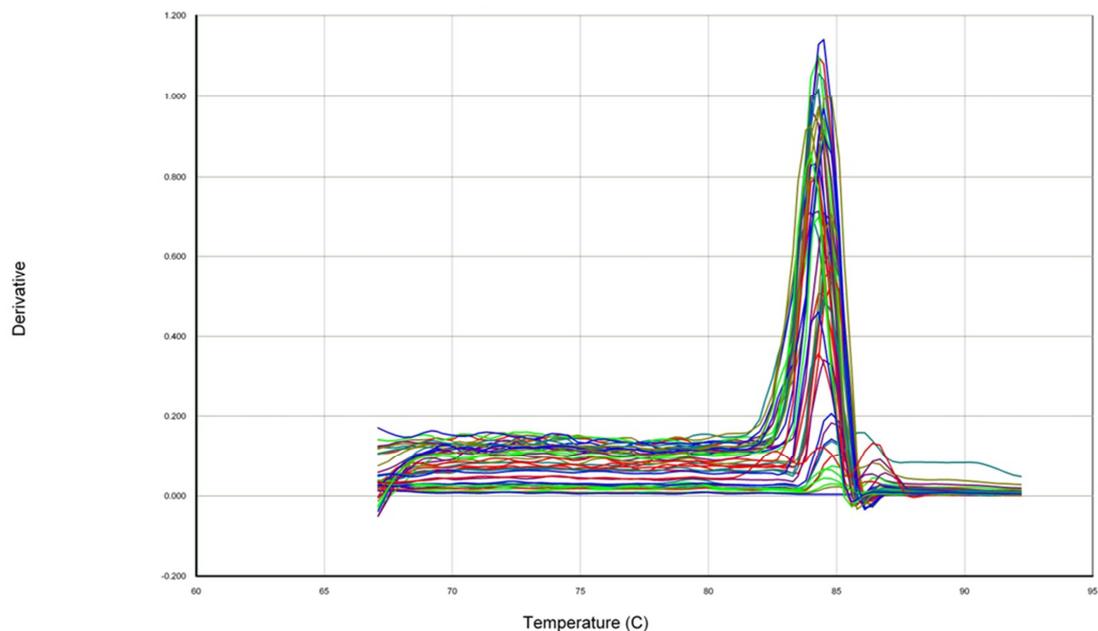


Figura 12. Curva de disociación obtenida tras la PCR a tiempo real de PCV2



Todas las muestras de íleon fueron positivas a la presencia de genoma de PCV2, mientras que solamente el 75% de las muestras de colon en los animales vacunados y el 80% en los controles fueron positivas (Tabla 25). La carga vírica fue de $13,6 \times 10^8 \pm 5,6 \times 10^8$ y $10,2 \times 10^6 \pm 8,7 \times 10^6$ copias/g de tejido para las muestras de íleon y colon de los animales vacunados y $3,9 \times 10^8 \pm 1,8 \times 10^8$ y $5,8 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^6$ copias/g de tejido para las muestras de íleon y colon de los animales controles, respectivamente (Figuras 13 y 14). No hubo diferencias significativas en la carga observada en ninguno de los dos tejidos comparando animales vacunados con animales control. Se observó una correlación significativa entre la carga vírica detectada en íleon y en colon ($r^2 = 0,570$, $p < 0,001$).

Tabla 25. Resultados de la PCR a tiempo real para la detección de PCV2

GRUPO EXPERIMENTAL	ANIMAL	PCV2 (N° COPIAS/g DE TEJIDO)	
		ÍLEON	COLON
PROTOCOLO V 10-20	1	85597600	280446
	2	17400720	803248
	3	282606000	1650210
	4	1403526000	2114960
	5	289982000	1860032
	6	7291780000	11280240
	7	6220580	175575400
	8	51367800	2940880
	9	8044100000	2321020
	10	70101800	0
	11	9642640	346638
	12	2445420000	449212
	13	1197090	953420
	14	1215446	0
	15	5443560000	2225340
	16	699876	121180
	17	606038	0
	18	10832440	0
	19	98079000	1346312
	20	1611770000	0
PROTOCOLO C 10-20	26	2648380000	2441860
	27	5781540	203440
	28	1545382	1068802
	29	209198000	418218
	30	4910660	1241052
	31	87766800	12678280
	32	206418000	1354242
	33	980392000	4452160
	34	1046086	0
	35	372722000	58725000
	36	1284302	1562918
	37	8553980	1188368
	38	13447000	15134700
	39	19563960	1189634
	40	347136000	1538170
41	2830020000	12798120	
42	37782400	0	
43	5887360	0	
44	21931400	1006180	
45	52132200	0	

Figura 13. Carga de PCV2 detectada en la PCR a tiempo real en los animales vacunados y no vacunados en íleon. A) Tomando todos los casos. B) Eliminando los casos extremos. La línea gruesa representa la mediana y las cajas están delimitadas por los cuartiles 25 y 75.

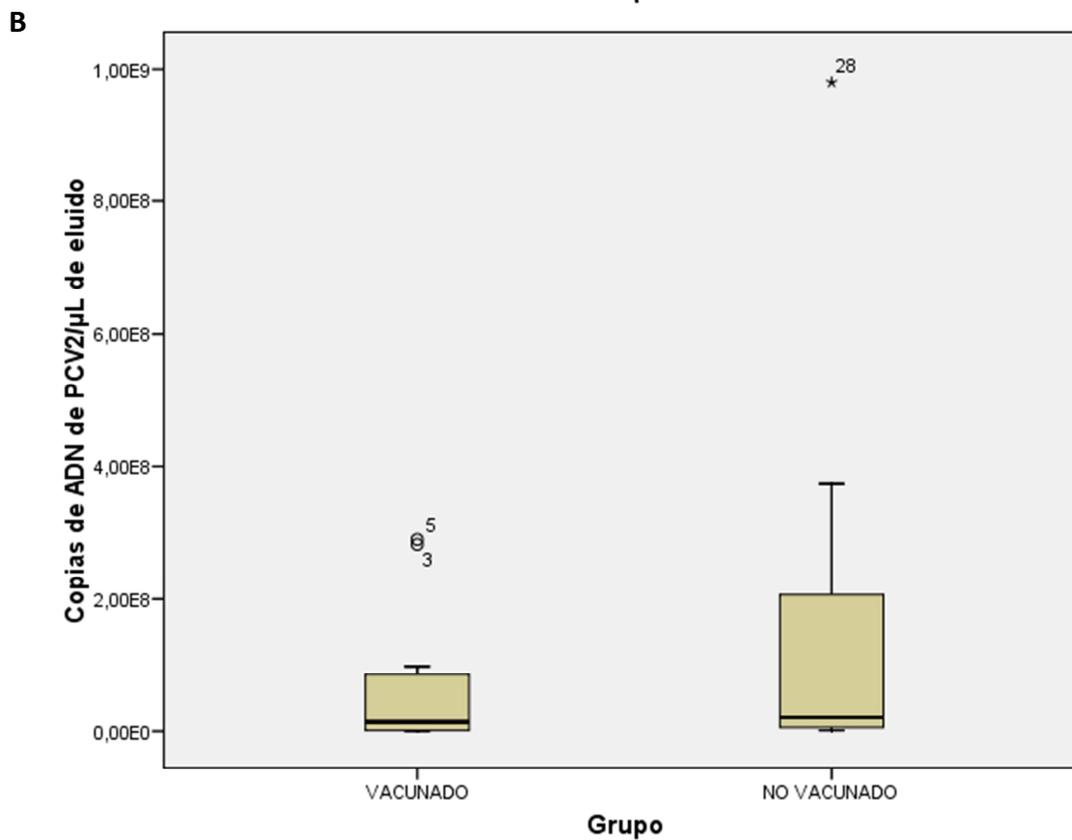
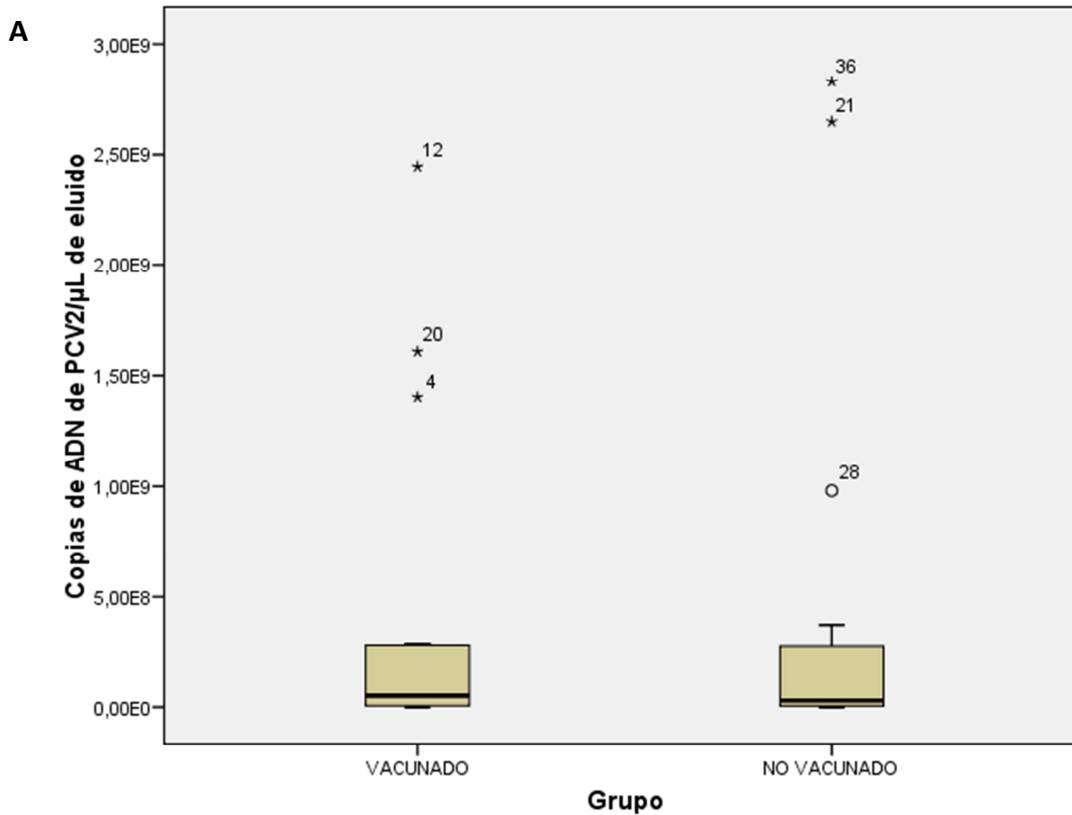
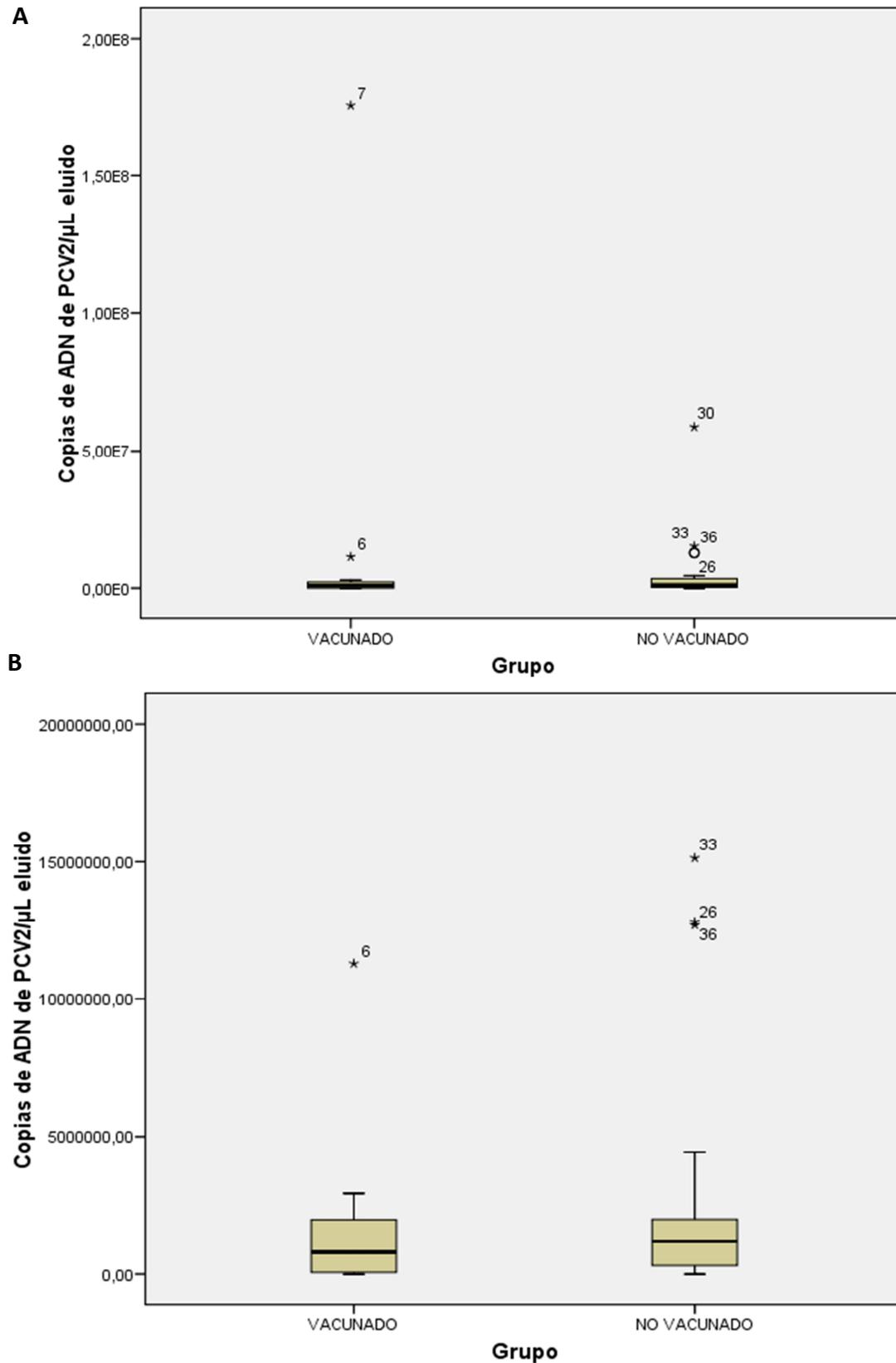


Figura 14. Carga de PCV2 detectada en la PCR en tiempo real en los animales vacunados y no vacunados en colon. A) Tomando todos los casos. B) Eliminando los casos extremos. La línea gruesa representa la mediana y las cajas están delimitadas por los cuartiles 25 y 75.



Con respecto a PCV2, el 100% de las muestras de ambos grupos fueron positivas mediante PCR, no siendo observadas diferencias en la carga vírica detectada entre los animales vacunados y control. Esto indica que ambos grupos estuvieron sometidos al mismo efecto derivado de este virus.

En el estudio realizado por Kim *et al.* (2004) con lechones destetados que presentaban diarrea resistente a antibióticos y que no presentaban signos del Síndrome del Desmedro Multisistémico Posdestete (PMWS), se encontró PCV2 en 100% de los animales, lo que se asemeja al presente estudio, en el cual las muestras de íleon fueron 100% positivas y las de colon presentaron positividad en 75% y 80%, respectivamente, en los grupos vacunados y de control. Kim *et al.* (2004) también identificaron que las principales lesiones histológicas encontradas fueron la depleción de linfocitos en la placa de Peyer e infiltrado granulomatoso. Estos resultados coinciden con los de este trabajo, ya que en la inmunohistoquímica se evidenció que el virus está en las células del tejido linfoide y no en la mucosa del órgano, descartando la posibilidad de que este agente haya producido algún efecto patogénico en el intestino, ya que no hay lesiones e infiltrado típicos de PCV2 y el agente no está asociado a ninguna lesión en las muestras analizadas.

McIntosh *et al.* (2008) cuantificaron la presencia de PCV2 en heces de cerdos que presentaban o no manifestación de PMWS mediante PCR. Se encontró que prácticamente en todas las fases, todas las muestras fueron positivas para PCV2. A pesar del método de diagnóstico utilizado fue la PCR en muestras fecales, los resultados están de nuevo en línea con los del presente estudio, en el que se realizó inmunohistoquímica.

5.7. Estudio histopatológico al sacrificio

Las lesiones histopatológicas intestinales observadas fueron:

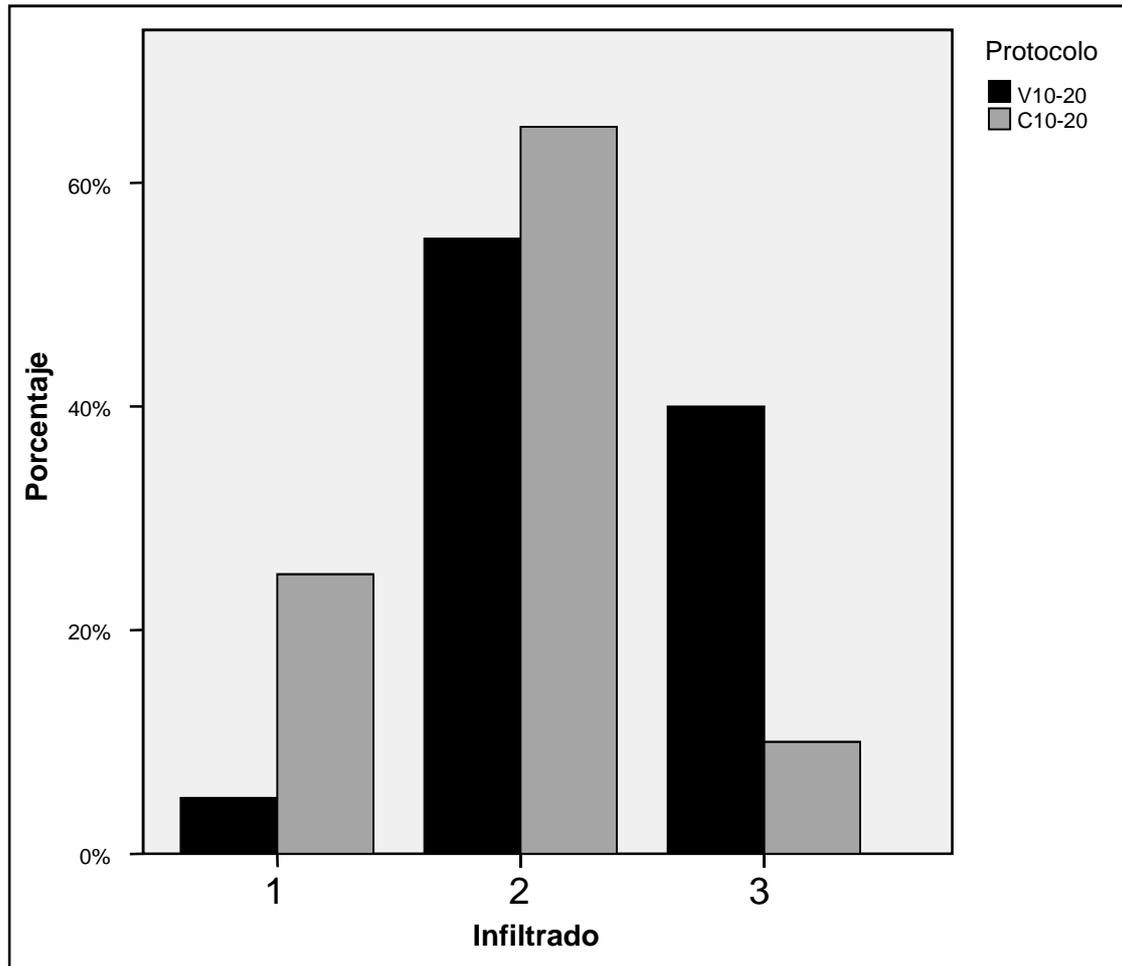
- Depleción linfoide en placas de Peyer y nódulos linfáticos en seis cerdos, tres pertenecientes al grupo V10-20 y tres al grupo C10-20.
- Edema en lámina propia de intestino grueso en 80% de los animales.
- Infiltrado de eosinófilos en el intestino delgado de todos los animales estudiados.
- Infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en el intestino delgado de todos los animales estudiados.

La valoración realizada del infiltrado celular en el intestino, se describe en la Tabla 23. Para facilitar la interpretación de los resultados de la Tabla 26, se calculó para cada grupo experimental el porcentaje de animales valorados con cada puntuación (Figura 15). En los animales vacunados, el 55% presentaron un infiltrado celular moderado; el 40% de los cerdos tenían un infiltrado celular alto y tan solo el 5% fueron clasificados como infiltrado celular bajo. En cuanto a los controles, también la mayoría de los cerdos presentaron un infiltrado celular moderado (65%), pero en este grupo sólo el 10% de los animales tuvieron un infiltrado celular alto mientras que el 25% se clasificaron como infiltrado celular bajo.

Tabla 26 Resultado de la valoración del infiltrado celular.

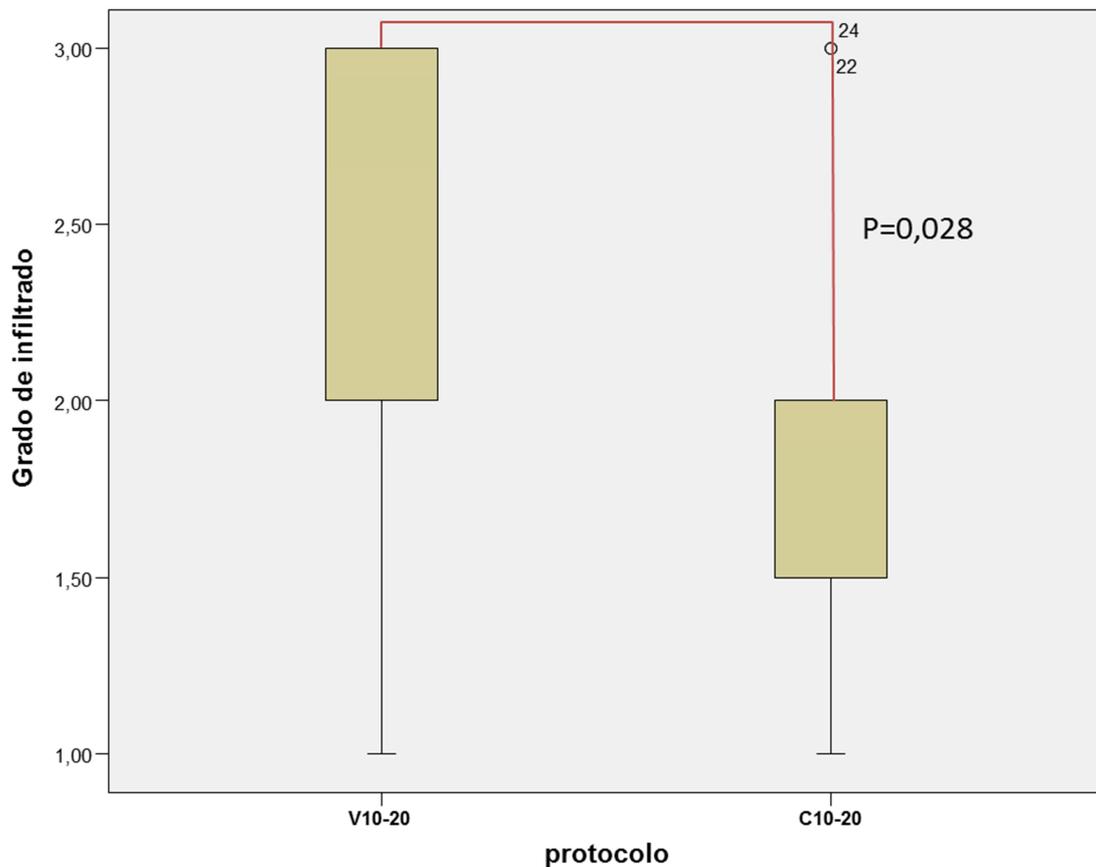
GRUPO EXPERIMENTAL	ANIMAL	PUNTUACIÓN
PROTOCOLO V 10-20	1	2
	2	2
	3	1
	4	2
	5	2
	6	2
	7	2
	8	3
	9	3
	10	3
	11	3
	12	2
	13	3
	14	2
	15	2
	16	2
	17	3
	18	3
	19	3
	20	2
PROTOCOLO C 10-20	26	2
	27	3
	28	2
	29	3
	30	2
	31	2
	32	2
	33	1
	34	1
	35	2
	36	2
	37	2
	38	2
	39	2
	40	2
41	2	
42	2	
43	1	
44	1	
45	1	

1: infiltrado celular bajo. 2: infiltrado celular medio. 3: infiltrado celular alto.

Figura 15. Porcentaje de animales clasificados según puntuación de infiltrado celular.

Para comparar los animales vacunados y controles se calculó la mediana de las puntuaciones obtenidas por cada uno de ellos (Figura 16). La mediana obtenida fue mayor en los animales vacunados (2,35) que en los animales control (1,85). El estudio estadístico reveló que la diferencia fue significativa ($p=0,0289$).

Figura 16. Diagrama de cajas para el infiltrado celular. La línea gruesa representa la mediana y las cajas están delimitadas por los cuartiles 25 y 75.



La presencia de factores de virulencia de *E. coli*, la carga de *L. intracellularis* o de PCV2 no mostraron una influencia sobre el grado de infiltrado inflamatorio.

Los resultados del estudio histopatológico mostraron que tanto los lechones vacunados como los lechones del grupo control presentaron infiltrado inflamatorio de linfocitos y células plasmáticas, siendo éste clasificado como moderado a alto en la mayoría de los animales. El grupo vacunado presentó un mayor grado de infiltrado que el grupo no vacunado ($p=0,035$). La diferencia entre los grupos podría ser debido a una movilización más intensa de linfocitos a la mucosa intestinal de los animales que, una vez inmunizados recibieran continuos contactos con antígenos de *E. coli* presentes en

el ambiente de la granja. Estos resultados concuerdan con (Valpotic *et al.*, 1994; Vijiuk *et al.*, 1995; Lackovic *et al.*, 1997; Janjatovic *et al.*, 2008) que describieron el reclutamiento de linfocitos a la mucosa intestinal como respuesta a una inmunización con cepas no patogénicas de *E. coli*. No obstante, en todos estos estudios la inmunización se realizó vía oral y las muestras de intestino fueron tomadas pocos días después de la inmunización del animal. Hallazgos similares también fueron encontrados por Bozic *et al.* (2002) que detectaron la presencia de un mayor infiltrado linfocitario en la mucosa del íleon y yeyuno de animales inmunizados en comparación con los controles, pero dichos linfocitos no era protectores frente a *E. coli*.

Trabajos previos también demuestran una rápida protección de cerdos gnotobióticos contra infección experimental con *Salmonella* obtenida después de la infiltración de leucocitos en el intestino, siendo esta infiltración causada por la administración previa de una cepa de *Salmonella entérica* avirulenta (Foster *et al.*, 2003). Estos autores demostraron que la infiltración celular en el intestino fue compatible con la protección contra el desafío con *S. entérica*. De manera similar, sugiere que el estímulo inicial inducido por la vacuna frente a *E. coli* usada en el presente estudio, podría incrementar el reclutamiento de células inmunológicas hacia el intestino lo que conduciría a una mejor protección intestinal frente a dicho patógeno.

En contraste a los resultados del presente trabajo, Bianchi *et al.* (1996) observaron una disminución en la respuesta de las células B en la mucosa intestinal tras la administración de una vacuna frente a *E. coli*, vía parenteral. Esta discordancia entre los resultados de los estudios probablemente se debe a que Bianchi *et al.* (1996)

usaron una cepa *E. coli* F4+, mientras la vacuna utilizada en el presente estudio está compuesta por siete cepas de *E. coli*. Además, Bianchi *et al.* (1996) administraron la vacuna a los 29 días de vida sin revacunación.

Interesantemente, los animales negativos para *E. coli* pertenecen mayormente al grupo de animales vacunados. Estos datos sugieren que el infiltrado celular observado, formado básicamente por células plasmáticas, sería un mecanismo de defensa del intestino desencadenado por la vacunación, lo que estaría de acuerdo con Slifka *et al.* (1998), que relata que la inmunidad humoral intestinal puede ser dependiente de células plasmáticas.

5.8. Detección de células productoras de IgA en intestino mediante inmunocitoquímica

Se registró un mayor número de células productoras de IgA en los animales vacunados, siendo significativa la diferencia con los respectivos controles ($p < 0,01$). La media de células productoras de IgA fue $25,78 \pm 0,84$ y $10,38 \pm 0,41$ para los vacunados y control, respectivamente (Figuras 17 a 19).

Figura 17. Diagrama de cajas del número de células productoras de IgA en los animales V10-20 y C10-20. La línea gruesa representa la mediana y las cajas están delimitadas por los cuartiles 25 y 75.

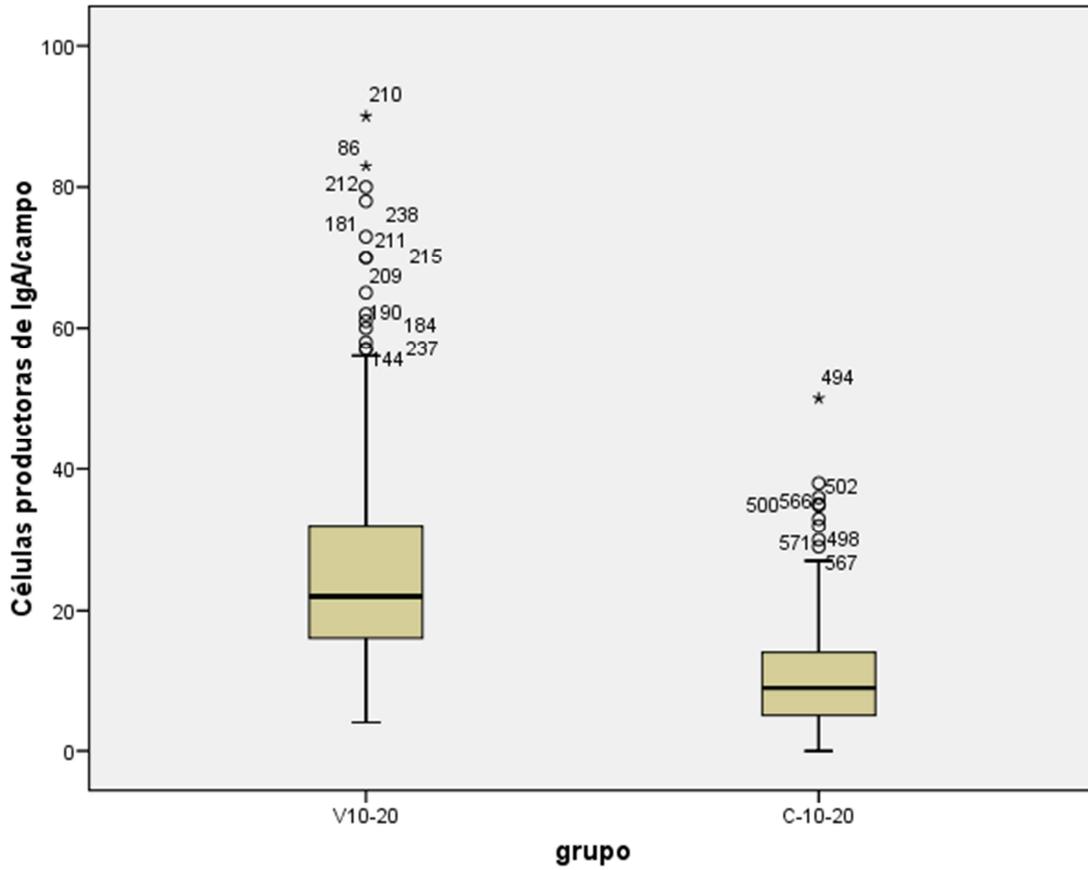


Figura 18. Imagen de la lámina propia del intestino delgado de un lechón vacunado frente *E. coli* con numerosas células productoras de IgA.

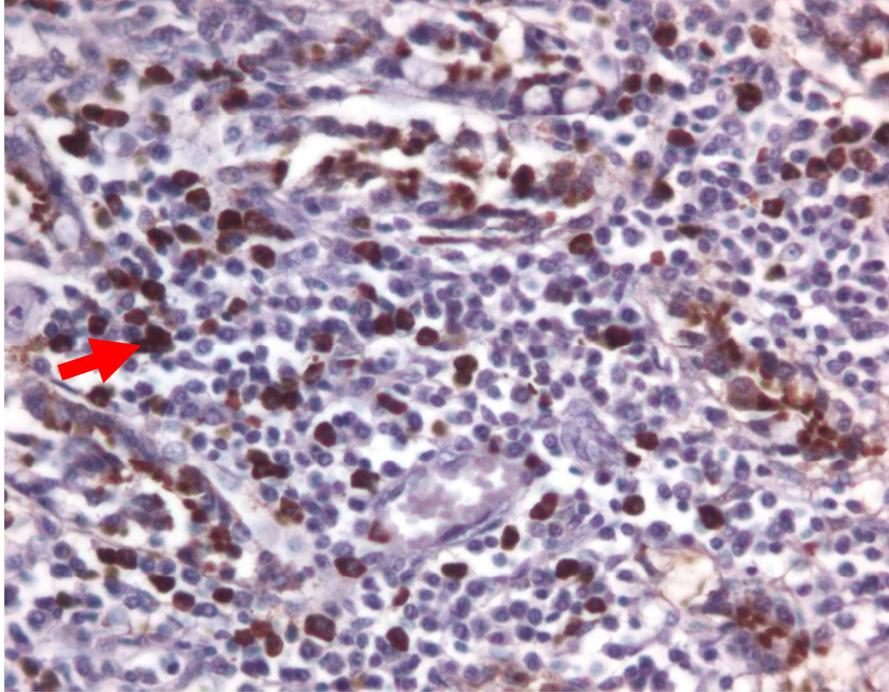
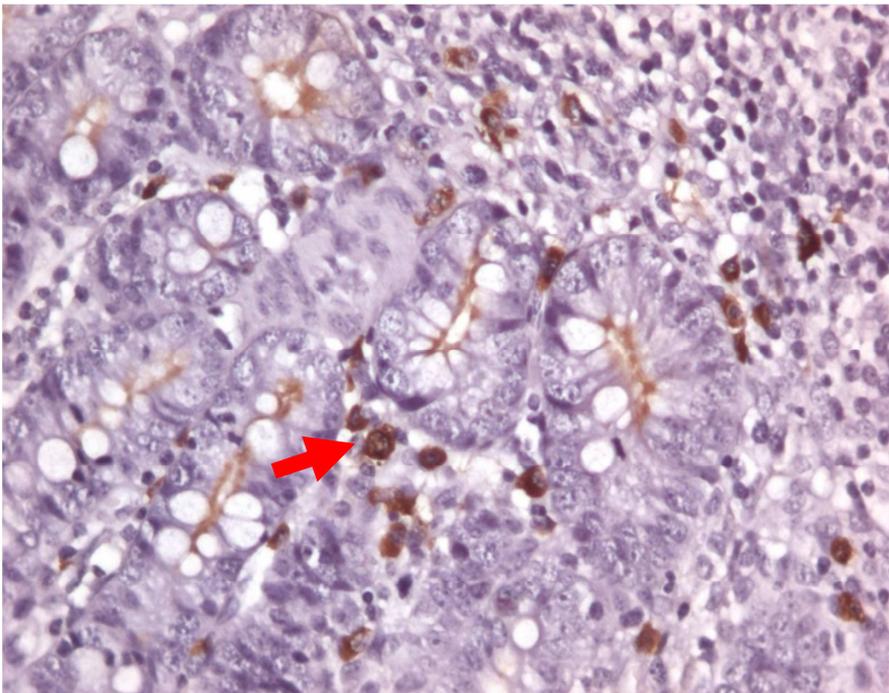
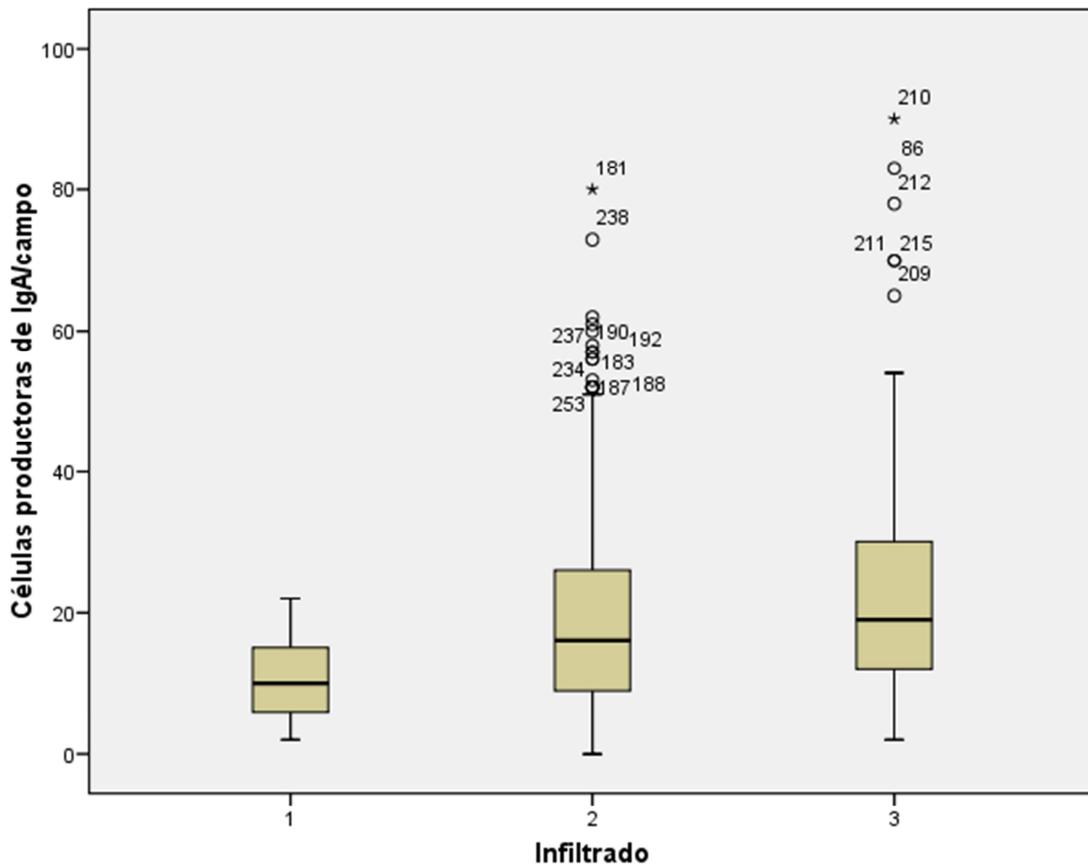


Figura 19. Imagen de la lámina propia del intestino delgado de un lechón no vacunado frente *E. coli* con escasas células productoras de IgA.



El número de células productoras de IgA en cada animal fue proporcional a la cantidad de infiltrado inflamatorio ($p < 0,001$).

Figura 20. Células productoras de IgA en cada puntuación de infiltrado celular.



Está bien documentado que los anticuerpos IgA actúan como una importante primera línea de defensa contra los patógenos en las mucosas limitando la adherencia de microorganismos patógenos al epitelio intestinal con la consiguiente reducción de las tasas de colonización (Williams y Gibbons, 1972; Husband *et al.*, 1999). Los datos inmunohistoquímicos obtenidos de IgA muestran que los animales vacunados poseían más células productoras de IgA que los controles ($p < 0,01$). Este hecho asociado al resultado de que los cerdos con mayor número de células productoras de IgA

resultaron negativos para *E. coli* mediante la técnica de PCR, sugiere que la administración de la vacuna generó inmunidad contra esta bacteria.

Se ha sugerido que la administración parenteral de vacuna frente a *E. coli* produce una estimulación de la producción de IgA sistémica y no local a nivel de intestino. Según Melkebbek *et al.* (2013) para aumentar el número de células productoras de IgA en las placas de Peyer con administración parenteral habría que inyectar simultáneamente vitamina D3. Por el contrario, en el presente estudio se empleó una vacuna parenteral sin administración de vitaminas concomitante e interesantemente se observó incremento de la inmunidad local intestinal.

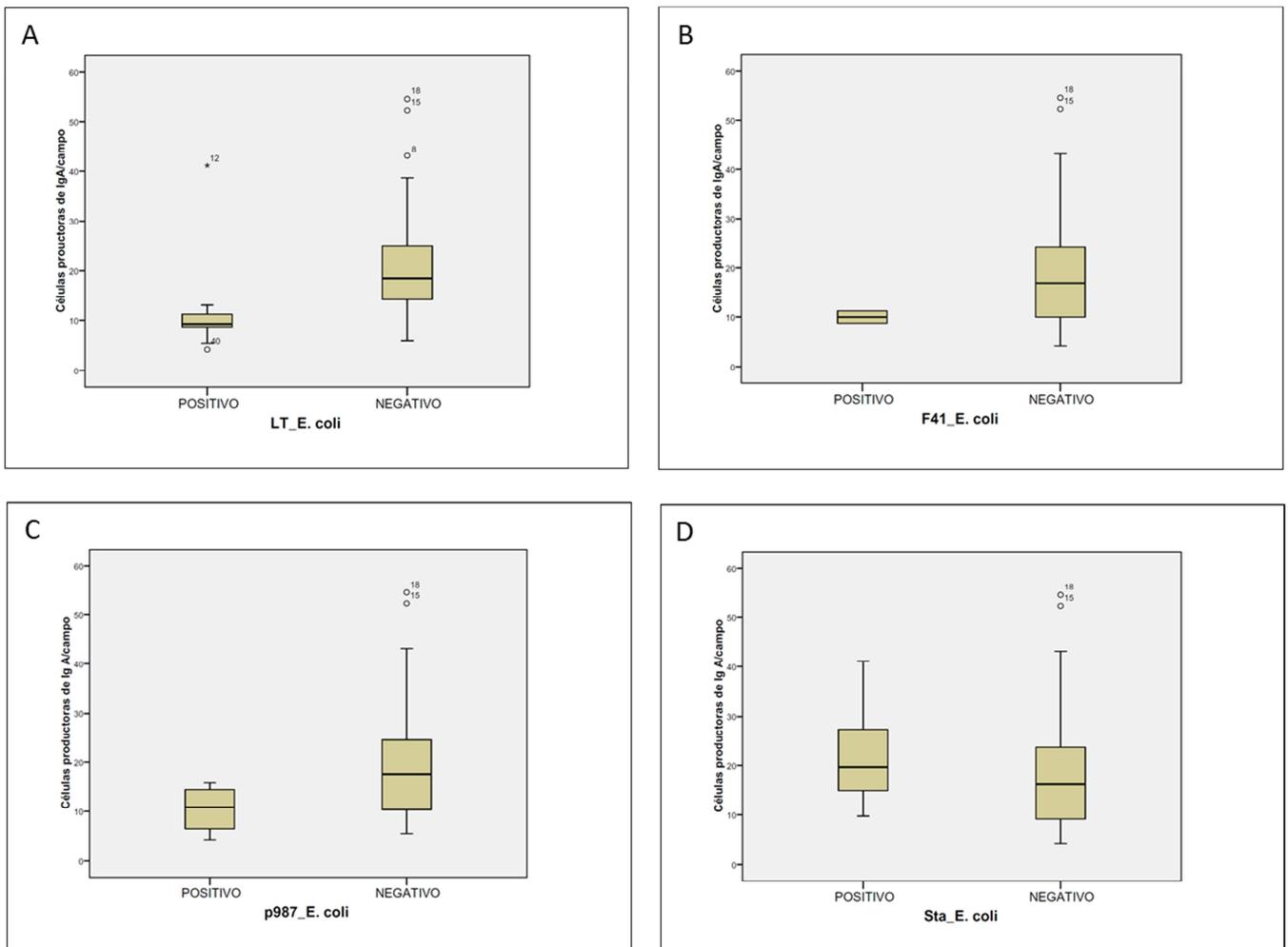
La abundancia de células plasmáticas observada en el infiltrado podría ser un efecto derivado de la vacunación y se correlaciona con el mayor número de células marcadas para IgA en los animales vacunados. El aumento de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa intestinal de los animales vacunados observado en el estudio histopatológico, hallazgos que coinciden con los descritos por Corrêa *et al.* (2006) y Segalés (2012), concuerda con el aumento de las células productoras de IgA detectadas por inmunohistoquímica.

5.8.1. Relación entre la cantidad de células productoras de IgA y presencia de factores de virulencia de *E. coli*

Analizando el número de células productoras de IgA en función de la presencia de factores de virulencia de *E. coli*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el factor de virulencia LT ($p < 0,03$). Los animales negativos para este

factor de virulencia presentaron mayor número de células productoras de IgA mientras que los animales positivos presentaron menor número de células productoras de IgA (Figura 21).

Figura 21. Células productoras de IgA en función de la presencia de los factores de virulencia de *E. coli* LT, F41, p987 y Sta.



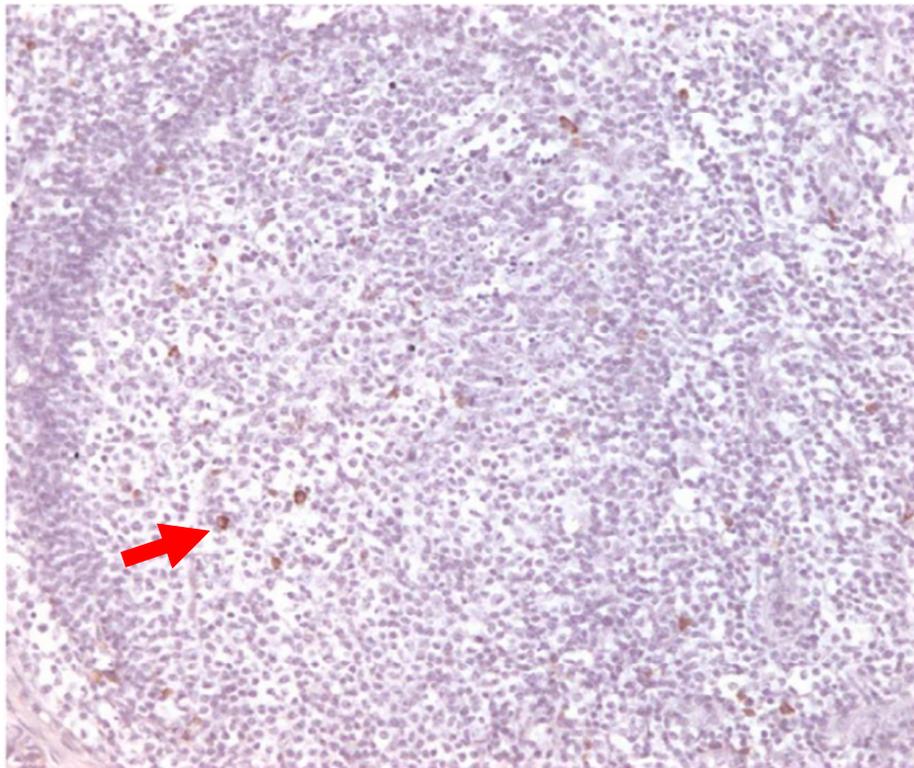
Para los demás factores de virulencia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, aunque se encontró tendencia ($p=0,061$) en el número

de células productoras de IgA con respecto a la presencia de p987, con un comportamiento similar que el factor LT. La mayor presencia de este factor estuvo relacionada con un menor número de células productoras de inmunoglobulina A.

5.9. Detección de PCV2 mediante inmunocitoquímica

PCV2 se encontró siempre en las placas de Peyer y en los nódulos linfáticos, pero en ningún caso apareció marcaje en la mucosa intestinal.

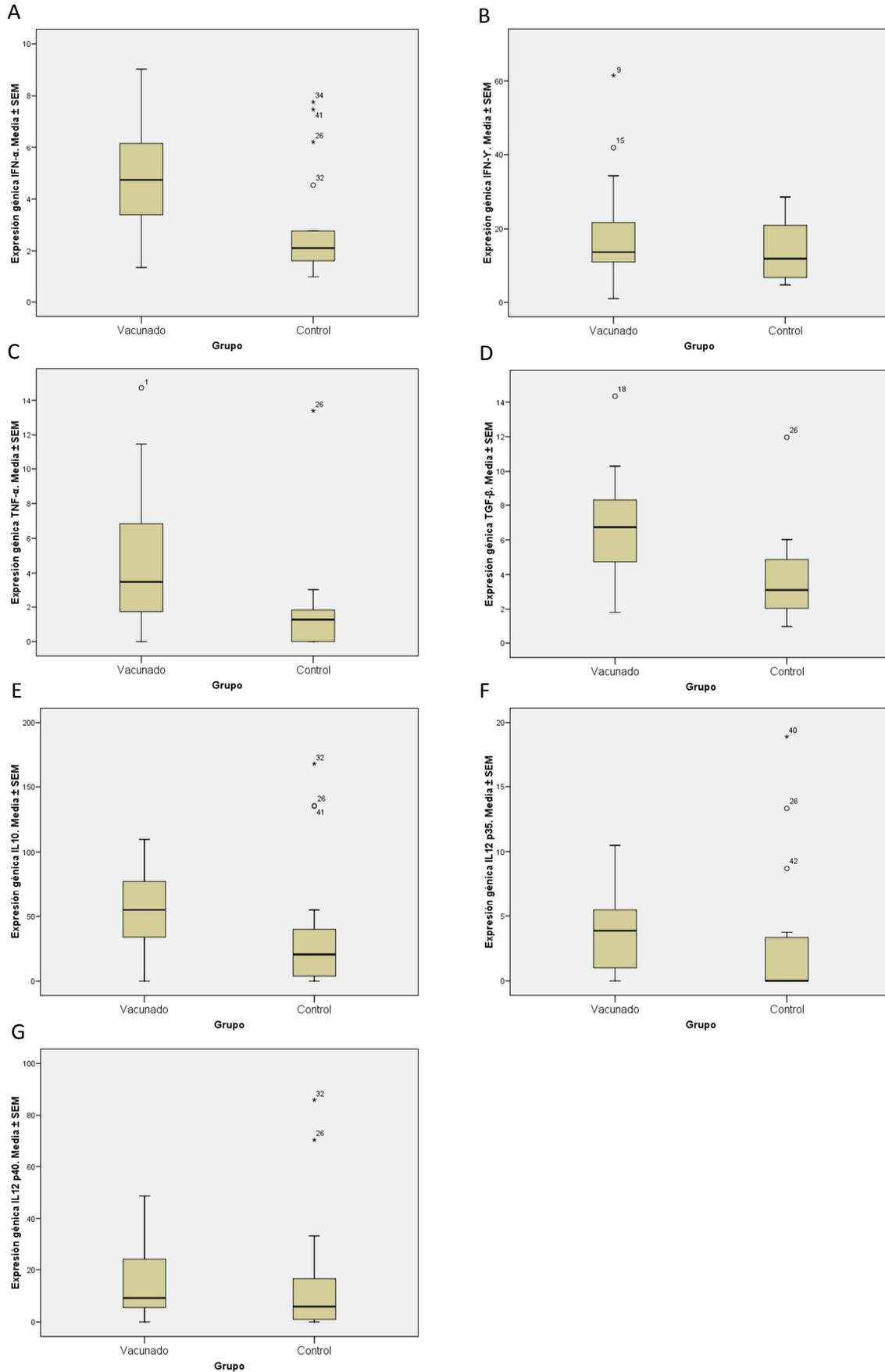
Figura 22. Imagen de una Placa de Peyer del intestino delgado de un lechón no vacunado frente *E. coli* con escaso número de células positivas a PCV2 mediante inmunohistoquímica.



5.10. Expresión de citocinas

La cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión génica de mRNA normalizada frente a los housekeeping β -actina, ciclofilina y GAPDH, demostró que los intestinos de los lechones vacunados produjeron más IFN- α (6,5 veces más que el control en los vacunados frente a 2,88 veces más frente al control en los no vacunados; $p < 0,001$), TNF- α (5,64 veces más para los vacunados frente a 1,67 veces más en los no vacunados; $p < 0,005$), TGF- β (6,81 veces más en los vacunados frente a 3,66; $p = 0,001$) e IL 12 p35 (3,70 veces en vacunados frente a 2,8 veces en no vacunados; $p = 0,009$) que los intestinos de los animales control (Figura 26).

Figura 26. Diagrama de cajas para la expresión génica de A) IFN- α , B) IFN- γ , C) TNF- α , D) TGF- β , E) IL 10, F) IL12 p35 y G) IL12 p40.



No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la expresión génica normalizada de IFN- γ , IL-10 y IL-12 p40 ($p=0,312$, $p=0,269$ y $p=0,895$, respectivamente) entre los animales vacunados y no vacunados comparados con los controles.

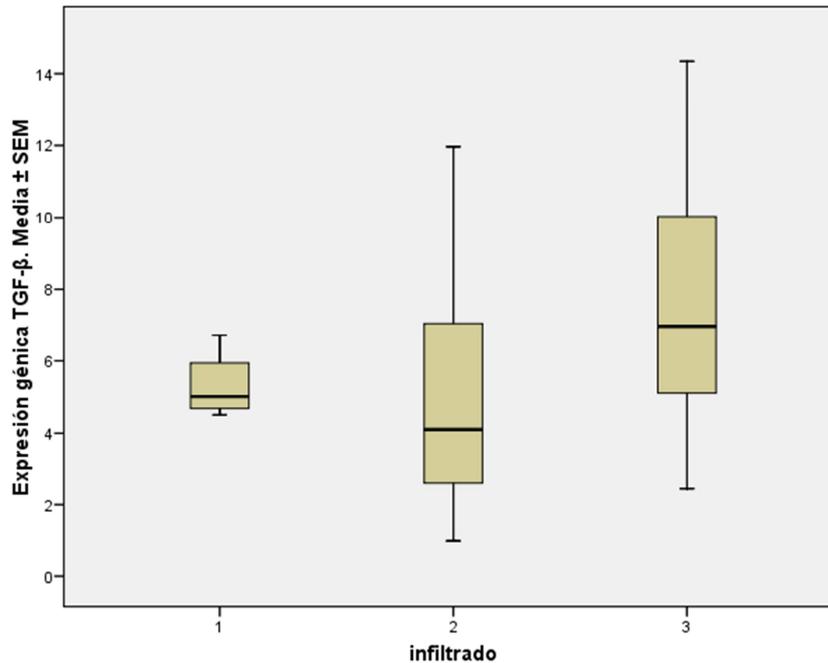
Se encontraron correlaciones positivas entre la expresión génica normalizada de IFN- α y TGF- β ($r^2 = 0,541$; $p=0,0001$), TNF- α y TGF- β ($r^2 = 0,648$ $p=0,001$), TNF- α y IL-10 ($r^2 = 0,379$; $p=0,012$); TNF- α e ILp35 ($r^2 = - 0,360$; $p=0,018$); TGF- β e IL12p35 ($r^2 = - 0,316$; $p=0,039$) y entre IL12p40 y IL10($r^2 = 0,743$; $p<0,001$).

5.10.1. Citocinas y células productoras de IgA

Se encontraron correlaciones positivas entre la expresión génica normalizada de IFN- α , TNF- α , TGF- β , IL-12 p35 y el número medio de células productoras de IgA ($r = 0,390$; $p=0,010$, $r = 0,384$; $p=0,011$, $r = 0,500$; $p=0,01$ y $r = -0,315$; $p=0,039$, respectivamente)

5.10.2. Citocinas e infiltrado inflamatorio

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de las distintas citocinas en relación a la puntuación de infiltrado inflamatorio, excepto para TGF- β al comparar la categoría 2 y 3 de infiltrado ($p=0,018$) (Figura 30).

Figura 30. Expresión génica del TGF- β en cada puntuación del infiltrado celular.

El TGF- β parece tener un papel destacado favoreciendo el cambio para que los linfocitos B cambien el isotipo de IgA (Austin *et al.*, 2003; Levast *et al.*, 2009; Tizard, 2009) causa que puede ser motivo del aumento de esta citocina en nuestro estudio. En el presente estudio, fue encontrada una correlación positiva entre la expresión génica de esta citocina y la presencia de células productoras de IgA. Estos hallazgos corroboran el estudio realizado por Ehrhardt *et al.* (1992) que observaron que el TGF- β indujo el aumento de la expresión de IgA cuando linfocitos de ratas fueron estimuladas con lipopolisacárido de *E. coli*. Hallazgos semejantes fueron encontrados por Rafferty y Montgomery (1995), que observaron aumento significativo de los niveles de IgA en fragmentos de tejido glandular parotídeo, submandibular o sublingual de ratas después de ser estimulados con TGF- β , usando para esta evaluación un sistema de cultivo *in vitro*.

De manera semejante, Jacobson *et al.* (2011) investigaron la expresión de citocinas en el intestino de cerdos en casos de diarrea de campo provocados por *L. intracellularis* y encontraron un aumento mayor del doble en la expresión de todas las citocinas que investigaron (IL-1b, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL12 p40), tanto en los animales con diarrea como en los animales usados como controles (sin diarrea). Los autores no consideraron el aumento consistente y atribuirán este hecho a pobre respuesta inmune observada en la adenomatosis intestinal porcina causada por *L. intracellularis* en animales jóvenes

5.10.3 Citocinas y factores de virulencia de *E. coli*

Al analizar las citocinas y los factores de virulencia de *E. coli* se observó que los animales positivos para la fimbria 987P presentaban una mayor expresión de IL12p40 ($p=0,02$) (Figura 31), y que los animales negativos para dicha fimbria tuvieron una mayor expresión de TGF- β ($p=0,043$) (Figura 32) y TNF- α ($p=0,003$) (figura 33).

En los animales negativos para la toxina LT se observó que la expresión génica de TNF- α fue mayor ($p=0,004$) (Figura 34). Los animales positivos para la fimbria F41 presentaron mayor expresión de IL 12 p35 ($p=0,001$) (Figura 35).

Figura 31. Expresión génica en animales positivos y negativos para la fimbria F6 de A) TGF- β , B) IL12p40 y c) TNF- α

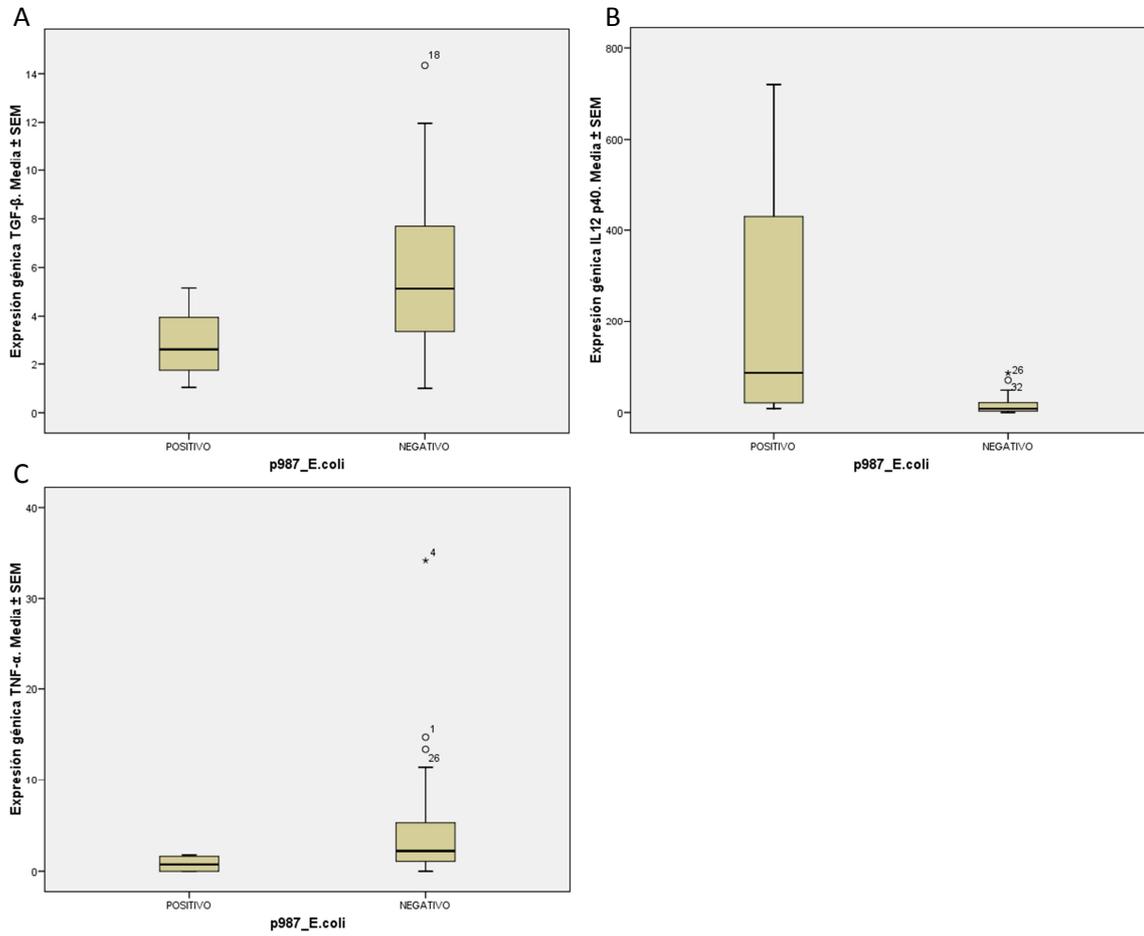


Figura 34. Expresión génica de TNF- α en animales positivos y negativos para la toxina LT.

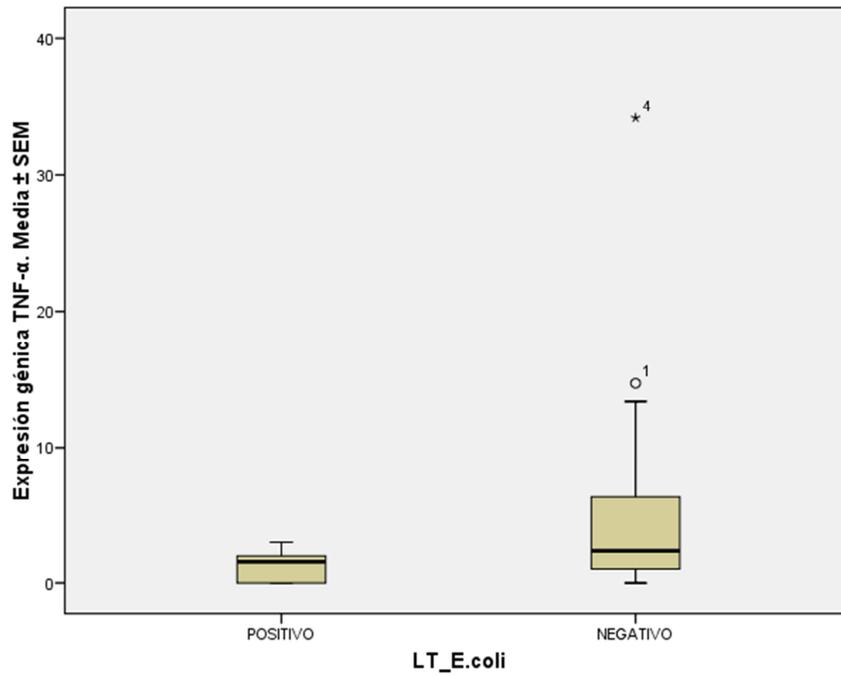
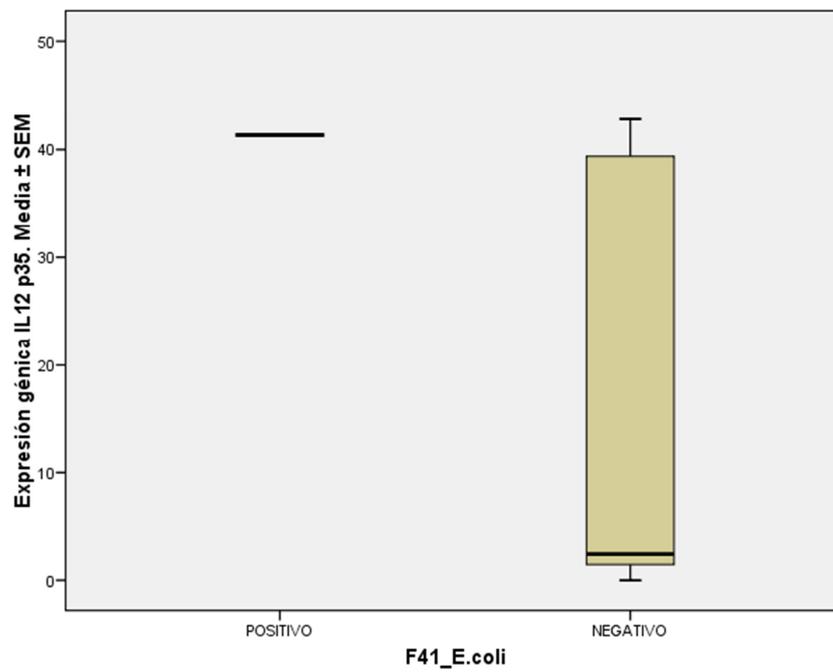


Figura 35. Expresión génica de IL12p35 en animales positivos y negativos para la fimbria F41.



Conclusiones

6. CONCLUSIONS

1. The use of Colidex[®] improves productive performances when vaccinated animals are compared with non-vaccinated pigs, in terms of feed conversion rate decrease. This effect is observed only when piglets are vaccinated at 10th day of life and revaccinated at 20th day of life.
2. The vaccination results in diarrhea outbreaks number decrease during rearing and finishing when compared to non-vaccinated animals.
3. The vaccination produced a decrease in *E. coli* isolation both in animals suspicious to suffer colibacillary diarrhea and in samples at slaughter. Moreover, the vaccination reduced the frequency of finding virulence related genes in the strains isolated.
4. The vaccination diminished the presence of other pathogens involved in the Porcine Enteric Complex Disease such as *L. intracellularis*, both in frequency and quantity.
5. Vaccinated animals showed higher number of inflammatory infiltrated cells in ileo and colon, which could be a part of the defense mechanism, recruiting inflammatory cells for this purpose.
6. Vaccinated animals had higher amount of IgA producing cells in the gut. This density is correlated to the quantity of inflammatory infiltrated cells and could be a part of the defense against *E. coli*.
7. The vaccination against *E. coli* produces a higher quantity of RNA for proinflammatory cytokines in vaccinated animals when compared to non-vaccinated animals. This is correlated to IgA producing cells number.

Resumen

7. RESUMEN

Esta tesis fue concebida con el objetivo de testar la eficacia de una vacuna (Colidex-C®-Farco Veterinaria, S.A., España) registrada para uso directo en lechones para prevención de problemas colibacilares post-destete. Para tal fin se emplearon criterios productivos, económicos, clínicos, anatomopatológicos e inmunológicos. Simultáneamente se evaluaron la incidencia y gravedad de otras enfermedades entéricas cuyos agentes etiológicos pueden interactuar con *E. coli*. Se utilizaron un total de 8299 cerdos de cruzamiento comercial Duroc x (Landrace x Large White). Los animales provenían de cerdas vacunadas con la misma vacuna del experimento a los 80 días de gestación así como en las dos gestaciones anteriores. Se testaron tres protocolos de vacunación: primo vacunación a 10 días y revacunación a 20 días (V10-20), primo vacunación a 10 días y revacunación a 30 días (V10-30), y vacunación a días 20 y 30 de vida (V20-30). Para cada protocolo, había un control (C10-20, C10-30 e C20-30). El sistema productivo era de ciclo completo. Una vez alcanzado el peso comercial, los animales fueron enviados al matadero. Durante la fase de transición/cebo se registraron datos de mortalidad, brotes de enfermedades entéricas y respiratorias, morbilidad, medicaciones colectivas, número de animales que no alcanzaron el peso esperado, mortalidad, peso de los lechones al inicio de transición, cantidad de alimento consumido durante transición/cebo, coste de las medicaciones, peso al sacrificio, duración de las fases, número de animales no comercializados al final de cebo y costes directos e indirectos. Se calcularon la Ganancia Media Diaria (GMD), el Índice de Transformación (IT) y el Coste por Kilo Repuesto (CKR). Se recogieron muestras de heces (escobillones intrducidos en la ampolla rectal) de animales con

diarrea durante las fases de transición y cebo para cultivo de colonias de *E. coli*. Se determinaron los serogrupos mediante técnica de microaglutinación y la detección de los factores de virulencia (LT, STa, STb, VT1 e VT2 y fimbrias F4, F5, F6, F18, F41) fue realizada mediante PCR. Para las cepas de *E. coli* aisladas se realizó antibiogramas con amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, gentamicina, neomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, marbofloxacina y ciprofloxacina. En el sacrificio, se tomó un escobillón de mucosa intestinal de cinco cerdos de los grupos experimentales V10-20 (n= 5) y C10-20 (n= 5) también para aislamiento de *E. coli*, determinación de los serogrupos y detección de los factores de virulencia. Se recogieron fragmentos de intestino al sacrificio y se acondicionaron en refrigeración, formol 10% o nitrógeno líquido dependiendo de las técnicas empleadas. Fragmentos de yeyuno e íleon de 20 animales del protocolo V10-20 y su control (C10-20) fueron recogidos para determinación de los factores de virulencia de *E. coli* (F4, F5, F41, F18 y F6, LT, STa), mediante PCR (ensayo plus/minus). Se realizó PCR clásica para *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae*, *Salmonella* spp y qPCR para *L. intracellularis*, *B. hyodisenteriae* y PCV2. De los mismos animales se realizó estudio histopatológico, utilizando el infiltrado celular a nivel de mucosa como parámetro de evaluación, e inmunohistoquímica (IHQ) para PCV2 y IgA. En las muestras ultra congeladas, se determinaron los niveles de transcritos de las citocinas IFN- γ , IFN- α , TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-12p35 y IL12-p40, mediante qPCR, utilizando como control endógeno los genes β -actina, ciclofilina y GAPDH porcinos. Los resultados mostraron que las principales diferencias en la fase de transición fueron entre el protocolo V10-20 y su control, observándose menor mortalidad (-2,11%), ausencia de casos de enfermedades entérica respecto al grupo control y menor número de muertes por enfermedades crónicas (-14,10%). Todos estos beneficios produjeron una

diferencia en el coste del lechón de 0,5 € en las condiciones de mercado analizadas. En la fase de cebo, utilizando como comparación la desviación estándar de los parámetros productivos del periodo 2008 -2010, se ha encontrado una diferencia significativa en el IC del pienso comparando V10-20 con C10-20 (-5,58%). Para los demás parámetros estudiados no se encontró diferencia significativa. Comparando el protocolo V10-20 con su control se observó reducción en la mortalidad (-18,65%), en el índice de conversión (-4,84%) y en el número de animales no comercializables (-14,6%), lo que llevó a una reducción en el coste de quilo repuesto del 2,06%. La mejora de estos parámetros en el protocolo V10-20 generó una ganancia de 1,90 € por cerdo finalizado, comparado el control C10-20. Sumando estos beneficios con los obtenidos de la fase de transición se acumula un beneficio de 2,40 € por cada animal finalizado, lo que deja un beneficio marginal elevado para el productor tras descontar el coste de la vacuna. De acuerdo con los resultados productivos de este estudio, la vacunación de lechones a los 10 días y revacunación a 20 días, vía intramuscular, demostró ser eficiente para mejorar la eficiencia y el coste de producción en granjas con problemas causados por *E. coli*. Por esto, a partir del sacrificio los análisis se centraron en el protocolo V10-20 y C10-20. Respecto al aislamiento y tipificación de *E. coli* durante las fases de transición/cebo, se aisló dicha bacteria en el 74,5% de las muestras sospechosas frente al 25,5% que resultó negativo. De las muestras positivas, el 68,4% correspondía a animales no vacunados y el 31,6% a animales vacunados, independiente del protocolo. Para los factores de virulencia *Stb* y *eae* la diferencia no fue significativa. No se encontró el gen de la toxina VT1 ni de las fimbrias F4, F5, F6, F41 y F17 en ninguna de las muestras analizadas. Respecto a VT2, solo fue encontrada en una muestra control. Solamente una cepa de las 20 sometidas a antibiograma no

presentó resistencia a ninguno de los antibióticos testados. Se han encontrado cepas con hasta seis resistencias a distintos antibióticos. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de resistencias al comparar los animales vacunados y controles, ni al comparar los diferentes protocolos de vacunación. La mayor frecuencia de número de resistencias fue a tres antibióticos (40% de las cepas). Respecto a los aislamientos de *E. coli* al sacrificio, los 5 animales del protocolo V10-20 resultaron negativos, mientras que los 5 animales del C10-20 resultaron positivos. De estos aislados, dos fueron positivos a STb, aunque no se encontró ningún gen para fimbrias. Dos fueron positivos a *eae* (factor de adhesión y borrado). Solo un animal fue positivo para la hemolisina. En la PCR – ensayo plus-minus, se encontraron 24 muestras positivas de las 40 analizadas (V10-20 = 20 y C 10-20 = 20), perteneciendo 17 muestras al protocolo C10-20 y siete al protocolo V10-20 ($p=0,035$). El 24% de las muestras de animales del protocolo V10-20 fue positiva para alguno de los genes de virulencia, mientras que un 55,6% fue detectado en el control C10-20 ($p=0,035$). Las PCR para *Salmonella spp.* y *B. hyodysenteriae* resultaron negativas para todos los animales. En la qPCR a tiempo real para la detección de PCV2, todas las muestras de íleon fueron positivas. En las muestras de colon, se detectó en el 75% de los animales vacunados y 80% de los controles. No hubo diferencias significativas en la carga vírica de PCV2 en ninguno de los dos tejidos comparando animales vacunados frente a animales control. Se observó una correlación significativa entre la carga vírica detectada en íleon y en colon ($r^2= 0,570$, $p<0,001$). En los análisis histopatológicos, se observó depleción linfoide en placas de Peyer y nódulos linfáticos en seis cerdos, tres pertenecientes al V10-20 y tres al C10-20, edema en la lámina propia de intestino grueso en 80% de los animales, infiltrado de eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas en el intestino

delgado de todos los animales estudiados. Con relación al infiltrado linfoplasmocitario, en el grupo de animales vacunados, 55% presentaron infiltrado celular moderado; 40% de los lechones presentaron infiltrado celular acentuado y solamente el 5% fueron clasificados como infiltrado celular discreto. En cuanto al grupo control, el 65% presentaron infiltrado celular moderado, el 10% infiltrado celular acentuado y el 25% infiltrado celular discreto. Para comparar el grupo vacunado con el grupo control, se calculó la mediana de puntuaciones obtenidas para cada grupo. La mediana fue mayor en el grupo de animales vacunados (2,35) que en el grupo control (1,85). La diferencia entre ambos grupos experimentales fue significativa ($p = 0,040$), siendo mayor el grado de infiltrado inflamatorio registrado en los animales vacunados. Se registró un mayor número de células productoras de IgA en los animales vacunados comparado con los controles ($p < 0,01$). La media de células productoras de IgA fue $25,78 \pm 0,84$ y $10,38 \pm 0,41$ por campo microscópico para los vacunados y control, respectivamente. Respecto a la expresión de citocinas, la cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión génica de mRNA normalizada frente a los housekeeping β -actina, ciclofilina y GAPDH, demostró que los intestinos de los lechones vacunados produjeron más IFN- α ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,005$), TGF- β ($p = 0,001$) e IL 12 p35 ($p = 0,009$) que los intestinos de los animales control. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la expresión génica normalizada de IFN- γ , IL-10 y IL-12 p40 entre los animales vacunados con los controles. De acuerdo con los resultados de este estudio, el uso de Colidex[®] para la prevención de la diarrea post destete en lechones produjo importantes mejoras sanitarias, productivas y económicas, siendo el mejor protocolo de vacunación el que incluye la primera vacunación a los 10 días de edad y revacunación a los 20 días de edad. Los resultados

productivos y clínicos mejorados en el grupo vacunado sugieren que el infiltrado de células del sistema inmune aumentadas en dicho grupo mejoraría la defensa intestinal frente a *E. coli*. Esta vacuna parenteral mostró ser una nueva estrategia en el control de la colibacilosis.

Palabras clave: citocinas, complejo entérico porcino, diarrea post-destete, lechones, vacuna parenteral, intestino.

Summary

8. SUMMARY

Efficacy of vaccination against swine colibacillosis under field conditions

This thesis was designed with the aim of testing the effectiveness of a vaccine (Colidex-C[®]-Farco Veterinaria, S.A., Spain) registered for direct use in piglets for the prevention of post-weaning colibacillosis. To this end, productive, economic, clinical, anatomopathological and immunological criteria were used. Simultaneously, the incidence and severity of other enteric diseases whose etiological agents can interact with *E. coli* was assessed. A total of 8299 commercial cross Duroc x (Landrace x Large White) pigs was used. Piglets were derived from sows vaccinated with the same experimental vaccine at 80 days of gestation, as well as in the two previous pregnancies. Three immunization protocols were tested: first vaccination at 10 days and revaccination at 20 days (V10-20); first vaccination at 10 days and revaccination at 30 days (V10-30), and vaccination at 20 and 30 days of life (V20-30). There was a control group (C10-20, C10-30 and C20-30) for each protocol. The production system was complete cycle. Once the commercial weight was reached, the animals were sent to slaughter. During the phase transition/fattening the following data were recorded: mortality rate, enteric and respiratory disease outbreaks, collective medicines, number of animals that did not reach the expected weight, weight of piglets at the beginning of the transition, amount of food consumed during the transition/fattening, cost of drugs, slaughter weight, duration of phases, number of animals not sold at the end of fattening, and direct and indirect costs. The average daily gain (ADG), the Transformation Index (TI) and the cost per kilogram of substitution (CKS) were calculated. Stool samples (via rectal swab) of animals with diarrhea were collected

during transition and fattening phases for culture of *E. coli*. Serogroups determination was done by microscopic agglutination technique and virulence factors (LT, Sta, STB, VT1 and VT2 and fimbriae F4, F5, F6, F18, F41) detection was performed by PCR. Antibiogram with amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, gentamicin, neomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin and marbofloxacin was carried out For isolated *E. coli* strains. At slaughter, the smears of intestinal mucosa were performed in five animals from the experimental groups V10-20 (n = 5) and C10-20 (n = 5), for *E. coli* isolation, serogroups determination, and virulence factors detection. Intestine fragments were collected at slaughter and placed in refrigeration, 10% formalin or liquid nitrogen, depending on the techniques to be employed. Jejunum and ileum fragments of 20 animals from V10-20 protocol and its control (C 10-20) were collected for determination of virulence factors of *E. coli* (F4, F5, F41, F18 and F6, LT, STa) by PCR (plus / minus test). Classical PCR was performed for *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* and *Salmonella spp L.* and qPCR for *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* and PCV2. From the same animals, a histopathological study was conducted using the cellular infiltration at mucosa as parameter, and immunohistochemistry (IHC) for PCV2 and IgA. In ultrafrozen samples, cytokines transcript levels of IFN- γ , IFN- α , TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-12p35 and IL-12-p40 were determined by qPCR using as endogenous control the swine genes β -actin , cyclophilin and GAPDH. According to the results, the main differences in the transition phase were between the V10-20 protocol and its control, showing lower mortality (-2.11%), no cases of enteric diseases in relation to the control group and fewer deaths from chronic diseases (14.10%). All these benefits resulted in a € 0.5 difference in the piglet cost at the analyzed market conditions. In the fattening phase, by using the standard deviation as a comparison of production parameters for

the years 2008-2010, there was a significant difference in the Feed Conversion Rate comparing V10-20 with C10-20 (-5.58%). For the other parameters studied, no significant difference was found. Comparing the V10-20 protocol with its control, reduction in mortality (-18.65%), in food conversion rate (-4.84%) and in the number of non-tradable animals (-14.6 %) were observed, leading to a reduction of 2.06% in the cost of replaced kilogram. The improvement of these parameters in V10-20 protocol produced a gain of € 1.90 per finished pig, comparing with its control (C10-20). Adding these profits to those obtained from the transition phase, profits of € 2.40 per finished animal accumulate, leaving a high marginal profit to the producer after deducting the cost of the vaccine. According to the productive results in this study, intramuscular vaccination of piglets at 10 days and revaccination at 20 days improved the efficiency and cost of production in farms with a history of problems caused by *E. coli*. Therefore, from the slaughter onwards, the analysis focused only in the V10-20 / C10-20 vaccination protocol. Regarding the isolation and characterization of *E. coli* during transition/fattening phases, the bacterium was isolated in 74.5% of suspected samples against 25.5% that tested negative. Of the positive samples, 68.4% corresponded to unvaccinated animals and 31.6% to vaccinated animals, regardless of the protocol. For STB and *eae* the difference was not significant. No VT1 toxin gene or the fimbriae F4, F5, F6, F41 and F17 were found in any of the analyzed samples. VT2 was found in only one control sample. Of the 20 strains submitted to antibiogram, only one showed no resistance to any of the antibiotics tested. Strains with resistance to up to six different antibiotics were found. There were no significant differences in the frequency of resistance when comparing vaccinated and control animals, or when comparing the different vaccination protocols. The highest frequency of resistance was to three

antibiotics (40% of the strains). Regarding the *E. coli* isolates found at slaughter, the five animals from V10-20 protocol were negative, while the five animals from C10-20 were positive. From these isolates, two were positive for STb, though no genes for fimbriae were found. Two isolates were positive for *eae* (fixing factor and dissecret factor). Only one animal was positive for hemolysine. In PCR (plus-minus test), 24 positive samples were found among the 40 analyzed samples (V10-20 = 20 and C10-20 = 20), being 17 samples from C10-20 protocol and seven from V10-20 protocol ($p = 0.035$). 24% of the samples from the animals from V10-20 protocol were positive for any of the virulence genes, whereas 55.6% was detected in C10-20 ($p = 0.035$). PCR for *Salmonella* spp., and *B. hyodysenteriae* were negative. In real time qPCR for the detection of PCV2, all ileum samples were positive. In colon samples, it was detected in 75% of vaccinated animals and 80% of controls. There were no significant differences in PCV2 viral load of any of the tissues in the comparison of vaccinated animals and control animals. There was a significant correlation between the viral load detected in the ileum and colon ($r^2 = 0.570$, $p < 0.001$). Histopathological analysis revealed lymphoid depletion on Peyer's patches and lymph nodes in six pigs (three belonging to V10-20 and three to C10-20), edema on large intestine slides in 80% of animals, eosinophils infiltrate, lymphocytes, and plasma cells in small intestine of all animals studied. Regarding lymphocytic infiltration in the group of vaccinated animals, 55% of the piglets showed moderate cell infiltration; 40% showed marked cellular infiltration, and only 5% were classified as mild cellular infiltration. In the control group, 65% had moderate cellular infiltrates, 10% severe cellular infiltrates and 25% mild cellular infiltrates. To compare the vaccinated group with the control group, the averages of scores obtained for each group were calculated. The average was higher in the

vaccinated group (2.35) than in the control (1.85) group. The difference between the two experimental groups was significant ($p = 0.040$), and the vaccinated animals presented higher degree of inflammatory infiltrate. An increased number of IgA producing cells was observed in vaccinated animals compared with the control group ($p < 0.01$). The mean of IgA cells was 25.78 ± 0.84 and 10.38 ± 0.41 for vaccinated and control groups, respectively. Regarding the expression of cytokines, the intestines of vaccinated piglets produced more IFN- α ($p < 0.001$), TNF- α ($p < 0.005$), TGF- β ($p = 0.001$), and IL 12 p35 ($p = 0.009$) than the intestines of the animals in control group. On the contrary, there were no statistically significant differences in normalized gene expression of IFN- γ , IL-10 and IL-12 p40 between vaccinated and control pigs. According to the study results, the use of Colidex[®] for the prevention of post-weaning diarrhea in piglets resulted in significant health, production, and economic improvements, and the best vaccination protocol is the one that includes the first vaccination at 10 days of age and revaccination at 20 days of age. The improved production and clinical results in vaccinated group suggests that immune cells infiltrate in this group would improve the protection against intestinal *E. coli*. Altogether these results suggest that This parenteral vaccine is a new strategy to control colibacillosis.

Keywords: cytokines, enteric swine complex, post-weaning diarrhea, piglets, parenteral vaccine, intestine.

Anexo

9. ANEXO. MATERIAL ADICIONAL

Tabla I. Resultados de los aislamientos de cerdos con diarrea en transición y cebo.

Factores de adhesión.

PROTOCOLO	GRUPO	EDAD	RESULTADO AISLAMIENTO	LREC	ea	F4 (K88)	F5 (K99)	F6 (P987)	F18	F40
C10_20	CONTROL	LECHONERA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12303	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12304	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12305	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12306	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12307	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12485	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12308	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12309	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	Hly-12310	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12311	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12484	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12483	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-12412	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	Hly-12413	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-12414	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECVT-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13248	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13249	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13250	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	Hly-13252	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-13253	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13254	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Tabla II. Resultados de los aislamientos de cerdos con diarrea en transición y cebo.

Factores de virulencia.

PROTOCOLO	GRUPO	EDAD	RESULTADO AISLAMIENTO	LREC	Hly	LT	STa	STb	VT1	VT2
C10_20	CONTROL	LECHONERA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12303	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12304	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12305	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12306	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12307	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12485	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12308	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12309	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	Hly-12310	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12311	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12484	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12483	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-CNL	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	CEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-12412	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	Hly-12413	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-12414	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECVT-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13248	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13249	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13250	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	Hly-13252	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-CNL	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-13253	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-CNL	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13254	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Tabla III. Resultados de los aislamientos de cerdos con diarrea en transición y cebo. Resistencias a antibióticos.

PROTOCOLO	GRUPO	EDAD	RESULTADO AISLAMIENTO	LREC	AM	AMC	GM	N	SXT	MAR	CIP
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12303	R	R	S	I	R	S	S
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12304	R	S	S	S	R	S	S
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12305	R	I	R	R	R	R	R
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12306	R	R	S	S	R	S	S
C10_20	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12307	R	I	S	S	R	S	S
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12485	R	I	S	S	R	S	S
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12308	R	I	S	I	R	S	S
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12309	R	I	S	I	R	S	S
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	Hly-12310	R	R	R	R	R	S	S
V10_30	VACUNADO	LECHONERA	POSITIVO	EAE-12484	R	R	S	I	R	S	S
C10_30	CONTROL	LECHONERA	POSITIVO	ECEP-12483	S	I	S	I	S	S	S
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-12412	I	I	S	I	I	S	S
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	Hly-12413	R	R	S	I	R	S	S
C10_20	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-12414	R	I	S	I	S	S	S
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13248	R	S	-	S	S	R	R
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13249	R	S	-	S	S	R	R
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13250	R	S	-	S	S	R	R
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	Hly-13252	R	S	-	S	R	R	R
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	EAE-13253	I	S	-	I	R	S	I
C10_30	CONTROL	CEBO	POSITIVO	ECEP-13254	R	S	-	S	S	R	R

AM: Amoxicilina, AMC: Amoxicilina+Clavulánico, GM: Gentamicina, N: Neomicina, SXT: sulfametoxazol-trometopim, MAR: Marbofloxacina, CIP: Ciprofloxacina

Tabla IV. Resultados de los aislamientos de cerdos tomados aleatoriamente a final de cebo. Factores de adhesión.

PROTOCOLO	GRUPO	EDAD	RESULTADO AISLAMIENTO	LREC	F4 (K88)	F5 (K99)	F6 (p987)	F18	F40
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	ECEP-12412	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	Hly-12413	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	ECEP-12414	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Tabla V. Resultados de los aislamientos de cerdos tomados aleatoriamente a final de cebo. Factores de virulencia.

PROTOCOLO	GRUPO	EDAD	RESULTADO AISLAMIENTO	LREC	Hly	LT	STa	STb	VT1	VT2
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
V10_20	VACUNADO	MATADERO	NEGATIVO	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	ECEP-12412	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	Hly-12413	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	EAE-CNL	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	ECEP-12414	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG

Tabla VI. Resultados de los aislamientos de cerdos tomados aleatoriamente a final de cebo. Resistencias a antibióticos.

PROTOCOLO	GRUPO	EDAD	RESULTADO AISLAMIENTO	LREC	AM	AMC	GM	N	SXT	MAR	CIP
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	ECEP-12412	I	I	S	I	I	S	S
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	Hly-12413	R	R	S	I	R	S	S
C10_20	CONTROL	MATADERO	POSITIVO	ECEP-12414	R	I	S	I	S	S	S

Bibliografía

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Akase S, Uchitani Y, Sohmura Y, Tatsuta K, Sadamasu K, Adachi Y. Application of real time PCR for diagnosis of Swine Dysentery. *J Vet Med Sci.* 2009; 71: 359-362.
2. Alustiza FE, Picco NY, Bellinger RV, Terzolo HR, Vivas AB. Frequency of virulence genes of *Escherichia coli* among newborn piglets from an intensive pig farm in Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2012; 44: 250-254.
3. Andersson M, Ahlberg V, Jensen-Waern M, Fossum C. Intestinal gene expression in pigs experimentally co-infected with PCV2 and PPV. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 142: 72-80.
4. Austin AS, Haas KM, Naugler SM, Bajer AA, Garcia-Tapia D, Estes D. M. Identification and characterization of a novel regulatory factor: IgA-inducing protein. *J Immunol.* 2003; 171: 1336-1342.
5. Bednorz C, Oelgeschläger K, Kinnemann B, Hartmann S, Neumann K, Pieper R, Bethe A, Semmler T, Tedin K, Schierack P, Wieler LH, Guenther S. The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303: 396-403.
6. Bertschinger HU, Fairbrother JM. *Escherichia coli* infections. In: Straw B.E., D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (Eds.), *Disease of swine*. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 431-467.
7. Bertschinger HU, Gyles CL. Oedema disease of pigs. In: Gyles CL, editor. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Wallingford: CAB International, 1994. P. 193–219.
8. Bhandari SK, Xu B, Nyachoti CM, Giesting DW, Krause DO. Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model of piglet diarrhea: effects on gut microbial ecology. *J Anim Sci.* 2008; 86: 836-847.

9. Bianchi ATJ, Scholten JW, Van Zijderveld AM, van Zijderveld FG, Bakhout BA. Parenteral vaccination of mice and piglets with F4 + *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine*. 1996; 14: 199–206.
10. Blanco J, Blanco M, Alonso MP, Blanco JE, Garabal JI, González EA. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. *FEMS Microbiol Lett*. 1992; 96: 155-160.
11. Blanco M, Blanco JE, Gonzalez EA, Mora A, Jansen W, Gomes TA, Zerbini LF, Yano T, Pestana AF, Blanco J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2958-963.
12. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dhahi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae). *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 645-651.
13. Blanco M, Lazo L, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int Microbiol*. 2006; 9: 53-60.
14. Bonardi S, Brindani F, Pizzin G, Lucidi L, D'Incau M, Liebana E, Morabito S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2003; 85: 101-10.
15. Boratto AJ, Lopes DC, Oliveira RFM, Albino LFT, Sá LM, Oliveira GA. Uso de Antibiótico, de Probiótico e de Homeopatia, em Frangos de Corte Criados em Ambiente de Conforto, Inoculados ou não com *Escherichia coli*. *Rev bras zootec*. 2004; 33: 1477–1485.
16. Borrueal N. Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. *Gastroenterol Hepatol*. 2003; 26:13-22.
17. Bot A, Bona, C. Genetic immunization of neonates. *Microbes Infect*. 2002; 4: 511–520.

18. Bozic F, Lackovic G, Stokes CR, Valpotic I. Recruitment of intestinal CD45RA+ and CD45RC+ cells induced by a candidate oral vaccine against porcine post-weaning colibacillosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 86: 137–146.
19. Brown CC, Baker DC, Barker IA. Alimentary System: Bacterial diseases of the alimentary tract. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals (Fifth Edition). Ed. by Maxie M. 2007a. p. 183-228.
20. Brown CC, Baker DC, Barker IA. Alimentary System: Intestine. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals (Fifth Edition). Ed. by Maxie M. 2007b. p. 69-127.
21. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25: 169-193.
22. Bustin SA. Developments in real-time PCR research and molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010; 10: 713-715.
23. Carlson SA, Wu MT, Frana TS. Multiple antibiotic resistance and virulence of Salmonella enteric serotype Typhimurium phage type DT 104. In: Torrence, M. E., and R. E. Isaacson (eds), *Microbial Food Safety in Animal Agriculture*. 2003: Current Topics, Chapter 14, pp. 123–129. Iowa State Press, Ames, Iowa.
24. Carvajal A, de Arriba ML, Rodríguez H, Vidal AB, Duhamel GE, Rubio P. Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *Vet Rec.* 2006; 158: 700-701.
25. Chen X, Gao S, Jiao X, Liu XF. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. *Vet Microbiol.* 2004; 103: 13-20.
26. Cheng X, Gao S, Jiao X, Liu XF. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. *Vet Microbiol.* 2004; 103: 13-20
27. Cheng D, Sun H, Xu J, Gao S. Prevalence of fimbrial colonization factors F18ab and F18ac in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema and/or diarrhea in China. *Vet. Microbiol.* 2005; 110: 35–39.

28. Chernysheva LV, Friendship RM, Gyles CL, Dewey CE. Field trial assessment of the efficacy of specific egg-yolk antibody product for control of postweaning *E. coli* diarrhea. *Vet Ther.* 2003; 279-284.
29. Clinical and laboratory Standard Institute (CLSI). Performance and Standards for Antimicrobial Disk Diffusion and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standards, 3rd edition, vol. 28, M31-A3 Edition. 2008.
30. Codina-Grau M, Tórtola-Fernández, GMT. Diagnostic utility of nucleic acid detection by real-time polymerase chain reaction. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24: 539-540.
31. Corrêa AMR, Pescador CA, Schmitz M, Zlotowski P, Rozza DB, Oliveira EC, Barcellos DE, Driemeier D. Aspectos clínico-patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 2006; 26: 9-13.
32. Cox E, Cools V, Thoonen H, Hoorens J, Houvenaghel A. Effect of experimentally-induced villus atrophy on adhesion of K88ac-positive *Escherichia coli* in just-weaned piglets. *Vet Microbiol.* 1988; 17: 159-69.
33. Devriendt B, Stuyvena E, Verdoncka F, Goddeeris BM, Coxa E. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells. *Dev Comp Immunol.* 2010; 34: 1175-1182.
34. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol.* 1995; 3: 118 -120.
35. Ehrhardt RO, Strober W, Harriman GR. Effect of transforming growth factor (TGF)-beta 1 on IgA isotype expression. TGF-beta 1 induces a small increase in sIgA+ B cells regardless of the method of B cell activation. *J Immunol.* 1992; 148: 3830 – 3836.
36. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. In situ class switching and differentiation to IgA producing cells in the gut lamina propria. *Nature.* 2001; 413: 639-643.

37. Fairbrother JM. Enteric colibacillosis. In: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire, Taylor D.J. (Eds.), Disease of swine. Ames: Iowa State University Press, 1992; 489-497.
38. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim Health Res Rev. 2005; 6: 17–39.
39. Felder CB, Vorlaender N, Gander B, Merkle HP, Bertschinger HU. Microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* and detached fimbriae for peroral vaccination of pigs Vaccine 19. 2001; 706–715.
40. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Xu Y, Potts B, Meng XJ. Detection and in vitro and in vivo characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product. J Gen Virol. 2004; 85: 337-382.
41. Foster N, Lovell MA, Marston KL, Hulme SD, Frost AJ, Bland P, Barrow PA. Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent *Salmonella enterica*. Infect. immun. 2003; 71: 2182-91.
42. Francis DH. Use of immunofluorescence, Gram's staining, histologic examination, and seroagglutination in the diagnosis of porcine colibacillosis. Am J Vet Res. 1983; 44: 1884-8.
43. Francis DH. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. J. Swine Health Prod. 2002; 10: 171-175.
44. Franklin MA, Francis DH, Baker D, Mathew AG. A PCR-based method of detection and differentiation of K88 adhesive *Escherichia coli*. J Vet Diagn Invest. 1996; 8: 460-463.
45. Frydendahl K, Imberechts H, Lehmann S. Automated 5' nuclease assay for detection of virulence factors in porcine *Escherichia coli*. Molecular and Cellular Probes. 2001; 15: 151-160.
46. Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. Vet Microbiol. 2002; 85: 169-182

47. Frydendahl K, Jensen TK, Andersen JS, Fredholm M, Evans G. Association between the porcine *Escherichia coli* F18 receptor genotype and phenotype and susceptibility to colonisation and postweaning diarrhoea caused by *E. coli* O138: F18. *Vet Microbiol* 2003; 93: 39–51.
48. Gaastra W, De Graaf FK. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microb*. 1982; 46: 129-161.
49. Gabler NK, Spencer JD, Webel DM, Spurlock ME. n-3 PUFA attenuate lipopolysaccharide-induced down-regulation of toll-like receptor 4 expression in porcine adipose tissue but does not alter the expression of other immune modulators. *J Nutr Biochem*. 2008; 19: 8-15.
50. Garabal JI, González EA, Vázquez F, Blanco J, Blanco M, Blanco JE. Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Vet Microbiol*. 1996; 48: 113-123.
51. Garabal JI, Vázquez F, Blanco J, Blanco M, González EA. Colonization antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Vet Microbiol*. 1997; 54: 321-328.
52. García-Feliz C, Collazos JA, Carvajal A, Vidal AB, Aladueña A, Ramiro R, de la Fuente M, Echeita MA, Rubio P. Salmonella enterica infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health*. 2007; 54: 294-300.
53. Gorton SJ, Kliebeinstein JB, Beran GW. Cost of on-farm microbial testing for Salmonella: An application by farm size and prevalence level. *ISU Swine Research Report*. 1996; 1-7.
54. Goswami PS, Gyles CL, Friendship RM, Poppe C, Kozak GK, Boerlin P. Effect of plasmid pTENT2 on severity of porcine post-weaning diarrhoea induced by an O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2008; 131: 400-5.
55. Guedes R, Barcellos D. Disenteria suína. In: Sobestianky, J, Barcellos, D. *Doenças dos Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2012, p. 140 – 412.
56. Guedes R. Enterite proliferativa suína. In: Sobestianky, J, Barcellos, D. *Doenças dos Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2012, p. 144 – 146.

-
57. Guineé PAM, Jansen HW, Wasdtrom T, Sellwood R. *E. coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: Leeww, P.W., Guineè, P.A.M. (Eds.), Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea. Current topics in Veterinary and animal science, 13, Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands. 1981. pp. 126-162.
58. Gyles CL. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. Can. J. Microbiol. 1992; 38: 734-746.
59. Gyles CL. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Wallingford, U.K.: CAB International. 1994.
60. Hampson DJ. Post-weaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs. In: Gyles, C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CABI, London, 1994. pp. 171–191.
61. Hampson DJ, Fellstromand C, Thomson JR, Swine dysentery. In: B.E. Straw, J.J. Zimmerman and S. D’Allaire *et al.*, Editors, Diseases of Swine (ninth ed.), Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, USA. 2006. pp. 785–805.
62. Hans P. Manual de las Enfermedades del Cerdo. Acribia, 2001. 670 p.
63. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, van den Biggelaar FL, van Leeuwen WJ, de Boer E. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. Int J Food Microbiol. 1999; 52: 67-75.
64. Hidalgo A, Carvajal A, García-Feliz C, Osorio J, Rubio P. Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. Res Vet Sci. 2009; 87: 7-12.
65. Holland RE. Some infectious cases of diarrhea in young farm animals. Clin Microbiol Rev. 1990; 3: 345-75.
66. Hur J, Lee JH. Protection against neonatal *Escherichia coli* diarrhea by vaccination of sows with a novel multivalent vaccine candidate expressing *E. coli* adhesins associated with neonatal pig colibacillosis. Res Vet Sci. 2013; 94: 198-204.

-
67. Husband AJ, Bao S, Beagley KW. Analysis of the mucosal microenvironment: factors determining successful responses to mucosal vaccines. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 72: 135-142.
68. Jacobson M, Fellström C, Jensen-Waern M. Porcine proliferative enteropathy: an important disease with questions remaining to be solved. *Vet J.* 2010;184: 264-268.
69. Jacobson M, Andersson M, Lindberg R, Fossum C, Jensen-Waern M. Microarray and cytokine analyses of field cases of pigs with diarrhoea. *Vet Microbiol.* 2011;153: 307-314.
70. Janjatović AK, Lacković G, Božić F, Popović M, Valpotić I. Levamisole synergizes proliferation of intestinal IgA+ cells in weaned pigs immunized with vaccine candidate F4ac+ nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *J Vet Pharmacol Ther.* 2008; 31: 328-33.
71. Jensen TK, Christensen BB, Boye M. *Lawsonia intracellularis* infection in the large intestines of pigs. *APMIS.* 2006; 114: 255-64.
72. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest.* 1997; 100: S51-S55.
73. Karlowsky JA, Kelly LJ, Thornsberry C, Jones ME, Sahm DF. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 2540-5.
74. Kaufmann M, Zweifel C, Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Beutin L, Stephan R. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *J Food Prot.* 2006; 69: 260-6.
75. Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, López C, González EA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *Vet J.* 2006; 174: 176-187.
76. Kich, JD. Salmonelose. In: Sobestianky, J., Barcellos, D. Doenças dos Suínos.

- Goiânia: Cânone Editorial, 2012, p. 196 – 203.
77. Kim J, HA Y, Jung K, Choi C, Chae C. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res.* 2004; 68: 218–221.
78. Kim J, Kovacs-Nolan JA, Yang C, Archbold T, Fan MZ, Mine Y. L-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *J Nutr Biochem.* 2010; 21: 468-475.
79. Kurtz HJ, Bergeland ME, Barnes DM. Pathologic changes in edema disease of swine. *Am J Vet Res.* 1969; 30: 791-806.
80. Kwon CH, Lee CY, Han SJ, Kim SJ, Park BC, Jang I, Han JH. Effects of dietary supplementation of lipid-encapsulated zinc oxide on colibacillosis, growth and intestinal morphology in weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Anim Sci J.* 2014; 85: 805-813.
81. Lackovic G , Vijiuk N, Balenovic T , Dean-Nystrom EA, Casey TA, Valpotic I. Detection of wCD1, SWC1a, SWC2 and CD45 molecules by immunofluorescence or immunoperoxidase techniques in porcine gut-associated lymphoid tissues following experimentally induced colibacillosis. *Period. Biol.* 1997; 99: 343–350.
82. Lawson GH, Gebhart CJ. Proliferative enteropathy. *J Comp Pathol.* 2000; 122: 77-100.
83. Levast B, De Monte M, Melo S, Chevaleyre C, Berri M, Salmon H, Meurens F. Differences in transcriptomic profile and IgA repertoire between jejunal and ileal Peyer’s patches. *Developmental and Comparative Immunology.* 2009; 34: 102-106.
84. Li XY, Jin LJ, Uzonna JE, Li SY, Liu JJ, Li HQ, Lu YN, Zhen YH, Xu YP. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): in vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 15: 132-136.
85. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000; 127: 117-126.

-
86. Lindecrona RH, Jensen TK, Andersen PH, Møller K. Application of a 5' nuclease assay for detection of *Lawsonia intracellularis* in fecal samples from pigs. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 984-7.
87. Liu W, Yuan C, Meng X, Du Y, Gao R, Tang J, Shi D. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *Vet J.* 2014; 199: 286-289.
88. Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW, Fang L, Frohlich AA, Baidoo SK. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *Immunol Med Microbiol.* 1999; 23: 283-289.
89. Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB J.* 1994; 8: 538-544.
90. Mazurek J, Bok E, Stosik M, Baldy-Chudzik K. Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* from Pigs during Metaphylactic Trimethoprim and Sulfamethoxazole Treatment and in the Post-Exposure Period. *Int. J. Environ. Res. Public Health;* 2015, 12: 2150-2163.
91. McDonald DE, Pethick DW, Mullan BP, Hampson DJ. Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *British Journal of Nutrition.* 2001; 86: 487-498.
92. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: S93-S106.
93. McIntosh KA, Harding JCS, Parker S, Krakowka S, Allan G, Ellis JA. Quantitative polymerase chain reaction for Porcine Circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. *Can Vet J.* 2008; 49: 1189-1194.
94. McOrist S, Jasni S, Mackie RA, Neef N, Lawson GHK. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont *intracellularis*. *Infection and Immunity.* 1993; 61: 4286-4292.

95. McOrist S, Mackie RA, Neef N, Aitken I, Lawson GHK. Synergism of ileal symbiont intracellularis and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Rec.* 1994; 134: 331-332.
96. Melkebeek V, Verdonck F, Goddeeris BM, Cox E. Comparison of immune responses in parenteral FaeG DNA primed pigs boosted orally with F4 protein or reimmunized with the DNA vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2007a; 116: 199–214
97. Melkebeek V, Sonck E, Verdonck F, Goddeeris BM, Cox E. Optimized FaeG Expression and a Thermolabile Enterotoxin DNA Adjuvant Enhance Priming of an Intestinal Immune Response by an FaeG DNA Vaccine in Pigs. *Clin Vaccine Immunol.* 2007b; 14819: 28–35.
98. Melkebeek V, Goddeeris BM, Cox E. ETEC vaccination in pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; 152: 37-42.
99. Meng Q, Kerley MS, Russel TJ, Allee GL. Lectinlike activity of *Escherichia coli* K88, *Salmonella Choleraesuis*, and *Bifidobacteria pseudolongum* of porcine gastrointestinal origin. *J Anim Sci.* 1998; 76: 551-556.
100. Mølbaek L, Johnsen K, Boye M, Jensen TK, Johansen M, Møller K, Leser TD. The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Vet Microbiol.* 2008; 128: 96-107.
101. Møller K, Jensen TK, Jorsal SE, Leser TD, Carstensen B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet Microbiol.* 1998: 52-72.
102. Moon HW, Bunn TO. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine.* 1993; 11: 213–220.
103. Moon HW, Booher SL, Cornick NA, Hoffman LJ. Prevalenc of virulence factors among *Escherichia coli*. *Iowa State University Technicall Bulletin.* 2005.
104. Mores N, Moreno AM. Síndrome da diarreia pós-desmame. In: Sobestianky, J. Barcellos, D. Doenças dos Suínos. Goiânia: Cãnone Editorial, 2012, p. 203 – 205.

105. Moue M, Tohno M, Shimazu T, Kido T, Aso H, Saito T, Kitazawa H. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim Biophys Acta - General Subjects*. 2007; 1780: 134-144.
106. Mullaney CD, Francis DH, Willgohs JA. Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia coli*. *J Vet Diagn Invest*. 1991; 3: 115–118.
107. Nagy B, Wilson RA, Whittam TS. Genetic diversity among *Escherichia coli* isolates carrying f18 genes from pigs with porcine postweaning diarrhea and edema disease. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1642-1645.
108. Nathues H, Holthaus K, Grosse Beilage E. Quantification of *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2009; 107: 2009-16.
109. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*. 2006;6: 148-158.
110. Nienaber JA, Hahna GL, Klemcke HG, Becker BA, Blecha F. Cyclic temperature effects on growing-finishing swine. *J Therm Biol*. 1989; 14: 233-237.
111. Niewold TA, van Dijk AJ, Geenen PL, Roodink H, Margry R, van der Meulen J. Dietary specific antibodies in spray-dried immune plasma prevent enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 (ETEC) post weaning diarrhoea in piglets. *Vet Microbiol*. 2007; 124: 362-369
112. Noamani BN, Fairbrother JM, Gyles CL. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. *Vet Microbiol*. 2003; 97: 87-101.
113. Ojeniyi B, Ahrens P, Meyling A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their relevance in piglets with diarrhea: The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J Vet Med B*. 1994; 41: 49-59.
114. Opapeju FO, Krause DO, Payne RL, Rademacher M, Nyachoti CM. Effect of dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health and

- gastrointestinal microbial ecology of weaned pigs induced with post-weaning colibacillosis. *J Anim Sci.* 2009; 87: 2635-43.
115. Paiba GA. Prevalence of VTEC O157 in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain, and in cattle on farms in England and Wales. Proceedings of the meeting "Zoonotic infections in livestock and the risk to public health, VTEC O157" 28th June 2000. Royal College of Physicians of Edinburgh, Scotland. 2000. pp. 19–21.
116. Pallarés FJ, Ramis G, Seva J, Muñoz A. Implicación de la Sanidad en el Nuevo Orden Zootécnico. En: Producir carne de cerdo en el siglo XXI, generando un Nuevo Orden Zootécnico. Ed. Acalanthis. 2006. Capítulo 4: p. 89-117
117. Pallarés FJ, Lasa C, Rozen M, Ramis G. Use of tylvalosin in the control of porcine enzootic pneumonia. *Vet Rec Open.* 2015; 2: e000079.
118. Penteado AS, Ugrinovich LA, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Andrade JRC, Corrêa SS, Pestana de Castro, AF. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Vet Microbiol.* 2002; 89: 41-51
119. Pié S, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, Oswald IP. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr Biochem.* 2004; 134: 641-647.
120. Rafferty DE, Montgomery PC. The effects of transforming growth factor-beta and interleukins 2, 5 and 6 on immunoglobulin production in cultured rat salivary gland tissues. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10: 81-86.
121. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. The bowel: a key component of the immune system. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008;100: 29-34.
122. Ramis G, Otero LC, Pallarés FJM, Rafael J, Astorga Marquez RJA, Muñoz AM, Laguna J G. Patologías digestivas porcinas en imágenes. Zaragoza: Editorial Servet, 2011, 226 p.
123. Raz R, Chazan B, Kennes Y, Colodner R, Rottensterich E, Dan M, Lavi I, Stamm W. Urinary Tract Infection Group. Empiric use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) in the treatment of women with uncomplicated

- urinary tract infections, in a geographical area with a high prevalence of TMP-SMX-resistant uropathogens. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 1165–1169.
124. Royae AR, Husmann RJ, Dawson HD, Calzada-Nova G, Schnitzlein WM, Zuckermann, FA, Lunney, JK. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004; 102: 199-216.
 125. Rubio P, Carvajal A. Diarreas en lactación: colibacilosis. Artículo publicado en www.3tres3.com 2009.
 126. Rutter JM, Burrows MR, Sellwood R, Gibbons RA. Genetic basis for resistance to enteric disease caused by *Escherichia coli*. *Nature*. 1975; 257: 135–6.
 127. Sansonetti, PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 953-964.
 128. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. 2012; 164: 10–19.
 129. Schierack P, Steinrück H, Kleta S, Vahjen W. Virulence Factor Gene Profiles of *Escherichia coli* Isolates from Clinically Healthy Pigs. *Applied Environ Microbiol*. 2006; 72: 6680–6686.
 130. Shikina T, Hiroi T, Iwatani K, Jang MH, Fukuyama S, Tamura M, Kubo T, Ishikawa H, Kiyono H. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J Immunol*. 2004; 172: 6259-6264.
 131. Sköld, O. Sulfonamides and trimethoprim. *Expert Rev. Anti Infect Ther*. 2010; 81: 1–6.
 132. Slifka, MK, Antia, R, Whitmire, JK, Ahmed, R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998; 8: 363-372.
 133. Smith HW, Linggood MA. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J Med Microbiol*. 1971; 4: 467-85.

134. Smith MG, Jordan D, Chapman TA, Chin JJ, Barton MD, Do TN, Fahy VA, Fairbrother JM, Trott DJ. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Vet Microbiol.* 2010; 145: 299-307.
135. Sommer C, White F. Cytokines, Chemokines, and Pain, en: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F. *Pharmacology of Pain.* 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010. 279-302
136. Stege H, Jensen TK, Møller K, Baekbo P, Jorsal SE. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med.* 2000; 46: 279-92.
137. Suh DK, Song JC. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. In swine 190 intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. *J Vet Sci.* 2005; 6: 231-237.
138. Svendsen J, Larsen J Bille N. Outbreaks of postweaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs. *Nord Vet-Med.* 1974; 26: 314-322.
139. Teale CJ. Antimicrobial resistance and the food chain. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92: 85S–89S.
140. Tiels P, Verdonck F, Coddens A, Goddeeris B, Cox E. The excretion of F18+ *E. coli* is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate. *Vaccine.* 2008; 26: 2154-63.
141. Tizard, IR. *Immunologia Veterinaria.* 8 edición. Ed. Elsevier, 2009. 592p.
142. Toledo A, Gómez D, Cruz C, Carreón R, López J, Giono S, Castro AM. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 148-156.
143. Torrallardona D, Conde MR, Badiola I, Polo J, Brufau J. Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weaning pigs challenged with *Escherichia coli* K99. *J Anim Sci.* 2003; 81: 1220-1226.
144. Trevisi P, Melchior D, Mazzoni M, Casini L, De Filippi S, Minieri L, Lalatta-Costerbosa G, Bosi P. A tryptophan-enriched diet improves feed intake and growth performance of susceptible weaning pigs orally challenged with

- Escherichia coli* K88. J Anim Sci. 2009; 87: 148-156.
145. Vaerman JP, Heremans JF. Immunoglobulin A in the pig. I. Preliminary characterization of normal pig serum IgA. Int Arch Allergy Immunol. 1970; 38: 561-572.
 146. Valpotic I, Vijiuk N, Trutin-Ostovic K , Casey TA, Dean-Nystrom EA, Lackovic G. Identification and distribution of CD⁺ T-cell subsets in porcine gut following experimental infection with F4ac⁺ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) or non-ETEC strains. Reg Immunol. 1994; 6: 387-390.
 147. Van den Broeck W, Cox E, Goddeeris BM. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. Vaccine. 1999; 17: 2020-9.
 148. Van Dijk AJ, Enthoven PM, Van den Hoven SG, Van Laarhoven MM, Niewold TA, Nabuurs MJ, Beynen AC. The effect of dietary spray-dried porcine plasma on clinical response in weaned piglets challenged with a pathogenic *Escherichia coli*. Vet Microbio. 2002; 84: 207-218.
 149. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002;3:RESEARCH0034.
 150. Verdonck F, Cox E, Van der Stede Y, Goddeeris BM. Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response. Vaccine. 2004; 22: 4291-9.
 151. Verdonck F, Tiels P, van Gog K, Goddeeris BM, Lycke N, Clements J, Cox E. Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ *Escherichia coli* infection. Vet Immunol Immunopathol. 2007; 120: 69-79.
 152. Vidotto MC, Lima NCS, Fritzen JTT, Freitas JC, Venâncio EJ, Ono MA. Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana state, Brazil. Braz J Microbiol. 2009; 40:199-204.

-
153. Vijić N, Curić S, Lacković G, Udovičić I, Vrbanac I, Valpotić I. Histopathological features in the small intestine of pigs infected with F4ac+ non-enterotoxigenic or enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. J Comp Pathol. 1995; 112: 1-10.
 154. Wada Y, Nakaoka Y, Kondo H, Nakazawa M, Kubo M. Dual Infection with Attaching and Effacing *Escherichia coli* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Post-weaning Pigs. J Comp Path. 1996; 114: 93-99.
 155. Weber N, Nielsen JP, Jakobsen AS, Pedersen LL, Hansen CF, Pedersen KS. Occurrence of diarrhoea and intestinal pathogens in non medicated nursery pigs. Acta Vet Scand. 2015; 57:64.
 156. West DM, Sprigings KA, Cassar C, Wakeley PR, Sawyer J, Davies RH. Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan[®] PCR assays. Vet microbiol. 2007; 122: 323-331.
 157. Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. Science, 1972; 177:697-699.
 158. Wilson RA, Francis DH. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. Am J Vet Res. 1986; 47: 213–217.
 159. Yan XM, Ren J, Huang X, Zhang ZY, Ouyang J, Zeng WH, Zou ZZ, Yang SJ, Yang B, Huang LS. Comparison of production traits between pigs with and without the *Escherichia coli* F4 receptors in a White Duroc x Erhualian intercross F2 population. J Anim Sci. 2009; 87: 334-339.