

A black and white photograph showing a hand holding a syringe with a needle. The syringe is filled with a clear liquid. In the background, there is a blurred image of a pig's head. The text is overlaid on the right side of the image.

**Control de
Escherichia coli mediante
vacunación
parenteral**

La enfermedad y el patógeno

La colibacilosis sigue siendo uno de los principales problemas digestivos en la fase de transición y cebo, caracterizado porque hay una inmensa variedad de cepas de *Escherichia coli* que pueden dar lugar a cuadros clínicos y lesiones diversos; diarrea neonatal a las pocas horas de vida, diarreas del lactante, diarrea postdestete, enfermedad de los edemas y colibacilosis septicémica. La **diarrea neonatal** puede aparecer a las 2-3 horas post nacimiento, se caracteriza por la presencia de diarrea líquida y de color variable (amarillo a marrón), signos de deshidratación (ojos hundidos, piel seca), pérdida de peso muy rápida y en ocasiones comienza con muertes súbitas, incluso antes de que haya ningún otro síntoma. La **diarrea postdestete** también puede iniciarse con muertes súbitas de animales en buena condición corporal (incluso los mejores), deshidratados y con diarrea líquida y de color variable, incluso con sangre. El estómago puede estar lleno de pienso y suele haber signos de deshidratación (ojos hundidos, piel seca y ausencia de hemorragia durante la necropsia). La **forma septicémica** suele acompañar a alguna de las otras. Produce una poliserositis indistinguible de las que producen enfermedad de Glässer, estreptococia o micoplasmosis por *Mycoplasma hyorhinis*. Puede haber signos nerviosos, pedaleo e incoordinación. En ocasiones hay disnea y también signos de deshidratación. Pueden aparecer muertes súbitas. Finalmente, la **enfermedad de los edemas** es producida por las cepas verotoxigénicas (productoras de verotoxina 2e) también puede debutar con muertes súbitas. Lo más ca-



Figura 1. ¿De qué depende que se produzca un cuadro u otro? Del patotipo de *E. coli* que produce el cuadro. Y esto depende de dos elementos: los elementos de adhesión (fimbrias) y las toxinas que produzca (exotoxinas: LT y StA y StB, y endotoxinas: VT1 y VT2).

racterístico es la aparición de edemas (resultado de una vasculopatía por la toxina) en párpados, cara, jeta y labios. En ocasiones aparece edema de glotis en algunos animales lo que produce un sonido sibilante característico. Si se afecta el cerebro puede haber signos nerviosos. La aparición de diarrea es variable y puede observarse solo en algunos animales. (Figura 1 y 2)

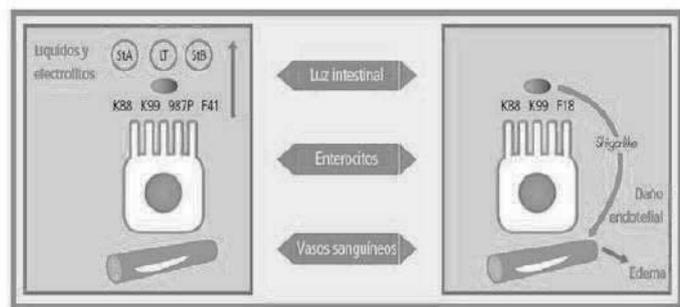
Hay numerosos factores que pueden desencade-

nar un brote de colibacilosis, incluyendo factores nutricionales, ambientales, patologías concurrentes y manejo de los animales.

Prevención

La prevención de la colibacilosis pasa por cuidar los factores antes mencionados: piensos de calidad

Comparación entre el mecanismo patogénico de las diarreas neonatales y de la producción de edemas por *E. coli*.



Principales factores de virulencia de *E. coli* relacionados con las diarreas neonatales y postdestete.

Neonatales		Postdeste	
Fimbrias	Exotoxinas	Fimbrias	Exotoxinas
K88 (F4) K99 (F5) 987P (F6) F41	LT StA StB	K88 (F4) K99 (F5) F18	Shiga-like

Figura 2. Mecanismos de acción *E.Coli* y cuadro de elementos de adhesión y toxinas.

con cantidad de proteína controlada (*E. coli* es proteolítico), sin disrupciones en la alimentación, buenas condiciones ambientales; el frío produce un aumento de la ingesta y el calor altera el comportamiento alimentario. Ambos promueven la aparición de colibacilosis.

Y además, también se ha optado clásicamente por la inmunización de las reproductoras (generalmente en vacunas combinadas con *E. coli* y *Clostridium spp.*), para que la inmunidad calostroal proteja a los lechones en los primeros momentos de su vida. El problema es que esto requiere un manejo del encalostrado adecuado, y esto con las estirpes hiperprolíficas actuales es complicado.

Sin embargo, en la última década han aparecido diversas vacunas frente al patógeno para su uso directo en lechones. Esto será adecuado como prevención cuando tengamos el tiempo suficiente como para que se establezca una respuesta inmune antes de que aparezca la enfermedad. Se suelen aplicar en los primeros días de vida de los lechones.

Evidencias del uso de vacuna parenteral frente a *E. coli*

En este artículo se van a ofrecer evidencias del funcionamiento de una vacuna frente a *E. coli* y la toxina β de *Clostridium perfringens* C (Colidex-C, Vetia, España). Se evaluaron parámetros clínicos en la transición, así como productivos y económicos en el cebo, se estudió la presencia de lesiones entéricas al sacrificio en animales vacunados y animales control, se analizó el grado de infiltrado inflamatorio en íleon y colon al sacrificio, se determinó la presencia de cepas patógenas

de *E. coli* en muestras de heces tomadas durante los episodios diarreicos acontecidos en transición y cebo, y se estudiaron la presencia de células productoras de IgA en intestino, así como la expresión génica para citosinas proinflamatorias.

Los animales y las pruebas

Se utilizaron un total de 3762 cerdos de cruce 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. El protocolo de vacunación fue: primo vacunación a 10 días y revacunación a 20 días (V10-20), con su correspondiente control (C10-20). 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 Ruego (CKR). Se recogieron muestras de heces (escobillones introducidos 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 fac-

tores de virulencia (LT, STa, STb, VT1 e VT2 y fimbrias F4, F5, F6, F18, F41) fue realizada mediante PCR. 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. Se recogieron 20 fragmentos de yeyuno e íleon de animales vacunados y control para determinar de los factores de virulencia de *E. coli* (F4, F5, F41, F18 y F6, LT, STa), mediante PCR (ensayo plus/minus). También se realizó PCR clásica y q-PCR para *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* y *Salmonella* spp. De los mismos animales se realizó estudio histopatológico, utilizando el infiltrado celular a nivel de mucosa como parámetro de evaluación, e inmunohistoquímica (IHQ) para células productoras de IgA como indicador de inmunidad humoral de mucosas. En las muestras ultra congeladas, se determinaron los niveles de transcritos de las citocinas IFN- γ , IFN- α , TNF- α , TGF- β ,

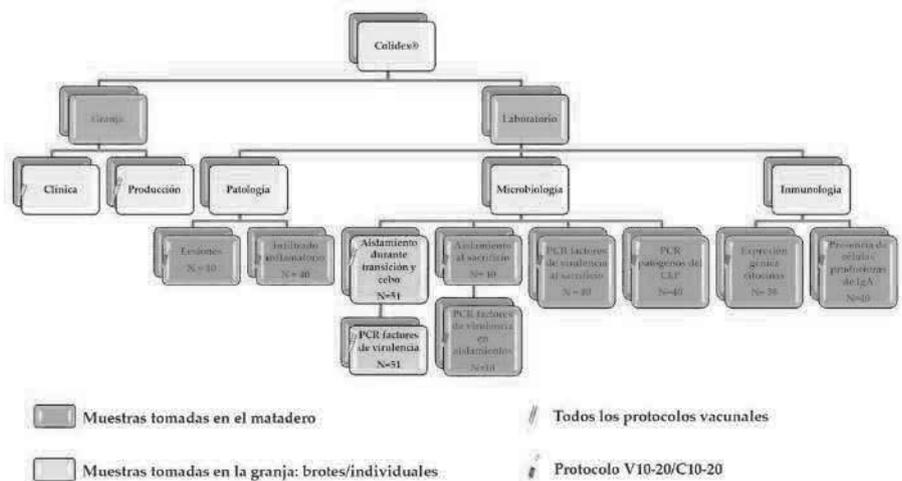


Figura 3. Diseño experimental.

Protocolo	Grupo	Animales	Bajas	Mortalidad (%)	ΔMortalidad (%)	CAUSAS		
						Entéricas %*	Respiratorias %*	Crónicos %*
V10-20	vacunado	1893	29	1,53	-1,87	0	10,34	24,14
C10-20	control	1869	68	3,64		11,76	0	38,24

Tabla 1. Mortalidad total de lechones y mortalidad por causas en los grupos vacunados y control en la fase de transición.

* Porcentaje calculado sobre el total de las bajas.

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

Tabla 2. Resultados productivos en cebo para cada grupo experimental. 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.

IL-10, IL-12p35 y IL12-p40, mediante qPCR, utilizando como control endógeno los genes β -actina, ciclofilina y GAPDH porcinos. La Figura 3 muestra un resumen del diseño experimental.

Rendimientos productivos

Los resultados de parámetros de mortalidad y causas en transición se muestran en la Tabla 1, siendo la mayor diferencia 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%). Esto supone una diferencia en el coste del lechón de 0,5 € en las condiciones de mercado analizadas.

En la fase de cebo (Tabla 2), 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.

Aislamiento de *E. coli* y determinación de factores de virulencia

Respecto al aislamiento y tipificación de *E. coli* durante las fa-

ses de transición/cebo (Figura 2A), 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. Respecto a los aislamientos de *E. coli* al sacrificio (Figura 2B), 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-

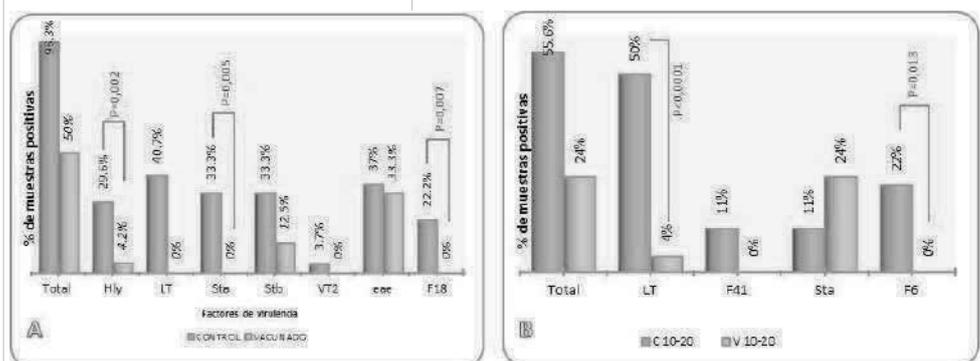


Figura 4. Frecuencia de factores de genes para virulencia encontrados en los aislados de A) brotes de diarrea y B) Animales al sacrificio.

Protocolo	PCR clásica (% positivos)		PCR en tiempo real (% positivos)	
	Ileon	Colon	Ileon	Colon
V10-20	25	5	40	20
C10-20	40	20	100	70
V10-20	--	15		
C10-20	15	70		

Tabla 3. Resultados de los análisis mediante las dos técnicas de PCR

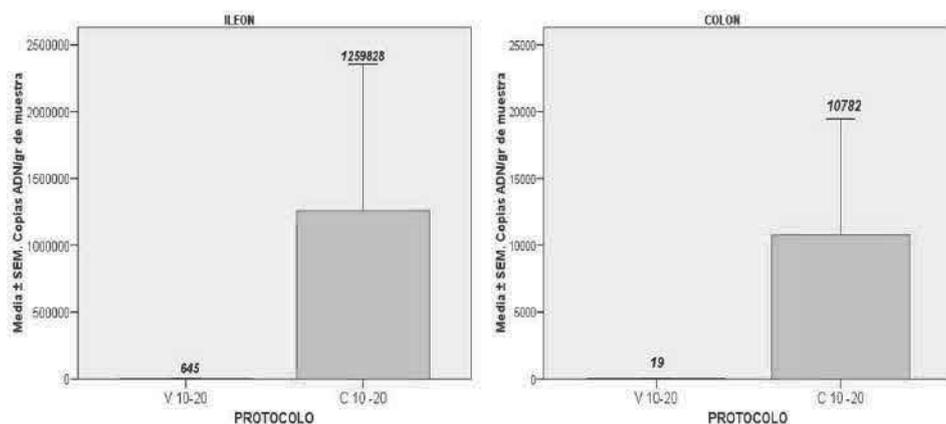


Figura 5. Cuantificación de ADN de *L.intracellularis* por gramo de tejido en Ileón y colon de los animales vacunados y no vacunados.

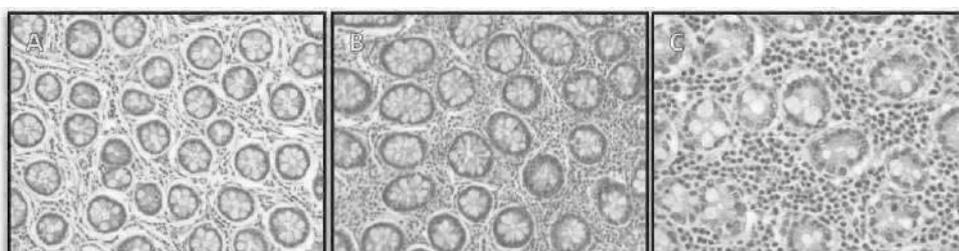


Figura 6. Ejemplos de valoración del infiltrado. A) Escaso, B) Moderado y C) Abundante

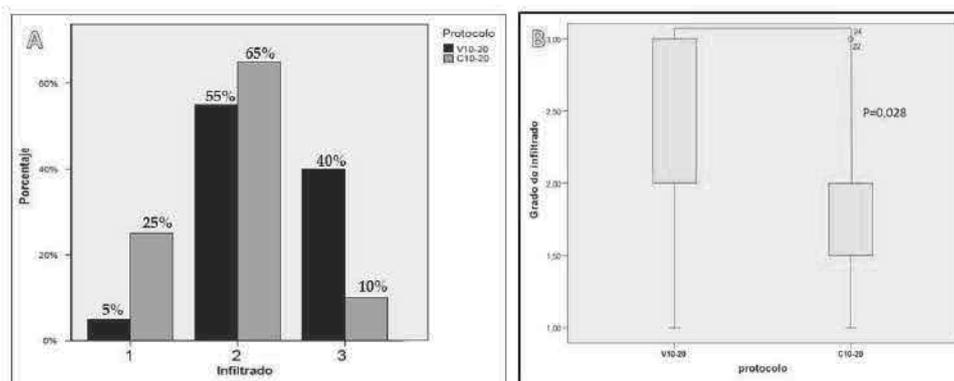


Figura 7. A) Frecuencia de puntuación de lesiones en cada grupo. B) Diagrama de cajas para comparación de medianas entre grupos.

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). (Figura 4)

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).

Determinación de la presencia de otros patógenos del complejo entérico

Las PCR para *Salmonella spp.* y *B. hyodysenteriae* resultaron negativas para todos los animales. Los resultados obtenidos tanto en la PCR clásica como en qPCR para *L. intracellularis* aparecen en la Tabla 3.

Se observaron diferencias en la frecuencia de positivos tanto en la PCR clásica como en la qPCR (p<0,001). Y no solo hubo diferencias en la frecuencia, también en la cuantificación del número de copias de ADN de *L. intracellularis* por gramo de tejidos (Figura 5).

Histopatología, infiltrado celular y células productoras de IgA

Con relación al infiltrado linfoplasmocitario, la figura 6 muestra un ejemplo de cada clasificación. (Figura 6)

En el grupo de animales vacunados, 55% presentaron infiltrado celular moderado; 40% de los lechones presentaron infiltrado celular acentuado y solamente el

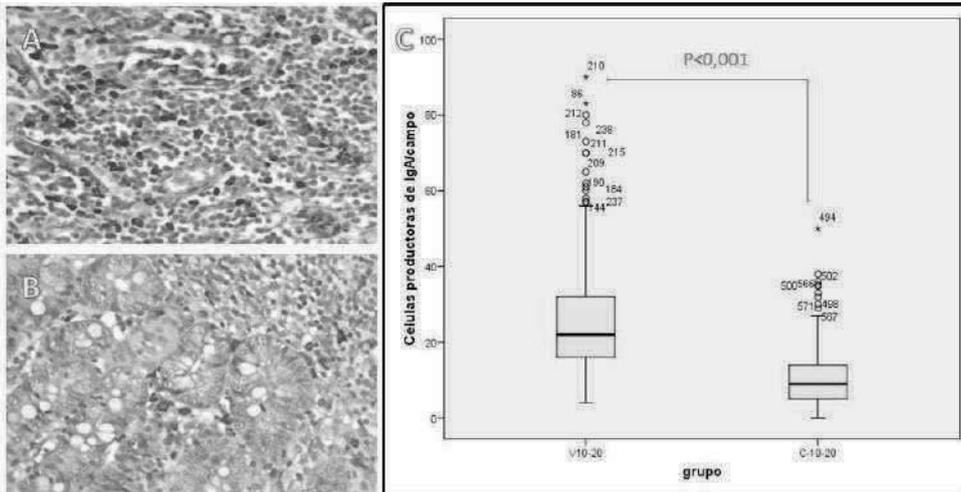


Figura 8. A) Muestras del grupo V10-20 se evidencian numerosas células productoras de IgA; B) Muestra del grupo C10-20 con escasa células productoras de IgA. C) Diagrama de cajas para el análisis de medianas entre grupos.

5% fueron clasificados como infiltrado celular discreto (Figura 4). 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. (Figura 7)

Se registró un mayor número de

células productoras de IgA en los animales vacunados comparado con los controles ($p<0,01$; Figura 4). 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.

Estimulación del sistema inmune: expresión génica de citosinas

Respecto a la expresión de citosinas, la cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión génica de ARNm normalizada frente a los genes de referencia β -actina, ciclofilina y GAPDH, demostró que los intestinos de los lechones vacunados produjeron más $\text{IFN-}\alpha$ ($p<0,001$), $\text{TNF-}\alpha$ ($p=0,005$), $\text{TGF-}\beta$ ($p=0,001$) e IL 12 p35 ($p= 0,009$) que los intestinos de los animales control. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente

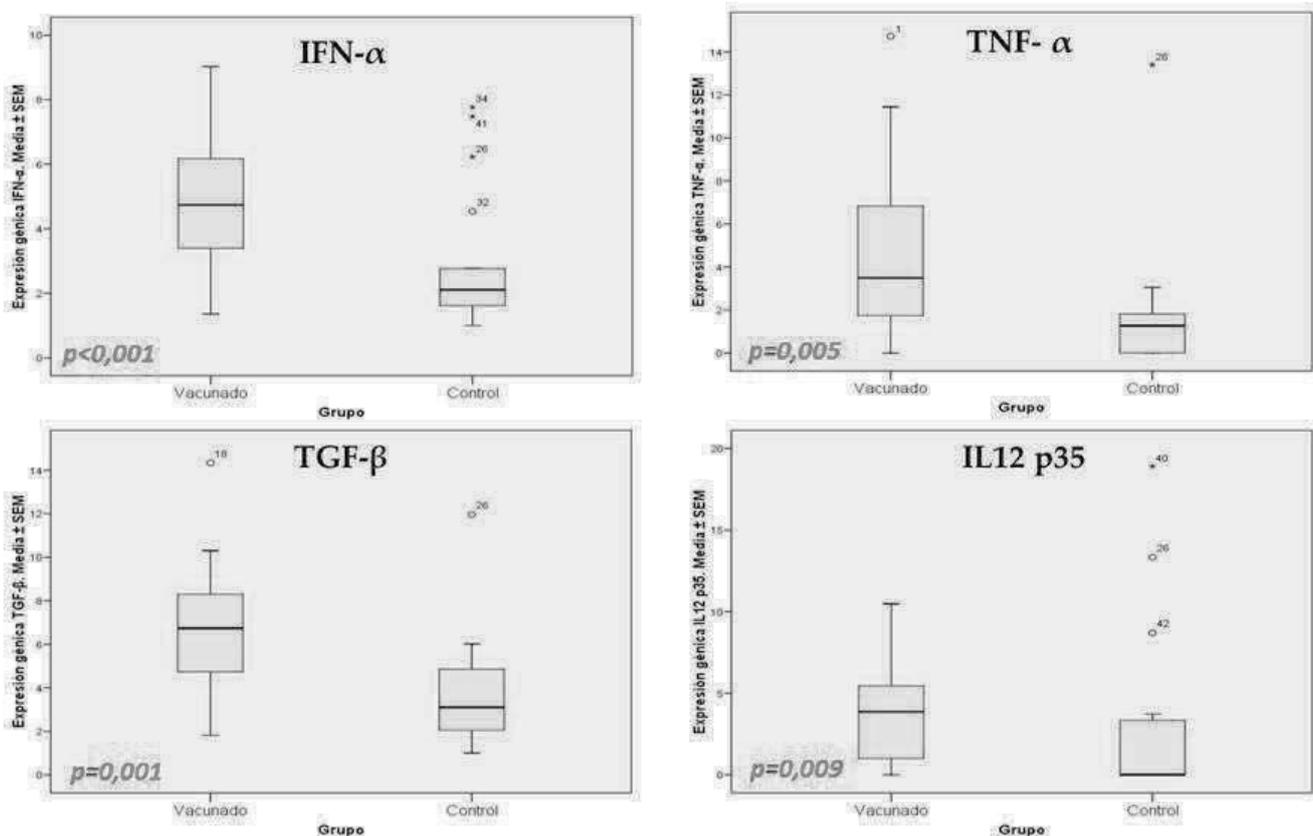


Figura 9. Expresión génica en cada grupo para $\text{IFN-}\alpha$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$ e IL12-p35

