



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Bacterias y parásitos vinculados al Síndrome Diarreico Porcino en Villa Clara

Aguiar-Sotelo, Javier ^a, MSc.; javieras@uclv.edu.cu

^a Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

Resumen

El presente trabajo evalúa algunos de los principales agentes etiológicos presentes, en 90 cerdos pequeños sacrificados con síntomas diarreicos, los que se dividieron en un grupo de cerdos lactantes en las edades comprendidas entre 0 y 25 días de edad y un grupo de cerdos de preceba en las edades comprendidas entre 26 y 50 días de edad, procedentes de 6 cochiqueras de la provincia de Villa Clara. Al total de los cerditos sacrificados les fueron realizados exámenes parasitológicos, (Isospora por métodos clásicos y *Cryptosporidium parvum* por DAS-ELISA, por inmunocromatografía, *Clostridium perfringens* por el método DAS-ELISA con doble anticuerpos, y detectabilidad de las toxinas alfa, beta y épsilon, y *Salmonella* spp por métodos convencionales. La prevalencia de *E. coli* (fimbriales F-4 y F-18) se llevó a cabo por un método Immuno-dot-blot bacteriológico usando anticuerpos monoclonales contra estas fimbrias. A excepción de la *Salmonella* spp todos los demás patógenos entéricos manifestaron elevados porcentajes de prevalencia como por ejemplo *Cr. parvum* (10%), *I. suis* (6,67%), toxina alfa (8,89%), toxina beta (7,78%), toxina épsilon (10%), *Salmonella* entérica serovar Newport (2,22%), *E. coli* f-4 (16,66%) y *E. coli* f-18 (8,89%). Mientras que a través del análisis estadístico se demostraron diferencias específicas entre los patógenos entéricos, entre categorías y entre cochiqueras; y similitudes existentes entre bacterias y parásitos.

Palabras claves: Síndrome diarreico; patógenos entéricos; bacterias; parásitos.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Introducción

Las enfermedades del tracto gastrointestinal que afectan a los cerdos en todas sus etapas, son los mayores factores que limitan la eficiencia y el desarrollo de la producción global porcina. (Thompson *et al.*, 2004), siendo las diarreas un problema que resulta de la interacción entre los agentes infecciosos, la inmunidad del hospedero y los procedimientos de manejo, causando considerables pérdidas económicas en la industria de la producción porcina, especialmente en cerdos lactantes y destetados (Katsuda *et al.*, 2006).

Algunos de los principales factores de riesgo para la aparición de enteritis los son: la edad ya que el 60% de las muertes ocurren en la primera semana de vida, el 10.5% en la segunda y el 1.3% con posterioridad. Las muertes por enteritis ocurren principalmente en los primeros 5 días, debidas a *E. coli* enterotoxigénicas. (Fairbrother *et al.*, 2005.)

En nuestro país, la colibacilosis es una de las primeras causas de mortalidad infecciosa en cerdos neonatos y según datos del IMV, con una pérdida anual de hasta un 10 %, lo cual afecta la economía nacional en más de un millón de pesos (MN) (Wong *et al.*, 1996).

De acuerdo a todo lo anteriormente expresado nos proponemos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Identificar las bacterias y parásitos asociados al síndrome diarreico en cerditos lactantes y postdestetados.

Objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia de estos agentes causales del síndrome diarreico por categorías y por cochiqueras.
- Evaluar las correlaciones existentes entre los patógenos entéricos estudiados.

Materiales y Métodos



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

El trabajo se realizó en los laboratorios de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en el Laboratorio de Proteínas del Instituto de Biotecnología de las Plantas, en la Provincia de Villa Clara, Cuba.

Los muestreos se realizaron entre las fechas del 15 de mayo y el 10 de junio del 2008, distribuidos sus cantidades por las unidades objeto de estudio como aparece en la siguiente tabla.

Muestreos realizados en las diferentes unidades

Unidad	Identificación	Crías (0-25 días)	Preceba (26-50 días)	Total
Salamina II	A	9	6	15
Calabazar	B	6	9	15
Charco hondo	C	7	8	15
Negrilo	D	8	7	15
Remate	E	7	8	15
Cordobanal	F	7	8	15
Total		44	46	90

Investigaciones realizadas:

- Diagnóstico parasitológico (*Isospora suis*) Otros protozoos y nemátodos. Por métodos clásicos: frotis fecal, flotación de Sheather’s, Mc Master Stoll, cultivo de ooquistes en bicromato de potasio.
- *Cryptosporidium parvum* (das-elisa kit (Bio-X Diagnostic))

KIT ELISA BIO K 070 para *Cryptosporidium parvum*

- Microplate cubierta con anticuerpo monoclonal
- Agregar las muestras y el control positivo. Incubar 1 hora a 21⁰C +/- 3⁰C. Lavar
- Agregar conjugado. Incubar 1 hora a 21⁰C +/- 3⁰C. Lavar



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

- Agregar cromógeno más sustrato. Esperar 10 minutos. Agregar solución de stop. Leer a 450 nm.

- Diagnóstico de *E. coli* (fimbrias F-4 y F-18) Immuno-dot-blot bacteriológico usando anticuerpos monoclonales contra esas fimbrias.

Mab Dot Blot Assay Para la Detección de Antígenos Fimbriales F4 y F18.

Obtención de Monoclonales A- F4 Y A- F18 con Hibridomas

Purificación de IgG en sobrenadantes de hibridomas: Cromatografía de Columna de Proteína G.

- Diagnóstico de *Salmonella spp.*

Salmonella spp.: las muestras fueron inoculadas en placas con Agar Verde Brillante (BGA) y en caldo Rappaport-Vassiliadis y después de incubación a 37°C toda la noche, un bucle del caldo fue sembrado en BGA. Todas las colonias rosadas encontradas fueron resembradas en Agar Infusión Cerebro Corazón y se hizo una aglutinación en placa usando antisueros polivalentes (A, B, C1, C2, D, E1, E2, E4 y F) y monovalentes (A, B, C1 y C2) (Instituto Carlos J, Finlay, IMEFA, CUBA). Todos los aislamientos positivos fueron analizados por el test multiplex DNA typing Premi®Test (CODA, Belgium).

- Los resultados de las prevalencias se expresaron en porcentajes.

La prevalencia cuantifica la proporción de individuos de una población que padecen una enfermedad en un momento o período de tiempo determinado. Su cálculo se estima mediante la expresión:

$$P = \frac{\text{No. de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de Población en ese momento}}$$

Análisis estadístico



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Se realizaron comparaciones de tasas, Correlaciones por Rangos de Spearman, pruebas de contraste de hipótesis, comparación de proporciones múltiples y tabulación cruzada (chi-cuadrado). Todo ello a través del paquete STAGRAPHS Plus 5.1 para WINDOWS.

Resultados y Discusión.

Teniendo en consideración que el síndrome diarreico es un fenómeno polietiológico y multifactorial, analizamos los resultados alcanzados en los estudios parasitológicos de las crías que se reflejan en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados obtenidos en los estudios parasitológicos realizados en las diferentes granjas porcinas.

UNIDADES	<i>Isospora suis</i>		<i>C. parvum</i>	
	Crías	Precebas	Crías	Precebas
A	0	0	1	1
B	0	1	1	1
C	1	0	0	0
D	0	0	0	2
E	2	0	1	0
F	1	1	0	2
Total por Categorías	4	2	3	6
Total General	6		9	

Las cifras de casos afectados tanto por la *I. suis* como por el *Cr. parvum*, se consideran elevados, siendo elementos de potenciales riesgos de afectación a las crías en la etapa perinatal, y su influencia en los cuadros enteropáticos, y las perdidas económicas que conllevan. La *I.suis* fue descrita en 1934 por Biester y Murray y en 1970 es que se le reconoce su importancia en neonates, que la adquieren por las heces de la madre o las instalaciones contaminadas, en animales de 7 a 11 días de nacidos, con rara mortalidad y elevada morbilidad. También Morgan *et al.*, (1999), encontraron que el *Cr. parvum*, se puede encontrar



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

en animales de hasta 12 semanas de edad, adquiriéndose por los alimentos o el agua contaminada, provocando diarreas no hemorrágicas moderadas, con atrofia de las vellosidades intestinales.

Los diagnósticos de *Cl. perfringens* principales (toxinas alfa y beta) fueron elevados, siendo la generalidad de los casos de tipo subagudos o crónicos presuntamente, y principalmente en cerditos de menos de 15 días de edad, con predominio de las toxinas alfa y beta. Collins *et al.*, (1989) reportan en Estados Unidos, cerditos de 3 días de nacidos con enterotoxemia por *Cl. perfringens* tipo A, con alta morbilidad (cerca del 100%) y baja mortalidad (menos del 1%), sin tener las características clínicas y patomorfológicas graves planteadas para estos procesos, al estudiar 3 de los cerditos enfermos sacrificados. Sin embargo Niilo, (1987) refiere que el subtipo C, causa severas hemorragias y necrosis (enterotoxemia) en animales muy jóvenes, siendo la producción de la toxina delta, una de sus características principales.

Tabla 2. Resultados diagnósticos del *Cl.perfringens* y sus toxinas.

UNIDADES	A toxinas		A <i>Cl. perfringens</i>	
	Crías	Precebas	Crías	Precebas
A	5	-	7	3
B	3	2	3	4
C	2	1	2	1
D	2	-	5	1
E	1	-	6	3
F	1	-	6	2
Total por Categorías	14	3	29	14
Total General	17		43	

Como se aprecia en la Tabla 2, de las 17 muestras que resultaron positivas a alguna de las toxinas alfa (α), beta (β) o épsilon (ϵ); 14 muestras (82.4%)



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

pertenecían a cerdos clasificados dentro de la categoría “crías”, entre 0-25 días de nacidos, lo que nos confirma lo descrito en la literatura por Songer (1996) y Das (2009), sobre el poder infecciosos de estas toxinas en los cerditos neonatos o en sus primeras semanas de vida. Las muestras restantes (3; 17.6%) donde se diagnosticaron toxinas, pertenecían a la categoría “preceba”. En esta etapa, los cerditos ya han sido destetados pero la presencia de las toxinas en sus heces todavía se considera como un factor de riesgo para contraer la enfermedad y no se descarta la posibilidad de infección (Riopérez y Rodríguez, 2005).

Igualmente sucede para las determinaciones positivas a *C. perfringens*. De un total de 43 muestras positivas a la bacteria, 29 muestras (67.4%) pertenecían a la categoría “crías” (0-25 días), mientras que las restantes 14 muestras (32.6%) pertenecían a la categoría “preceba” (26-50 días), reafirmando la presencia de dicha bacteria, con un mayor por ciento, en las primeras etapas de la vida de los cerditos.

Solo fueron aisladas dos cepas de *Salmonella*, en un cerdos de más de 30 días de edad, en las Unidades A y C, clasificada como *S. entérica serovar*. Newport, del serogrupo C-2, las que según la literatura, circulan en la población porcina, y con altas propiedades de resistencia a los antibióticos convencionales. (Talavera, 2004)

Los resultados alcanzados en los diagnósticos para la *E. coli* (Fimbrias F-4 y F-18) se reflejan a continuación, las cifras de animales reaccionantes en ambos casos, tanto para las fimbrias F-4 como para las F-18, de la *E. coli*, se presentaron aumentados, siendo mayores las F-4, (16,6%), con animales en edades menores de 11 días, principalmente, y solo se presentó un cerdito con ambas fimbrias. Las fimbrias K88 (F4) se encuentran asociadas con la diarrea por colibacilosis en cerditos. Se describen tres tipos antigénicos diferentes: K88ab, K88ac, K88ad, y se ha podido determinar resistencia en algunas líneas y progenies porcinas a *E.*



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

coli F4, y que esta es debida a la ausencia de receptores en las células intestinales, pero también la edad y otros factores relacionados, tienen que ver con la resistencia a la colonización del íleon por la misma, al igual que con la flora indígena gástrica (Geenen, 2004), mientras que las fimbrias F18 se encontraron en el mutante 107/86 de la cepa de *E. coli* 0139:K12 (B):H1 que estaba asociada a la enfermedad edemática de los cerdos en Suiza (Nagy *et al.*, 1999). Al respecto Frydendahl, (2002) y Monserrat (2008) refieren que las cepas enterotoxigénicas de *E. coli* incluyen generalmente las fimbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987), F41 y F18 que actúan sobre la mucosa intestinal, pasando a la sangre para producir septicemia, diarrea aguda y deshidratación, preferentemente en lechones de 4 -15 días de edad de una misma camada, siendo difícil el contagio entre las mismas.

A excepción de la *Salmonella spp* todos los demás patógenos entéricos manifestaron elevados porcentajes de prevalencia; *Cr. parvum* (10%), *I. suis* (6,67%), toxina alfa (8,89%), toxina beta (7,78%), toxina épsilon (10%), *Salmonella entérica* serovar Newport (2,22%), *E. coli* f4 (16,66%) y *E. coli* f18 (8,89%).

Los resultados obtenidos tanto en sus aislamientos individuales como en las asociaciones fueron similares a los nuestros con excepción de que en su estudio no detectaron *Salmonella spp.* y nosotros detectamos 2 casos de *S. entérica* serovar Newport. Esta es la primera vez que se asocia a *Cryptosporidium* y sobre todo, primera vez que se asocia Newport a diarrea en cerdos y no se diagnosticó otra *Salmonella*. Además, obtuvimos un mayor aislamiento de *Cl. perfringens*, pero como se puede apreciar, en todos los casos no se diagnosticaron toxinas. (Tabla 3)

Tabla 3. Asociaciones encontradas entre patógenos entéricos (n=90)

<i>C. parvum</i>+<i>C. perfringens</i> (toxina beta y epsilon)	1	4.44
<i>C. parvum</i>+<i>E. coli</i> F4	2	1.11
<i>C.parvum</i> + <i>S. newport</i>	1	1.11



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

<i>I. suis</i>+<i>C. perfringens</i> (toxina epsilon)	1	2.22
<i>I. suis</i>+<i>C. perfringens</i> (toxina alfa) +<i>E. coli</i> F4	1	2.22
<i>E. coli</i> F4+ <i>E. coli</i> F18	1	1.11
<i>E. coli</i> F4+ <i>E. coli</i> F18+<i>C. perfringens</i>	1	1.11

Las asociaciones de los grupos toxigénicos del *Cl. perfringens* con otros patógenos son de gran importancia ya que este germen anaerobeo precisa de lesiones previas causadas por otros patógenos para instaurarse y poder producir un proceso infeccioso (Riopérez y Rodríguez, 2005; Das 2009).

Tabla 4: Comparación de tasas en cerditos lactantes. (Expresadas en %)

Patógenos	Tasa * 100
<i>Cl. perfringens</i>	71.1 a
Toxina alfa	15.6 c
Toxina beta	13.3 d
Toxina epsilon	13.3 d
<i>E. coli</i> f4	20.0 b
<i>E. coli</i> f18	13.3 d
<i>I. suis</i>	8.9 e
<i>Cr. parvum</i>	6.7 f

Letras desiguales indican diferencias significativas (p<0,05)

La tabla anterior (Tabla 4) expresa que existen diferencias significativas en los agentes patógenos en cerdos lactantes estudiados en cuanto al porcentaje de prevalencia. En los cuales se analizan las tasas por cien para cada uno de los gérmenes. Donde hay una marcada diferencia entre los causales bacterianos con mayor predominio y en menor grado los parásitos.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

En el caso de los cerditos destetados (Tabla 5) se manifiestan también diferencias significativas pero con valores menores con respecto a los lactantes y se aprecia un incremento de la tasa de *Cryptosporidium parvum*.

Tabla 5. Comparación de Tasas de Poisson en cerditos destetados (expresadas en %)

Patógenos	Tasa * 100
<i>C. perfringens</i>	26.7 a
toxina alfa	2.2 f
toxina beta	2.2 f
toxina épsilon	6.7 d
<i>E. coli</i> f14	11.1 c
<i>E. coli</i> f18	6.7 d
<i>I. suis</i>	4.4 e
<i>Cr. parvum</i>	13.3 b

Letras desiguales indican diferencias significativas (p<0,05)

La tabla anterior (tabla 5) muestra una comparación entre categorías donde existen diferencias significativas para todos los patógenos entéricos por categorías, exceptuando la toxina alfa que tuvo igual comportamiento para ambas categorías.

Se evidencia que existen diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de los patógenos entéricos por categorías (p<0,05), a excepción de la *E. coli* f18 en la cochiguera D, la toxina alfa en la cochiguera C y *I. suis* en la cochiguera F, que no mostraron diferencias significativas entre categorías.

Conclusiones



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la bibliografía consultada, podemos arribar a las siguientes conclusiones:

1. A excepción de la *Salmonella spp* todos los demás patógenos entéricos manifestaron elevados porcentajes de prevalencia.
2. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre los patógenos entéricos por categoría y por cochiquera y que existen correlaciones significativas entre bacterias y parásitos, lo que verifica altos niveles de asociación.

Referencias Bibliográficas

- Collins JE, Martin E, Bergeland Diane, Ducommun A, Francis D, Yeske P. 1989. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type an enterotoxin in neonatal pig. J. Vet. Diagn. Invest. 1:351-53.
- Das, A.; Mazumder, Y.; Dutta, B. K.; Kumar, A. and Selvi, S. Diagnosis of acute diarrhea in pigs and piglets in Meghalaya, India. Malaysian Journal of Microbiol. Vol. 5. No. 1. 2009.
- Fairbrother, J. M.; Nadeau, E.; Gyles, C.L. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on the bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim. Health Res. Rev. 6:17–39
- Geenen, P.L. 2004. Estimating transmission parameters of F4+ *E. coli* for F4 receptor positive and negative piglets: one-to-one transmission experiment. Epidemiology and Infection 2004; 132: 1039–1048
- Katsuda, K.; Kohmoto, M.; Kawashima, K. & Tsunemitsu, H. 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. J Vet Diagn Invest 18:350–354



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

- Morgan, U. M., J. R. Buddle, A. Armson, A. Elliot, and R. C. Thompson. 1999. Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium* in pigs. *Aust. Vet. J.* 77:44-47.
- Niilo, L 1987 Toxigenic Characteristic of *Clostridium perfringens* Type C in Enterotoxemia in Domestic Animals. *Can.J. Vet. Res.*51:224-228.
- Riopérez, J. y Rodríguez M. L. Nutrición y patología digestiva del lechón y del cerdo en crecimiento-cebo. Fuente: www.cuencarural.com. 2005.
- Songer, J. G. and Uzal, F. A. Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 528-536. 2005.
- Songer, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals: a review. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 9. No. 2: p. 216–234. 1996.
- Straw, Barbara; Zimmerman, JJ; Allaire Sylvie, D. & Taylor, DJ. 2006. *Disease of Swine*. 9th ed. Blackwell Publishing. pp: 993-1010.
- Talavera, R.M. (2004) Análisis epidemiológico molecular de *Salmonella spp.* y su relación con la Resistencia antibiotic en credos de abasto en rastros del Valle de Toluca, Mexico. Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima. Mexico.
- Thomson JR, Edwards SA, Strachan WD, King T, Hazzeldine M. 2004. Effects of dietary raw materials and processing on non-specific colitis in pig in proc. 18th Int. Pig Vet. Soc. Cong. Vol 2. p: 885
- Wong, Idania; Bover, E.; Ramos, M.; Gonzalez, N.; Exposito, M.; Segura Rutdalys; Salazar, E.; Agraz, A.; Jiménez Idalmis; Herrera, L. & de la Fuente J. 1996. Eficacia en condiciones de campo de una vacuna recombinante contra la colibacilosis porcina. *Biotecnología Aplicada*, 13:16-19.