vêtia®

¿INFLUYE EL CONTROL DE *ESCHERICHIA COLI* EN OTROS **PATÓGENOS** DEL COMPLEJO ENTÉRICO?

AUTORES

G. Ramis[1,2], L. Mendonça[2,3], F.J. Pallarés[4], J.J. Quereda[5], J.M. Abellaneda[2], A. Muñoz[1]

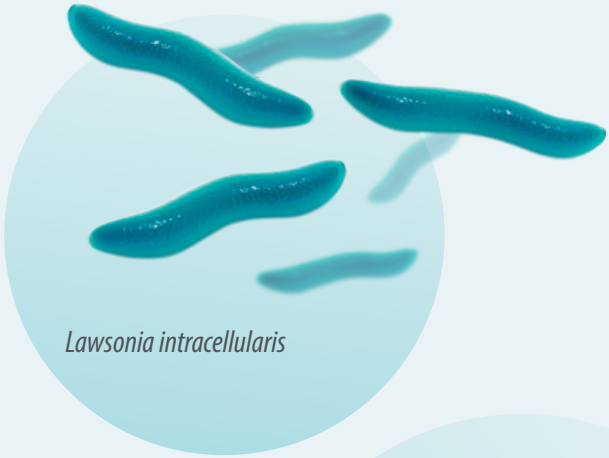
[1]Departamento Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia

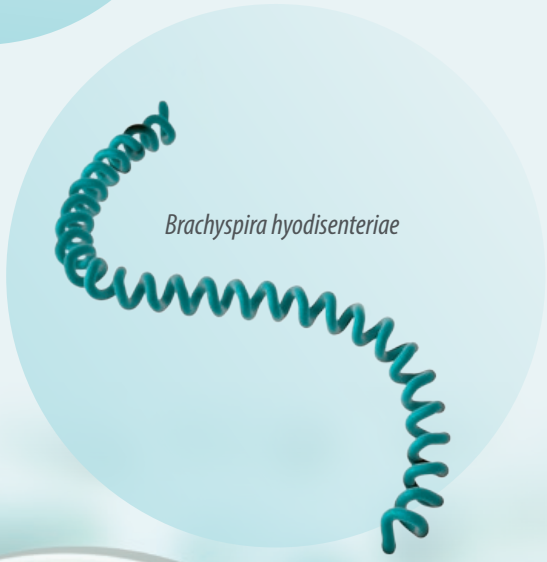
[2] Grupo Investigación Cría y Salud Animal, E58-005, Universidad de Murcia

[3] Escola de Veterinaría, Universidad Federal de Goiás, Goiania, Brasil

[4] Departamento Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia

[5] Grupo Fisiopatología de la Reproducción. Departamento Producción y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia





Hace décadas que hablamos de complejos, tanto entérico como respiratorio, como una **asociación entre patógenos que interaccionan entre sí y se potencian unos a otros**. O al menos actúan de forma simultánea aprovechando la debilidad propiciada por alguno de ellos.

Centrándonos en el **complejo entérico**, vemos interacciones entre virus (rotavirus, coronavirus de gastroenteritis transmisible porcina o diarrea vírica epidémica), bacterias (*E. coli, Lawsonia intracellularis, Clostridium sp., Brachyspira hyodisenteriae, Salmonella sp., etc.*) y diversos parásitos.

Hay interacciones evidentes como entre rotavirus y *E.coli*, pero hay otras que no están tan bien estudiadas. Y una de las hipótesis que siempre se han barajado es que **cuantos más de estos patógenos tengamos controlados, más difícil lo tendrán los otros para ejercer su acción patogénica.**

En este trabajo se estudió la presencia de patógenos relacionados con el complejo entérico, como *Salmonella enterica, Brachyspira hyodisenteriae* y *Lawsonia intracellularis,* como tres de los más importantes de este complejo, en animales vacunados y no vacunados frente a *E. coli* y toxoide β de *Clostridium perfringens* tipo C con **Colidex-C** (Vetia, España).

Animales y muestras

Animales

Se utilizaron un total de **3.762 cerdos de cruzamiento comercial Duroc x** *(Landrace x Large White)*.

- Se **vacunaron** a los **10 y 20 días de edad** 1.893
- Se dejaron **animales control** 1.869

Se criaron en ciclo cerrado, en naves adyacentes. 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.

Muestras

Se decidió muestrear los animales al sacrificio, puesto que la intención era **estudiar la influencia de la vacunación a muy largo plazo** (al final de la vida productiva de los animales).

- En el matadero, **se tomaron muestras de íleon y colon**, procurando no contaminar la muestra con suciedad ambiental o con restos de otros intestinos.
- Una vez tomadas las muestras con bisturí estéril se metieron en un contenedor estéril de plástico.
- **Se tomaron 25 muestras de cada uno de los grupos experimentales**.
- En el laboratorio se lavaron cuidadosamente las muestras y se procedió a aislar el ADN contenido en el tejido, preservándose a -80ºC hasta el momento de su análisis.
- Se testó la presencia de los tres patógenos mediante **PCR clásica** *Suh y Song (2005)*, que es una PCR múltiplex en la que se amplifican simultáneamente los tres patógenos.
- Para la **PCR en tiempo real cuantitativa**, se utilizaron * primers previamente diseñado para *L. intracellularis (Lindecrona et al., 2002), B. hyodisenteriae (Akase et al., 2009)* y *Salmonella sp. (Fenaux et al., 2004)* y se llevó a cabo utilizando química Sybr-green.
- Para la cuantificación se construyó una **curva estándar mediante un plásmido para cada uno de los tres patógenos.**
- Las **frecuencias** se analizaron utilizando un **test de chi cuadrado** y las diferencias entre grupos mediante **U de Mann-Whitney**.

**Fragmento corto de ADN de cadena simple con afinidad por secuencia de ADN que se desea amplificar y que sirve para iniciar el proceso de amplificación.*

Resultados

Ninguna de las muestras fue positiva para *B. hyodisenteriae* y *Salmonella*, por ninguna de las dos técnicas.

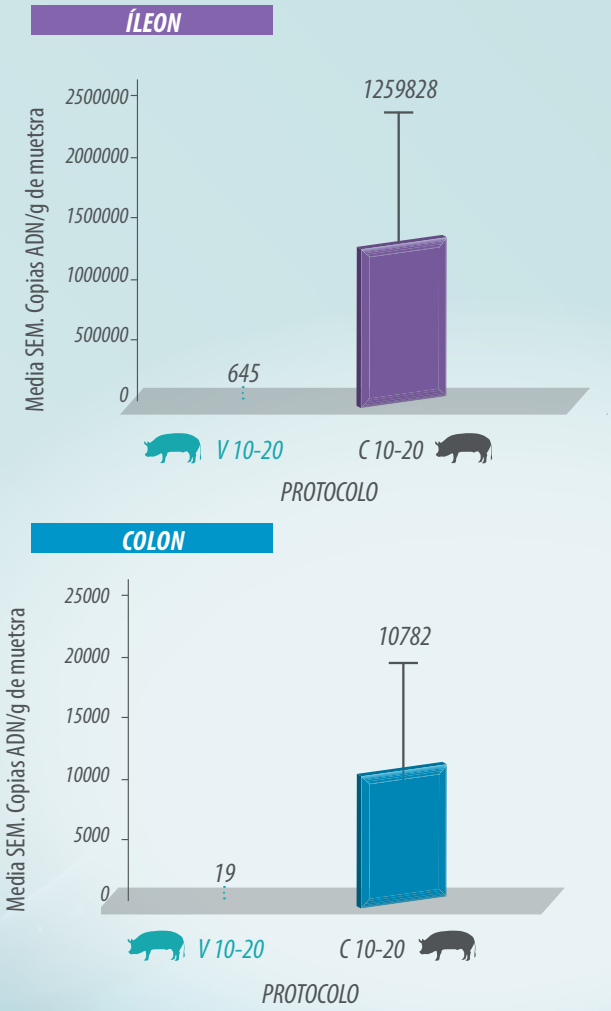
Respecto a ***L. intracellularis***, los resultados para las PCR en ambas técnicas aparecen en la ***Tabla 1***:

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

***Tabla 1**. Resultados de los análisis mediante las dos técnicas de PCR.*

- **Hubo menor frecuencia de positivos de los esperados en el grupo vacunado** ($p<0,001$) **en ambas técnicas y en los dos tejidos**. Se observa cómo las frecuencias son distintas en las dos PCR debido a que la PCR en tiempo real tiene mayor sensibilidad.
- Otra diferencia significativa fue **el número de muestras que fueron positivas simultáneamente en ambos tejidos.** Mediante la PCR clásica ninguna de las muestras del grupo vacunado fue positiva simultáneamente, mientras que un 15% lo fue en el grupo control ($p=0,03$). Al usar la q-PCR se sigue la misma proporción; un 15% el grupo vacunado y un 70% el grupo control ($p=0,001$).

Figura 1. *Media de la cantidad de copias de ADN por gramo de tejido en íleon y colon*



Las copias de ADN por gramo de tejido aparecen en la ***Figura 1***.

- En los dos tejidos hay una gran diferencia en la **cuantificación de *L. intracellularis***, siendo significativa en el íleon (p=0,004), mientras que no lo es en colon dada la baja cuantificación en el grupo vacunal.
- Es remarcable la diferencia en la dimensión de las cuantificaciones:

  Íleon — En las muestras de **íleon** del grupo control hay una media de más de un 1.200.000 copias frente a algo más de 600 copias en el grupo vacunado.

  Colon — En el **colon,** el grupo control obtuvo cuantificación de más de diez mil copias frente a menos de 20 en el grupo vacunado.

CONCLUSIONES

Al comparar la presencia de *L. intracellularis* en un grupo vacunado frente a *E. coli* (**Colidex-C**) frente a su grupo control no vacunado, se encontraron **diferencias muy marcadas**, tanto en el **porcentaje de muestras positivas** en los dos tejidos estudiados, como en la **cantidad de bacteria presente** en las muestras.

Los animales no vacunados tenían entre tres y cuatro exponenciales más cantidad de *L. intracellularis* que los animales vacunados.

Estos hallazgos nos sugieren que **el control de *E. coli* ayuda de forma colateral al control de *L. intracellularis***.

Otra cuestión es el mecanismo por el cual la vacunación ayuda al control de *Lawsonia*. Algo que se ha comprobado es que **en los animales vacunados el nivel de estimulación inmune era mayor que en los animales control** (datos no mostrados), **tanto a nivel humoral como a nivel celular,** demostrado mediante histología (presencia de células inmunes), presencia de células productoras de IgA y expresión génica para citoquinas. **Este nivel de estimulación puede contribuir al control de otros patógenos del complejo entérico presentes en los animales.**

Vetia Animal Health, S.A.U.
C/ Teide, nº 4 – 3ª planta, Oficina 3-2
28703 San Sebastian de los Reyes
Madrid

vetia.es